編號：CCMP94-RD-018

評估靈芝免疫調節功能蛋白抑制肺癌細胞轉移能力

柯俊良

中山醫學大學

摘　要

松杉靈芝（Ganoderma tsugae）中可分離出免疫調節蛋白質（FIP-gts），其分子量 13kDa。此蛋白質對於人類週邊血液細胞具有刺激增殖並誘發 TNF-α 大量表現，可能是促進 Th1 路徑有關。在動物試驗中已被證實可當作免疫抑制劑。靈芝一直以來被視為健康食品的一員，以細胞和動物實驗證實靈芝具有保護肝臟、抗腫瘤等功能。腫瘤的治療一直是大家關心的事，尤其是許多人著重於促進腫瘤細胞死亡來達到減緩腫瘤的形成。肺癌是一非常惡性的腫瘤，主要是大部分的肺癌細胞容易進行轉移，經由轉移侵入至其他器官部位造成更大傷害且不易進行治療和控制。所以本計畫考量抑制腫瘤細胞的運動性、轉移性及侵入性的方面著手。所以本研究計畫已先期著手建立了一轉移能力相當強的細胞株：將一點突變型 p53 (H179Y 的突變)表現載體轉染入肺癌 A549 細胞株中作為主要的分析系統，此細胞的轉移能力相當強。惡性細胞則會以輻射狀向四周擴散，並很快且大量的吸取養分、壓迫和毀滅相鄰的正常細胞，但我們初步實驗證實松杉靈芝蛋白（FIP-gts）會造成肺癌細胞皺縮，是否有抗腫瘤轉移的特性仍有待進一步分析，所以擬分析 FIP-gts 毒殺腫瘤細胞和抑制腫瘤細胞的運動性、轉移性及侵入性。癌細胞的轉移通常必須伴隨著一些生理變化，其中主要包括細胞外基質的瓦解，改變細胞與細胞基質間的貼附能力以及調控細胞的移動性等來影響細胞的侵入能力。首先，藉由利用 Boyden chamber assay 與 cell-matrix adhesion assay，我們發現 FIP-gts 抑制 A549 (H179Y)肺癌細胞 p53 突變株侵入的能力，並在 gelatin zymography 與 casein zymography assay 中也觀察到 FIP-gts 影響 A549 的 MMP-2 及 MMP-9 的表現能力，且利用 RT-PCR 的方式觀察 MMP 的抑制劑 TIMP-1 和 TIMP-2，發現到 TIMP-1 則受到重組

FIP-*gts* 蛋白增加其表現，但 TIMP-2 則沒有變化，而 MMP-2 的量同時也看到表現量的減少，因此得知重組 FIP-*gts* 蛋白能抑制 MMP-2 的活性，使得細胞移動性也被抑制。在此時，我們也發現到重組 FIP-*gts* 蛋白有誘導 Nm23 抑癌蛋白及其 mRNA 活化的能力，進而導致抑制細胞的轉移能力，且在過度表現 Nm23 蛋白的 A549 細胞中，也觀察到細胞的移動能力很明顯下降許多。期望能建立一套評估減緩肺癌轉移能力的方法，發展出能預防、治療或抑制腫瘤細胞之輔助性中藥。所以本研究闡釋松杉靈芝免疫調節蛋白 FIP-*gts* 有潛力發展成臨床抑制細胞轉移能力的藥劑。

關鍵詞：松杉靈芝、免疫調節蛋白質、肺癌細胞、轉移

Number: CCMP94-RD-018

Inhibition of Lung Metastasis by Fungal Immunomodulatory Protein, FIP-gts, from Ganoderma Tsugae

Jiunn-Liang Ko
Chung Shan Medical University

ABSTRACT

A large number of polysaccharide and triterpenoids of Ganoderma lucidum has been reported to inhibit the growth of tumors. Fungal immunomodulatory proteins, FIP-*gts*, were found in *Ganoderma tsugae*. In this study, we expressed and purified the fungal immunomodulatory protein (FIP-*gts*) in E. coli. However, the effect of FIP-*gts* on cancer cells has not been characterized clearly. Metastasis is one of the most difficult problems in cancer therapy. In wound healing assay, the level of motility have been decreased by the increasing concentration of FIP-*gts* in the previous study. In order to confirm the effect of FIP-*gts*, the Modified Boyden chamber assay was applied. Treatment of A549 cells with up to 0.07μM of FIP-*gts* decreased cell migration by 11% for 8 h. 0.075μM of FIP-*gts* decreased cell invasion significantly. In addition, Nm23 protein and mRNA was increased by reFIP-*gts* addition on A549 cells. We also observed the inhibitor of cell migration by overexpression of Nm23 protein in A549 cells. The secreted MMP-2 activity was notably inhibited measured by gelatin-zymography. Inhibitioty effect the FIP-*gts* on the MMP-2 activity of A549 cells in gelatin-zymography assay. In RT-PCR, the level of MMP-2 and MMP-9 were decreased but the MMP inhibitor of TIMP-2 had no effect and TIMP-1 increased after treated with FIP-*gts*. To further ascertain the antimetastatic activity of FIP-*gts*, we assessed the counteraction of FIP-*gts* with monoclonal FIP-*gts* antibody. Monoclonal FIP-*gts*

antibody could reverse cell migration by 55%. In gelatin-zymography assay, MMP-2 activity was also slightly increased. We also observed different proteins that changed between untreated or treated with FIP-*gts* in A549 cells using 2-DE gel analysis. We are going to identify these proteins in the future. Our results highlight the potential of FIP-*gts* in the treatment of clinical cancer metastasis.

Keywords: Ganoderma tsugae, Fungal immunomodulatory proteins, human lung carcinoma, metastasis

壹、前言

一般癌症細胞最主要威脅人類生命的主因是因為癌細胞會進行-轉移（metastasis）。在腫瘤生成的初期，腫瘤細胞僅侵犯並毀壞病源周圍的組織，並大量吸取宿主的養分。而惡性細胞則會以輻射狀向四周擴散，並很快且大量的吸取養分、壓迫和毀滅相鄰的正常細胞。當腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部或原位癌。如果能在此階段進行治療則治癒率最高。當腫瘤細胞藉由血液、淋巴管等方式轉移到人體其他部位生長成續發性惡性腫瘤，就稱為轉移性癌（Chambers, Groom et al., 2002）。轉移首先從-浸潤（invasion）開始；腫瘤細胞破壞基底膜（basal membrane）以侵入周圍組織，隨後進入血液或淋巴到更遠的組織和其他內臟器官，在此位置生長形成新的腫瘤（Chambers, Groom et al., 2002）。

若癌症起始於周圍空間較大的組織，一些腔道的表皮細胞如：胃壁細胞、腸壁細胞及膀胱壁細胞等；此些地方腫瘤細胞較容易生長，因有足夠的空間可以發展。然而，相對的若腫瘤細胞始於具實質組織的內臟器官則生長比較困難。在這些組織中，腫瘤細胞都須先生長，向四周擴充其生長空間，但等到一定的數目後，會擠壓和搶附近正常的細胞的養分，使其死亡。此外，也可能使血管壁或神經受到破壞，造成出血或疼痛等症狀。因此，原發性或續發性腫瘤組織壓迫、侵犯或毀壞維持生命的重要器官時，會造成壓迫、潰爛、感染、出血、疼痛或器官功能喪失等症狀，最終導致個體的死亡（Chambers, Groom et al., 2002）。

癌症的轉移乃一複雜的過程，當正常細胞轉變成癌症細胞時，需要特殊的訊息使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發癌細胞組織周圍血管增生，以供應足夠的養分，並提升癌細胞對周圍組織的浸潤和轉移（Overall and Lopez-Otin, 2002）。轉移的機轉並不是很清楚，可能的原因如下：一是基因突變造成功能失調，如 Myc、Ras 及 p53 等。當 myc 表現失調時會造成腫瘤細胞不斷的分裂（Dang, 1999）。此外，當 Myc 基因突變時會造成抗凋亡的能力，這主要是因為 Myc 誘發 Bcl-$_{XL}$ 蛋白質的表現（Conner, Teramoto et al., 1999）。而 Ras 的突變在很多研究證實與腫瘤細胞轉移有關，其可能原因為 Ras-MAPK 訊息一直被活化而誘發 matrix metalloproteinase-2(MMP-2)的大量表現，促使腫瘤細胞分解基底膜造成轉移（Bos, 1989; Webb, Taylor et al., 1998; Zhang, Thant et al., 2002）。p53 為轉錄因子具調節細胞週期、幫助 DNA 修復以及引發不正常細胞凋亡防止細胞癌化（Conner, Teramoto et al., 1999）。造成腫瘤細

胞轉移的另一種機轉是因生長因子及其受體過度表現或活化，常見的有 FGF、EGF、IGF、HGF、PDGF 等（Giatromanolaki, 2001）。在此情況下，生長因子的訊息傳遞路徑會被持續性的激活，因而提高細胞生長速率、轉移及抗凋亡能力等。

