

編號：CCMP96-RD-025

# 中草藥抗發炎藥效評估篩檢平台之開發 ——樟芝之抗發炎作用

李金木

中台科技大學

## 摘 要

抗發炎及調節免疫功能長久以來一直為許多中草藥的重要藥理作用，既能抗發炎又能增強免疫力為開發中藥複方重要的特色。樟芝是否具有提高人體免疫力的效果，有無可能開發為具免疫調節功效的保健食品，近年來成為生技產業界關切的重點。為求探討樟芝免疫療效與功能，我們曾應用 RT-PCR 方法配合活體動物模式對樟芝進行評估分析。從免疫細胞基因表現之分子層次觀察到樟芝能增強體內 Th1 細胞激素(IFN- $\gamma$ , IL-2)以及巨噬細胞分泌之細胞激素 TNF- $\alpha$  等之表現；而應用本實驗室獨特設計的活體動物實驗模式說明了經樟芝增強的免疫功能能在生物體內發揮其療效。

然樟芝是否同時具有抗發炎及增強免疫力之功能，目前並不清楚，主要尚未建立標準及有效的評估中草藥抗發炎之研究篩檢平台。本研究計畫擬分析免疫細胞基因表現來探討樟芝調節抗發炎因子的作用，建立能快速篩檢抗發炎中草藥的細胞分子與動物評估模式。利用腹腔注射 LPS 誘發發炎反應引發之急性發炎之模式，對小鼠 Leukocytes 之 mTREM-1 及發炎相關 cytokine 基因之表現進行比較分析。本研究亦將偵測專一性的 mTREM-1 蛋白表現指標做為發炎診斷標準，並偵測與發炎相關的細胞激素，如 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-12 等，加以評估其對免疫細胞間的調控關係，以求精確的詮釋樟芝之消炎療效及功能。

本研究結果顯示小鼠餵食樟芝達四週時 Trem-1<sup>HI</sup> 的表現開始下降，至六週時降到最低。說明以 Trem-1 表現作為檢測標的，樟芝的確具有抗發炎的效果；配合發炎相關的細胞激素表現，小鼠服用樟芝，能有效的抑制 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12 的表現。除此而外，樟芝亦能有效顯著提升免疫細胞表面專一性標幟蛋白表現，顯示樟芝具有有效增強免疫細胞的成熟、活化與分化的功能。從實驗結果來看，不論是樟芝菌絲多醣體或是樟芝濾液多醣體(但以樟芝菌絲體效果較佳)，服用的時間越久，藥效持續的時間也越長，符合開發樟芝成為保健食品的條件。本計畫冀圖建立客觀、可信的中藥免疫藥效之評估篩檢平台，有助於未來傳統中草藥在臨床醫療應用之研發。

關鍵詞：抗發炎作用、樟芝、Trem-1 基因、評估篩檢平台

# Development of Evaluation Model for Chinese Herbs against Inflammatory Responses and Anti-inflammatory Effects of *Antrodia Camphorata*

Kin-Mu Lee

Central Taiwan University of Science and Technology

## ABSTRACT

It is well known that *Antrodia camphorata* have many pharmacological effects such as antidote, anticnesmatic and anti-tumor activities. Studies have shown that it does have antioxidation activity and can inhibit the growth of B hepatitis virus via *in vitro* experiment. Whether *A. camphorata* can enhance the host immune response that leads to the promoting longevity and maintaining the health remain unknown. However, the anti-tumor effect of the polysaccharide of *A. camphorata* was shown to be mediated by potentiating or enhancing immune response. We have previously demonstrated that mice fed orally with *A. camphorata* responded with enhanced production of a panel of cytokines (IFN- $\gamma$ 、IL-2 and TNF- $\alpha$ ) that translated into reduced rate of worm count upon experimental schistosome infection.

The main focus of this project is to develop the evaluation model for Chinese herbs against inflammatory reponses and to investigate the efficacy of *A. camphorata* on the anti-inflammatory effects induced and probable mechanisms of action. The Trem-1 gene and its protein expression will probably provide the most unique markers to investigate the inflammatory responses. To have an in depth understanding of the molecular basis and efficacy of *A. camphorata*, the detection of gene expression of leukocytes after herb treatment will be performed. In addition, the experiments of RT-PCR and method combined with the *in vivo* animal model will also be done.

The results showed that the expression profile of the Trem-1 protein started to decrease at 4th week and reached the lowest level at 6th week when mice administered with *A. camphorata* for 6 weeks; this result indicates the anti-inflammatory effect of *A. camphorata*. The TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12 mRNA cytokine expression, also, decreased obviously after feeding with *A. camphorata* for 6 weeks and treating by LPS. Based on these results, *A. camphorata* has effects on both immunomodulatory and

anti-inflammation. These markers would serve as candidate targets of drug action, through which the immunology of host response can be further investigated. Once established, this model system can be further tested against a whole range of other potential drugs including other active substances from other mushrooms and fungi.

Keywords: anti-inflammatory effects, *Antrodia camphorata*, Trem-1 gene, evaluation model

## 壹、前言

抗發炎及調節免疫功能長久以來一直為許多中草藥的重要藥理作用，既能抗發炎又能增強免疫力為開發中藥複方重要的特色。本實驗室之前之研究報告證明樟芝確實有調節免疫細胞活性的功能，然樟芝是否同時具有抗發炎及增強免疫力之功能，值得深入探討。本研究冀圖在開發一標準及有效的評估中草藥抗發炎之評估模式。本計畫擬分析免疫細胞基因表現來探討樟芝調節抗發炎因子的作用，期盼建立能快速篩檢抗發炎中草藥的細胞分子與動物研究篩檢平台。

樟芝(*Antrodia camphorata*)又稱牛樟菇或牛樟芝，生長於台灣山區特有牛樟樹(*Cinnamomum Kanehirae Hay*)上，為多孔科無褶菌目之新種擔子菌。樟芝一般生長在幽暗、潮濕且溫度稍低的中海拔地區，由於牛樟樹在本島之分佈不多，加上此樹種材質細緻、不易腐敗，為藝品及傢俱的上等材料，導致盜伐情形嚴重，造成樟芝之來源稀少且有限。相傳樟芝具神奇療效，為民間流傳之良好民俗偏方，甚至被渲染為上藥中之上藥。坊間相傳樟芝有解毒、抗癌、解酒及消炎等功效 ( Wu et al., 1997; 廖 1998; Liu et al., 2004)。研究顯示樟芝具有良好的抗氧化性(Song and Yen, 2002)，亦可於體外試驗中抑制 B 型肝炎病毒生長(Lee et al., 2002)。

在之前已完成的研究報告中顯示樟芝的確具有調節免疫細胞活性的功能，而抗發炎及調節免疫功能長久以來一直為許多中草藥的重要藥理作用，既能抗發炎又能增強免疫力為開發中藥複方重要的特色。發炎為組織或器官層次的生理現象，較不適合以體外培養(Cells cultured *in vitro*)來作「模型」實驗，最好以動物活體(*in vivo*)系統進行實驗。且一般抗發炎的活性評估多利用 cytokines 的基因調控機制，重點性的探討發炎作用之調節。發炎作用的分子生物學一方面似乎有幾千甚至上萬的文獻發表，另一方面，一旦觸及到主要的關鍵性問題，卻又往往說不清如何應用到醫學或生物技術學上，例如缺乏一個或一類具代表性的分子或細胞型態或標的。根據我們的瞭解，坊間迄今篩檢符合此特色中草藥的細胞分子與動物評估模式，都不免面臨相同的問題。如何能建立一快速、具標準化的評估相關中草藥對於此關鍵指標的相對強度變化，提出一客觀可信的研究方法，不但可加速中草藥指標成分之鑑定，未來並可進一步提供臨床上應用之可行性。

最近的研究曾指出，樟芝的培養菌絲體萃取物能藉由抑制人類白血球的 reactive oxygen species (ROS)生成，達到抗發炎的效果，其子實體萃取物能抑制嗜中性細胞的 ROS 製造，並降低其附著能力，因此亦具有抗發炎的



功效(Shen et al., 2004a; 2004b)。此初步結果顯示樟芝可能可做為一抗發炎的候選藥物，然至今並未建立合適的篩檢抗發炎與增強免疫力之細胞分子與動物評估研究平台。本研究計畫的目的即為達成上述目標而設計。

細菌感染初期中性球(neutrophil)與單核球(monocyte)/巨噬細胞(macrophage)是天然免疫的第一道防線(Nathah and Ding, 2001; Diefenbach and Raulat, 2003)，這些細胞通常因受感染原的刺激而釋放出一些具有促進發炎的因子(proinflammatory factors)，此因子可以促使感染原被免疫細胞消滅清除，並加強受損組織之修復。細菌感染引起的過度發炎反應可導致組織傷害以及敗血性休克等。最近的研究結果顯示由微生物病原產生之發炎反應可經由表現在骨髓細胞上之一種激發受體 TREM-1 促進增強。TREM (Triggering Receptors Expressed on Myeloid cell)是一類當骨髓細胞受到刺激之後會表現的活化受體，位於膜上之 glycoprotein，屬於 V-type 的 Ig family。TREM-1 為一種活化受體，在微生物感染浸潤組織中的中性球及單核球中會呈現高度的表現。在細菌性敗血症病人及經 LPS 所誘發休克現象之小鼠腹腔中的中性球皆可發現 TREM-1 有 upregulation 之現象。研究結果亦顯示將 TREM-1 阻斷後，發現可保護小鼠抵抗由 LPS 所誘發之敗血性休克，以及大腸桿菌或盲腸穿刺縫合所引起之細菌性敗血症產生(Bouchon et al., 2001)。此研究結果說明 TREM-1 對細菌所引起之急性發炎反應所扮演之重要功能，並且可能成為治療敗血性休克之標的。TREM-1 之活化可使 proinflammatory factors 大量表現，但目前還尚未找到其正確之 Ligand，TREM-1 可經由許多物質之刺激表現，如 G(+)、G(-)細菌或其表面的一些細胞壁成分 (LPS、LTA 等)，此外部份黴菌也可以刺激其表現。因此，我們利用此與發炎密切相關的特殊細胞蛋白標記 TREM-1 作為一主要的發炎篩檢指標標的，配合與發炎反應相關的細胞激素基因的表現檢測，將能建立一具有代表性與實際應用的發炎診斷標準與篩檢評估平台。

