

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文

Department of Biochemical Science and Technology

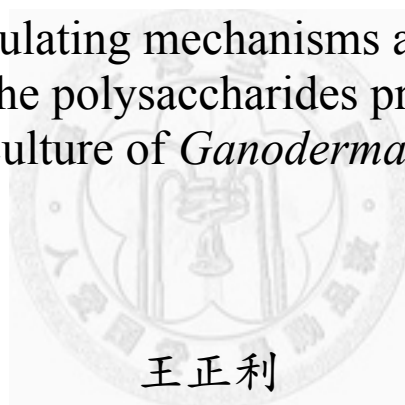
College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

台灣紫芝多醣體免疫調節機轉與功能評估

Immunomodulating mechanisms and functional
evaluation of the polysaccharides produced from the
submerged culture of *Ganoderma formosanum*



Cheng-Li Wang

指導教授：陳俊任 博士

劉文雄 博士

Advisor: Chun-Jen Chen, Ph.D.

Wen-Hsiung Liu, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

中文摘要

靈芝具有多種的藥理功能，在亞洲已有相當久遠的藥用歷史，台灣紫芝是台灣原生種靈芝，其藥用相關研究卻相當少，因此本研究以液態深層發酵培養法生產台灣紫芝胞外多醣體，探討台灣紫芝多醣體之免疫調節功能、作用機制與功能性評估。

台灣紫芝發酵液經酒精沉澱和膠體過濾層析純化可分離得 PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 三個主要分劃，其各分劃佔比分別為 $16.24 \pm 2.19\%$ 、 $55.81 \pm 2.97\%$ 和 $27.95 \pm 2.11\%$ 。PS-F2 多醣體分子量約 14 KDa，主要單糖組成為 mannose、galactose、glucose 及 fucose，分別佔 44.91%、38.64%、8.26% 及 8.02%，而醣基鍵主要以 6-Gal 和 t-Man 鍵結為主。

PS-F2 能夠刺激小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 產生 $\text{TNF-}\alpha$ 和 NO，並增強巨噬細胞的吞噬能力，並能刺激巨噬細胞增生。以 PS-F2 刺激小鼠腹腔能誘發急性發炎反應，吸引嗜中性球和單核球來到腹腔。另外 PS-F2 亦可刺激小鼠樹突細胞表面成熟標誌 CD40、CD80、CD86 及 MHC II 的表現增加，顯示 PS-F2 具有免疫調節之活性，能活化先天性免疫反應。

PS-F2 作用的受體研究方面，PS-F2 刺激巨噬細胞產生 $\text{TNF-}\alpha$ 受到 anti-Dectin-1 抗體、anti-CR3 抗體和 laminarin 顯著性抑制，TLR4 受體缺陷小鼠 BMDM 也降低了 PS-F2 刺激 BMDM 產生 $\text{TNF-}\alpha$ 的活性。以上結果顯示 PS-F2 能經由 Dectin-1、CR3 及 TLR4 受體刺激巨噬細胞產生 $\text{TNF-}\alpha$ 。

在 PS-F2 活化巨噬細胞作用機制部分，PS-F2 刺激能使 ERK、JNK 和 p38 絲裂原活化蛋白激酶磷酸化、I- κ B 降解和 NF- κ B 核移位反應。添加 ERK、JNK、p38 和 NF- κ B 訊息傳遞途徑專一性抑制劑皆可顯著抑制 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α ，確認 PS-F2 透過活化絲裂原活化蛋白激酶和 NF- κ B 訊息傳遞途徑產生 TNF- α 。此外，以 Syk 抑制劑 piceatannol 處理後也會抑制 PS-F2 刺激 RAW 264.7 產生 TNF- α 、I- κ B 降解和 ERK 磷酸化，顯示 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞會經由 Dectin-1 受體透過 Syk 活化下游 NF- κ B 和 ERK 訊息傳遞途徑。

在功能性評估方面，C57BL/6 小鼠以 PS-F2 每兩天管餵一次持續四週後，發現小鼠脾臟細胞之 T 淋巴球族群比例提高，血清中之 IgM 及 IgG 抗體濃度均有顯著增加，顯示 PS-F2 會活化 C57BL/6 小鼠體內非特異性免疫反應。

在抗腫瘤功能評估上，發現腹腔注射 PS-F2 可有效抑制 Sarcoma 180、B16 黑色素瘤細胞和 C26 腫瘤細胞之生長，抑制率分別達 67.5 %、23.7 %及 43.3 %；以管餵方式給予小鼠 PS-F2 亦有抗腫瘤之效果。腹腔注射 PS-F2 使接種腫瘤小鼠脾臟細胞之 T 淋巴球族群比例顯著性提高，其中 CD4 與 CD8 之細胞比例均有增加，特別是 CD4 細胞；而表現 CD49b 的 NK 細胞比例及其胞殺活性有些微增加；而在血清中也發現 IgM 抗體濃度有顯著增加。在 C26 腫瘤細胞模式中，腹腔注射 PS-F2 小鼠 CD4 與 CD8 T 細胞活化標誌表現 CD44^{high} CD62L^{low}，顯示 T 細胞有顯著性活化；PS-F2 在 SCID 小鼠模式不具有抗腫瘤活性，以及 adoptive transfer 試驗也都近一步確認 CD4 T 細胞和 B 細胞為主要影響抗腫瘤的免疫細胞。綜合

以上結果顯示 PS-F2 能活化先天性免疫相關細胞及後天性免疫反應，透過活化細胞介導免疫反應和體液免疫反應使腫瘤生長受到抑制，證實 PS-F2 具有抗腫瘤活性。

本研究確認以液態深層醱酵培養台灣紫芝生產之胞外多醣體 PS-F2 具有免疫調節活性及抗腫瘤功能，確立台灣紫芝多醣體於機能性食品之用途與應用。



Abstract

The fungus of *Ganoderma*, called 'Reishi', has been used as traditional medicine in Asia and has been shown to exhibit various pharmacological functions. In this study, we investigated the immunomodulating activities and antitumor functions of polysaccharides produced from the submerged culture of *Ganoderma formosanum*, a native species isolated in Taiwan.

The crude polysaccharides could be separated into three main fractions according to their sizes after alcohol precipitation and gel filtration. These three fractions were designated as PS-F1, PS-F2 and PS-F3, and the yields were $21.9\% \pm 2.19\%$, $55.81 \pm 2.97\%$, and $27.95 \pm 2.11\%$, respectively. The molecular weight of PS-F2 was about 14 KDa. The monosaccharide composition analyse by HPLC-PDA method demonstrated that PS-F2 was composed of mannose, galactose, glucose and fucose with the mole percentage of 44.91:38.64:8.26:8.02. The mainly glycosyl linkages were 6-Gal and t-Man.

We found that PS-F2 could stimulate RAW 264.7 murine macrophage cells to produce TNF- α and nitric oxide, and to enhance the phagocytic activity and proliferation of macrophages. *In vivo*, PS-F2 challenge in mice triggered an inflammatory response and led to the recruitment of neutrophils and monocytes. In addition, treatment of bone marrow-derived dendritic cells with PS-F2 resulted in the

enhanced cell-surface expression of CD40, CD80, CD86 and MHC II, suggesting that PS-F2 was able to induce the maturation of immature dendritic cells and activation of innate immune response.

Studies on the immune receptors for PS-F2 stimulated, PS-F2-stimulated TNF- α production in macrophages was significantly reduced in the presence of anti-Dectin-1 Ab and anti-CR3 Ab blocking antibody or laminarin. Moreover, PS-F2 induced TNF- α production by BMDM from C3H/HeN mice, but not C3H/HeJ mice that have a mutated TLR4 molecule, suggesting that TLR4 was also involved in PS-F2-mediated macrophage activation. In conclusion, we demonstrated that PS-F2 induced TNF- α production through the Dectin-1, CR3, and TLR4 membrane receptors in murine macrophages.

About signaling mechanisms of cytokine production upon PS-F2 stimulation, we found that PS-F2 stimulated the phosphorylation of MAP kinases (ERK, JNK and p38), degradation of I- κ B and the nuclear translocation of NF- κ B. TNF- α production was decreased in the presence of specific inhibitors of MAP kinases and NF- κ B in RAW 264.7 cells, suggesting that MAP kinases and NF- κ B pathways play a crucial role in activating TNF- α expression upon PS-F2 stimulation. In addition, treatment of macrophages with the piceatannol also inhibited TNF- α production, I- κ B degradation and ERK phosphorylation, indicating that Syk functioned upstream of other signaling

events. These results may have important implications for our understanding on the molecular mechanisms in immunomodulating activities of PS-F2.

We further investigated the immunomodulating functions and antitumor activities of PS-F2 *in vivo*. We examined the effect of oral administration on the immune functions in C57BL/6 mice with PS-F2, 50 mg/kg PS-F2 once every two days for 4 weeks. PS-F2 administration resulted in increased in the splenic CD3 T lymphocyte populations and the IgM and IgG levels in serum. It demonstrated that oral administration of PS-F2 activated non-specific immune response in C57BL/6 mice.