1995 年在衛生署登記的癌症病人資料中，男性罹患癌症的機率第二名為肺癌，其發生為十萬分之三十二。而女性中患癌症的機率為第四，發生率為十萬分之十二。到了 2002 年肺癌死亡人數高達六千二百六十一人，成為國人十大癌症之首（郭壽雄，1998）。

在一些食用菇類，如：靈芝、草菇及金針菇中所純化分離出來的蛋白質，他們具有類似的胺基酸序列及免疫調節功能，我們已將此種類之蛋白質，命名為真菌類免疫調節蛋白質（Fungal immunomodulatory proteins, FIPs）（Ko, et al., 1995）。尤其以靈芝在傳統中藥已成為翹楚，且已成為健康食品中的一員，對維持人體健康，有莫大作用。過去研究發現它具有抗過敏（Chen, et al., 1992）、保護肝臟功能（Lin, 1993）、抗腫瘤及增強免疫功能，但大多侷限於粗萃取物（Horner, 1993）研究，或小分子化合物（Kawagishi, 1993）研究。直到 1989 年日本明治製藥從靈芝中純化得一免疫調節功能蛋白，LZ8 (Kino, 1989)，實驗結果發現 LZ-8 可以明顯的抑制全身性過敏反應，治療肝炎及預防糖尿病。具有 mitogenic 能力，且可抑制 CFW 老鼠由牛血清蛋白 BSA 所引起的 anaphylaxis。柯（1995）等人亦自另一可食用的菇類-金針菇（FIP-fve）發現與 LZ8 及免疫球蛋白的重鏈區之蛋白質結構有相當程度的相似性，且二級結構多為β-Sheet，而測量其對於人類淋巴球細胞增殖能力時由以上實驗結果得知此蛋白質具有免疫調節活性。靈芝免疫調節功能蛋白質明顯增加 IFN-γ，因此靈芝增加 CD2 表現，引起 rosette 形成， 所以靈芝可藉著調節 immunocompetent cell 上 adhesion 分子（Miyasaka, 1992）來表現其藥性。而在先前的研究證實，靈芝免疫調節功能蛋白質會活化人類週邊血液單核球（human peripheral blood mononuclear cells, HPBMCs），並能夠促進 HPBMCs 與小鼠脾臟細胞的增生（van der Hem, van der Vliet et al., 1995），測量其對於人類淋巴球細胞增殖能力時，以 ^{3}H-thymidine 測量 DNA 之合成量，並以 PHA 作為對照組，結果發現 FIP-*gts* 只要 5 微克/毫升（μg/ml）即可達到促進人類淋巴球細胞最高的細胞增殖量（Hsu, 1996）。

大部分的原發性的病灶可以由外科手術及其他治療方式將其移除，但是轉移性癌因已擴散至身體各處，造成治療上的困難。再者，惡

性腫瘤的演變過程中，雖然通常是由單一細胞為癌症起源但當其轉移時已累積許多基因突變，而形成許多不穩定且多樣性的腫瘤細胞群落，這也造成治療上的困難。而且在化學藥物治療常無法完全根除所有的腫瘤細胞，反因物競天擇的定律下，產生一些具抗藥性或更惡性化的腫瘤細胞子株有機會活下來繼續發展，最後造成治療失敗。事實上，腫瘤轉移所造成的死亡率約 90%（姜伯穎、謝文斌，2000）。由於腫瘤轉移的複雜性，使其在治療上有極大的困難。在中藥方面期能開發出抑制癌症轉移的良藥並瞭解其有效成分。A549 肺癌細胞為一種高度惡化的肺癌上皮細胞，其 p53 為野生種，可藉由淋巴及血液系統散播到身體其他的組織器官，造成癌症的轉移擴散，所以即使腫瘤經由手術切除或放射線治療後，依舊難以根治，造成病人癒後狀況不佳。我們知道癌細胞的侵入與細胞間質的分解、細胞的貼附能力及細胞的移動性有關。所以本計畫擬探討由松杉靈芝中所分離出的免疫調節蛋白、多醣體或帖類，於處理至肺癌細胞後，是否可有治療和抑制肺癌細胞的運動性、轉移性及侵入性。

一、建立轉移能力較強的 p53 突變肺癌細胞株。

選用 A549 細胞株為肺癌腫瘤細胞（human lung carcinoma），從 58 歲高加索男性（Caucasian male）肺部中取得，其是貼附型的細胞，且 A549 之 p53 為野生型（Lieber et al., 1976）。而 50%以上肺癌的 p53 為突變型，所以我們特地構築一突變型 p53 (H179Y)的基因轉殖到 A549 細胞株，使此細胞株更高度惡化及轉移能力更強（Fig. 3）作為比較，且其 MMP-2 活性較原始細胞株強。所以以利分析抑制轉移能力。分析免疫調節抗腫瘤蛋白 FIP-gts 對於肺癌細胞的毒殺能力。

二、細胞傷口癒合分析（wound healing assay）了解 FIP-gts 對於肺癌細胞轉移性、運動性及侵入性的變化。

三、建立 gelatin zymography 與 casein zymography assay 分析 FIP-gts 對於肺癌細胞 MMP-2 及 MMP-9 的活性。

四、分析 Boyden chamber assay 及 cell matrix adhesion assay 分析 FIP-gts 抑制 A549 (H179Y)突變株的侵入能力。

五、下年度期望在動物實驗方面證明此蛋白（FIP-gts）可同樣有能抑制癌細胞生成和轉移的能力。

六、此研究工作由於開發的靈芝免疫調節功能蛋白是針對應用於預防、治療和抑制肺癌細胞的運動性、轉移性及侵入性。所以將來有發展出治療或搭配其他抗癌藥物一起處理可抗腫瘤減少腫瘤細胞的再復發。

貳、材料與方法

一、材料：純化靈芝免疫調節功能蛋白、多醣體及帖類

一般而言，靈芝有效成分多為多醣體與帖類及本研究團隊倡導的免疫調節蛋白，我們為了釐清何種成分具有抑制癌症轉移能力，所以準備了三種材料。

(一) 在大腸桿菌中表現融合蛋白重組 FIP-*gts* 與純化

松杉靈芝 FIPs 的分離與純化：大腸桿菌中重組 FIP-*gts* 的表現與純化（延續今年度執行計畫的方法）松杉靈芝免疫調節蛋白質的分離與純化主要利用遺傳工程方式選殖此蛋白之基因，將已構築完成含有 FIP-*gts* coding region 的 pGEX 4T-1 表現載體，轉形至大腸桿菌中表現，並利用 glutathione-Sepharose 4 Fast Flow 親和性管柱純化重組 FIP-*gts* 融合蛋白。接下來進一步使用 Thrombin 將 Glutathione S transferase 與重組蛋白間的鍵結切去，利用內含 25 kDa molecular weight cut 的分子篩離心管，將 26 kDa 的 GST 與 13 kDa 的重組 FIP-*gts* 分離開，則能得到較純的重組 FIP-*gts* 約 9mg。

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 3ml LB，作為大量表現菌液的菌種，再製備含有 Ampicillin (50μg/ml)之 LB broth 共 2 公升，取 40g LB Broth 溶於二次水中攪拌均勻再加入 1M $MgSO_4$ 20ml，最後補二次水到 2L，並分裝到 4 個大錐形瓶中，每瓶 500ml，以 121℃，15 lb 滅菌 20 分鐘，待冷卻後加入 Amp (50mg/ml)，在各錐形瓶中加 500μl 並混合均勻，再加入上述預先製備的小量菌種，每瓶加入 1.5ml，於 37℃培養箱中震盪培養 3 至 4 小時，直到 OD_{600} 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 250μl 的 1M IPTG 予以刺激，並更改培養箱溫度為 30℃繼續震盪培養達 3 小時，再將菌液以 4℃，9500rpm 離心 20 分鐘後，取 60ml resuspension buffer (需現配) 【10mM Tris-HCl, pH 7.5，100mM NaCl，1mM $MgCl_2$，1mM DTT，60mg Lysozyme】將菌液沉澱物再懸浮，於 37℃水浴槽中作用 15 分鐘，即置於-80℃。隔日於 37℃水浴回溫後，再用超音波均質機在冰上打破細胞，每次約 10 秒，每次間隔 10 分鐘預冷，反覆共 6 次。之後加入 DNase (10mg/ml)及 RNase A (10mg/ml)各 40μl，於 37℃

水浴槽中作用 15 分鐘，以 4℃，12000rpm 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 500μl 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 OD_{280} 總濃度使用。