之前的研究大多著重於細菌性急性發炎所引起 TREM-1 之表現及促發炎因子的調節。最近有研究指出，mTREM-1 不僅僅在急性發炎時會大量表現，在細菌所引起的一些慢性肝炎之中也會有大量表現之情況(Nochi et al., 2003)。根據之前的研究指出，在細菌感染之急性發炎(Colonna and Facchetti, 2003)及慢性發炎的情況之下 TREM-1 都會有大量表現之情形，但細菌感染作用期間通常較為短暫，且多為單一發炎反應；而在許多寄生蟲感染的例子中，宿主會有較為複雜的發炎症狀，常出現同時具有急性及慢性發炎的症狀。例如曼氏血吸蟲感染時，初期具有類似細菌感染之急性發炎的症狀，但到了後期會因蟲卵出現，於血液及各組織間會造成慢性發炎，這些複雜

的情況與 TREM-1 表現可能就會有不同的交互作用。例如在慢性感染時其肝臟組織因蟲卵堆積，大量免疫細胞聚集而產生肉芽腫(granuloma)的形成，其肉芽腫的局部周圍會大量發炎反應發生，此時 TREM-1 表現與不同類型發炎反應之間的調節關係即值得探討。

為評估本研究計畫設計之可行性與實用性，在本計畫完整提出前，本實驗室已先進行小型計畫之初步研究。我們利用曼氏血吸蟲感染小鼠，冀圖瞭解寄生蟲感染症所引起的發炎反應與 mTrem-1 基因表現之關聯性與其中的調控關係。研究中發現，曼氏血吸蟲感染小鼠時所造成的發炎反應確實會引起 mTrem-1 大量活化表現，且與血吸蟲所引起發炎反應的強度有正向的相關性。由 RT-PCR 實驗結果顯示，脾臟細胞 mTrem-1 之 mRNA 表現於第 1 週即快速大量上升，mTrem-1 的活化使得 TNF- $\alpha$  被大量誘導生成；在 3、5 週時 mTrem-1 的表現會呈現下降趨勢；7~9 週之間由於蟲卵之大量產生，因此 mTrem-1 mRNA 在 7、9 週時會再度上升，TNF- $\alpha$  在第 9 週的表現也隨之上升。另外，在 IFN- $\gamma$  表現上由於受到 mTrem-1 調控，IFN- $\gamma$  亦大量表現，且隨著感染時間增加而逐漸上升並在第 5 週時達到最高峰(林, 2005)。以上初步結果為第一個利用寄生蟲模式發現 TREM-1 基因與寄生蟲感染發炎反應之調控關係。此一研究發現及其實驗模式，可做為我們進一步探討樟芝在增強免疫力之功能外，是否亦同時具有抗發炎之藥理作用。

在我們剛執行完成的 94 年度教育部產學合作計畫研究(樟芝免疫調節療效之研究—對樹突狀細胞及巨噬細胞之調控作用)中，我們發現 DC 上 CD86 的表現於餵食樟芝 4 週後開始下降，在其他 APC (Macrophage、B cell) 上亦有相同的現象，我們推測此與其他協同刺激分子：DC 上之 CD80 / CD86、ICOSL 及 T 細胞上 CD28、CTLA-4、ICOS 之間的交互作用有關(Sharpe Freeman, 2002)。最初是由活化後 DC 上的 CD80/CD86 與 T 細胞上的 CD28 結合促使 T 細胞的活化並釋放 IL-2，而 T 細胞上的 CTLA-4 也隨之被 induce 生成，與 CD80/CD86 結合，抑制平衡 CD28 的反應，避免自體免疫的產生。因此 APC 上 CD86 的表現下降，其主要原因可能是 CTLA-4 參與調控平衡而抑制之。這其中涉及各種免疫分子間深層微妙的訊息傳導作用機轉，值得繼續探討。從以上的文獻報告與研究得知，CD28 主要的功能是擔任誘導初期免疫反應，而 ICOS 則是負責維持 T 細胞的免疫反應，更進一步的，可以加強 Th 細胞的分化。因此，ICOS 很有可能未來作為篩選中草藥時一個更好的指標，更甚者，將 CD86 與 ICOS 表現的消長，作為藥效短期與長期作用轉換的分界點，更進一步的闡明其功效。經由以上的實驗設計，必能對中草藥藥效的評估有更深一層的了解。

本研究計畫擬分兩大實驗策略執行，首先我們將分析免疫細胞基因表現來探討樟芝有無調節抗發炎因子的作用，利用 LPS 誘發小鼠之急性發炎，對小鼠 Leukocytes 之 mTREM-1 及發炎相關 cytokine 基因之表現進行分析比較；抑制發炎的實驗設計上，以樟芝做為一抗發炎的候選標的，偵測專一性的蛋白表現指標做為發炎診斷標準，並偵測相關與發炎相關的細胞激素，如 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-12 等；另外將利用 Flow cytometry 分析免疫細胞表面的 marker，如 Trem-1、CD40、CD86、ICOS 等，加以評估其對免疫細胞間的調控關係，以求精確的詮釋樟芝之消炎療效及功能。

本研究擬應用合適的活體動物實驗模式來瞭解樟芝能否在生物體內發揮其抗發炎之療效，期望能建立一客觀、可信的中藥免疫藥效之活體動物篩選平台。本研究計畫的完成能配合已有的實驗資料完成系列性的研究成果，瞭解樟芝等機能性食品提昇免疫功能之調控機轉及影響。其對抗發炎作用的深入了解，有助於未來傳統中草藥在臨床醫療應用之研發。

## 貳、材料與方法

### 一、樟芝之製備

樟芝菌絲體發酵凍乾品擬經由葡萄王企業股份有限公司製備提供，分有樟芝菌絲多醣體以及樟芝濾液多醣體兩種。菌絲體之工業化量產以 Glucose (2.0%)、Yeast extract(0.5%)、Peptone(0.5%)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.3%)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3%)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.3%)、Citric acid (0.05%)，pH 4.5 為培養基。接入菌種量為 1%，調節轉數至 90 rpm，通氣量為 0.5 vvm，溫度控制於 28°C 恆溫，在 50 噸不鏽鋼槽體進行 35 噸液態培養，8 天後可得到紅色菌絲，經離心 3000rpm，10 分鐘後分別獲得上清液與發酵液菌絲。上清液加入 4 倍體積的 95% 酒精於 4°C 下培養約三天後，再離心 16000rpm，10 分鐘，得到溶於濾液之多醣體。發酵液菌絲經水洗兩次(去除殘留發酵液)並加水至原體積，於 100°C 下煮沸 1 小時後冷卻，離心 3000rpm，10 分鐘後取出液體並去除菌絲，加入 4 倍體積的 95% 酒精於 4°C 下培養約三天後，再離心 16000rpm，10 分鐘，得到附於細胞壁上之多醣體。將此二種多醣體進行冷凍乾燥後，可符合實驗之要求。

### 二、樟芝抗發炎藥效之細胞分子診斷

使用小鼠 (BALB/c) 作實驗，分兩大組實驗組與兩組對照組。將 6-8 週齡之 mice 分成 18 組，每組 5 隻小鼠。其中 9 組小鼠分別連續給予口服樟芝達二週、四週或六週，每日每隻口服劑量為餵食溶於 0.2ml 生理食鹽水(加熱至 45°C)的 2.5mg 樟芝菌絲多醣體。每組小鼠在服完藥後 (24、72、120 小時) 給予腹腔注射 LPS (0.18mg/mice)，16 至 18 小時之後犧牲取其脾臟細胞進行 Macrophage 細胞表面標記與發炎指標性 Marker (TREM-1) 測定。並分析發炎指標性 Marker (TREM-1) 與  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{iNOS}$  等相關細胞激素之表現。另 9 組小鼠則以樟芝濾液多醣體取代樟芝菌絲多醣體，每日餵食小鼠同劑量之樟芝多醣體，並於同樣 9 個時間點將小鼠犧牲進行相同實驗。藉以比較並了解兩種不同之樟芝多醣體對增進宿主體內細胞表現之劑量依存關係。對照組(5 隻 6-8 週小鼠)則餵食二次水取代樟芝多醣體。未服用藥材之小鼠則餵食二次水後亦同時注射相同劑量的 LPS 作為 positive-control，未注射 LPS 者為 negative-control。

### 三、BLAB/c 小鼠脾臟細胞分離

將小鼠犧牲後取脾臟，以 1ml 針筒及 23G 針頭用含 FCS 之 PBS (PBS + 5% FCS + 0.1% sodium azide) 沖出脾臟細胞，於室溫下靜置 30 分鐘，使 macrophage 貼於細胞培養皿底層。之後吸取細胞懸浮液至 15ml 離心管，於



4°C、1800 rpm 離心 3 分鐘，倒去上清液後加入 RBC lysis buffer (0.15M NH<sub>4</sub>Cl + 1.0mM KHCO<sub>3</sub> + 0.1mM Na<sub>2</sub>EDTA) 以溶解紅血球，經離心後以 PBS 懸浮細胞液備用，調整細胞密度至所需。

#### 四、純化脾臟細胞之 mRNA

將 10<sup>6</sup> 細胞以 PBS 清洗後於 4°C、3000 rpm 離心 5 分鐘，加入 Trizol (GIBCO BRL) 1ml 後均勻混合，靜置 5~10 分鐘，加入 Chloroform 0.2ml 後搖晃，於 4°C、12000rpm 離心 15 分鐘，取上清液加入 Isopropanol 0.5ml 後混勻，再於 4°C、12000 rpm 離心 10 分鐘，倒去上清液之後以 75 % 酒精清洗 RNA 沈澱，完全移去上清液，以 DEPC 水溶解 RNA 沈澱，以分光光度計測 RNA 濃度及 260/280 比率。

#### 五、以 RT-PCR 偵測 TREM-1 與其發炎相關之細胞激素 mRNA 的表現

取定量之樣本 RNA 於 70°C 作用 5 分鐘，以破壞 RNA 之二級結構，再加入 MuMLV RT buffer，2.5mM dNTP (BRL)，0.1M DTT (BRL)，Rnasin (Promaga)，MuMLV RTase，hexamers 與 DEPC 水配成總體積 25μl 混合液，於 37°C 反應 60 分鐘後於 90°C 作用 5 分鐘使酵素去活化，加入 175μl 滅菌水溶解 cDNA。取其中 10μl 進行 PCR 反應，將樣本 cDNA 加入 PCR buffer，0.25mM dNTP，Tag polymerase，sense primer，antisense primer 與滅菌水配成總體積 40μl 混合液，於 HYBAID PCR Express thermal cycler 進行 PCR 反應。實驗根據不同 primer 序列設計不同 PCR program。

其反應條件設定為：

變性反應(denaturation)：94°C、1 分 30 秒~3 分 30 秒

以下進行 25~40 個 Cycle (視不同的 primer 而定)

變性反應(denaturation) 94°C、30 秒~40 秒

黏合反應(annealing) 57~68°C(依 primer 而調整)、30 秒~40 秒

合成反應(extension) 72°C、40 秒~1 分鐘

25~40 個 Cycle 完成

合成反應(extension) 72°C、10 分鐘

反應完之產物以 1.5% 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分析之，以電泳影像分析儀 (Gel Documentation and Image Analysis) 及 Image Quant 軟體分析測量 mRNA 之表現趨勢。