Furthermore, we examined the effect of PS-F2 administration on tumor growth in an allogeneic and two syngeneic tumor models. Intraperitoneal administration of PS-F2 markedly inhibited the growth of sarcoma 180, C26, and B16 melanoma in mice and the inhibition rates were 67.5 %, 23.7 %, and 43.3 %, respectively. PS-F2 administration resulted in increases in the splenic CD3, CD4, and CD8 T lymphocyte populations, as well as the serum IgM level. Although PS-F2 administration did not affect the frequency of NK population in the spleen, we observed a slight increase in cytotoxic activity in PS-F2-treated mice. In C26-bearing mice, PS-F2 induced a CD44^{high} CD62L^{low} phenotype on CD4 and CD8 T cells isolated from spleen of treated mice, suggesting the splenic T cells activated in PS-F2-treated mice. We further

used B16 tumor xenografted SCID mice model and adoptive transfer to find out whether transfer of immune cell from PS-F2-treated mice might be sufficient to prevent tumor development. We found that adoptive transfer CD4 T cells and serum antibodies into B16 tumor bearing mice significantly inhibited B16 progress in recipient mice. Overall, our results using different tumor cell lines and different mouse strains indicated that PS-F2 administration could protect mice from tumor challenge. PS-F2 administration may exert the anti-tumor effect via modulating the functions of both T and B cells in mice and enhancing cell-mediated immunity and humoral immunity.

The studies demonstrated that PS-F2 exhibited immunomodulating activities and antitumor response from the submerged culture of *G. formosanus*. Therefore, the polysaccharides PS-F2 from *G. formosanus* have the potential to be used as an immunomodulating agent in functional food for tumor therapy.

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	IV
目錄.....	VIII
圖目錄.....	XI
表目錄.....	XIII
縮寫表.....	XIV
第一章 序論.....	1
一、靈芝的藥用功能.....	1
1. 認識靈芝.....	1
2. 靈芝的生理活性.....	2
3. 靈芝的活性成分.....	2
二、靈芝的栽培與量產.....	7
1. 子實體.....	9
2. 菌絲體.....	9
三、多醣體的生物活性.....	10
1. 生物活性多醣體.....	10
2. 抗發炎活性.....	12
3. 抗氧化活性.....	12
4. 護肝效果.....	14
5. 修復傷口.....	14
6. 心血管疾病預防.....	14
7. 減緩自體免疫疾病.....	15
8. 改善糖尿病症狀.....	15
9. 抗皰疹活性.....	16
10. 保護神經功效.....	16
11. 免疫調節功能.....	16
12. 抗腫瘤活性.....	18
四、免疫與腫瘤.....	20
1. 先天性免疫.....	20
2. 後天性免疫.....	22
4. 訊息傳導路徑.....	28
5. 細胞激素.....	30
6. 腫瘤的治療.....	30
7. 生物性抗癌療法.....	32
五、菇類之抗腫瘤成分.....	34

1. 低分子量化合物.....	34
2. 高分子量化合物.....	34
六、研究架構.....	41
1. 動機與目的.....	41
2. 研究架構.....	42
第二章 台灣紫芝多醣體刺激小鼠巨噬細胞活化及樹突細胞成熟.....	45
一、前言.....	45
二、材料與方法.....	47
1. 實驗菌株、細胞株及動物.....	47
2. 培養基組成.....	47
3. 培養方法.....	47
4. 胞外多醣體之回收及純化.....	48
5. 測定總醣及蛋白質含量.....	49
6. 單糖組成分析.....	49
7. 醣鍵結分析.....	50
8. 分子量測定.....	50
9. β -1,3-glucan 含量分析.....	50
10. 多醣體刺激小鼠巨噬細胞產生腫瘤壞死因子.....	51
11. 多醣體刺激小鼠巨噬細胞產生一氧化氮.....	51
12. 多醣體刺激小鼠巨噬細胞增生之影響.....	52
13. 製備小鼠骨髓細胞分化之樹突細胞.....	52
14. BMDCs 成熟標記之分析.....	52
15. 巨噬細胞吞噬作用分析.....	53
16. 西方轉漬法及抑制劑試驗.....	54
17. 製備西方轉漬法細胞質與細胞核萃取液.....	55
18. 參與細胞膜受體之分析.....	55
19. 製備小鼠骨髓分化巨噬細胞.....	55
20. 統計分析.....	56
三、結果.....	57
1. 以膠體過濾層析分離純化台灣紫芝多醣體.....	57
2. 台灣紫芝多醣體之單糖組成及分子量.....	57
3. PS-F2 醣基鍵結分析.....	61
4. β -1,3-glucan 的含量.....	61
5. PS-F2 刺激巨噬細胞產生 TNF- α	65
6. PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生一氧化氮.....	69
7. PS-F2 可增強 RAW 264.7 細胞的吞噬作用.....	71
8. PS-F2 會刺激 RAW 264.7 細胞的增生.....	71

9. PS-F2 刺激未成熟樹突細胞成熟.....	73
10. PS-F2 會誘發小鼠體內發炎反應.....	73
11. PS-F2 誘導絲裂原活化蛋白激酶磷酸化.....	76
12. PS-F2 刺激 NF- κ B 的活化	80
13. 甘露糖受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色.....	83
14. Dectin-1 受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色.....	83
15. PS-F2 透過 Dectin-1 受體下游的 NF- κ B 和 ERK 活化	85
16. CR3 受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色	88
17. TLR4 受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色	88
四、討論.....	93
 第三章 評估台灣紫芝多醣體之抗腫瘤活性.....	106
一、前言.....	106
二、材料與方法.....	108
1. 菌株、細胞株及動物.....	108
2. 非特異性免疫反應評估.....	108
3. 抗腫瘤活性之評估.....	108
4. 血清中抗體之測定.....	109
5. 脾臟細胞製備.....	109
6. 脾臟細胞族群比例分析.....	110
7. NK 細胞毒殺活性之測定.....	110
8. MTT 法分析細胞存活	110
9. 細胞介導毒殺活性分析.....	111
10. 免疫細胞純化.....	111
11. adoptive transfer.....	112
12. SCID mice 之抗腫瘤模式.....	112
13. 統計分析.....	112
三、結果.....	113
1. 台灣紫芝多醣體於動物體內引起之非特異性免疫反應.....	113
2. 台灣紫芝多醣體抗 S180 腫瘤之活性	120
3. 台灣紫芝多醣體抗 B16 melanoma 腫瘤之活性	124
4. 台灣紫芝多醣體抗 C26 腫瘤之活性.....	129
5. PS-F2 促進 T 細胞活化	142
6. SCID mice 之抗腫瘤模式.....	149
 第四章 結論.....	163
第五章 參考文獻.....	168
個人簡歷.....	184

圖目錄

圖 1-1. 真菌細胞壁成分及 β -glucan 結構	6
圖 1-2. 生產赤芝子實體與菌絲體的主要栽培方式	8
圖 1-3. 先天性免疫反應與後天性免疫反應相關之免疫細胞	21
圖 1-4. CD4 細胞在腫瘤微環境中的複雜角色	24
圖 1-5. <i>Candida albicans</i> 辨識之免疫細胞及其模式辨識受體	27
圖 1-6. 哺乳動物三種絲裂原活化蛋白激酶訊息傳導途徑簡圖	29
圖 1-7. NF- κ B 的活化路徑	31
圖 1-8. 食用菇菌中具有抗腫瘤功能之有效成分	37
圖 1-9. 靈芝多醣體 GLPS 對免疫細胞之免疫調節機制	40
圖 1-10. 本研究之基本架構	44
圖 2-1. 台灣紫芝粗多醣體之 Sepharose CL-6B 層析圖	58
圖 2-2. PS-F1、PS-F2 與 PS-F3 之 HPAEC-PAD 層析圖譜	59
圖 2-3. 以 Sepharose CL-6B 層析管柱測定 PS-F2 分子量	62
圖 2-4. PS-F2 之 GC-MS 圖譜	63
圖 2-5. 以 aniline blue 方法測定 β -1,3-glucan 含量	66
圖 2-6. 台灣紫芝多醣體會誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 和 NO	68
圖 2-7. PS-F2 不具 LPS tolerance 效應	70
圖 2-8. PS-F2 刺激對 RAW 264.7 細胞吞噬作用之影響	72
圖 2-9. PS-F2 刺激對 RAW 264.7 細胞增生之影響	74
圖 2-10. PS-F2 會誘導 C57BL/6 小鼠骨髓分化樹突細胞表面成熟標誌之表現	75
圖 2-11. PS-F2 會刺激小鼠產生急性發炎反應	77
圖 2-12. PS-F2 誘導絲裂原活化蛋白激酶磷酸化	79
圖 2-13. PS-F2 誘導 I- κ B 的降解及 NF- κ B 之核移位	82
圖 2-14. 甘露聚醣對 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之影響	84
圖 2-15. Dectin-1 受體抑制劑對 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之影響	87
圖 2-16. piceatannol 對 PS-F2 誘導 MAPKs 磷酸化及 I- κ B 降解之影響	89
圖 2-17. anti-CR3 中和抗體對 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之影響	90
圖 2-18. TLR 4 和 Dectin-1 參與 PS-F2 活化骨髓分化巨噬細胞產生 TNF- α	92
圖 2-19. 赤芝多醣體的骨架	98
圖 3-1. 以 PS-F2 管餵小鼠四週期間之體重變化	114
圖 3-2. 以 PS-F2 管餵 C57BL/6 小鼠對脾臟中細胞比例之影響	115
圖 3-3. 以 PS-F2 管餵 C57BL/6 小鼠對脾臟中 NK 細胞之影響	116
圖 3-4. 以 PS-F2 管餵 BALB/c 小鼠對脾臟中細胞比例之影響	117
圖 3-5. 以 PS-F2 管餵 BALB/c 小鼠對脾臟中 NK 細胞之影響	118
圖 3-6. 以 PS-F2 管餵小鼠對血清中抗體濃度之影響	119