1. 融合蛋白的純化

以 50ml 的 PBS 緩衝液【150mM NaCl，16mM Na_2HPO_4、4mM NaH_2PO_4，pH 7.3】清洗 Glutathion sepharose 4 Fast Flow column (約 2ml)，再以 50ml 含 1mM DTT 的 PBS 緩衝液平衡管柱，接著通入菌液上清液，再以 50ml 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 OD_{280} 吸光值低於 0.05 後，即可再加入 elution buffer 沖流約 50ml【5mM reduced form Glutathione，50mM 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 2ml，並測其在 280nm 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。

2. 重組 FIP-*gts* 的純化

將 OD 值大於 0.5 的蛋白液收集起來，每 1mg 融合蛋白以 0.2 Unit Thrombin (Roche)酵素於 22℃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 確定純化效果，若尚未切完全，則持續補充 Thrombin。利用陽離子交換樹脂 CM-52 (0.01 M sodium acetate, pH 5.2)，GST 會結合在 CM-52 管柱上，所以先收集為結合在管柱上的蛋白所獲得的 *re*FIP-*gts* 純度可利用 SDS-聚丙烯電泳進行分析。

(二) 靈芝多醣體：與順天堂的順天生物科技公司簡督憲總經理聯絡，索取該公司靈芝多醣體原料藥。

(三) 靈芝帖類：與雙鶴集團陳光地所長索取其原料藥。

二、In vitro 方式：了解在有過度表現點突變的 p53 基因肺癌細胞中對於 FIP-gts、多醣體及帖類處理後與細胞運動性、轉移性及侵入性之關係用以輔助及減緩肺癌轉移

(一) 利用 colony formation 分析 FIP-gts、多醣體或帖類對細胞的

毒性

肺癌細胞（$1X10^6$）分至 6 公分盤中，隔天加以不同濃度（0, 0.5, 1, 2, 4ug/ml）的 FIP-gts、多醣體或帖類處理 24 小時，再把細胞打下來，以每盤 400 個細胞種至 6 公分盤，37℃繼續培養 12 天，用以 1×PBS 清洗細胞二次，再加入 0℃ 95% ethanol 2ml 於每盤細胞中，靜置室溫 20min，倒掉 ethanol 後再加入每盤 2ml 之 10% Geimsa stain（用二次水加以稀釋原倍 Geimsa stain），室溫中靜置染 30min，回收染劑並以清水輕輕冲去殘留染劑，等晾乾後計數並統計細胞群落數。

(二) 在經過 FIP-gts、多醣體或帖類處理後算細胞存活率看其對細胞的毒殺性

肺癌細胞分至 6 公分盤中，隔天加以不同濃度（0, 0.5, 1, 2, 4 ug/ml）的 FIP-gts、多醣體或帖類處理分別在第一、二、三天收細胞，收集細胞方式為，將細胞培養液收集至 15ml 離心管內，用 1×PBS 清洗細胞二次，之後加 0.5ml 的 TE buffer，置於室溫 1min 將細胞打下來，接著用所收集的細胞培養液中和 TE buffer 的反應，再將細胞收到 15ml 離心管裡，離心 800rpm，5min，接著將上清液倒掉，用 0.5ml 的 1×PBS 將細胞打散，取 20μl 的細胞懸浮液，再外加 5μl Trypan blue solution，用細胞計數器數細胞的數目。

(三) 以細胞傷口癒合分析（wound healing assay）先把有過度表現點突變的 p53 基因及一般肺癌細胞在 FIP-gts、多醣體或帖類處理後作其細胞運動性測試

肺癌 A549 細胞及突變型 p53(H179Y)的細胞株以每盤 2×10^5 個細胞種植至 24 孔的培養盤中。待細胞長到幾乎全滿時先處理 mitomycin C (25μg/ml) 30 分鐘以抑制細胞生長含 0.5% FBS 之培養液 24hr 以抑制細胞生長，接下來用吸管尖（blue tip）在每一個孔中劃線，其距離約為 80μm，肺癌細胞分 24 孔的培養盤中。待細胞長到幾乎全滿時，再用 1×PBS 洗細胞，含有不同濃度的 FIP-gts、多醣體或帖類，每 24 個小時，以 95%乙醇固定分鐘，10% Giemsa 染色並照相，以觀察細胞移動情形。

(四) Gelatin Zymography

將 A549 細胞以 1×10^5 個種植至 24 孔盤中，隔天（16hr 後）

加入不含血清 200μl/孔（去除血清中內含之 MMP 的干擾）的細胞培養液並同時添加不同濃度（0, 0.5, 1, 2, 4ug/ml）的 FIP-gts、多醣體或帖類培養 24hr，並收集細胞培養液，再用 1×PBS 清洗細胞，用 CE buffer【配方同 western 的 CE buffer】收細胞並以 Bio-Rad Protein Assay 定量蛋白，依此結果來作為培養液中蛋白的定量值。接下來將配製含 0.1% Gelatin 之 8% SDS-PAGE 電泳上膠片：

	8 %
d.d. H_2O	3.0 ml
1.5M Tris pH 8.8	2.0 ml
(38.67:1.33) Acrymide: Bis	2.2 ml
10 % SDS	0.08 ml
APS (10 mg/ml)	0.4 ml
2 % Gelatin (sigma#G9391)	0.4 ml
TEMED	10μl
Total Volume	8ml

(注：2% Gelatin 是以 2g/100ml d.d.H_2O，在 55℃溶解)

而上膠則和西方點墨法一致。將之置於含有電泳緩衝容液的電泳槽中，把之前所取之培養液與 5×染劑【0.1% SDS、104mM Tris-HCl pH 6.8、50% Glycerol、0.125% bromophenol blue】均勻混合注入膠瑱中跑電泳。在電泳結束後以 Washing Buffer【40mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM $CaCl_2$、2.5% Triton X-100】在室溫下沖洗 30min 2 次，然後加入 Reaction Buffer【40mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM $CaCl_2$、0.01% NaN_3】在 37 ℃恆溫箱中反應 12hr，最後反應完之膠片以 Coomassie blue【0.2% Coomassie blue R-250、50% methanol、10% acetic acid】染色 30min，再以褪色液【10% acetic acid 和 20% methanol】退染，待退染完成後，先將膠片浸至於乾膠液【50% ddH_2O、50% methanol 和 0.33% glycerol】中 30min，再用玻璃紙和壓克力板將膠片製成乾膠觀察。

(五) 利用 Boyden chamber 來觀察 FIP-gts、多醣體或帖類處理後對肺癌細胞之細胞運動性、轉移性及侵入性分定量的肺癌細胞

以 Neuro Probe Inc.出產的 Boyden Chamber 48 well 進行，在 bottom chamber 加入 22ul 含有 10%FBS 的培養基（培養基需微

凸，以利 chamber 與 medium 緊密接觸)，蓋上 polycarbonate member，8um pore (Neuro Probe Inc.)（需平行移入)，放上橡膠片，蓋上上層 chamber。在 Top chamber 計算每個 well load $1.5x10^4$ cells/50ul（依細胞種類而定)（注意不可以有氣泡產生)（註：含有 Matrix Gel (BD Pharmagen) 適用於 invasion 分析，需加入 10ul，並且置於 Hold 中，大約 4 小時後才能加入細胞。）並同時添加不同濃度（0, 0.5, 1, 2, 4ug/ml）的 FIP-gts、多醣體或帖類繼續培養 37℃，5% CO_2 incubater 6hr，取出中間的 polycarbonate member（要做記號)。Ice-cold 95% Methanol 固定 10min（欲染色那面朝下，浮在水面，勿壓到最底)，室溫待乾約 5min（欲染色的那面改朝上)，10% Gemsia stain 30min（欲染色那面朝下，浮在水面，勿壓到最底)，最後以 ddH_2O 清洗一下，於顯微鏡下（200X）隨機選視野，選出 3 個視野並計算細胞數目。

(六) 西方點墨法（westrn blot）分析：給予 FIP-gts、多醣體或帖類處理過的細胞和細胞凋亡或調控一些和轉移有關的蛋白

首先將肺癌細胞處理不同濃度的 FIP-gts、多醣體或帖類，收集培養基蛋白，並測其蛋白量，進行 SDS-PAGE 分析，再轉換（transfer）至膜上，用 5%牛奶的 TTBS 進行 Blocking，以蛋白專一性 MMp-2 及 MMP-9 的一次抗體去做結合，接下用二次抗體去和一次抗體做結合，最後用 ECL 成色至底片，用此來偵測細胞內蛋白的變化。