#### 六、流式細胞儀分析所需抗體

##### Monocyte/Macrophage :

FITC-conjugated anti-mouse CD11b

PE-conjugated anti-mouse TREM-1 (Clone 174031, R&D)

Cy-chrome-conjugated anti-mouse CD8 $\alpha$  (Ly2, clone 53 - 6.7 ,Ph)

**DC :**

FITC-conjugated anti-mouse CD11c (clone HL3, Ph)

PE- conjugated anti-mouse CD40 (clone 3/23 , Ph )

Cy-chrome-conjugated anti-mouse CD8 $\alpha$  (Ly2, clone 53 - 6.7 ,Ph)

APC-Biotin conjugated mouse anti CD86(B7-2, clone PO3 , Ph)

**T cell :**

FITC-cojugated anti-mouse CD4 (L3T4,clone RM4-5, Ph)

Cy-chrome-conjugated anti-mouse CD8 $\alpha$  (Ly2, clone 53 - 6.7 ,Ph)

APC-Biotin conjugated mouse anti ICOS(CD278, clone 7E.17G9 , Ph)

七、以流式細胞儀偵測細胞表面標記

將 10<sup>6</sup> 細胞以 PBS 清洗後於 4°C、3000 rpm 離心 5 分鐘，倒去上清液，加入 2.4G<sub>2</sub> Blocking 單株抗體 100 $\mu$ l，靜置冰上作用 20 分鐘。加入 PBS 清洗後離心，倒去上清液，以特殊螢光染色之單株抗體 50 $\mu$ l 靜置冰上作用 60 分鐘。以 PBS 清洗後離心，最後加入 1ml PBS 懸浮細胞液，再利用 FACSort 流速細胞儀測定樣本中不同類型細胞之螢光強度，並以 Cell Quest<sup>TM</sup> 軟體進行分析。

## 參、結果

### 一、Macrophage 細胞表面發炎指標性 Marker (Trem-1<sup>HI</sup>) 測定

以 FACScalliber 流式細胞儀測定餵食樟芝後，小鼠各組間細胞比例與其細胞上各 CD marker 表現，所得參數以 Cell Quest<sup>TM</sup> 軟體進行分析後再以 Excel 系統分析的差異性，使用 Z test 比較分析各實驗數值結果於統計上之差異。先以經 LPS (lipopolysaccharide) challenge 的小鼠脾臟細胞上各 cell marker 的表現與未經任何處理的對照組相比較，將特定表面標記如 TREM-1，區分為低度表現區及高度表現區(如 TREM-1<sup>LO</sup>、TREM-1<sup>HI</sup>)，分析其高度表現區之統計值。

由實驗結果得知，餵食樟芝濾液多醣體之小鼠；其 Trem-1<sup>HI</sup> 的表現與作為陽性對照組(Trem-1<sup>HI</sup> 表現的百分比為 21.24±1.11%)比較，於二週時尚未有明顯下降的趨勢(20.31±1.24%~21.94±0.33%)，但自四週後有顯著的下降趨勢(14.68±1.12%~16.87±1.66%， $p<0.01$ ~ $p<0.001$ )，於六週時亦同樣維持在(14.77±0.98%~16.27±1.46%， $p<0.01$ ~ $p<0.001$ )。而在未受 LPS 刺激的 macrophages 上 Trem-1 的基礎表現量約在 2.89±1.34%。而餵食樟芝菌絲多醣體之小鼠；Trem-1<sup>HI</sup> 的表現於二週時即有明顯下降的趨勢(13.56±1.75%~16.84±1.64%， $p<0.001$ )，自四週時降至最低 10.65±1.49%， $p<0.001$ )，於六週時亦同樣維持在(13.29±1.78%~17.12±1.68%， $p<0.01$ ~ $p<0.001$ )(圖三)。

### 二、樟芝對免疫細胞之調控機轉

#### (一)小鼠脾臟細胞—DC 之表現

DC 的細胞數量(CD11c<sup>+</sup>) 百分比，樟芝濾液多醣體之組別，相對於 LPS 陽性對照組，二週時有被抑制的情形(7.89±1.02%~12.48±2.00%)，至四週時後回升，於六週時到達最高點(6 週 72 小時，20.96±0.65%)(圖二(a))。由(圖二(b))中可得知，餵食樟芝菌絲多醣體的組別，其細胞數量百分比並無明顯差異，約在 15.54±2.61%~20.71±2.13%。

CD40 代表了 DC 成熟與活化的情形，由圖(五)得知，不論是樟芝菌絲多醣體亦或樟芝濾液多醣體，其 CD40<sup>HI</sup> 的表現均在餵食樟芝第四週時有上升趨勢(樟芝濾液多醣體至六週時 120 小時為最高，11.93±1.97%)，與陽對照組相較均低於陽性對照組但高於陰性對照組。CD8 $\alpha$  為 DC 的

作用亞群標記，由圖(六)中可得知，不論是餵食樟芝菌絲多醣體亦或樟芝濾液多醣體，其趨勢均與 CD40<sup>HI</sup> 的表現相近，但有較高度的表現(二組表現均於六週時到達最大值，濾液組為  $37.01\pm 1.04\%$ ~ $40.79\pm 1.21\%$ ，菌絲組  $27.25\pm 2.00\%$ ~ $28.22\pm 1.48\%$ )。CD86 同樣代表了 DC 活化的情形，CD86<sup>HI</sup> 的表現(圖七)於餵食樟芝二週時高於對照組(濾液組  $4.03\pm 1.86\%$ ~ $5.71\pm 2.05\%$ 、菌絲組  $4.05\pm 0.52\%$ ~ $5.12\pm 0.41\%$ )，但餵食四週後卻開始有明顯被抑制的情形(濾液組  $0.38\pm 0.23\%$ ~ $0.42\pm 0.16\%$ 、菌絲組  $1.80\pm 0.92\%$ ~ $1.94\pm 0.33\%$ )，尤其是樟芝菌絲多醣體之組別，並持續至第六週(與陽性對照組相比，二組皆為  $p<0.001$ ，並同樣低於陰性對照組)。

### (二)小鼠脾臟細胞—Macrophge 之表現

除 Trem-1 的表現之外，由圖(一)中可得知，在巨噬細胞的數量上發現並無顯著差異，Macrophage 的細胞數量(CD11b<sup>+</sup>)百分比均在  $67.93\pm 3.33\%$ ~ $84.22\pm 4.33\%$ 。CD8 $\alpha$ <sup>HI</sup> 於 Macrophage 上的表現與陽性對照組相較(圖四)，與 DC 上 CD8 $\alpha$ <sup>HI</sup> 的表現趨勢相同。CD8 $\alpha$  為 DC 的作用亞群標記，由圖(四)中可得知，不論是餵食樟芝菌絲多醣體亦或樟芝濾液多醣體，其趨勢均與 CD40<sup>H</sup> 的表現相近。

### (三)小鼠脾臟細胞—T 細胞之表現

由圖(八)中可得知，T 細胞的細胞數量(CD4<sup>+</sup>)百分比在服用樟芝六週時約略下降(濾液組六週 120 小時  $p<0.05$ ，菌絲組為  $p<0.01$ )。T 細胞的細胞數量(CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>)百分比相較於對照組，在服用樟芝二週後有約略上升的趨勢，四週開始降回 15% 左右並持續至六週(圖(九))。T 細胞上 ICOS 的表現是本次實驗所設定的新 surface marker，與 DC(APCs)、T 細胞之間 CD28-CD80/CD86 和 CTLA-4、ICOS-ICOSL 之間的免疫調控有關。不論濾液組或是菌絲組，其 ICOS 的表現均在二週時被明顯抑制，至四週始有上升趨勢並持續至六週，其中以菌絲組至六週 72 小時  $11.92\pm 0.98\%$  為最高，效果較濾液組佳。



### 三、以 RT-PCR 分析相關細胞激素及特殊基因之 mRNA 表現

#### (一) 甘油醛三磷酸去氫酶(GAPDH) mRNA 含量(Internal control)之測定

取口服樟芝二週、四週及六週並於每個實驗週數停藥達 24、72、120 小時之小鼠脾臟細胞，及未經任何處理之正常小鼠脾臟細胞作為對照組，萃取 Total RNA 俾行 RT-PCR 反應，於 1.5% 瓊脂凝膠(Agarose gel)進行電泳分析，均可獲得一 752bp 片段之終產物(圖十一)—GAPDH，是為醱解反應(glycolysis)中的作用酵素，催化 glyceraldehyde 3-phosphate 的氧化，為小鼠體內一恆定基因。將電泳圖利用 Image Quant 軟體測定其 Volume value (Volume 值)，結果得到其 Volume 值均維持在一定值內，顯示在各組小鼠體內之 GAPDH 基因含量均控制為大致相同，已證實本實驗於反轉錄聚合酶連鎖反應過程中的一致性，作為其他 mRNA 表現之參考對照。

#### (二) 各細胞激素 mRNA 之表現

取餵食樟芝各實驗點小鼠與正常小鼠比較，於施打 LPS 後犧牲，分析脾臟細胞 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-6、IL-4、IL-10 mRNA 之基因表現(圖十一)。結果顯示，不論是樟芝濾液多醣體或樟芝菌絲多醣體，與陽性對照組相比，TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-6 的表現趨勢均相似：在二週時被抑制，四至六週時稍微偏高，但整題而言仍明顯低於陽性對照組，甚至部分能被抑制近陰性對照組(至六週時幾與正常無異)；以每週的時間點來說，停藥五天者較停藥一天者為強；但整體表現以樟芝菌絲多醣體較強(抑制效果較為明顯)。IL-4、IL-10 的表現較為一致，無明顯趨勢變化，但大致趨勢與其他細胞激素相近，僅變化幅度較為趨緩。

## 肆、討論

抗發炎及調節免疫功能長久以來一直為許多中草藥的重要藥理作用，既能抗發炎又能增強免疫力為開發中藥複方重要的特色。樟芝為生長於台灣的特有真菌，長久以來坊間盛傳其具各種神奇療效，另根據以前的一些研究報告，其與增強宿主免疫能力有密切關係(Lee *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004a; 2004b; Song & Yen, 2002; Wang *et al.*, 1997)。本實驗室先前實驗中，以 RT-PCR 配合活體動物模式對樟芝的進行藥效評估。在體外實驗中應用 RT-PCR 技術分析脾臟細胞 mRNA 以了解細胞激素之調節作用，發現樟芝具有有效成分，確實能增強小鼠體內 Th1 細胞激素(IFN- $\gamma$ 、IL-2)及巨噬細胞分泌的細胞激素 TNF- $\alpha$  等表現，相對的亦抑制 Th2 細胞所產生的細胞激素 IL-4、IL-10 表現，這些基因表現和樟芝有著相當的劑量的依存關係。根據實驗結果顯示，若服用藥材時間愈久，脾臟細胞中細胞激素 INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的表現更加顯著。然樟芝是否同時具有抗發炎及增強免疫力這兩種功能，值得深入探討。