圖 3-7. PS-F2 對 S180 之抗腫瘤效果	122
圖 3-8. PS-F2 對 S180 腫瘤生長之影響	123
圖 3-9. PS-F2 對接種 S180 小鼠脾臟重量之影響	125
圖 3-10. PS-F2 對接種 S180 小鼠脾臟細胞族群比例之影響	126
圖 3-11. PS-F2 對接種 S180 小鼠脾臟中 NK 細胞之影響	127
圖 3-12. PS-F2 對接種 S180 小鼠血清抗體濃度之影響	128
圖 3-13. PS-F2 對 B16 抗腫瘤之效果	130
圖 3-14. PS-F2 對 B16 腫瘤生長之影響	131
圖 3-15. PS-F2 對接種 B16 小鼠脾臟重量之影響	132
圖 3-16. PS-F2 對接種 B16 小鼠脾臟細胞族群比例之影響	133
圖 3-17. PS-F2 對接種 B16 小鼠脾臟 NK 細胞之影響	134
圖 3-18. PS-F2 對接種 B16 小鼠血清抗體濃度之影響	135
圖 3-19. PS-F2 對 C26 抗腫瘤之效果	137
圖 3-20. PS-F2 對 C26 腫瘤生長之影響	138
圖 3-21. PS-F2 對接種 C26 小鼠脾臟重量之影響	139
圖 3-22. PS-F2 對接種 C26 小鼠脾臟細胞族群比例之影響	140
圖 3-23. PS-F2 對接種 C26 小鼠脾臟 NK 細胞毒殺活性之影響	141
圖 3-24. PS-F2 對接種 C26 小鼠血清 IgM 濃度之影響	143
圖 3-25. 接種 C26 小鼠 T 細胞 CD44 的表現情形	144
圖 3-26. 接種 C26 小鼠 T 細胞 CD62L 的表現情形	145
圖 3-27. PS-F2 對接種 C26 小鼠 Treg 細胞比例之影響	147
圖 3-28. Adoptive transfer 免疫細胞對 B16 腫瘤生長之影響	148
圖 3-29. Adoptive transfer 免疫細胞對小鼠存活率之影響	150
圖 3-30. PS-F2 在 SCID 小鼠抗腫瘤之效果	151
圖 3-31. 腫瘤碎片刺激 CD4 和 CD8 細胞之反應	158
圖 4-1. PS-F2 刺激巨噬細胞產生 TNF- α 之受體及訊息傳導途徑簡圖	164
圖 4-2. PS-F2 抗腫瘤之免疫調節功能	166

表目錄

表 1-1. 台灣地區常見的野生靈芝種類及特性	1
表 1-2. 赤芝的生物活性成分及其藥用功能	5
表 1-3. 藥用真菌類的 β -glucans 活性成分	11
表 1-4. 高等擔子菌綱其抗腫瘤化學結構及免疫調節多醣體	13
表 1-5. 真菌辨識有關之模式辨識受體	13
表 1-6. 食用菇菌中小分子之抗腫瘤有效成分	38
表 1-7. 菇類中具抗腫瘤活性之高分子化合物	39
表 2-1. PS-F1、PS-F2 與 PS-F3 之單糖組成	60
表 2-2. 以 GC-MS 分析 PS-F2 之醣基鍵結及滯留時間	64
表 2-3. 不同靈芝來源多醣體之單糖組成	95
表 3-1. PS-F2 對小鼠 CD4/CD8 比率之影響	160



縮寫表

7/4	neutrophil- specific rat mAb
AC-PS	polysaccharides derived from <i>Antrodia camphorata</i>
ALT	alanine transaminase
AP-1	activator protein 1
APBP	acidic protein bound polysaccharide
APCs	antigen-presenting cells
B16	B16 melanoma
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bcl-2	B-cell lymphoma 2
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein
BMDCs	bone marrow-derived macrophages
BRM	biological response modifier
BSA	bovine serum albumin
C26	colon cancer cells
CARD9	caspase recruitment domain protein 9
CD	cluster of differentiation
cEPS	crude extracellular polysaccharide
ConA	Concanavalin A
COX-2	cyclooxygenase-2
CR3	Complement receptor type 3
DC	dendritic cells
Dectin-1	dendritic-cell-associated c-type lectin-1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EAC	Ehrlich ascites carcinoma
ECL	enhanced chemluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
FcγR	Fcγ receptor
GC-MS	gas chromatography-mass spectrophotometer

G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GLP	polysaccharides from <i>Ganoderma lucidum</i>
GLP	<i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharide
GLPG	<i>Ganoderma lucidum</i> proteoglycan
GLPL	low-molecular-weight polysaccharides
GLPP	<i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharide preparation
GLPS	<i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharides
GI-PS	polysaccharide extract isolated from <i>Ganoderma lucidum</i>
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GOT	glutamate oxaloacetate transaminase
GRN	grifolan
HDAC-1	histone deacetylase 1
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPAEC-PAD	high-performance anion-exchange chromatography-pulse amperometric detector
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HSV-1, 2	herpes simplex virus 1 and 2
IFN- γ	interferon-gamma
IL-1 β	interleukin-1 β
iNOS	inducible nitric oxide synthase
ip	intraperitoneal
ITAM	tyrosine-based activation-like motif
iv	intravenous
I- κ B	inhibitor protein κ B
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAL	Limulus amoebocyte lysates
LDH	lactate dehydrogenase
LPS	lipopolysaccharide
Ly-6G	myeloid differentiation antigen Gr-1
LZ	<i>Ganoderma</i> extract
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MFI	mean fluorescence intensities
MG132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal
MHC II	major histocompatibility complex class II
MMP	matrix metalloproteinase
MnSOD	manganese superoxide dismutase

MR	mannose receptor
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	nuclear factor κ B
NK	natural killer cells
NO	nitric oxide
OX40	a member of the TNFR-superfamily of receptors
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PDA	potato dextrose agar
PI3K	phosphoinositide 3-kinases
PKC	protein kinase C
PKC- γ	protein kinase C- γ
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
Poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid
PRRs	pattern recognition receptors
PSG-1	<i>Ganoderma atrum</i> polysaccharide
PSK	krestin
PSK	protein-bound polysaccharide K
ROS	reactive oxygen species
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RR	Rokkaku-reishi
S-180	sarcoma 180
SB202190	4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(4-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]phenol
sc	subcutaneous
SCID	severe combined immune deficiency
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SE	standard error
SP600125	1,9-pyrazoloanthrone
SPF	specific pathogen free
Syk	spleen tyrosine kinase
TBS	tris buffered saline
TFA	trifluoroacetic acid
THP-1	human acute monocytic leukemia cell line
TLR	Toll-like receptors
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
Treg	regulatory T cells

TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
U0126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene
YAC-1	T cell lymphoma



第一章 序論

一、靈芝的藥用功能

1. 認識靈芝

靈芝在中國已有久遠的使用歷史，一直被視為稀有珍貴之藥材。神農本草經記載，靈芝為草藥中之上藥，「上藥」又稱為神藥，也就是養生之藥，具有調整體質及增強體魄之功效；而「中藥」是指能預防疾病並補充體力的藥材；「下藥」則只能用於對症治療，不可經常服用的治療藥。

目前至少有 270 種食用菇類被發現具有治療用途之特性。靈芝分類上屬於真菌界 (Myceteae)、無鞭毛菌門 (Amastigomycota)、擔子菌綱 (Basidiomycetes)、無茸褶目 (Aphyllorphales)、多孔菌科 (Polyporaceae)，靈芝屬 (Ganoderma)。子實體為一年生，生長於闊葉樹之腐木，分布廣及熱帶至溫帶地區 (Wasser, 2002)。

靈芝子實體具有光亮的表皮，菌蓋有漆狀分泌物，可利用木質素及纖維素，擔孢子呈卵形，具雙層壁，會分泌漆化酵素 (laccase) 和過氧化酵素 (peroxidase)。依據菌蓋外觀顏色的不同可將靈芝分為青、赤、黃、白、黑和紫色六種，由於菇類的子實體是長期適應環境演化而完成特定繁殖功能的組合，因此在靈芝異種間的子實體中，無論就外部形態和內部解剖構造上皆有很大的差異，每一種均有不同種類之功效 (Wasser, 2002; Sanodiya *et al.*, 2009)。古籍中記載靈芝的分佈可分成兩大區域，赤芝、紫芝和黑芝產於衡山、高夏山及常山等，屬於長江流域；而黃芝、白芝和青芝生於嵩山、華山及泰山等，屬於黃河流域，顯示靈芝的生態習性與分佈區域有密切的關係。