參、結果

一、松杉靈芝免疫調節功能蛋白對肺癌細胞（A549 及 H1299）與正常肺細胞（BEAS-2B 及 MRC-5）造成之細胞毒性

FIP-*gts* 會對肺癌細胞產生毒性造成細胞生長的被抑制，因此本實驗的目的為利用 MTS assay 偵測 FIP-*gts* 對細胞產生毒性的程度為何，分別以 0、0.15、0.3、0.6μM 的 FIP-*gts* 處理肺癌及肺細胞 48 小時，最後 60 分鐘加入 MTS/PMS reagent 測定波長 490nm 時的吸光值，計算細胞存活率，以未處理 FIP-*gts* 細胞之存活率為 100%，而結果發現處理 1、2、4、10μg/ml FIP-*gts* 細胞群落形成分別為 97.3%、91.5%、69.6%、39.0%（圖一 A, B），除了處理 1μg/ml 的 FIP-*gts* 以外處理其他的濃度都明顯有造成存活率的差異（以 student T test 計算得 $p<0.05$，且具有統計上的意義）。

二、松杉靈芝免疫調節功能蛋白對細胞移行性（Migration）之影響

一般癌症細胞會先有移行性，接下來才會進行轉移作用（metastasis），由於 FIP-*gts* 刺激 A549 細胞後會使細胞的型態產生變化，推估可能因此會改變細胞的移行性，本實驗的目的為處理不同濃度的 FIP-*gts* (0, 2 ,4, 10μg/ml)後，利用 wound healing assay 在不同時間觀察細胞有無運動性，結果發現隨著時間增加 48 小時前不管在哪種濃度處理的細胞中都無法有細胞有明顯的移動出來，直到 72 小時，隨著濃度的增加再處理較低濃度 FIP-*gts* 0, 1, 2μg/ml 都還有看到細胞移出，把原本所劃的線遮住，而到了處理高濃度 4, 10μg/ml 時細胞幾乎不會移出，且有一點細胞死亡而浮起的現象。在 96 小時時又更明顯，沒有處理 FIP-*gts* 移出的相當明顯，有 1/3 左右的劃線被蓋住，而其他處理 FIP-*gts* 的細胞只有在低濃度有細胞移出，而移出細胞的量也沒有超過沒有處理 FIP-*gts* 的細胞的數量（圖二）。

三、松杉靈芝免疫調節功能蛋白對細胞轉移能力之影響

由於之前已發現重組 FIP-*gts* 蛋白刺激 A549 肺癌細胞後會使細胞的型態產生變化，且利用 wound healing assay 也初步發現到重組 FIP-*gts* 蛋白可以有效的抑制 A549 肺癌細胞移動的發生。所以本實驗的目的著重於處理不同濃度的重組 FIP-*gts* 蛋白（0, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60, 0.75μM）後，並進一步利用 Boyden chamber 觀察重組 FIP-*gts*

蛋白是否可以抑制細胞移動性。一般 A549 肺癌細胞需 8 小時的培育後，才能觀察到細胞移動現象。結果發現當加入重組 FIP-*gts* 蛋白濃度到達 0.15μM 時，就抑制了 50% ($p<0.05$) 以上的 A549 肺癌細胞移動的發生（圖三 A）。接著，我們使用類似血管基底膜的 Matrix Gel 做細胞的侵襲現象的分析，一般 A549 肺癌細胞需要 9 小時培育後始能有侵襲現象的發生，其結果發現與抑制細胞移動的情形相類似，但重組 FIP-*gts* 蛋白濃度下降至 0.018μM 時，就抑制了 50% ($p<0.005$) 以上的 A549 肺癌細胞的侵襲現象的發生，重組 FIP-*gts* 蛋白對於細胞的侵襲能力較細胞移動性上有比較好的抑制效果（圖三 B）。

A549 之 p53 為野生型（Lieber et al., 1976）。而 50%以上肺癌的 p53 為突變型，我們特地構築一突變型 p53 (H179Y)的基因轉殖到 A549 細胞株，使此細胞株更高度惡化及轉移能力更強（圖四）作為比較，以利分析抑制轉移能力。結果發現與抑制 A549 細胞移動的情形相類似（圖四）。接著我們評估各種靈芝萃取液對 A549/細胞轉移能力之影響。結果發現雙鶴高多醣體靈芝（4μg）和雙鶴極品多醣體（4μg）最為明顯（圖五）。

四、觀察松杉靈芝對 A549 肺癌細胞之 MMP-2 的影響

細胞的轉移性和細胞所分泌的 MMP (Matrix metalloproteinases) 有很大的關聯性存在，所以利用 gelatin-zymograpghy 分析細胞所分泌的 MMP-2 的活性，看是否處理重組 FIP-*gts* 蛋白後，會不會影響細胞分泌的 MMP-2 活性，進而導致細胞的移行性改變。結果發現如我們所推測，MMP-2 的活性表現有很明顯的隨著重組 FIP-*gts* 蛋白濃度增高而降低（圖六），且當濃度到達 10μg/ml 時就幾乎看不到 MMP-2 活性的表現，因此推測重組 FIP-*gts* 蛋白可抑制細胞移動性與 MMP-2 的分泌量的降低有密切的關係存在。

五、觀察松杉靈芝對 A549 肺癌細胞之細胞移行性（Metastasis）相關的 mRNA 表現情形

由於細胞在加入重組 FIP-*gts* 蛋白到 0.15μM 濃度後，細胞的移動能力有顯著的影響，所以分析與細胞轉移相關的最主要因子如 MMP-2 和 MMP-9，和 TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinases 為 MMP 的抑制物) 。因此分別以重組 FIP-*gts* 蛋白（0, 0.30, 0.60, 1.20μM）加入 48 小時後，利用 RT-PCR 的方式對以下的基因進行分析比較，結果發現在 A549 肺癌細胞株中 TIMP-1（圖七）的表現量，

在當加入重組 FIP-*gts* 蛋白濃度到達 1.20μM 有些微增加的情形，且 MMP-9 的量（圖七）也有些微被抑制現象，但兩者的 TIMP-2 變化情形並不明顯（圖七），但 MMP-2 的量（圖七）也都呈現被抑制現象。在型態上，可明顯的觀察到 FIP-*gts* 對細胞造成型態上的變化，且 E-cadherin 和細胞附著、抑制癌症發展有關，因此我們也用 RT-PCR 分析 E-cadherin 的 mRNA 狀態的表現情況。結果卻發在加入 FIP-*gts* 不同濃度（0, 2, 4, 10μg/ml）在 24 小時後不管是在高濃度還是低濃度下 E-cadherin 都沒有任何的變化（圖八），所以 FIP-*gts* 並不是透過 E-cadherin 造成細胞型態改變而抑制癌症的發展。

六、觀察 A549 肺癌細胞在處理重組 FIP-gts 後，細胞之 p53、p21 和 Nm23 蛋白表現

(一) 處理不同時間與不同濃度重組 FIP-*gts* 蛋白對 A549 肺癌細胞的 p53 蛋白的影響

在很多不同的癌症中都是經由 p53 突變或缺失所產生的，所以首先研討在重組 FIP-*gts* 蛋白刺激之下細胞 p53 的變化情形。結果發現 A549 肺癌細胞的 p53 蛋白在重組 FIP-*gts* 蛋白 0.60μM 刺激 24 小時後有些為增加情形，而在 48 小時後，更可以明顯看到當重組 FIP-*gts* 蛋白濃度在 0.60μM 時，p53 蛋白表現量有大量增加情形（圖九）。

(二) 處理不同時間與不同濃度重組 FIP-*gts* 蛋白對 A549 肺癌細胞的 p21 蛋白的影響

由於 p53 表現結果使我們好奇 p53 下游基因 p21 的表現情形，而 p21 為 G1 主要的一個 checkpoint，結果顯示 p21 蛋白和 p53 蛋白的表現情形類似，在經過重組 FIP-*gts* 蛋白 0.60μM 刺激 48 小時後，表現量也增加了許多（圖九）。

(三) 處理不同時間與不同濃度重組 FIP-*gts* 對 A549 肺癌細胞的 Nm23 蛋白的影響

在很多不同的文獻中都闡述 Nm23 腫瘤抑制蛋白與細胞轉移有密切的關連性。我們也好奇在重組 FIP-*gts* 蛋白刺激之下細胞內 Nm23 蛋白的變化情形。結果顯示 Nm23 蛋白的表現量在經過重組 FIP-*gts* 蛋白 0.60μM 刺激 48 小時後和 p53、p21 蛋白一樣，表現量突增（圖九）。

七、觀察松杉靈芝對 A549 肺癌細胞之 Nm23 mRNA 表現情形

之前已經發現 Nm23 蛋白在加入重組 FIP-*gts* 蛋白之後有明顯增加的情形，故想了解在其 mRNA 表現情形又是如何。結果我們可以看到當重組 FIP-*gts* 蛋白濃度加到 1.20μM 後，Nm23mRNA 也明顯增加了許多。重組 FIP-gts 蛋白可誘導 Nm23 基因表現出蛋白，進而達到抑制細胞轉移的發生（圖十）。