在本實驗中，小鼠長期餵食樟芝後以腹腔注射 LPS 的方式，使小鼠產生發炎反應，再以流式細胞儀測定分析 Macrophage 上 Trem-1 的表現。研究結果顯示餵食樟芝達四週時 Trem-1<sup>HI</sup> 的表現開始下降，持續至六週為止仍有明顯差異。配合偵測發炎相關之細胞激素 INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-6 發現，細胞激素的表現趨勢與 Trem-1 的表現趨勢相符合，均明顯抑制陽性對照組之表現；且以不同週的時間點來說，餵食樟芝後停藥五天者較停藥一天者強，其 Trem-1 與發炎相關之細胞激素表現均低於陽性對照組，但四至六週時仍有小幅度的上升，推測與餵食樟芝後能夠促使免疫細胞增加有關(劉,2007)，且此一現象與其餘 DC 上之 CD11c、CD8 $\alpha$ 、CD40，Macrophage 上之 CD8 $\alpha$  之表現趨勢相符。

在本實驗中亦發現，在對照巨噬細胞上 CD8 $\alpha$ <sup>HI</sup> 的表現，可以發現 Trem-1<sup>HI</sup> 與 CD8 $\alpha$ <sup>HI</sup> 在 LPS 的刺激下，其表現趨勢相同，推測有可能主要被抑制的是 CD8 $\alpha$ <sup>HI</sup> 巨噬細胞上的 Trem-1<sup>HI</sup>，此結果與血吸蟲感染所導致巨噬細胞上的 Trem-1、CD8 $\alpha$  與 INF- $\gamma$  的表現相同(林, 2005)。足以顯示 CD8 $\alpha$  表現於巨噬細胞上之重要性，值得進一步研究探討。本研究結果顯示，長期餵食小鼠樟芝，能提升施打 LPS 後脾臟細胞中 DC 上 CD40<sup>HI</sup>、CD8 $\alpha$ <sup>HI</sup>，Macrophage 上之 CD8 $\alpha$  的表現。已有文獻指出，主要是因 CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 上被活化後的 CD40 可與 CD4<sup>+</sup>T 細胞上的 CD154 相結合並促使 T 細胞的活化，使其趨向 Th1 反應並分泌 INF- $\gamma$ 、IL-2 等 Th1 相關的細胞激素而非刺激 IL-4

分泌，以引發之後的細胞型免疫反應(Straw *et al.*, 2003; Yasumi *et al.*, 2004)，促使 T 細胞大量增生，增加其毒殺外來病原體的效用。印證於本研究結果，顯示較長期餵食樟芝後，脾臟細胞中 INF- $\gamma$  的表現可能是經由 CD8 $\alpha$  DC 上的 CD40 與 T 細胞上的 CD154 相結合，活化 DC 與 T 細胞後而產生。文獻另指出，CD8 $\alpha^+$ DC 會選擇性誘導 Th1 反應的原因是與 CD8 $\alpha^+$ DC 產生 IL-12 的選性能力有關(Maldonado-Lopez *et al.*, 1999a; 1999b)，也發現 CD8 $\alpha^+$ DC 分泌 IL-12 的生物活性確實也比 CD8 $\alpha^-$ DC 高(Liu *et al.*, 2001)。因此本實驗中 IL-12 的增加可能與 DC 數量上升(尤其是 CD8 $\alpha^+$ DC)及 MHC 的活化有關。

在餵食樟芝的初期，CD4 $^+$ T 細胞、CD8 $^+$ T 細胞有微幅上升的一個趨勢，當 CD80/86 活化初期，與 ICOS 低度表現時，均能促使 T 細胞的活化並釋放 T 細胞的 mitogen—IL-2，使得 T cells 可以增生(Akbari *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2001; Nurieva *et al.*, 2003; Sharpe & Freeman, 2002)，與實驗所得結果相符。

IL-4 的表現與流式細胞儀檢測的結果比較，發現與 CD4 $^+$ T 細胞數量的趨勢、APCs 上 CD86 的表現相符，而不論是 CD80 或是 CD86 都能提供共同刺激的訊息導致 IL-4 的產生(Gause *et al.*, 1997)，已知 CD86 在無 CD40-CD154 刺激細胞影響的情形下，主要是對 T 細胞的增生與產生 Th2 的細胞激素有關(Straw *et al.*, 2003; Yasumi *et al.*, 2004)，因此在餵食樟芝初期(二週)較能引起 IL-4 的表現產生，但至四週時 INF- $\gamma$  與 CD40 的表現上升後而下降。

在我們剛執行完成的 94 年度教育部產學合作計畫研究(樟芝免疫調節療效之研究—對樹突狀細胞及巨噬細胞之調控作用)中，我們發現 DC 上 CD86 的表現於餵食樟芝 4 週後開始下降，在其他 APC (Macrophage、B cell) 上亦有相同的現象，我們推測此與其他協同刺激分子：DC 上之 CD80 / CD86、ICOSL 及 T 細胞上 CD28、CTLA-4、ICOS 之間的交互作用有關(Sharpe Freeman, 2002)。最初是由活化後 DC 上的 CD80/CD86 與 T 細胞上的 CD28 結合促使 T 細胞的活化並釋放 IL-2，而 T 細胞上的 CTLA-4 也隨之被 induce 生成，與 CD80/CD86 結合，抑制平衡 CD28 的反應，避免自體免疫的產生。因此 APC 上 CD86 的表現下降，其主要原因可能是 CTLA-4 參與調控平衡而抑制之。這其中涉及各種免疫分子間深層微妙的訊息傳導作用機轉，值得繼續探討。從以上的文獻報告與研究得知，CD28 主要的功能是擔任誘導初期免疫反應，而 ICOS 則是負責維持 T 細胞的免疫反應，更進一步的，可以加強 Th 細胞的分化。在本實驗中，我們證實了此一假設，亦即當 DC 上

的 CD86 的表現下降時，T 細胞上的 ICOS 隨之被 induce 產生，取代原有 CD28-CD86 之免疫途徑，進一步維持 T 細胞的免疫反應。此現象說明了 LPS 所引起的發炎反應，並不能影響 DC(APCs)與 T 細胞之間 CD28-CD80/CD86 和 CTLA-4、ICOS-ICOSL 之間的免疫調控。因此，ICOS 很有可能未來作為篩選中草藥時一個更好的指標，且可將 CD86 與 ICOS 表現的消長，作為藥效短期與長期作用轉換的分界點，並獨立於抗發炎藥效的篩檢平台，使中草藥的免疫活性、抗發炎藥效同時進行，亦能更進一步的闡明其功效。經由以上的實驗設計，必能對中草藥藥效的評估有更深一層的了解。



## 伍、結論與建議

綜上所述，以流式細胞儀偵測 Trem-1 結果看來，二種樟芝萃取物對於抗發炎的功效均顯著，均能持續抑制至第六週，尤以樟芝菌絲多醣體為佳，因其在第二週即明顯觀察到 Trem-1 之下降趨勢，有助於盡早控制發炎反應之功效。

而在以 RT-PCR 分析相關細胞激素及特殊基因之 mRNA 表現部分，餵食樟芝濾液多醣體之組別，其 INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12 等發炎相關激素表現量與陽性對照組差異較不顯著，然餵食樟芝菌絲多醣體之表現量下降則較為顯著。流式細胞儀與 mRNA 表現研究結果顯示，長期餵食二種樟芝萃取物能有效達到抗發炎的效果，且服用樟芝的時間越久，Trem-1 被抑制的結果越明顯，藥效持續的時間也越長。以本次所得之樟芝濾液多醣體與樟芝菌絲多醣體相比，樟芝菌絲多醣體之抗發炎效果及其免疫調控作用均較樟芝濾液多醣體為佳。

本次實驗礙於經費大幅度縮減，不得不做實驗設計上的修改與變動，但仍能保持實驗設計的一致性。未來希望能再進一步的以寄生蟲感染誘發之慢性發炎反應，配合腹腔注射 LPS 誘發發炎反應引發急性發炎之雙效模式，方能較完整建立抗發炎藥效的篩檢平台。

除此而外，未來應進一步研究探討 CD86 與 ICOS 免疫分子表現所引發的訊息傳導作用機轉，作為評估藥效短期與長期作用轉換的分界點，並獨立於抗發炎藥效的篩檢平台，使中草藥的免疫活性、抗發炎藥效同時進行，亦能更進一步的闡明其功效。經由以上的實驗設計，必能對中草藥免疫藥效的評估有更突破性的了解。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP96-RD-025 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

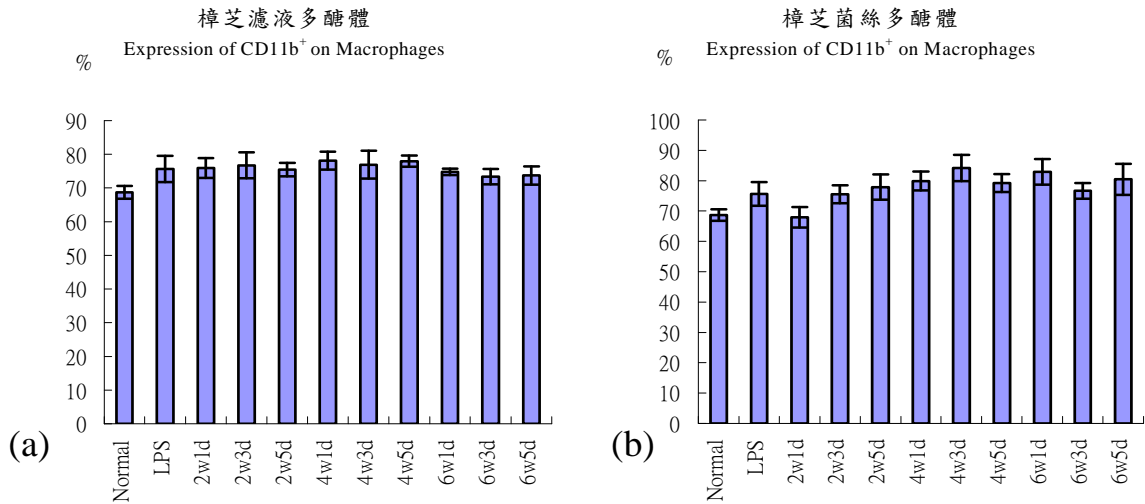
1. 劉千臻。樟芝對樹突狀細胞之免疫調控與對巨嗜細胞之抗發炎反應。國立陽明大學碩士論文。2007。
2. 林清楠。曼氏血吸蟲發炎反應中 TREM-1 基因表現之研究。國立陽明大學碩士論文。2005。
3. 廖英明。菇類中的許不了~樟芝。農業世界雜誌 1998, 176:76-79。
4. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS/ICOS- ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002, 8:1024-1032.
5. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, and Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001, 410(6832):1103-7
6. Carreno BM, and Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune response. *Annu. Rev. Immunol* 2002, 20:29-53.
7. Chung DH, Seaman WE, and Daws MR. Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *European Journal of Immunology* 2002, 32(1):59-66.
8. Choe J, and Choi YS. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol* 1998, 28:508-515.
9. Colonna, M. TREMs in the immune system and beyond. [Review] [86 refs]. *Nature Reviews Immunology* 2003, 3(6):445-53.
10. Colonna M, and Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *Journal of Infectious Diseases* 2003, 187 Suppl 2:S397-401.
11. Diefenbach A, and Raulet DH. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. [Review] [54 refs]. *Current Opinion in Immunology* 2003, 15(1):37-44.
12. Dong C, Juedes AE, Temann UA, et al. ICOS costimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001, 409:97-101.
13. Duvall RH, and DeWitt WB. An improved perfusion technique for

- recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg* 1967, 16:483-6.
14. Gause WC, Halvorson MJ, Lu P, Greenwald R, Linsley P, Urban JF, and Finkelman FD. The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells. *Immunol. Today* 1997, 18: 115-120.
  15. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999, 397:263-266.
  16. Lee IH, Huang RL, Chen CT, Chen HC, Hsu WC, and Lu MK. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiol Lett* 2002, 209:63-7.
  17. Liu JJ, Huang TS, Hsu ML, Chen CC, Lin WS, Lu FJ, and Chang WH. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, 201:186-93.
  18. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001, 106: 259-262.
  19. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, and Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol* 2001, 2: 585-589.
  20. Maldonado LR, De ST, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Maliszewski CR, and Moser M. Role of CD8alpha+ and CD8alpha-dendritic cells in the induction of primary immune responses *in vivo*. *J. Leukoc. Biol* 1999b, 66: 242-246.
  21. Maldonado LR, and Moser M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin. Immunol* 2001, 13: 275-282.
  22. Nathan C, and Ding A. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nature Medicine* 2001, 7(5):530-2.
  23. Nochi H, Aoki N, Oikawa K, Yanai M, Takiyama Y, Atsuta Y, Kobayashi H, Sato K, Tateno M, Matsuno T, Katagiri M, Xing Z, and Kimura S. Modulation of hepatic granulomatous responses by transgene expression of DAP12 or TREM-1-Ig molecules. *American Journal of Pathology* 2003, 162(4):1191-201.
  24. Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, and Dong C. B7h is required

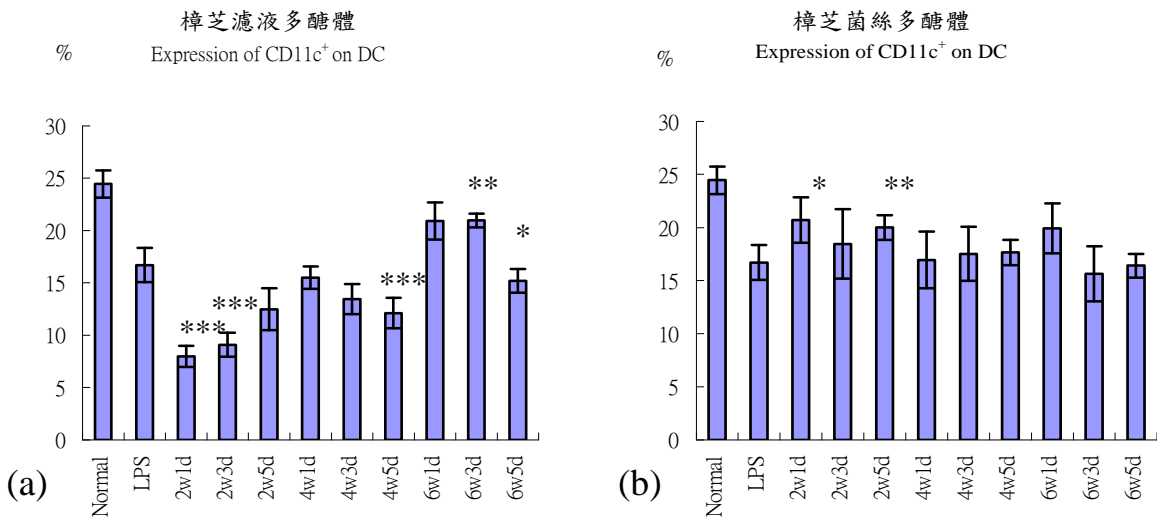
- for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:14163-14168.
25. Rousset F et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1992, 89:1890-1893.
26. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:116-26.
27. Shen YC, Wang YH, Chou YC, Chen CF, Lin LC, Chang TT, Tien JH, and Chou CJ. Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhankuic acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*. *Planta Med* 2004, 70:310-314.
28. Shen YC, Chou CJ, Wang YH, Chen CF, Chou YC, and Lu MK. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum* species. *FEMS Microbiol Lett* 2004, 231:137-143.
29. Song TY, and Yen GC. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J. Agric. Food. Chem* 2002, 50: 3322-3327.
30. Straw AD, Macdonald AS, Denkers EY, and Pearce EJ. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J. Immunol* 2003, 170: 727-734.
31. Wang S, and Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes and Infection* 2004, 6:759-766.
32. Wu SH, Ryvarden L, and Chang TT. *Antrodia camphorata*, combination of a medicinal fungus in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin* 1997, 38:273-275.
33. Yasumi T, Katamura K, Yoshioka T, Meguro TA, Nishikomori R, Heike T, Inobe M, Kon S, Uede T, and Nakahata T. Differential requirement for the CD40-CD154 costimulatory pathway during Th cell priming by CD8 alpha+ and CD8 alpha- murine dendritic cell subsets. *J. Immunol* 2004, 172: 4826-4833.