大部分的靈芝子實體具有菌蓋和菌柄兩個部份。菌蓋呈半圓形、腎形、貝殼形等，表面有同心環紋或放射狀縱紋，具有漆樣光澤，有時因生長成熟之程度不同而同時存在數種不同顏色之區域，一般而言其生長區域位於菌蓋的最外緣，菌蓋外緣顏色最淡而向內則顏色漸深。菌柄亦具有漆樣光澤，顏色與菌蓋相同或較深，另外有些靈芝子實體則直接著生於寄主之上，只有短基柄或是無菌柄（表 1-1）。台灣常見的野生靈芝有樹舌靈芝（*G. applanatum*）、台灣紫芝（*G. formosanum*）、拱狀靈芝（*G. fornicatum*）、赤芝（*G. lucidum*）、新日本靈芝（*G. neo-japonicum*）、熱帶靈芝（*G. tropicum*）、松杉靈芝（*G. tsugae*）和小孢子靈芝（*G. microsporum*）八種，其外觀及特性整理於表 1-1（許, 1993）。

2. 靈芝的生理活性

近年來，台灣、日本、中國、韓國及美國等地學者發表相當多的研究報告證實靈芝的藥用效果，以現代的生物技術、藥學及臨床研究來看靈芝的活性成分及功能，靈芝對抗腫瘤、提升免疫調節功能、降血壓、降血脂、保肝、抗動脈硬化、降低自由基、抑制血小板凝集、抗 HIV 病毒、抗細菌、抗寄生蟲、抗過敏、治療氣喘等（Lin, 2005; Yuen and Gohel, 2005; Paterson, 2006; Boh *et al.*, 2007; Sanodiya *et al.*, 2009）都有不錯的效果。其中又以其抗腫瘤及免疫調節功能研究的最多，被視為最主要的生理功能。

3. 靈芝的活性成分

而靈芝的藥用活性成分已被證實的有三萜類（triterpenoids）、多醣體

表 1-1. 台灣地區常見的野生靈芝種類及特性

Table 1-1. The kinds and charatertistics of wild *Ganoderma* in Taiwan (許, 1993).

學 名	子 實 體				孢 子		寄 生	俗 名
	菌 柄	顏 色	菌 蓋 形 狀	漆 光	大 小(μm)	特 性		
樹舌靈芝 <i>G. applanatum</i>	無或短柄	灰白至灰褐色	半圓形，不規則形	無	7-10×4.3-6.2		闊葉樹、針葉樹、棕櫚	白芝、平蓋靈芝、古梅靈芝、扁芝
赤芝 <i>G. lucidum</i>	有或短柄	黃褐色、紅褐色	半圓形，腎形	有	8.5-11.2×5.2-7		闊葉樹	赤芝、相思赤芝、淺山赤芝
松杉靈芝 <i>G. tsugae</i>	有	紅褐色、紫褐色	腎形，近扇形	有	9-11×6-8		針葉樹、闊葉樹	高山赤芝、赤芝
台灣靈芝 <i>G. formosanum</i>	有	暗紫色、黑紫色	近圓形，腎形	有	11.5-13×7-8.5	頂端透明凸起	楓樹	紫芝、黑芝、玄芝
新日本靈芝 <i>G. neo-japonicum</i>	有	褐色、紫褐色	近圓形，腎形	有	10-12.5×7-8.5	頂端透明凸起	竹類	竹生赤芝、竹芝、紫芝
拱狀靈芝 <i>G. fornicatum</i>	無或短柄	紅褐色至褐色	近圓形，腎形	較弱	8.7-10.4×5.2-7		闊葉樹	無柄赤芝、紅樹舌
熱帶靈芝 <i>G. tropicum</i>	有	黃褐色、紫褐色	半圓形，漏斗形	較弱	8.5-11.5×5.2-6.9		豆科植物	赤芝、淺山赤芝、相思赤芝
小孢子靈芝 <i>G. microsporum</i>	無或短柄	古銅形、紫黑色	貝殼形，不規則形	有	6-8.5×4.5-5	頂端透明凸起	柳樹	青芝

(polysaccharides)、核苷酸、蛋白質、胺基酸、生物鹼及多種微量元素等 (Yuen and Gohel, 2005; Paterson, 2006)，三萜類與多醣體的功效更是備受矚目。目前從靈芝分離純化的有效藥用成分已高達 400 種以上 (Shiao, 2003; Sanodiya *et al.*, 2009)，表 1-2 為已發表之靈芝活性成分及生理活性，主要成分陳述如下：

3.1 多醣體

真菌來源的多醣體具有刺激免疫系統，保護身體免受病原性微生物或是外來毒素的侵襲 (Brown and Gordon, 2005)。赤芝多醣體中的 β -1,3-glucan 主鏈和 β -1,6-glucan 支鏈 (圖 1-1) 也已證實具有抗腫瘤及免疫調節功能 (Miyazaki and Nishijima, 1981)。近來的研究更顯示萃取自子實體、菌絲體或孢子的靈芝多醣體對巨噬細胞 (Hua *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2007)、B 細胞 (Zhang *et al.*, 2002b; Lin *et al.*, 2006a; Zhuang, 2009)、樹突細胞 (Cao and Lin, 2002; Lin *et al.*, 2006b) 及嗜中性白血球 (Hsu *et al.*, 2003) 均具有免疫調節的功能。

3.2 三萜類

三萜類為靈芝的二級代謝產物，也是靈芝苦味的主要來源，超過 150 種以上的三萜類已從靈芝中被分離鑑定，大多屬於氧化型羊毛固醇類衍生物，像是 ganoderic、lucidenic、ganodermic、ganoderenic、ganolucidic、applanoxidic acids、lucidones、ganoderals 和 ganoderols 等結構 (Boh *et al.*, 2007)。靈芝中的三萜類主要功能有抗腫瘤、保肝、抗血管新生、抗高血壓 (Kabir *et al.*, 1988; Lee and Rhee, 1990)、降膽固醇、抑制組織胺釋放、促進血小板凝集及抗 HIV 病毒 (Paterson, 2006; Boh *et al.*, 2007)。

表 1-2. 赤芝的生物活性成分及其藥用功能

Table 1-2. Biological activities and pharmacological functions reported for the fungus *Ganoderma lucidum* (Sanodiya *et al.*, 2009).

Bioactive Compound	Therapeutic Effects
Protein LZ-8, β -D-glucan,	Immunomodulation
Polysaccharides, glycoproteins,	Anti-cancer, anti-tumor, chemo and
lanostanoid, Triterpenoids , and steroid	radio prevention
Polysaccharides	Anti-herpetic
	Anti-ulcerogenic
Polysaccharides, ganodermin	Anti-microbial
Triterpenoids	Anti-HIV-1 and Anti-HIV-1-protease
Glycans	Anti-diabetic
Ganoderic acids R and S and	Hepatoprotective
ganosporeric acid A	
Ganoderic acid	Immunomodulation, Anti-inflammatory,
	Anti-allergic
Ganoderic acid T	Anti-proliferative activity
ganoderol B	Anti-androgenic
	Anti-angiogenic activity
Ethanol extract	Estrogenic
Chloroform extract	Anti-oxidant
Methanol extract	Anti-mutagenic
Powdered mycelium and water extract of	Cardiovascular and circulatory functions
mycelium	