八、觀察過度表現 Nm23 蛋白的 A549 肺癌細胞之 MMP-2 的表現情形

由先前的實驗證實重組 FIP-*gts* 蛋白可以抑制細胞分泌出的 MMP-2 蛋白活性和 mRNA 的表現量，且也看到加入重組 FIP-*gts* 蛋白之後，細胞的 Nm23 mRNA 和 Nm23 蛋白也被活化。所以想知道 Nm23 蛋白與 MMP-2 蛋白表現和活性是否有相關性的存在。利用 gelatin-zymograpghy 分析 A549/Nm23 細胞所分泌的 MMP-2 的活性是否有受到過度表現 Nm23 蛋白而有所影響，結果發現 MMP-2 的活性沒有顯示出來（圖十一），因此得知過度表現 Nm23 蛋白的細胞株可抑制 MMP-2 蛋白的表現，進而無法產生 MMP-2 活性。

九、松杉靈芝對 A549/Nm23 肺癌細胞之細胞移行性（Metastasis）之影響

由上述實驗可知，在過度表現 Nm23 蛋白的細胞株中，與轉移相關的 MMP-2 mRNA、MMP-2 蛋白和 MMP-2 活性都降低了，所以接下來我們想知道它在轉移方面的表現情形又是如何。結果我們發現再將過九小時的培育之後，有過度表現 Nm23 蛋白的細胞株和轉染 pcDNA 的細胞株來比較的話，只有 30%左右的細胞有移動的情形發生，換句話說當 A549 肺癌細胞表現出 Nm23 蛋白之後，Nm23 蛋白會透過抑制 MMP-2 的表現去抑制 A549 肺癌細胞移動的情形發生(圖十二）。

肆、討論

在癌細胞的轉移過程中，伴隨著細胞許多生理狀態的改變，其中包含了細胞與細胞外基質之間結合能力的改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞，及細胞外基質的分解。緊接著癌細胞會穿過細胞外基質，侵入血液或淋巴系統，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官（Bremnes et al., 2002; Cavallaro and Christofori, 2001; Ellenrieder et al., 1999）。最後癌細胞大量增生，藉由奪取正常組織器官的養分而造成正常組織器官功能的耗弱，是造成癌症病人的死亡的主要原因。肺癌是具有高度轉移能力的癌症，可藉由淋巴及血液系統散播到身體其他的組織器官，造成癌症的轉移擴散（Bremnes et al., 2002），所以即使腫瘤經由手術切除或放射線治療後，依舊難以根治，造成病人癒後狀況不佳。

在臨床上也有許多抑制細胞轉移的藥，如 SU5416 的新藥，作用機轉是可以抑制轉移性大腸直腸癌組織的血管生成（需要量 145mg/m^2），使腫瘤組織得不到養分的供應而死亡（Berlin, 2002; Ellis et al., 2002; Shaheen et al., 1999）；大部分乳癌患者對雌激素具敏感度，這表示癌細胞會因為雌激素而成長，tamoxifen（需要量 20mg/day）和 Aromasin（需要量 25mg/day）這兩種藥物為較新的 aromatase 抑制劑-可降低雌激素的效果，因此達到抑制乳癌細胞的轉移 (Brodie and Mouridsen, 2003; Ingle, 2004; Mouridsen, 2004) ；在 1997 年 Yasunari 等人也指出在血管的平滑細胞中（Vascular smooth muscle cell）Dopamine（需要量 10μmol/L）可經由 Dopamine D1-Like Receptors 達到抗細胞增生和抗轉移 (Yasunari et al., 1997) ；2004 年 2 月美國食品及藥物管理局正式批准世界第一種抑制血管新生（Angiogenesis）的抗癌藥物—Bevacizumab（需要量 5mg/kg），作為一線治療轉移性的結直腸癌 (Alekshun and Garrett, 2005; Barriuso Feijoo et al., 2004; Labianca et al., 2004; Moses et al., 2004; Sparano et al., 2004)。此藥是一種專門抑制血管內皮生長素的單源抗體。血管內皮生長素能與某些細胞結合後，刺激新血管形成。但當血管內皮生長素與 Bevacizumab 結合時，血管新生便受到抑制，干擾血液供應到腫瘤，令腫瘤細胞生長減慢。此藥不能單獨使用來治療癌症，它要配合其他抗癌藥物來增強化療療效。在臨床上常使用 Curcumin（一般稱為 turmeric，10g/day）抑制 MMP-9 的活性，來達到抑制細胞的轉移 (Aggarwal et al., 2003)。Falardea 等人提出 Neovastat 可抑制血管增生和 MMP-2 的表現來達到抑制肺癌細胞轉移的發生 (Falardeau et al., 2001)，但目前只到臨床試驗第二期，臨床試驗第三期仍在評估中。而

Melanie 等人提出利用 5-Aza-CdR (75nM)去減少乳癌病人的 Nm23 promoter 的甲基化，而使得 Nm23 表現量增加，而達到抑制乳癌細胞的轉移 (Hartsough et al., 2001)。

一般來說，在靈芝之中具有抗癌效果的主要以多醣體或是三帖類，由松杉靈芝（*Ganoderma tsugae*）菌絲體中純化的免疫調節功能蛋白－FIP-*gts* 具有誘發人類週邊血液單核球的增生和免疫調節活性 (Hsu, 1996)。為了瞭解重組 FIP-*gts* 蛋白對細胞轉移的影響，故以高度惡化的肺癌上皮細胞和具有極高度轉移能力-A549 肺癌細胞來作為研究。我們團隊已知當細胞處理重組 FIP-*gts* 蛋白在不同時間下，由顯微鏡下觀察其細胞型態，發現其細胞型態由飽滿的多邊形變成圓形緊密狀，且細胞與細胞之間鍵結的能力似乎也減弱，使細胞不能緊密的貼附在一起，形成鬆散、分散的一顆顆單獨的細胞（王宗煥碩士論文）。且依照加入重組 FIP-*gts* 蛋白濃度而有程度上的不同，濃度越高其細胞緊縮成圓形的程度和細胞變形的量也就越多。因此就推測重組 FIP-*gts* 蛋白可能會經由影響細胞型態的改變，進而影響其細胞的移動能力或貼附能力。本實驗主要是以 Boyden chamber 來進行細胞轉移的分析，結果顯示重組 FIP-*gts* 蛋白能有效抑制具有高度轉移能力的 A549 肺癌細胞的轉移。

Rho GTPases 家族有很多功能包括了細胞骨架的改變、細胞表面貼附的能力、轉譯活性、調控細胞週期和轉型作用等，而其中主要藉由調控 actin filaments 與 focal adhesion complex 相關蛋白來促使細胞伸出突觸以便移動，而細胞這種延伸（spreading）的能力也就決定了細胞的移動性 (Yoon et al., 2001)。細胞的移動性包括細胞骨架的改變、細胞表面貼附的能力，同時也是決定了癌細胞在轉移的過程中，是否能順利到達目標器官，在本實驗中，我們利用 Boyden chamber assay 觀察細胞的轉移的能力。結果證實了，當細胞處理重組 FIP-*gts* 蛋白 0.15μM 後就可明顯抑制細胞的移動，且當 FIP-*gts* 的濃度高達 0.30、0.75μM 時，發現 A549 細胞的很少會有移動的現象（$p<0.005$）。在侵襲上的分析也呈現相同的結果，但濃度降到 0.018μM 時就可以抑制細胞轉移的發生（$p<0.005$），所以重組 FIP-*gts* 蛋白對於細胞的侵襲能力上有比較好的抑制效果。

當細胞受到外來刺激時，如 UV、cisplatin 等可以活化並使 p53 的蛋白變穩定，而 p53 可以活化下游的基因--p21，p21 為細胞週期 G1 期的主要 checkpoint (Demidenko and Blagosklonny, 2004)。而之前也已經發現到重組 FIP-*gts* 蛋白主要造成細胞存活率的降低的主要原因是由於造

成 G1 期停滯，因而抑制細胞增生所造成的，且會伴隨相當微量的細胞凋亡現象。利用 Western blotting 的方法，發現 A549 肺癌細胞經處理重組 FIP-*gts* 蛋白（0.6μM）48 小時後，發現 p53 蛋白有被誘導出來，且其下游基因 p21 也有因此被活化表現出來，證明由於 p21 的被活化而使細胞週期在 G1 期有停滯的現象。而在許多文獻 (Chen et al., 2005b; Fischbach and Settleman, 2003; Zheng et al., 2005; Zollo et al., 2005) 中，都闡述 Nm23 蛋白表現量與許多癌細胞的 metastasis 有莫大的關聯性存在，故將 A549 肺癌細胞加入重組 FIP-*gts* 蛋白（0.6μM）48 小時後，利用 Western blotting 的方法進行 Nm23 蛋白表現分析，結果發現 Nm23 蛋白也有大量表現的情形，Nm23 mRNA 的量受到重組 FIP-*gts* 蛋白（1.2μM）刺激之後也顯示相同的情形。