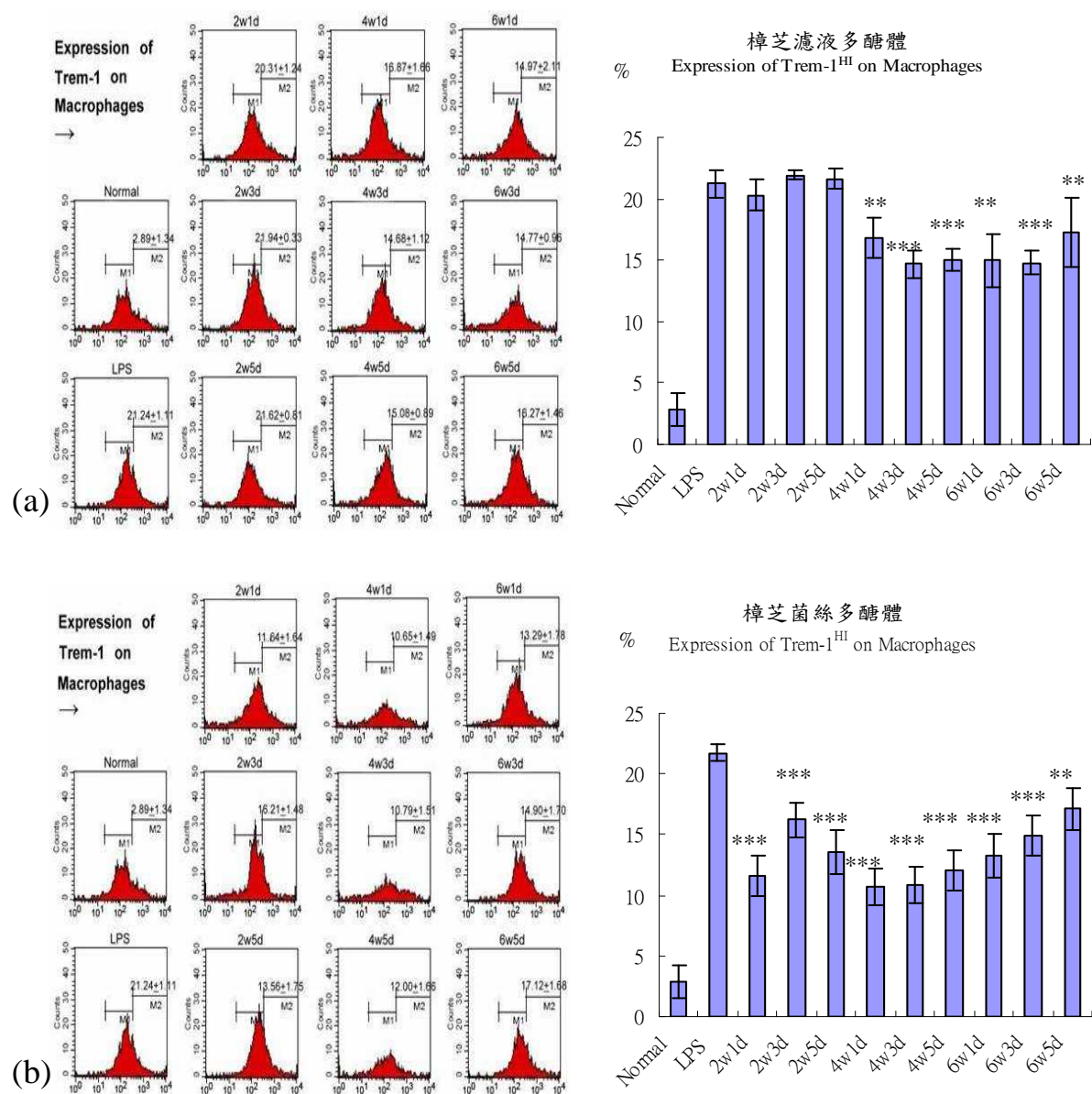
柒、圖、表



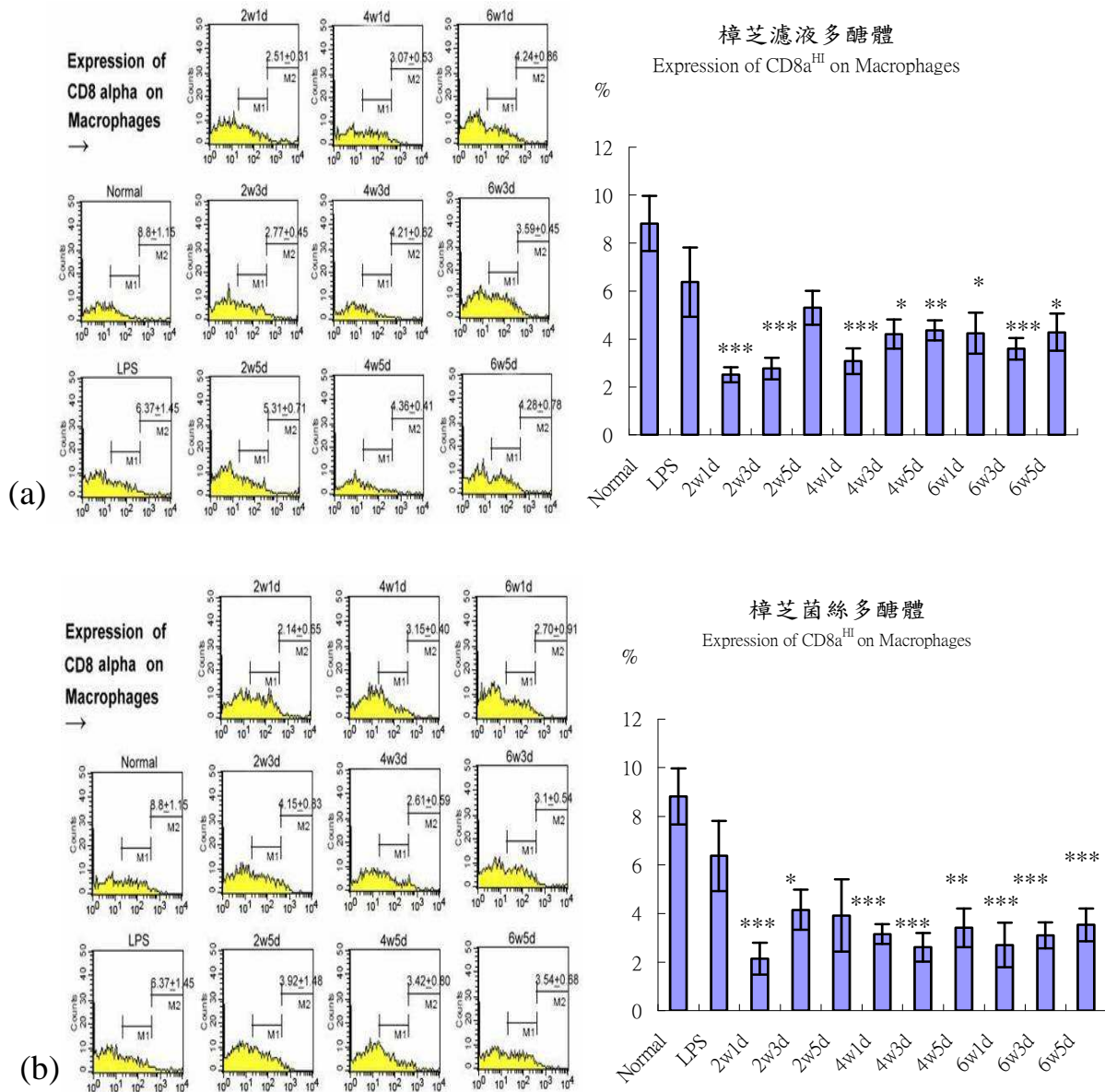
圖一：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 Macrophage 數量百分比表現以流式細胞儀分析後之結果。CD11b 之 Histogram 圖表現經 Excel 數量化分析後表示為以上之直方圖。(與只以 LPS challenge 之陽性對照組統計分析)



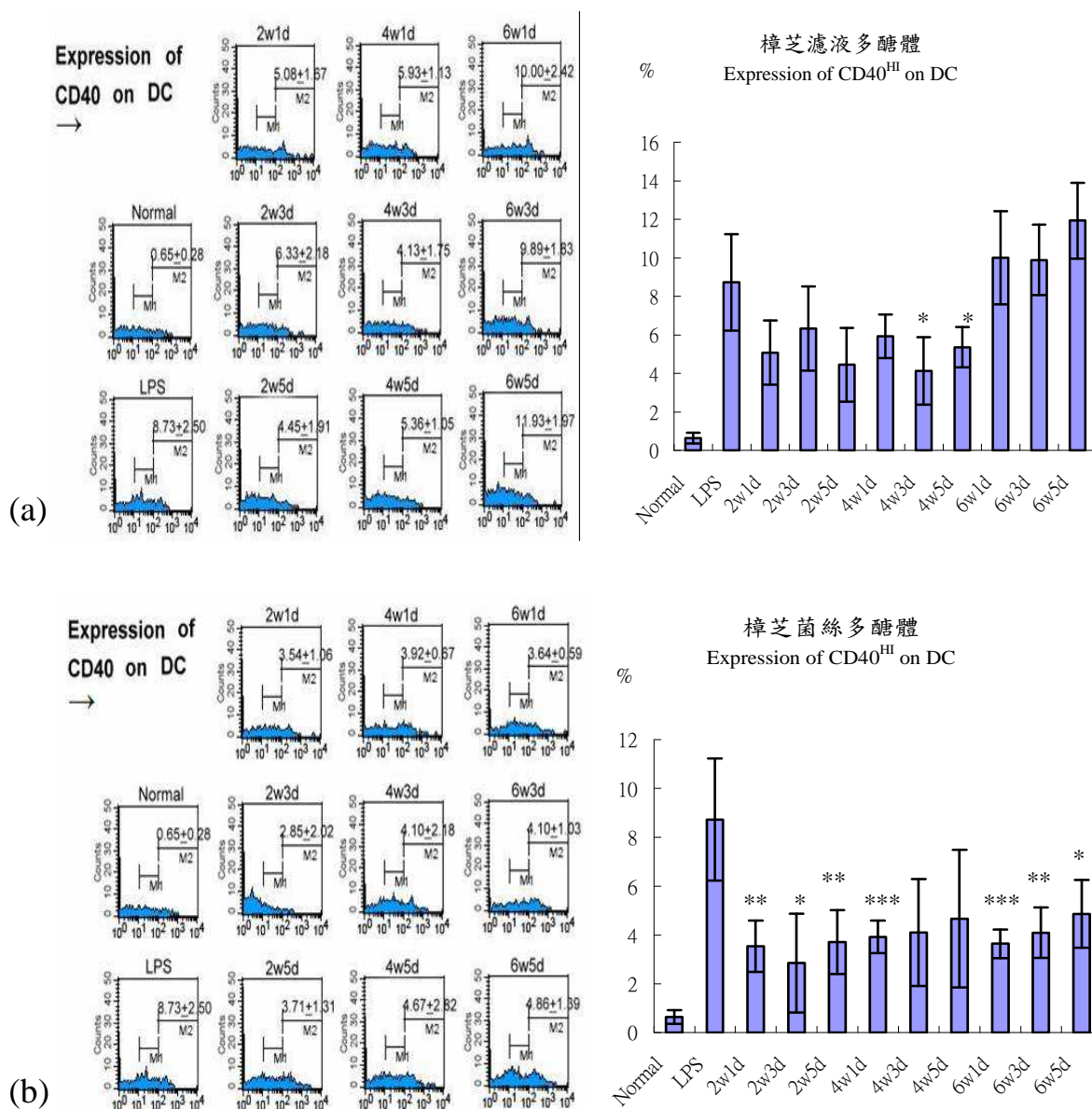
圖二：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 DC 數量百分比表現以流式細胞儀分析後之結果。CD11c 之 Histogram 圖表現經 Excel 數量化分析後表示為以上之直方圖。(與陽性對照組統計分析；\*表示  $p < 0.05$ ；\*\*表示  $p < 0.01$ ；\*\*\*表示  $p < 0.001$ )



圖三：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中巨噬細胞上 Trem-1 的表現百分比以流式細胞儀分析後之結果。左圖為 Trem-1 之 Histogram 圖，高度表現區經 Excel 數量化分析後表示為右圖之直方圖，直方圖尚包含未給予 LPS 刺激(餵食樟芝之後即犧牲)之 Trem-1<sup>HI</sup> 基礎表現量。(與只以 LPS challenge 之陽性對照組統計分析； \*\*表示 p<0.01；\*\*\*表示 p<0.001)