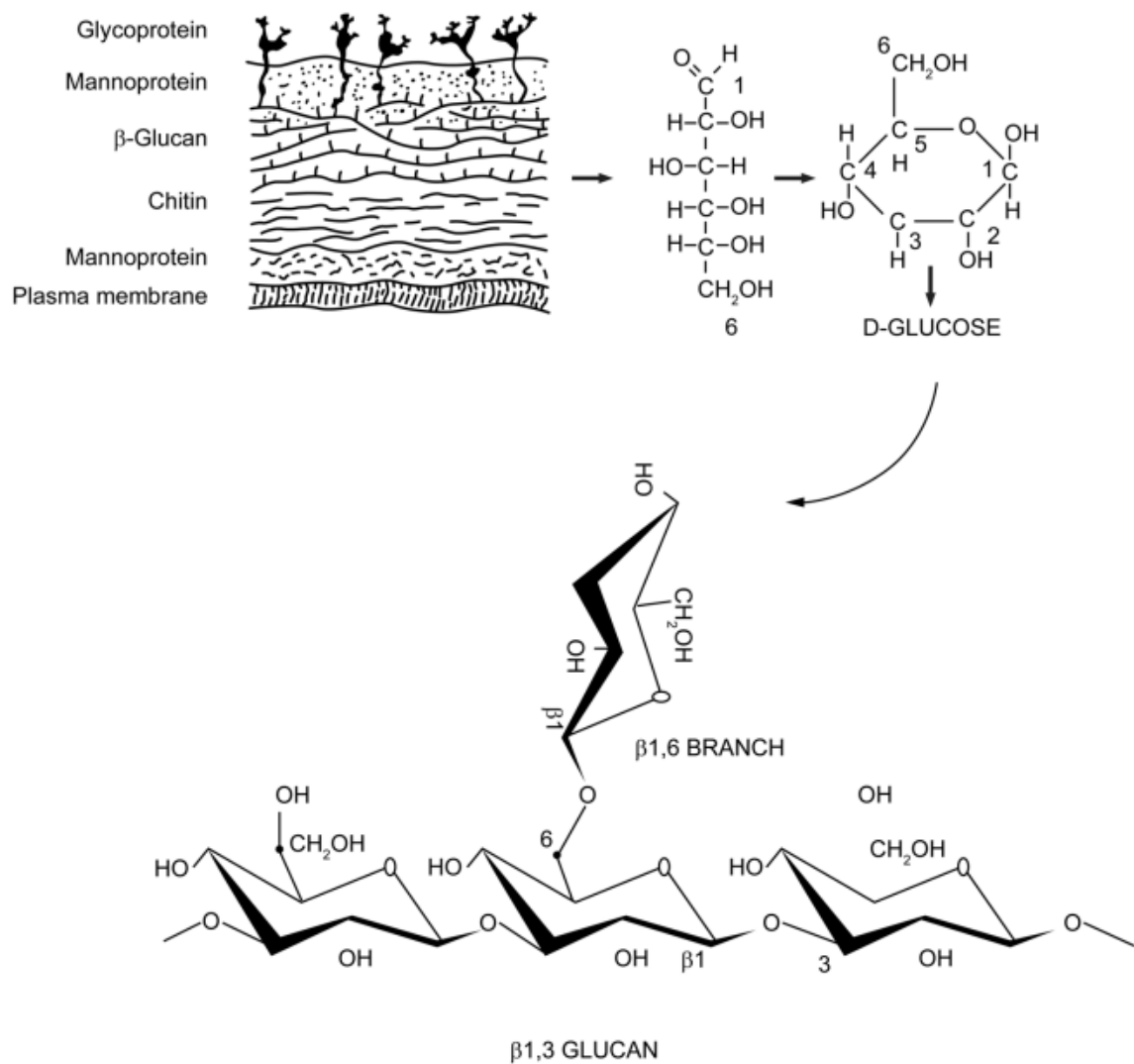


圖 1-1. 真菌細胞壁成分及 β -glucan 結構

Figure 1-1. β -glucan is one of the key components of the fungal cell wall (Chan *et al.*, 2009). The basic subunit of the fungal β -glucan is β -D-glucose linked to one another by 1-3 glycosidic chain with 1-6 glycosidic branches. The length and branches of the β -glucan from various fungi are widely different.

3.3 蛋白質及胺基酸

1989 年 Tanaka 等人從赤芝純化出具有免疫調節功能之 LZ-8 蛋白質，研究顯示 LZ-8 具有抗腫瘤及治療自體免疫疾病之效果 (Tanaka *et al.*, 1989)，是這幾年很熱門研究材料。而分離自赤芝的 GLL-M 屬於一種親糖蛋白 (lectin) (Kawagishi *et al.*, 1997)；另外也在靈芝發現一些具生物活性之胜肽及胺基酸 (Shiao, 2003; Paterson, 2006; Boh *et al.*, 2007; Sanodiya *et al.*, 2009)。

3.4 核苷酸

從 *G. capense* 的菌絲體中分離出多種的核苷酸，有 adenine、adenosine、uracil 和 uridine (Boh *et al.*, 2007)。水溶性的核苷酸發現具有抑制血小板凝集的功能 (Shimizu *et al.*, 1985)。

3.5 其他微量元素

微量元素有鉀、鈣、磷、鎂和有機鍺 (水野和川合, 1997; Chiu *et al.*, 2000)。

二、靈芝的栽培與量產

由於靈芝的藥用保健功能，早在中國古代已被視為珍貴藥材，野生的靈芝非常稀少，在整個保健食品市場的需求日益擴增，野生靈芝早已不符所需，1971 年日本人直井幸雄氏成功建立量產靈芝子實體的方法，人工栽培的靈芝已成為供應市場的主要來源。

人工栽培靈芝可分成子實體與菌絲體的生產兩種 (圖 1-2)。子實體傳統的栽培方式是以包裝木屑、瓶裝木屑或直接栽種在段木上；這種在段木或以木屑、麥

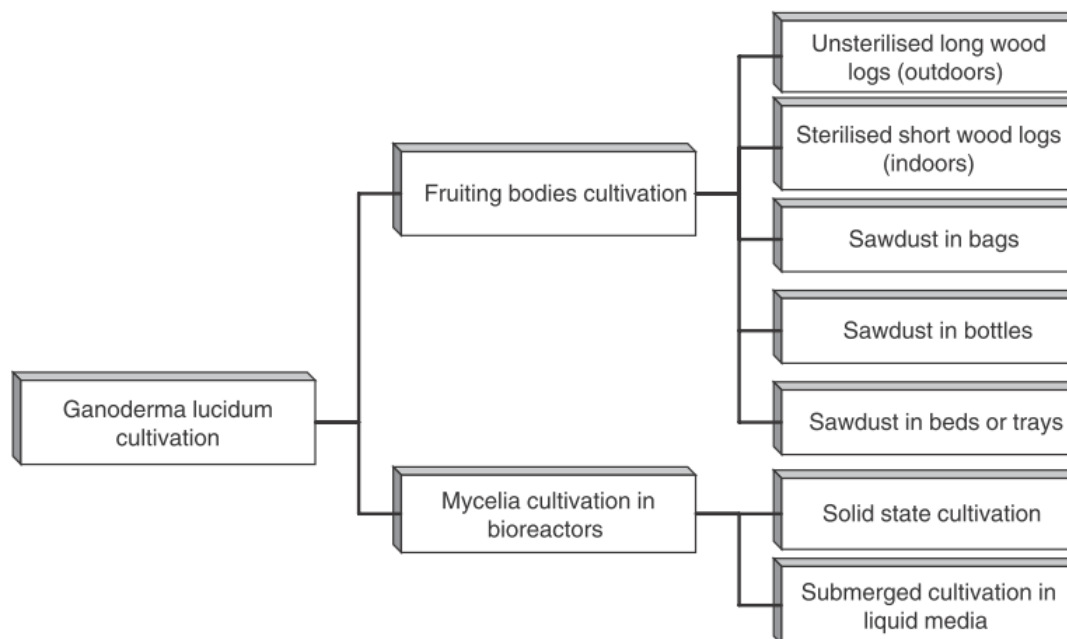


圖 1-2. 生產赤芝子實體與菌絲體的主要栽培方式

Figure 1-2. Main cultivation methods for the production of *G. lucidum* fruit bodies and mycelia (Boh *et al.*, 2007).

桿及稻桿填充的太空包的農場化栽培方式已發展三十幾年。另一種是在生物反應器培養的生產技術，以固態基質或是液態基質，在無菌的反應器中進行培養，作為小型或試驗型的生產工場 (Boh *et al.*, 2007)。

1. 子實體

在過去，靈芝栽培於沒有滅菌的天然原木，可能需要 2-3 年才能獲得成熟的子實體，這樣的生產方式培養時間長，也需要投入大量勞力。1980 年代後期，開始把使用的原木裁剪成較短的段木來栽培，菌絲培養只要 4-5 個月，而子實體也可在同年收穫，增加資金的週轉；而使用鋸木屑栽植子實體從 1990 年代開始發展。赤芝的栽培可利用充填鋸木屑的耐熱性聚丙烯瓶子或袋子、玻璃瓶、玻璃罐、托盤或苗床中成長，置於可調控溫度與溼度的菇舍栽培，環境及品質更加能控制 (Boh *et al.*, 2007)。

2. 菌絲體

靈芝子實體的栽培、生長到可採收，一般需要幾個月到一年，這樣的時間及成本已讓靈芝產品無法充分供應市場所需，使得價格居高不下，為突破這限制，漸漸有人利用固態基質或液態培養基生產靈芝菌絲體。利用深層液態發酵培養生產可以在 1-2 週的時間即可回收靈芝菌絲體及發酵培養液，這樣的生產技術一樣可以得到具生理功能的活性成分，惟其質與量受到靈芝菌種、培養條件、生長階段、加工的程序及製備等因素影響 (Boh *et al.*, 2007)。以深層液態發酵培養技術生產的培養液、菌絲體或是孢子已確認含有豐富的生物活性物質 (Bao *et al.*, 2002a; Bao *et al.*, 2002b)。

三、多醣體的生物活性

多醣體是由多個以上的單糖以糖苷鍵結所組成，連結成直鏈或分支長鏈的大分子（圖 1-1），如澱粉、纖維素、菇菌多醣體等等，均是屬於多醣體，纖維素和幾丁質為構成植物骨架及蝦蟹、昆蟲甲殼之多醣類，而澱粉和肝糖則為生物體儲存能量的多醣物質。菇類及真菌中所含的多醣體，因本身分子量較大，多為十萬以上，甚至上百萬。因此，所含的多醣類一般通稱為「多醣體」。

1. 生物活性多醣體

近年來，很多研究指出從植物、真菌、酵母、菇類及海藻等天然來源的多醣體具有免疫調節的生理活性，其中的菇類早被人們用於食用及醫藥的應用，表 1-3 列出了藥用菇類的 β -glucan 活性成分。多醣體特殊的結構，如多醣體中心結構的重複單位、環狀結構、糖苷鍵結位置、變旋異位構形（anomeric-center configurations）等會與病原或微生物表面產生作用，多醣體結構的多變性不同程度影響生體的反應，具有調控高等生物細胞間互相作用的彈性（Wasser, 2002; Avci and Kasper, 2010）。主要具有生物活性的多醣體主要是水溶性的 β -1,3 和 β -1,6-glucan，可以經由添加酒精將多醣體沉澱分離。

一般多醣體的純化可結合多種的純化技術，如酒精沉澱、分劃沉澱、醋酸沉澱、離子交換層析、膠體管柱層析和親和性層析等。基本上，可經由 DEAE-cellulose 離子交換層析管柱分離中性多醣體。多醣體大多是以不同種類的糖苷鍵結合成的多聚醣，如 β -1,3-glucan、 β -1,6-glucan 及 α -1,3-glucan 和一些異型葡聚醣（heteroglycans）。一般而言，除了 glucan 是由 glucose 為骨幹的多醣體，還有依骨架的單糖不同有 galactans、fucans、xylans 和 mannans；異型多醣體（

表 1-3. 藥用真菌類的 β -glucans 活性成分

Table 1-3. Selected medicinal mushroom with β -glucans as active components (Chan *et al.*, 2009).