由於發現重組 FIP-*gts* 蛋白會促進細胞的 Nm23 mRNA 和 Nm23 蛋白表現量增加，猜想 Nm23 蛋白在 A549 肺癌細胞中可能扮演抑制細胞轉移的重要因子，所以利用轉染的方式讓細胞過度表現的 Nm23 蛋白。發現在 A549 肺癌細胞，若過度表現 Nm23 蛋白的確可以抑制細胞的轉移情形發生，也發現 MMP-2 蛋白表現量下降和分泌出的 MMP-2 完全被抑制住的情形。換句話說，Nm23 蛋白的表現和 MMP-2 的表現呈反比的關係 (Ohba et al., 2005)。所以，過度表現 Nm23 蛋白的 A549 肺癌細胞可透過抑制 MMP-2 的活性而達到抑制細胞轉移的效果，此現象也可說明 Nm23 蛋白在臨床上為何可作為癌症預後的指標 (Liu et al., 2005)，也就是 Nm23 表現量越高，預後就越好。但是在口腔鱗狀細胞癌卻發現表現 Nm23 的細胞，與 MMP 的活性並無太大的關聯性的存在 (Khan et al., 2001)，所以極有可能在不同細胞中 Nm23 蛋白調控的機制不同所導致。綜合以上這些結果，也使我們更加相信肺癌細胞可以透過調控 Nm23 蛋白的表現來達到抑制細胞轉移的能力。因此我們認為 Nm23 蛋白在 FIP-*gts* 蛋白抑制細胞的轉移能力扮演著重要的角色，未來我們將近一步分析 Nm23 promoter 的轉錄因子，找出參與 FIP-*gts* 蛋白誘導 Nm23 基因的調控因子。

在轉移擴散的癌細胞中，癌細胞藉由蛋白質水解酵素來分解細胞外基質，導致細胞與細胞間基質的分離，促使癌細胞具有移動性。由過去的文獻中指出，基質金屬蛋白水解酵素家族中的 MMP-2 與 MMP-9 會被大量的表現在許多的惡性腫瘤中 (Johnsen et al., 1998)，因此 MMP-2 與 MMP-9 的表現與癌細胞的轉移和侵入具有高度相關性 (Curran and Murray, 2000; Liabakk et al., 1996)。由於 serum 中含有大量的 MMP-2 和

MMP-9，為了排除 serum 的干擾，於是實驗中採取 serum starvation 的方式以重組 FIP-*gts* 蛋白處理 A549 肺癌上皮細胞，來分析 MMP 活性，並以 Bio-Rad 定量蛋白濃度當細胞數定量的工具，以提高 gelatin zymography assay 的準確性。由實驗中證實了，當細胞處理高濃度的重組 FIP-*gts* 蛋白可以明顯抑制 MMP-2 活性的表達，並且有 dose-dependent 的現象。而 MMP-9 在此細胞株中，只有很微量的分泌，其活性不易偵測。而在 RT-PCR 分析方面，重組 FIP-*gts* 蛋白會增加 A549 肺癌上皮細胞 TIMP-1 mRNA 的量，亦即重組 FIP-*gts* 蛋白可以藉由誘導 TIMP-1 mRNA 的量增多，來減少 MMP-9 mRNA 的蛋白量，但由於合成的量與 MMP-2 mRNA 比較之下，少了許多，所以在活性分析方面就無法看到其表現。但是，TIMP-2 的 mRNA 表現並無太大的差異性存在，在 MMP-2 mRNA 方面可以看到隨著加入的重組 FIP-*gts* 蛋白會增加，呈現很明顯下降的趨勢，也就是說在 mRNA 層次上，重組 FIP-*gts* 蛋白會抑制 MMP-2 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表現，活化 TIMP-1 mRNA，進而控制分泌出的 MMP 蛋白來達到抑制肺癌細胞的轉移情形。

伍、結論與建議

有許多報導指出，靈芝具有抑制腫瘤生長的能力，但大多為多醣體和三帖類。由松杉靈芝（*Ganoderma tsugae*）當中發現的真菌類免疫調節蛋白稱為松杉靈芝免疫調節蛋白（Fungal immunomodulatory protein, FIP-*gts*），在此研究中我們利用已選殖此蛋白基因的重組蛋白工程在大腸桿菌中表現並純化得到 *re*FIP-*gts*。在之前使用受傷癒合分析（wound healing assay），已發現隨著加入重組 FIP-*gts* 蛋白濃度的增高，相對的也增強了抑制細胞移動性，本研究更進一步利用 Boyden Chamber 去分析證實重組 FIP-*gts* 蛋白可以抑制細胞移動（migration）及侵襲能力（invasion），分別處理 0.075μM 時只可以抑制 11%左右的細胞移動，在抑制侵襲能力方面，分別處理 0.075μM 時就可以抑制 95%左右的細胞侵襲。在此時，我們也發現到重組 FIP-*gts* 蛋白有誘導 Nm23 抑癌蛋白及其 mRNA 活化的能力，進而導致抑制細胞的轉移能力，且在過度表現 Nm23 蛋白的 A549 細胞中，也觀察到細胞的移動能力很明顯下降許多。

而在 gelatin-zymography 中觀察到 MMP-2 的活性完全被抑制住。而用 gelatin-zymography 方式偵測 MMP (Matrix metalloproteinases)活性，重組 FIP-*gts* 蛋白會抑制 MMP-2 的分泌量。且利用 RT-PCR 的方式觀察 MMP 的抑制劑 TIMP-1 和 TIMP-2，發現 TIMP-1 受到重組 FIP-*gts* 蛋白增加其表現，但 TIMP-2 則沒有變化，而 MMP-2 的量同時也看到表現量的減少，因此得知重組 FIP-*gts* 蛋白能抑制 MMP-2 的活性，使得細胞移動性也被抑制。在未來我們會利用二維電泳觀察 A549 細胞中受到重組 FIP-*gts* 刺激後蛋白改變情況，將再進一步確定這些蛋白為何。因此，靈芝免疫調節功能蛋白（FIP-gts）在發展出預防、治療和改善抑制肺癌細胞的運動性、轉移性之藥效。期望能建立一套評估減緩肺癌轉移能力的方法，發展出能預防、治療或抑制腫瘤細胞之輔助性中藥。

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 CCMP94-RD-018 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. Bos, J. L.: ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49(17): 4682-9.
2. Chambers, A. F., A. C. Groom, et al.: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8): 563-72.
3. Conner, E. A., T. Teramoto, et al.: HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1. *Carcinogenesis* 1999; 20(4): 583-90.
4. Dang, C. V.: c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1): 1-11.
5. Giatromanolaki, A.: Prognostic role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(6B): 4373-82.
6. Hsu, C.-i.: Study on the Fungal Immunomodulatory Proteins. *Department of Medical Technology, college of medicine.* Taipei, National Taiwan University, 1996.
7. Muller, A., B. Homey, et al.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410(6824): 50-6.
8. Overall, C. M. and C. Lopez-Otin: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(9): 657-72.
9. van der Hem, L. G., J. A. van der Vliet, et al.: Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation* 1995; 60(5): 438-43.
10. Webb, C. P., G. A. Taylor, et al.: Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene* 1998; 17(16): 2019-25.
11. Zhang, Y., A. A. Thant, et al.: Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3962-5
12. Overall, C. M. and C. Lopez-Otin: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(9): 657-72.
13. mast cells in atopic and nontopic asthma and in late phase allergic reactions in the lung and skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 99-107
14. Belardelli, F.: Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS*, 1995; 103: 161-179.

15. Devillier, P., Baccard, N. Advenier, C.: Leukotrienes, leukotriene receptro antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part II: clinical studies with leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma. *Pharmacol. Res.* 1999; 40: 15-29.

16. Biron, C. A., Nguyen, K. B. Pien, G. C. Cousens, L. P. and Salazar-Mather, T. P.: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu. *Rev. Immunol.* 1999; 17: 189-220.

17. Jiunn-Liang Ko, C-I Hsu, R-H Lin, C-L Kao and J-Y Lin : A new fungal immunomodulatory protein, FIP-*fve* isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur. J. Biochem*. 1995; 228: 244-249.

18. Chen, H. Y., Chen, C. H., Yeh, M. Y., Wu, J. S., Yazawa, K., and Mikami, Y.: In vivo anti-candidal activity induced by a traditional Chinese herbal medicine. *Ganoderma lucidum*. *Jpn. J. Med. Mycol.* 1992; 33: 505-512.

19. Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J., and Lee, S. G.: Evaluation of the anti-inflammatory and liver protective effects of Anoectochilus formosanus, Ganoderma lucidum and Gynostemma pentaphyllum in rats. *Am. J. Chinese Med.* 1993; 21: 59-69.