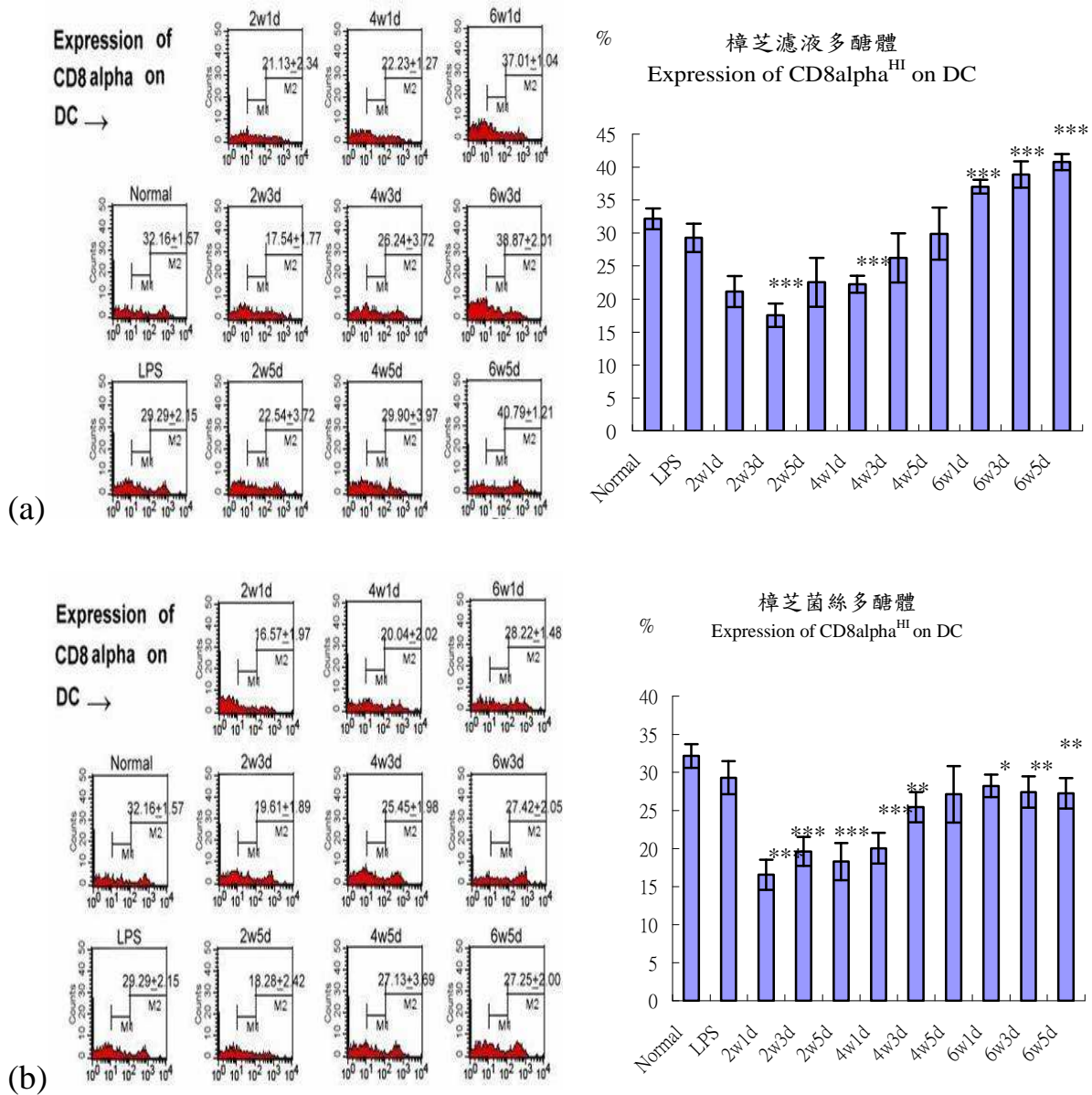


圖四：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 Macrophage 細胞上 CD8 $\alpha$  的表現百分比以流式細胞儀分析後之結果。左圖為 CD8 $\alpha$  之 Histogram 圖，高度表現區經 Excel 數量化分析後表示為右圖之直方圖，直方圖尚包含未給予 LPS 刺激(餵食樟芝之後即犧牲)之 CD8 $\alpha^{\text{HI}}$  基礎表現量。(與陽性對照組統計分析；\*表示  $p < 0.05$ ；\*\*表示  $p < 0.01$ ；\*\*\*表示  $p < 0.001$ )

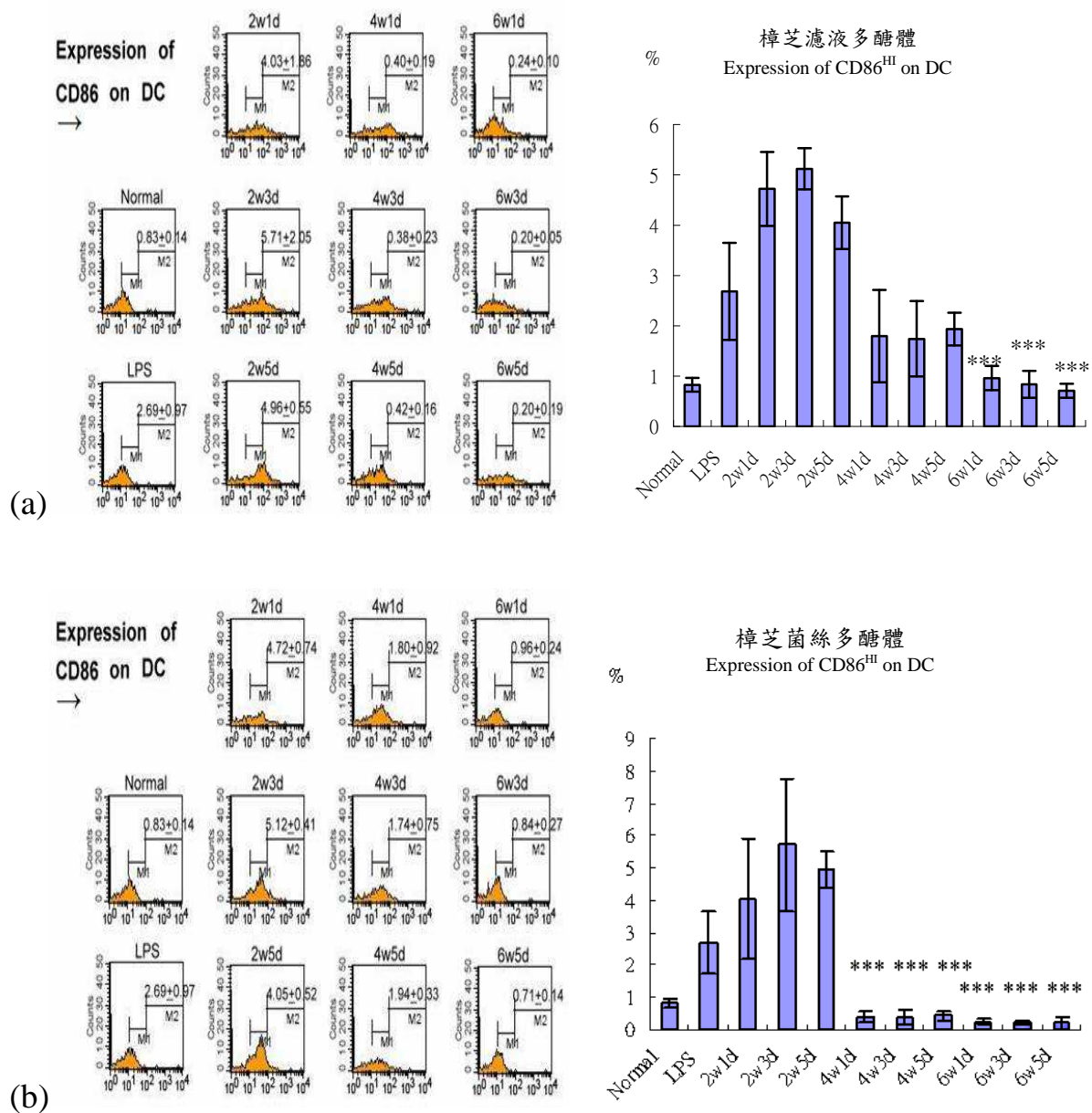


圖五：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 DC 細胞上 CD40 的表現百分比以流式細胞儀分析後之結果。左圖為 CD40 之 Histogram 圖，高度表現區經 Excel 數量化分析後表示為右圖之直方圖。(與陽性對照組統計分析；\*表示  $p < 0.05$ ；\*\*表示  $p < 0.01$ ；\*\*\*表示  $p < 0.001$ )

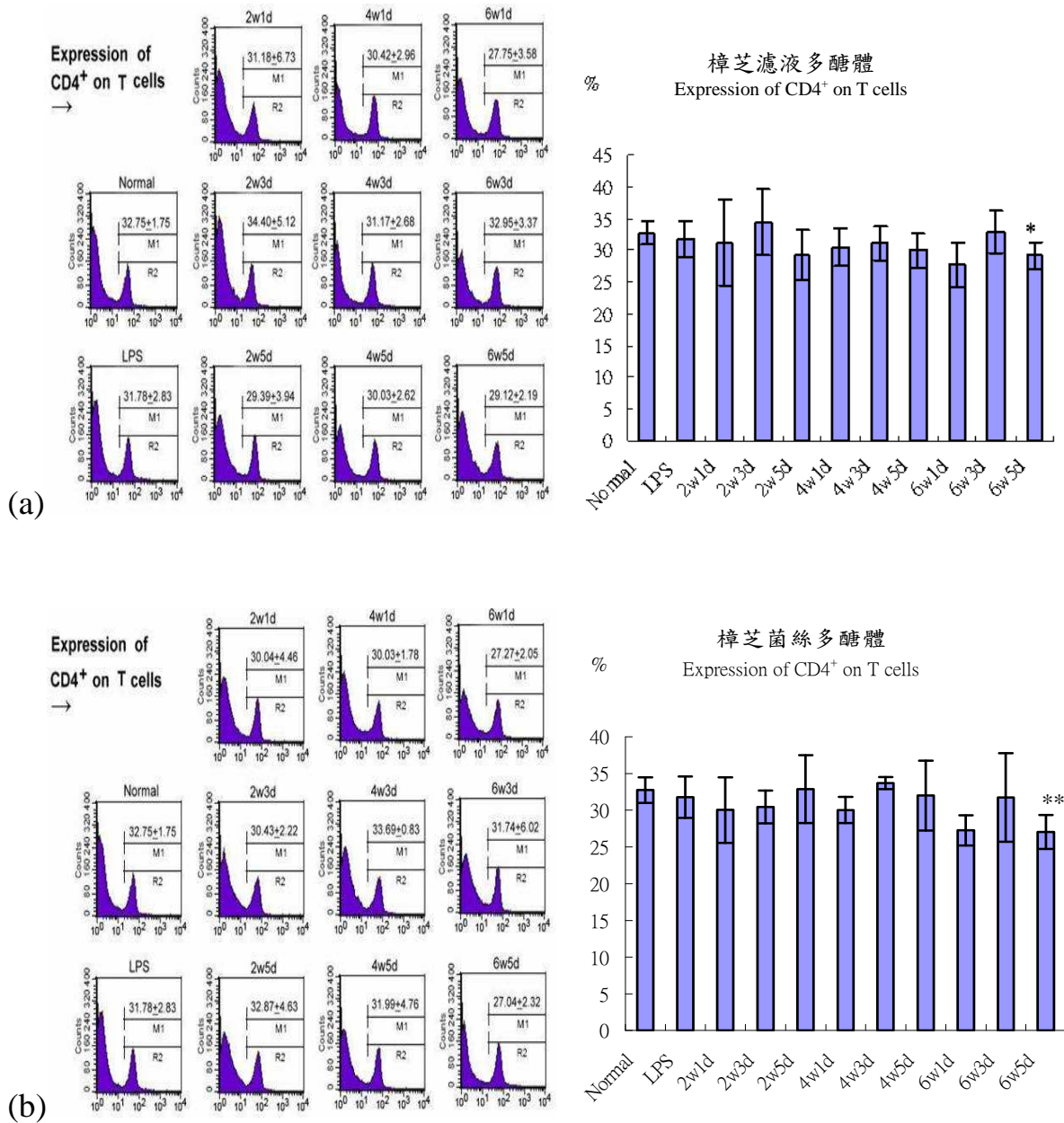




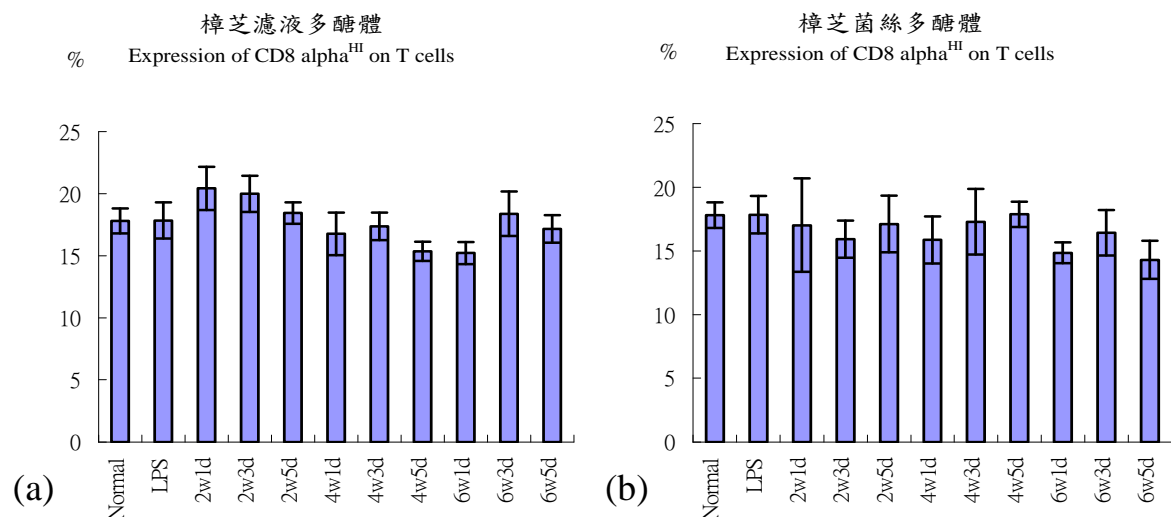
圖六：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 DC 細胞上 CD8α 的表現百分比以流式細胞儀分析後之結果。左圖為 CD8α 之 Histogram 圖，高度表現區經 Excel 數量化分析後表示為右圖之直方圖。(與陽性對照組統計分析；\*表示 p<0.05；\*\*表示 p<0.01；\*\*\*表示 p<0.001)