Herbs	Common Name	β -glucans structure	Types of β -glucans
<i>Lentinus edodes</i>	Shiitake mushroom	β -1,3;1,6-glucan	Lentinan
<i>Schizophyllum commune</i>	Brazilian mushroom, Schizophyllum	β -1,3;1,6-glucan	Schizophyllum (SPG) or sizofiran
<i>Grifola frondosa</i>	Maitake mushroom	β -1,3;1,6-glucan with xylose and mannose	Maitake D-Fraction
<i>Coriolus versicolor</i>	Yun Zhi	Protein bound β -1,3;1,6-glucan	PSP (polysaccharide peptide) PSK (polysaccharide-Kureha or polysaccharide-K, krestin)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Lingzhi, Reishi	β -1,3;1,6-glucan	Ganoderma polysaccharides, Ganopoly
<i>Agaricus blazei</i>	Brazilian sun-mushroom, Himematsutake mushroom	Protein bound β -1,6-glucan	Agaricus polysaccharides
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Oyster mushroom, píng gū	β -1,3-glucan with galactose and mannose	Pleuran
<i>Coprinus comatus</i>	Shaggy ink cap, lawyer's wig, or shaggy mane	β -1,3-glucan	Coprinus polysaccharides

heteropolysaccharides) 的側鏈可能接 glucuronic acid、xylose、galactose、mannose、arabinose 或 ribose 等單糖或不同的組合 (Wasser, 2002)。多醣體骨架除了連接單糖或寡醣外，也會與胜肽或蛋白質結合成醣蛋白 (Wang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002b)。多醣體已被認為主要透過增強宿主免疫功能而具有抗腫瘤的效果，而不是直接毒殺腫瘤細胞，表 1-4 是在高等擔子菌發現具有抗腫瘤及免疫調節活性的多醣體化學結構。研究人員發現來自靈芝子實體、孢子、菌絲體及培養菌液的多醣體已超過 200 種以上，不同的分子大小多醣體、單糖組成、單糖鍵結及側鏈修飾等結構的差異均對生物活性有直接影響 (Huie and Di, 2004; Paterson, 2006; Avci and Kasper, 2010)。

2. 抗發炎活性

研究發現赤芝的水萃取物可以有效抑制及減緩鹿角菜膠 (carrageenan) 引起的水腫，具有抗發炎的活性 (Lin *et al.*, 1993)。從赤芝子實體萃取的 GLPS 可減緩 indomethacin 和醋酸所誘發小鼠胃粘膜發炎，其修復活性可能透過抑制產生 TNF- α 及誘發 c-myc 和 ornithine decarboxylase 基因的表現 (Gao *et al.*, 2002)。

3. 抗氧化活性

在 UV 誘發光分解產生過氧化氫破壞 DNA 超螺旋 phiX174 的鍵結模式，赤芝純化的胺基多醣可顯著性抑制脂質過氧化，並且能保護細胞，修復活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 造成的傷害 (Lee *et al.*, 2001)。另以 tert-butylhydroperoxide (tBOOH) 誘發 ROS 在體內或體外對巨噬細胞造成的損害，而赤芝多醣體 GLPP 可以有效增加巨噬細胞的存活率，對於細胞內胞器 (粒腺體) 有保護的效果 (You and Lin, 2002)。Lai 等人也發現赤芝萃取物 LZ 能減緩

表 1-4. 高等擔子菌綱其抗腫瘤化學結構及免疫調節多醣體

Table 1-4. Chemical structure of antitumor and immunostimulating polysaccharides of higher *Basidiomycetes* (Wasser, 2002; Ferreira *et al.*, 2010).

Polysaccharide	Species
Homoglucans	
α -(1→3)-glucan	<i>Armillariella tabescens</i> , <i>Auricularia auricula</i> ,
Linear α -(1→3)-glucan	<i>Agaricus blazei</i> , <i>Amanita muscaria</i> , <i>Agrocybe aegerita</i>
α -(1→4)-; β -(1→6)-glucan	<i>Agaricus blazei</i>
α -(1→6)-; α -(1→4)- glucan	<i>Agaricus blazei</i>
β -(1→6)-glucan	<i>Lyophyllum decastes</i> , <i>Armillariella tabescens</i>
β -(1→6)-; β -(1→3)-glucan	<i>Agaricus blazei</i> , <i>Grifola frondosa</i>
β -(1→6)-; α -(1→3)-glucan	<i>Agaricus blazei</i>
β -(1→3)-glucuronoglucan	<i>Ganoderma lucidum</i>
Heteroglucans	
Mannoxyloglucan	<i>Grifola frondosa</i>
Galactoxyloglucan	<i>Hericium erinaceus</i>
Xyloglucan	<i>Grifola frondosa</i> , <i>Polyporus confluent</i>
	<i>Pleurotus pulmonarius</i> , <i>Agaricus blazei</i>
Xylogalactoglucan	<i>Inonotus obliquus</i>
Mannogalactoglucan	<i>Pleurotus pulmonarius</i> , <i>Pleurotus cornucopiae</i>
	<i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Agaricus blazei</i>
Galactomannoglucan	<i>Flammulina velutipes</i> , <i>Hohenbuehelia serotina</i> ,
	<i>Leucopaxillus giganteus</i>
Arabinoglucan	<i>Ganoderma tsugae</i>
Riboglucan	<i>Agaricus blazei</i> , <i>Flammulina velutipes</i>
glucuronoglucan	<i>Ganoderma lucidum</i>
Glycans	
Arabinogalactan	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>
Glucogalactan	<i>Ganoderma tsugae</i>
Fucogalactan	<i>Sarcodon aspratus</i>
α -(1→6)-mannofucogalactan	<i>Fomitella fraxinea</i>
Fucomannogalactan	<i>Dictyophora indusiata</i> , <i>Grifola frondosa</i>
Mannogalactan	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
Mannogalactofucan	<i>Grifola frondosa</i>
Xylan	<i>Hericium erinaceus</i>
Glucoxylan	<i>Hericium erinaceus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i>
Mannoglucoxylan	<i>Hericium erinaceus</i>
α -(1→3)-mannan	<i>Dictyophora indusiata</i>
Glucomannan	<i>Agaricus blazei</i>
β -(1→2)-; β -(1→3)-glucomannan	<i>Agaricus blazei</i>
Galactoglucomannan	<i>Lentinus edodes</i>
Galactomannan	<i>Morchella esculenta</i>
Glucuronoxylomannans	<i>Tremella fuciformis</i>

白蛋白誘發人類腎近曲小管上皮細胞的氧化損害及細胞凋亡 (Lai *et al.*, 2006)。

最近的研究更發現赤芝多醣體 GLPP 分離的低分子量多醣體 GLP_{L1} 和 GLP_{L2} 具有抗氧化活性，其中的 GLP_{L1} 對游離自由基的清除與亞鐵離子螯合更為有效 (Liu *et al.*, 2010)。對於罹患糖尿病小鼠，赤芝 GLP 會影響胰腺抗氧化酵素活性及脂質過氧化程度，透過調控 bcl-2 表現及 bax/bcl-2 比率，與增加抗氧化酵素活性，GLP 能有效減少氧化的損傷並抑制細胞凋亡 (Yang *et al.*, 2010)。

4. 護肝效果

以赤芝、台灣紫芝和新日本靈芝的水萃物處理 CCl₄ 引起肝損傷的小鼠，發現能降低血清 GOT 及 LDH 酵素活性，其中又以台灣紫芝的效果最好 (Lin *et al.*, 1995)。另以 BCG 或 BCG 加細胞激素處理 BALB/c 小鼠誘發免疫肝損傷，GLP 可以有效減緩肝腫脹，降低血清中 ALT 酵素的釋出與 NO 的產生，抑制 iNOS 蛋白的表現 (Zhang *et al.*, 2002a)。

5. 修復傷口

SACCHACHITIN[®]膜是由松杉靈芝子實體的加工剩餘物製作的皮膚替代物，它是一種由 60 % β -1,3-glucan 和 40 % N-acetylglucosamine 組成的絲狀結構聚合物 (Su *et al.*, 1997)。SACCHACHITIN 膜修復傷口的效果是對發炎細胞具有趨藥性 (chemotactic) 的效果，而且能影響活化增生細胞細胞核抗原表現、type I collagen 表現、創傷組織的重塑和降低傷口治療組織 transglutaminase 及 MMP 的表現 (Hung *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2005)。