20. Horner, W. E., Helbling, A., Lehrer, S. B.: Basidiomycete allergens: comparison of three Ganoderma species. *Allergy* 1993; 48: 110-116.

21. Kawagishi, H., Fukuhara, F., Sazuka, M., Kawashima, A., Mitsubori, T., and Tomita, T.: 5'-Deoxy-5'-methylsulphinyladenosine, a platelet aggregation inhibitor from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 1993; 32: 239-241.

22. Kino, K., Yamsshita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., and Tsunoo, H.: Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein. Ling Zhi-8 (LZ-8), from Ganoderma lucidium. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 472-478.

23. J. L. Ko., Hsu, C. I., Lin, R. W., Kao, C. L., and Lin, J. Y.: A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, Flammulina velutipes and its complete amino acid sequence. *Eur. J. Biochem.* 1995; 228: 244-249.

24. Frendscho, M. H., Kino, K., Sone, T., and Jardieu, P.: Ling Zhi-8: a novel T cell

mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. *Cell. Immunol.* 1993; 150: 101-113.

25. Miyasaka, N., Inoue, H., Totsuka, T., Koike, R., Kino, K., and Tsunoo, H.: An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, facilitates cellular interaction through modulation of adhesion molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 186: 385-390.

26. Hendrzak, J. A. and Morahan, P.: The role of macrophages and macrophage cytokines in host resistance to herpes simplex virus. *Immunol.* 1994; Series: 60, 601-617.

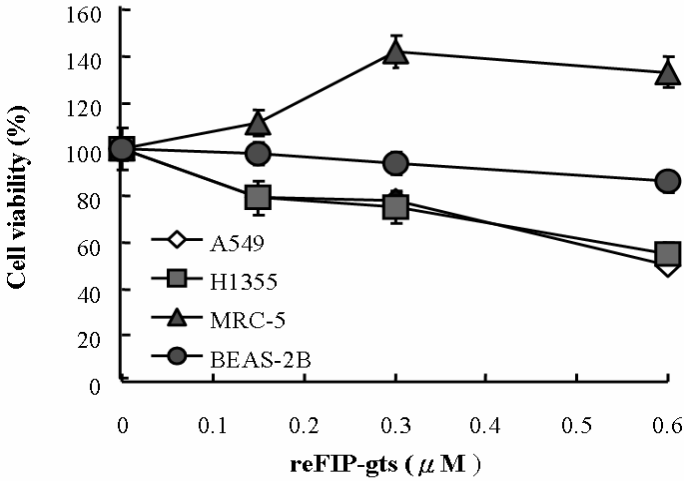
27. 伯穎、謝文斌：外科與非外科治療肺癌存活情形。*當代醫學雜誌* 2000；335：717。

28. 郭壽雄：肺癌。*當代醫學* 1998；13：8。

29. 衛生署癌症死亡登記，2003。

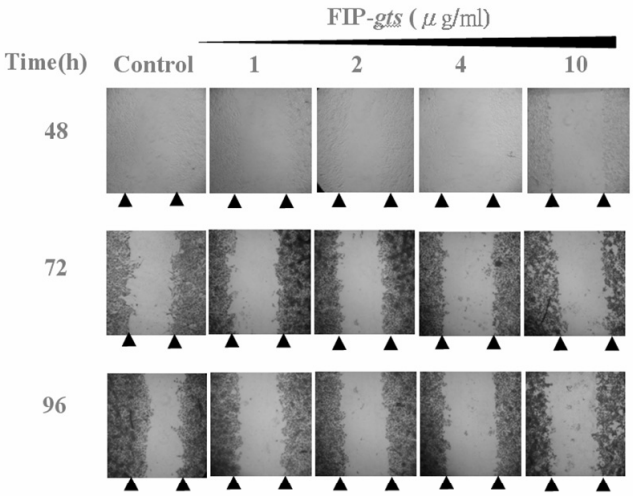
30. 林文輝：松杉靈芝免疫調節蛋白質之構造與機制之研究，台灣大學醫學院生化所碩士論文，1995。

柒、圖



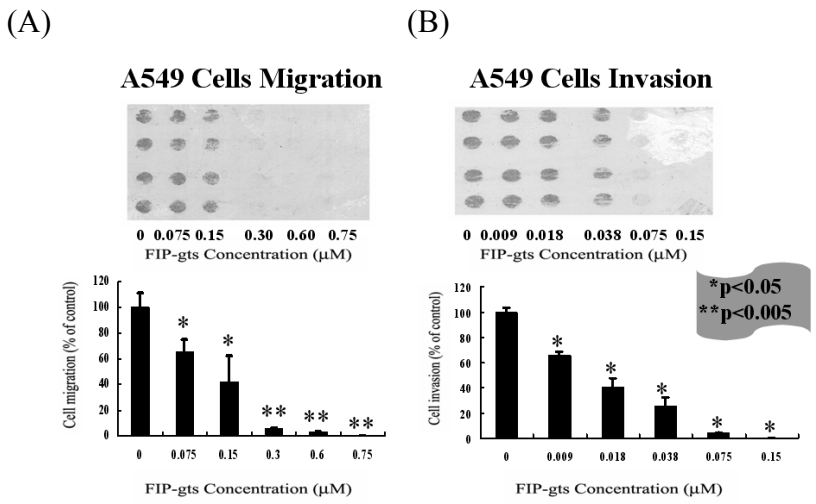
圖一　松杉靈芝免疫調節功能蛋白對肺癌（H1355 and A549）及肺細胞（BEAS-2B and MRC-5）造成之細胞毒性

A549, H1355, BEAS-2B and MRC-5 cells were treated with various concentrations of reFIP-gts (0, 0.15, 0.3 and 0.6μM for 48 h followed by MTS assay to estimate the cell viability. The data are presented as mean ± SD of triplicate experiments. The data shown are mean ± SD of triplicate experiments (* $p<0.05$, student T test).



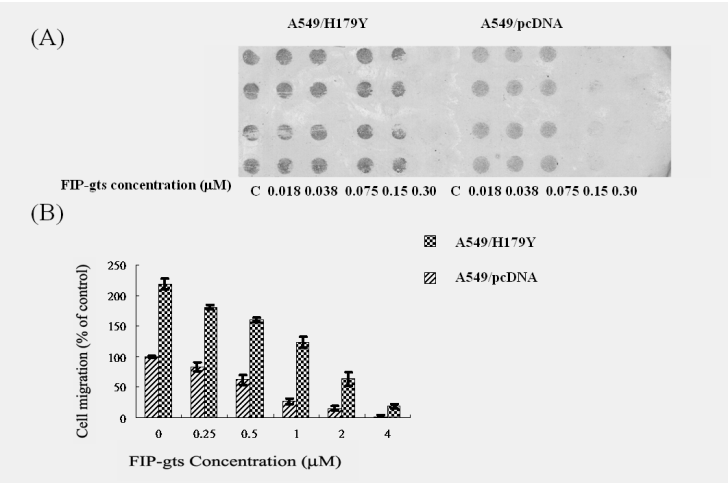
圖二　松杉靈芝免疫調節功能蛋白對細胞移行性（Migration）之影響

Wounds were done on confluent A549 cell cultures by the pipette tip (*arrowheads* show the size of the initial wound). After incubation for 72 hr, 96 hr the cells were fixed and stained by Geimsa stain.



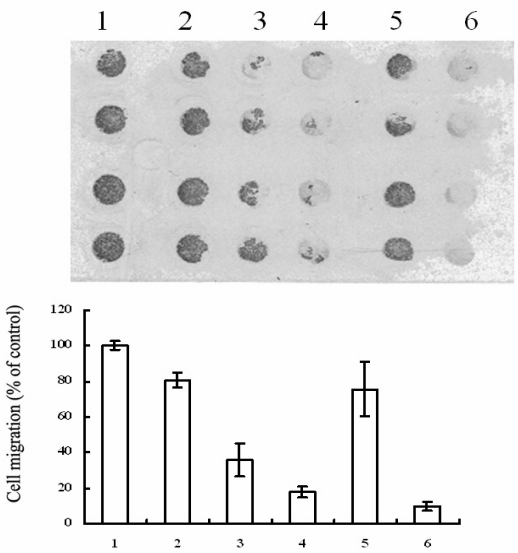
圖三　松杉靈芝免疫調節功能蛋白對細胞轉移能力之影響

(A) A549 cells were treated with FIP-*gts* (0, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60, 0.75 μM) for 8 h, and migration(A) and invasion(B) were measured by Modified Boyden chamber. Cell migration were quantified with microscope. Each bar represents mean ± SD of triplicate experiments (**p<0.01, ***p<0.001, student T test). Lane1: A549 cell migration, Lane2-6: Representative migration of the A549 cells were treated with FIP-*gts* (0, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60, 0.75μM).