圖七：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 DC 細胞上 CD86 的表現百分比以流式細胞儀分析後之結果。左圖為 CD86 之 Histogram 圖，高度表現區經 Excel 數量化分析後表示為右圖之直方圖。(與陽性對照組統計分析；\*\*\*表示 p < 0.001)

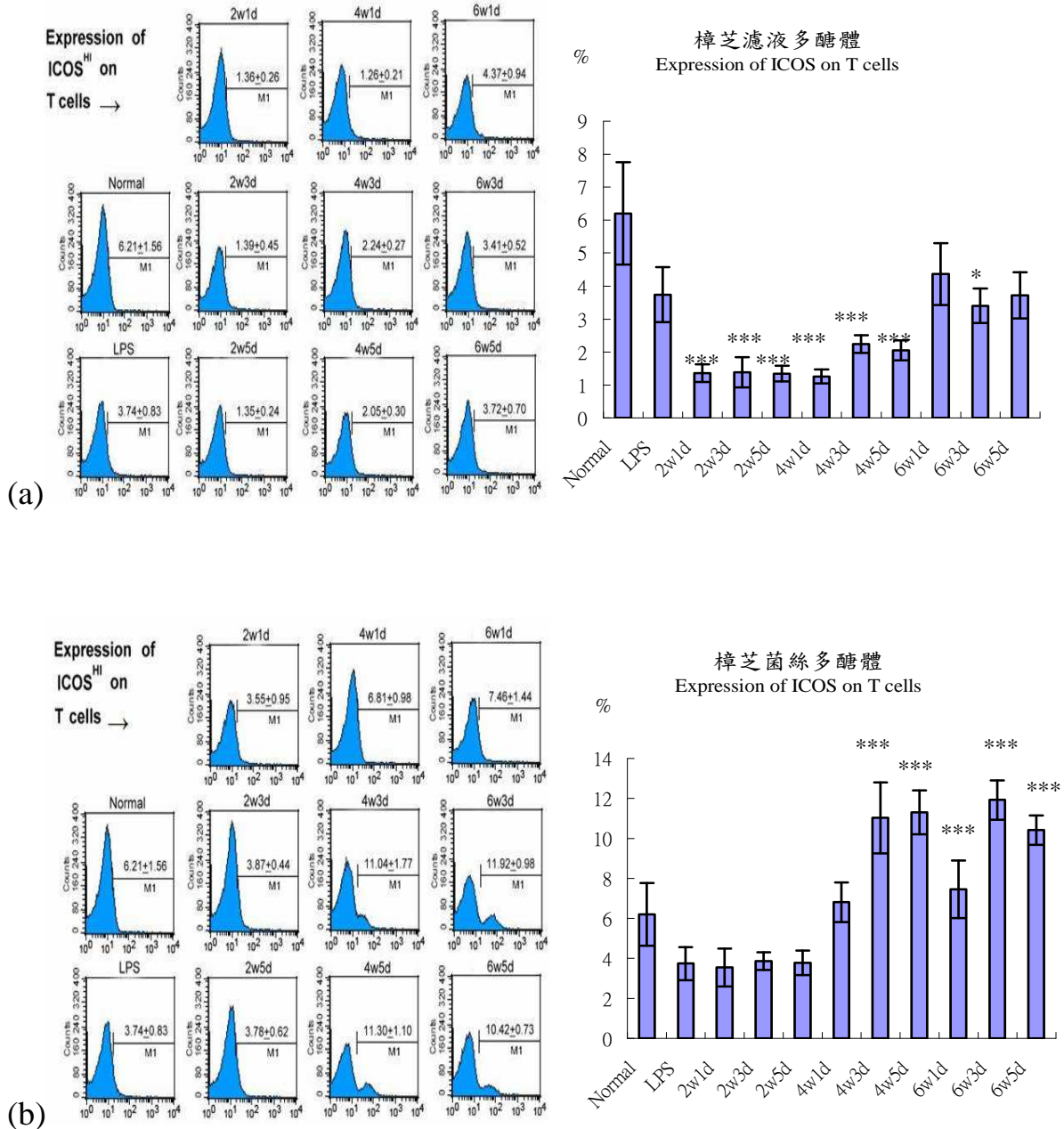


圖八：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 CD4+T 細胞數量百分比表現以流式細胞儀分析後之結果。左圖為 CD4 之 Histogram 圖，經 Excel 數量化分析後表示為右圖之直方圖。(與陽性對照組統計分析；\*表示 p < 0.05；\*\*表示 p < 0.01)

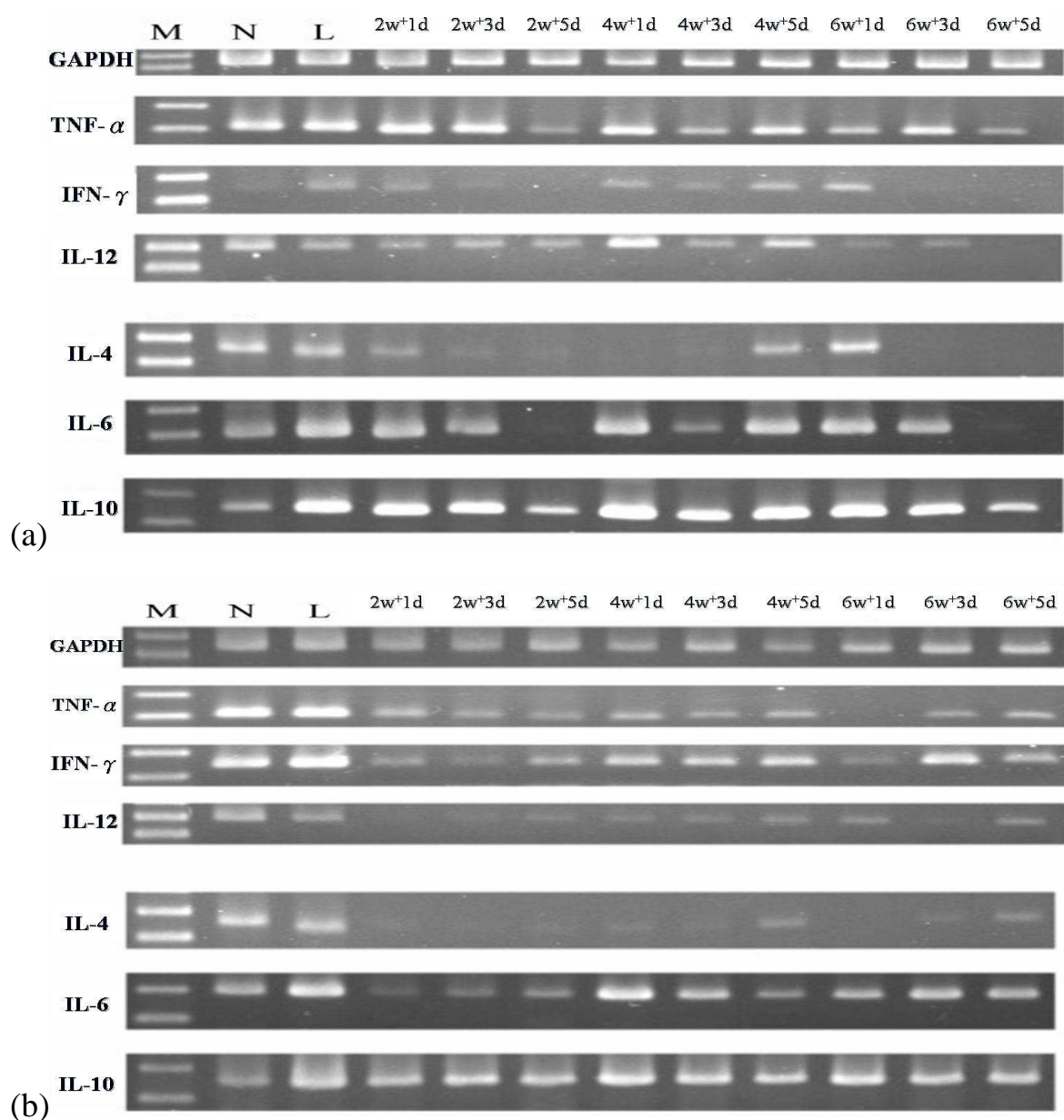


圖九：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 CD8+T 細胞數量百分比表現以流式細胞儀分析後之結果。CD8+之 Histogram 圖表現經 Excel 數量化分析後表示為以上之直方圖。(與陽性對照組統計分析)





圖十：經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠之脾臟細胞中 DC 細胞上 ICOS 的表現百分比以流式細胞儀分析後之結果。左圖為 ICOS 之 Histogram 圖，高度表現區經 Excel 數量化分析後表示為右圖之直方圖。(與陽性對照組統計分析；\*表示  $p < 0.05$ ；\*\*\*表示  $p < 0.001$ )



圖十一：以 RT-PCR 分析經樟芝濾液多醣體(a)、樟芝菌絲多醣體(b)餵食不同週數與不同停藥時間後，施打 LPS 再予以犧牲 BALB/c 小鼠，與正常小鼠(陰性對照組)、正常小鼠經腹腔注射 LPS 16~18 小時後犧牲(陽性對照組)之 BALB/c 小鼠脾臟細胞中各 mRNA 表現。