6. 心血管疾病預防

心血管疾病已是現在人的文明病，Lee 和 Rhee 以麻醉的兔子和大鼠評估赤芝菌絲體水萃物對心血管作用的相關活性，發現水萃物在不影響心跳下可抑制腎輸出交感神經活性，而降低血管的收縮壓與舒張壓 (Lee and Rhee, 1990)。

Li 等人也探討黑靈芝 (*Ganoderma atrum*) 多醣體 PSG-1 對心肌細胞及缺氧/複氧 (anoxia/reoxygenation, A/R) 損傷引起的氧化壓力之影響，發現 PSG-1 能保護心肌細胞受到缺氧/複氧損傷而死亡，減少缺氧/複氧損傷產生的活性氧、粒腺體膜電位降低以及 cytochrome c 從粒腺體釋出到細胞質，抑制 caspase-9 和 caspase-3 的活化，改變 Bcl-2 家族蛋白質及增加心肌細胞 MnSOD 的蛋白表現量 (Li *et al.*, 2010c)。

7. 減緩自體免疫疾病

自體免疫疾病 (autoimmune diseases) 是指生體對自身抗原產生過度免疫反應而導致自身組織損害的疾病，常見之紅斑性狼瘡即是一種慢性自體免疫引起的風濕疾病。在實驗動物模式，松杉靈芝萃取物能增加紅斑性狼瘡小鼠 (lupus mice) 的存活率，降低尿蛋白及血清中抗雙股 DNA 抗體之濃度，顯示靈芝多醣體能減緩自體免疫病的症狀 (Lai *et al.*, 2001)。而赤芝對於類風濕性關節炎 (Rheumatoid arthritis) 的症狀也有改善的效果 (Bao *et al.*, 2006)。

8. 改善糖尿病症狀

以赤芝多醣體產品 Ganopoly 針對 71 名罹患第二型糖尿病患者進行臨床的功效及安全性評估。服用 Ganopoly 12 週患者的紅血球糖化血色素平均值從 8.4 % 降到 7.6 %，同時也可以改善空腹血糖及餐後血糖值；空腹胰島素、餐後 2 小時胰島素、空腹 C-peptide 和餐後 2 小時 C-peptide 的變化，都顯示有一致性的改善，

服用 Ganopoly 12 週患者結果顯示可有效降低血液中葡萄糖濃度，改善糖尿病症狀(Gao *et al.*, 2004)。

9. 抗疱疹活性

單純疱疹 (Herpes simplex) 是一種病毒傳染的疾病。其病原為單純疱疹病毒第一型(HSV-1)及第二型(HSV-2)，感染病毒後會有局部的原發性病灶，痊癒後仍有復發的可能性。以 HSV-1 和 HSV-2 病毒感染 Vero 細胞，發現赤芝 APBP 多醣體具有抗病毒活性，當 APBP 結合抗疱疹用藥 acyclovir 使用更具有加乘的治療功效 (Oh *et al.*, 2000)；此外赤芝菌絲體純化之 GLPG 也能干擾病毒複製，進入感染細胞，抑制 HSV 病毒感染細胞 (Liu *et al.*, 2004)。

10. 保護神經功效

Zhao 等人探討小鼠皮質神經細胞在缺氧/複氧損傷過程，以 Gl-PS 處理的影響情形 (Zhao *et al.*, 2004)。Gl-PS (1、10、100 µg/ml)能增加神經細胞在缺氧/複氧損傷的存活率，同時有效降低 malondialdehyde 含量、ROS 的產生及增強 MnSOD 的活性。

11. 免疫調節功能

健康食品的免疫調節功能評估，是針對包括非特異性及特異性免疫功能之評估。所謂非特異性免疫力主要包括如嗜中性白血球 (neutrophils) 及單核球 (monocytes) 的吞噬能力或是 NK 細胞的活性，很多研究均顯示多醣體在免疫調節上的功效，對於各種免疫細胞之影響分述如下：

11.1 活化單核球與巨噬細胞

很多研究發現不同來源的多醣體會影響單核球與巨噬細胞 (macrophages) 的活性。以 PG-S 和 GLP 刺激人類血液單核球，其刺激培養液能夠誘導單核球增生並分化為成熟的單核球及巨噬細胞，具有吞噬功能與產生超氧化物；刺激巨噬細胞產生 IL-1 β 、IL-2、IL-10、TNF- α 和 IL-6，也會使 T 細胞產生 IFN- γ (Lieu *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2010)。

赤芝多醣體發現在體外能活化 BALB/c 小鼠 B 細胞和巨噬細胞，但是不能活化 T 細胞 (Shao *et al.*, 2004)。餵食 BALB/c 小鼠 RR (500 mg/kg) 14 天，LPS 和 ConA 刺激小鼠脾臟貼附細胞產生 IFN- γ 和 IL-12，顯示餵食 RR 能活化脾臟巨噬細胞及 T 細胞，走向 Th1 的免疫反應 (Kohguchi *et al.*, 2004)。

靈芝多醣體也發現能增加小鼠巨噬細胞表面的 CD14 和 TLR4 標誌，促進骨髓分化巨噬細胞增生，產生 NO，誘導細胞內呼吸爆發活性，增加 IL-1 β 、IL-12p35 及 IL-12p40 表現 (Wang *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2007)。顯示靈芝多醣體，尤其是 β -glucan，無論是在體內或體外，對於人類或小鼠巨噬細胞都有刺激活化的功能。

11.2 增強吞噬作用

以靈芝多醣體處理巨噬細胞能夠增強巨噬細胞 (Lieu *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009) 和嗜中性球 (Hsu *et al.*, 2003) 的吞噬能力，靈芝多醣體透過 PI3K、p38 MAPK 和 PKC 訊息傳導路徑增強嗜中性球的吞噬能力。

11.3 活化自然殺手細胞

自然殺手細胞 (NK cells) 為毒殺型淋巴球，屬於先天性免疫反應的免疫細胞，對於抗腫瘤及細胞受病毒感染扮演關鍵角色。很多研究指出實驗小鼠腹腔注

射或餵食靈芝多醣體能夠活化 NK 細胞 (Hsu *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2008)；刺激小鼠脾臟細胞活化產生 IL-1、IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、G-CSF 和 M-CSF，而大量誘導產生 IFN- γ 被認為是 NK 細胞活化的主因 (Wang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004)。

11.4 活化 T 細胞

T 細胞或是稱 T 淋巴球在細胞介導免疫反應 (cell-mediated immunity) 扮演重要的功能，在體內或體外的模式中可以發現靈芝多醣體能活化 T 細胞。以 γ 射線照射小鼠使脾臟 T 細胞受損，發現靈芝多醣體對受損 T 細胞的修復效果比雲芝多醣體 PSK 的效果好 (Chen *et al.*, 1995)。此外，在 PS-G (25–100 mg/ml) 處理 T 細胞能促進 IFN- γ 的產生 (Wang *et al.*, 1997)。靈芝多醣體也能增強 T 細胞增生和活化，使樹突細胞成熟，促使走向 Th1 反應 (Bao *et al.*, 2002b; Hsiao *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006b; Zhu *et al.*, 2007)。對於服用靈芝多醣體罹癌患者，12 週後發現 CD56 細胞有顯著性增加，而 CD3、CD4 和 CD8 細胞只些微增加 (Gao *et al.*, 2003)。

11.5 活化 B 細胞

赤芝多醣體能刺激小鼠脾臟 B 細胞增生，增加 3-4 倍的 B 細胞，B 細胞本身會變大，細胞表面的 CD71 和 CD25，增加免疫球蛋白的分泌和細胞內 PKC 與 PKC- γ 的表現 (Bao *et al.*, 2002a; Zhang *et al.*, 2002b; Shao *et al.*, 2004)；另外也發現 F3 多醣體能誘導調控漿細胞分化的轉錄因子 Blimp-1 表現，刺激小鼠 B 細胞活化，分化成能分泌 IgM 的漿細胞 (Lin *et al.*, 2006a)。

12. 抗腫瘤活性

早在 1968 年已有報告指出多孔菌科菇類及食用菇類子實體之熱水萃取物，在接種 Sarcoma 180 的小鼠都有明顯的抗腫瘤效果，而對於靈芝抗腫瘤之科學研究則在 1971 年開始 (Ikekawa *et al.*, 1968; Sasaki *et al.*, 1971)。後續的研究證實多醣體為其主要活性成分之一，其中 β -glucan 為有效之結構 (Borchers *et al.*, 1999)。多醣體的抗癌機制並非直接對癌細胞有細胞毒性 (cytotoxicity) 的作用，而是通過強化宿主的免疫調節功能，抑制腫瘤細胞的增殖或殺滅。抗腫瘤多醣體可歸類為一種生物反應修飾劑 (biological response modifier, BRM) (Wasser and Weis, 1999)。目前已有多種菇類多醣體進行抗癌之臨床試驗，如 lentinan (*Lentinula edodes*)、schizophyllan (*Schizophyllum commune*)、PSK (polysaccharide-K, Krestin)、PSP (polysaccharopeptide)(*Trametes versicolor*) 及 Grifon-D (*Grifola frondosa*) (Wasser, 2002; Ferreira *et al.*, 2010)。以下分別以細胞模式的體外試驗與小鼠的體內模式敘述靈芝多醣體的過去研究：