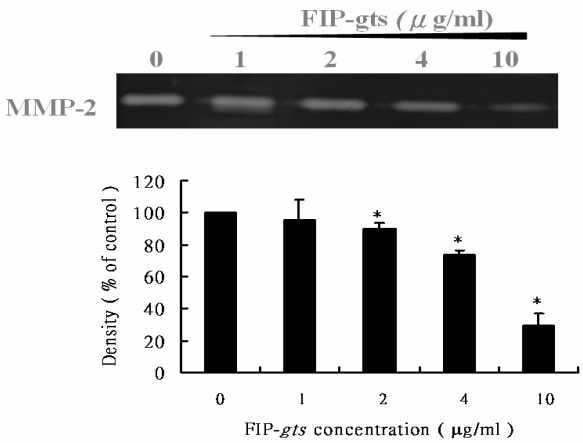
圖四　松杉靈芝免疫調節功能蛋白對 A549/H179Y 細胞轉移能力之影響

(A) A549/pcDNA and A549/H179Y cells were treated with FIP-*gts* (0, 0.018, 0.038, 0.075, 0.15, 0.30μM) for 9 h, and migration were measured by modified Boyden chamber. (B) Cell migration were quantified with microscope. Each bar represents mean ± SD of triplicate experiments.



圖五　評估各種靈芝萃取液對 A549/細胞轉移能力之影響

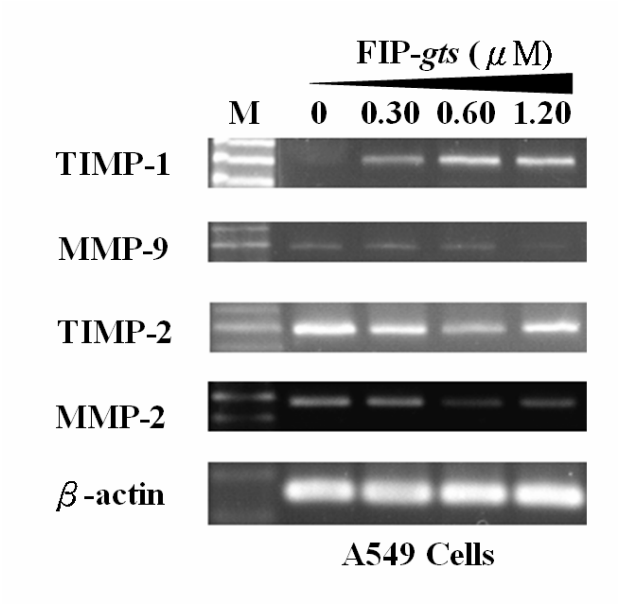
A549 cells were treated with FIP-*gts* for 9 h, and migration were measured by Modified Boyden chamber. Lane 1:A549 cell migration, Lane2: A549 cells were treated with 雙鶴極品靈芝(4μg), Lane3: A549 cells were treated with 雙鶴御品靈芝(4μg), Lane4: A549 cells were treated with 雙鶴高多醣體靈芝(4μg), Lane5: A549 cells were treated with 雙鶴高三帖靈芝(4μg), Lane6: A549 cells were treated with 雙鶴極品多醣體(4μg)



圖六　觀察松杉靈芝對 A549 肺癌細胞之 MMP-2 的影響

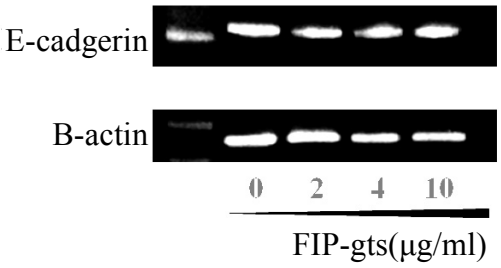
A549 cells were treated with FIP-*gts* 0, 1, 2, 4, 10μg/ml for 24 hrs. The conditioned media were collected and MMP-2 activities were determined by gelatin zymography. MMP-2 activity were quantified by densitomertic analysis. The densitomertic data shown are mean ± SD of triplicate

experiments (* p<0.05, student T test).



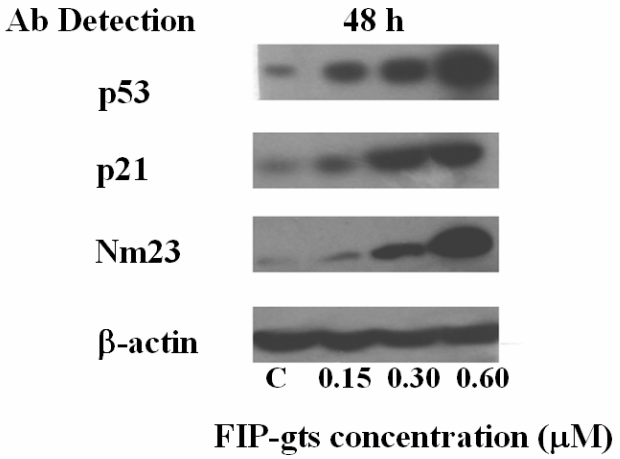
圖七　觀察松杉靈芝對 A549 肺癌細胞之細胞移行性（Metastasis）相關的 mRNA 表現情形

Total cellular RNA from A549 cells, untreated or treated with FIP-*gts* (0, 0.30, 0.60, 1.20μM) for 48 h, respectively, were analyzed using RT-PCR for β-actin and TIMP-1、MMP-9、TIMP-2、MMP-2. Lane M: 100bp DNA marker.



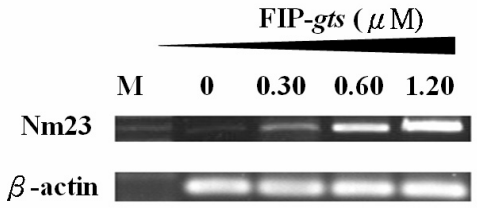
圖八　觀察松杉靈芝對 A549 肺癌細胞之細胞附著相關的 mRNA 表現情形

Total cellular RNA from A549 cells, untreated or treated with 2, 4 10μg/ml for 24 hr, respectively, were analyzed using RT-PCR for β-actin and E-cadherin.



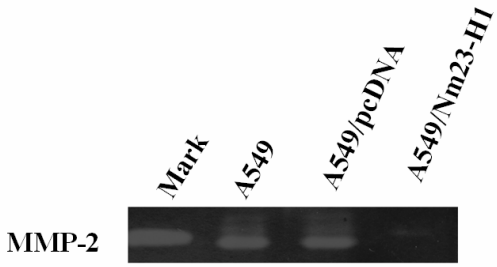
圖九　觀察 A549 肺癌細胞在處理重組 FIP-*gts* 後，細胞之 p53、p21 和 Nm23 蛋白表現

A549 cell were treated with FIP-*gts* (0, 0.15, 0.30, 0.60μM) for 48h, and total proteins were extracted and determined by Western blot analysis.

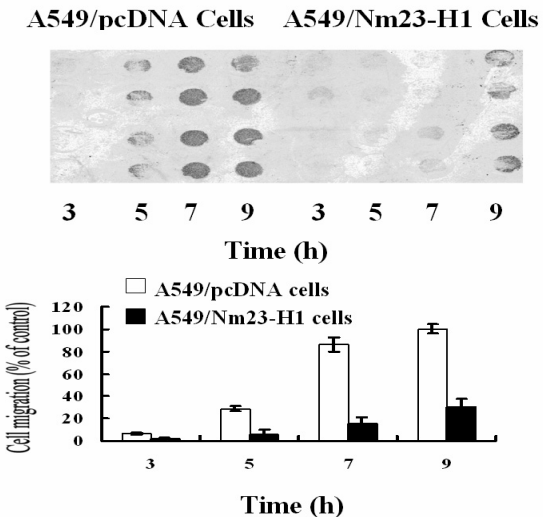


圖十　觀察松杉靈芝對 A549 肺癌細胞之 Nm23 mRNA 表現情形

Total cellular RNA from A549 cells, untreated or treated with FIP-*gts* (0, 0.30, 0.60, 1.20μM) for 48h, respectively, were analyzed using RT-PCR for β-actin and Nm23. Lane M: 100 bp DNA marker.



圖十一　觀察過度表現 Nm23 蛋白的 A549 肺癌細胞之 MMP-2 的表現情形
A549, A549/pcDNA and A549/Nm23 cells were cultured in serum free medium for 48 h. The conditioned media were collected and MMP-2 activities were determined by gelatin zymography. Lane1: A549 conditioned media, Lane2: A549/pcDNA conditioned media, Lane3: A549/Nm23 conditioned media, Lane M: Human serum 10 X dilute with 1 X PBS.



圖十二　松杉靈芝對 A549/Nm23 肺癌細胞之細胞移行性 (Metastasis)之影響
At indicated time, A549/pcDNA cell and A549/Nm23-H1 cells migration were measured by Modified Boyden chamber assay.
Cell migration were quantified with microscope. Each bar represents mean ± SD of triplicate experiments.