12.1 細胞體外模式

PS-G 處理人類血液單核球細胞的培養液能抑制人類血癌 U937 細胞生長，此外也可直接抑制 Sarcoma 180 細胞的增生 (Lieu *et al.*, 1992)。赤芝孢子多醣體對小鼠肝癌細胞、Sarcoma 180 細胞和 reticulocyte sarcoma L-II 細胞也有抑制生長的效果 (Liu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009b)；對人類結腸癌細胞株(SW480、HCT116 和 HT29)、血癌細胞、子宮頸癌細胞株(CaSki 和 SiHa)、乳癌細胞、肝癌細胞、淋巴瘤及多種骨隨瘤細胞都有抑制活性 (Gao *et al.*, 2005a; Muller *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006)。

比較赤芝、中國紫芝和松杉靈芝水萃物對人類乳癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 細胞株的抑制效果，發現松杉靈芝菌柄和野生中國紫芝子實體之多醣體對兩株乳

癌細胞的抑制效果是最好的 (Yue *et al.*, 2006)。

12.2 動物模式

小鼠皮下接種 Sarcoma 180 細胞模式是最常使用的動物模式，以腹腔注射 (Miyazaki and Nishijima, 1981; Sone *et al.*, 1985; Maruyama *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 2005a; Bukhman *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2008; Yue *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009b)或餵食 (Maruyama *et al.*, 1989)靈芝多醣體探討其抗腫瘤活性，其他使用的腫瘤模式還有艾氏腹水瘤 (Ehrlich ascites carcinoma, EAC) (Zhang *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2007)、肺癌細胞 (Cao and Lin, 2004; Nonaka *et al.*, 2008)、肝癌細胞 (Pang *et al.*, 2007)、乳腺腫瘤細胞 (Nonaka *et al.*, 2008)、血癌細胞 (Chang *et al.*, 2009)和前列腺癌細胞 (Evans *et al.*, 2009)，而臨床上也用於肺癌患者的治療 (Gao *et al.*, 2005b)。各種動物腫瘤模式均顯示靈芝多醣體具有抗腫瘤活性。

四、免疫與腫瘤

免疫系統是生體防衛病原菌入侵最有效的武器，可分成先天性免疫 (innate immunity) 與後天性免疫 (adaptive immunity)，圖 1-3 是參與免疫系統相關的免疫細胞：

1. 先天性免疫

先天性免疫屬於非特異性免疫，為生體第一道防線，透過吞噬細胞 (phagocytes)、樹突細胞和 NK 細胞等抵禦外來病原體的入侵。先天性免疫之細胞需經由物種特異性的受體以辨識同源抗原，為達到辨識所有的可能抗原，發展

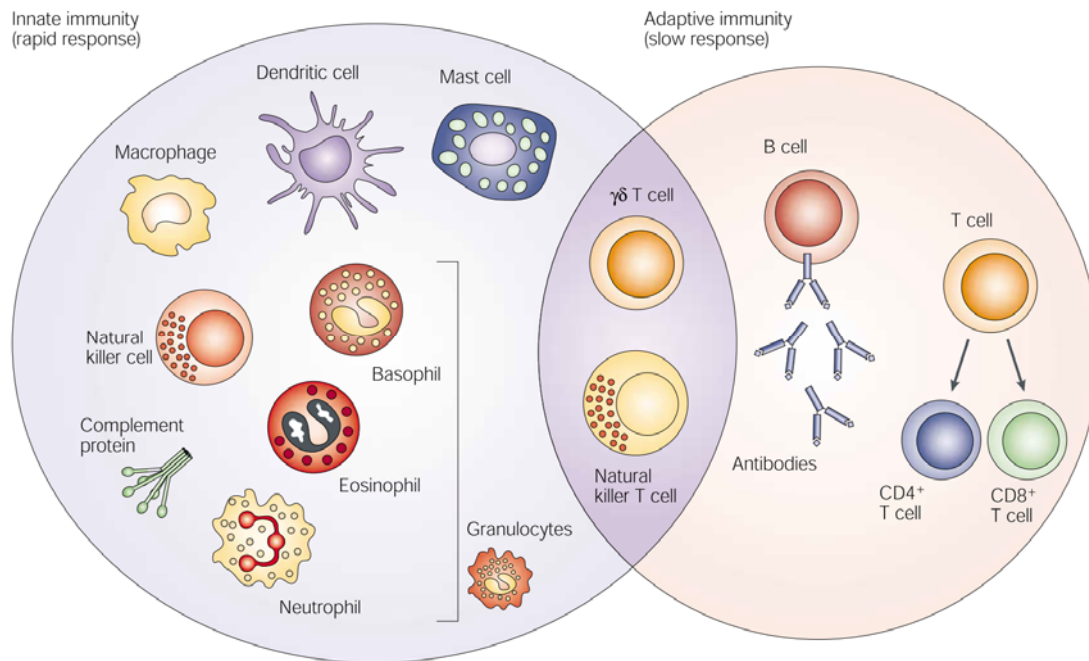


圖 1-3. 先天性免疫反應與後天性免疫反應相關之免疫細胞

Figure 1-3. The innate and adaptive immune response (Dranoff, 2004).

出一套特殊的免疫辨識系統 (Medzhitov and Janeway, 1997)。吞噬細胞包括了嗜中性白血球、單核球和巨噬細胞。當外來病原菌或微生物侵入淋巴、骨髓或是血液時，吞噬細胞會受侵入者引發的趨化作用，大量集中到感染發炎部位的附近，透過吞噬作用殺滅微生物；或是活化產生細胞毒殺物質，像是過氧化氫、一氧化氮、防禦素 (defensin) 或 TNF- α 等。NK 細胞則透過與標靶細胞緊密結合，分泌有毒物質毒殺細胞。

而發炎反應 (inflammatory response) 會使受傷或微生物入侵的部位發生小動脈和微血管擴張，增加微血管管壁的通透性，使體液和細胞由充血的血管進入組織，開始細胞內的消化反應。屬於一種保護反應，讓生體自然啟動修復機制 (Ferrero-Miliani *et al.*, 1997)。嗜中性球和單核球細胞通常出現在急性發炎反應，嗜中性球受刺激後會產生 prostaglandins 和 thromboxanes；單核球細胞則產生 arachidonic acid 氧化產物，這些免疫細胞在發炎反應均扮演重要的角色 (Davies and Allison, 1976; Goldstein *et al.*, 1977)。

2. 後天性免疫

後天性免疫屬於特異性免疫反應，除了非特異性的免疫作用外，免疫系統對於入侵外來病原視為抗原，對不同的抗原經由隨機基因重組產生專一性的抗體，專一性的分辨抗原的不同，具有免疫記憶的能力，當再次遇到相同的抗原時，即可引發更強烈的免疫反應。

特異性免疫細胞主要有淋巴細胞 (lymphocytes) 和抗原呈現細胞 (antigen-present cells, APC)。淋巴細胞又可分成 B 細胞和 T 細胞，B 細胞與抗原結合活化後分化成記憶 B 細胞和漿細胞。漿細胞可分泌大量的抗體，為體液

免疫 (humoral immunity) 的主要作用物質。而 T 細胞可分成輔助型 CD4 細胞和毒殺型 CD8 細胞。CD4 細胞主要分泌細胞激素和參與體液免疫與細胞介導免疫反應；CD8 細胞主要負責清除有病原感染的細胞。

T 細胞中的 CD4 細胞能分泌 IL-4 和 IL-5 細胞激素刺激 B 細胞，使 B 細胞成熟為漿細胞產生抗體；產生 IFN- γ 刺激樹突細胞、巨噬細胞和 B 細胞等抗原呈現細胞上的 MHC II 抗原，CD4 也會直接辨識表現 MHC II 的腫瘤細胞；傳遞訊息給 CD8 清除病原，分泌 IL-2 活化 CD8 細胞的增生及其記憶性(Bennett *et al.*, 1997; Shedlock and Shen, 2003; Gutcher and Becher, 2007; Kennedy and Celis, 2008)，而這些反應會被 Treg 抑制 (圖 1-4)。

CD8 細胞體內很重要的淋巴細胞之一，主要負責清除細胞內有病原的感染細胞，或者是清除一些變異的腫瘤細胞。CD8 細胞的活化需要 CD4 細胞提供訊息給抗原呈現細胞，再傳遞訊息給 CD8 細胞；或是 CD4 細胞直接將訊息傳遞給 CD8 細胞(Shedlock and Shen, 2003)。

樹突細胞 (dendritic cells) 活化過程，MHC II-peptide complexes 會累積在樹突細胞的表面，將抗原穩定的呈現給 CD4 細胞，活化 CD4 細胞，持續產生抗腫瘤的細胞毒殺 T 淋巴球的記憶反應 (Robson *et al.*, 2010)。

抗原呈現細胞包含了樹突細胞、巨噬細胞和 B 淋巴細胞。藉由與抗原結合進行成熟過程，並將訊息呈現給 T 細胞辨識。樹突細胞和巨噬細胞能夠察覺環境中的入侵微生物，將病原吞入並切成碎片，再將碎片的資訊呈現給 T 細胞，組成免疫示警系統，可說是啟動後天性免疫反應的關鍵，連接了先天性免和後天性免疫反應(Banchereau and Steinman, 1998; Zanoni *et al.*, 2005)。

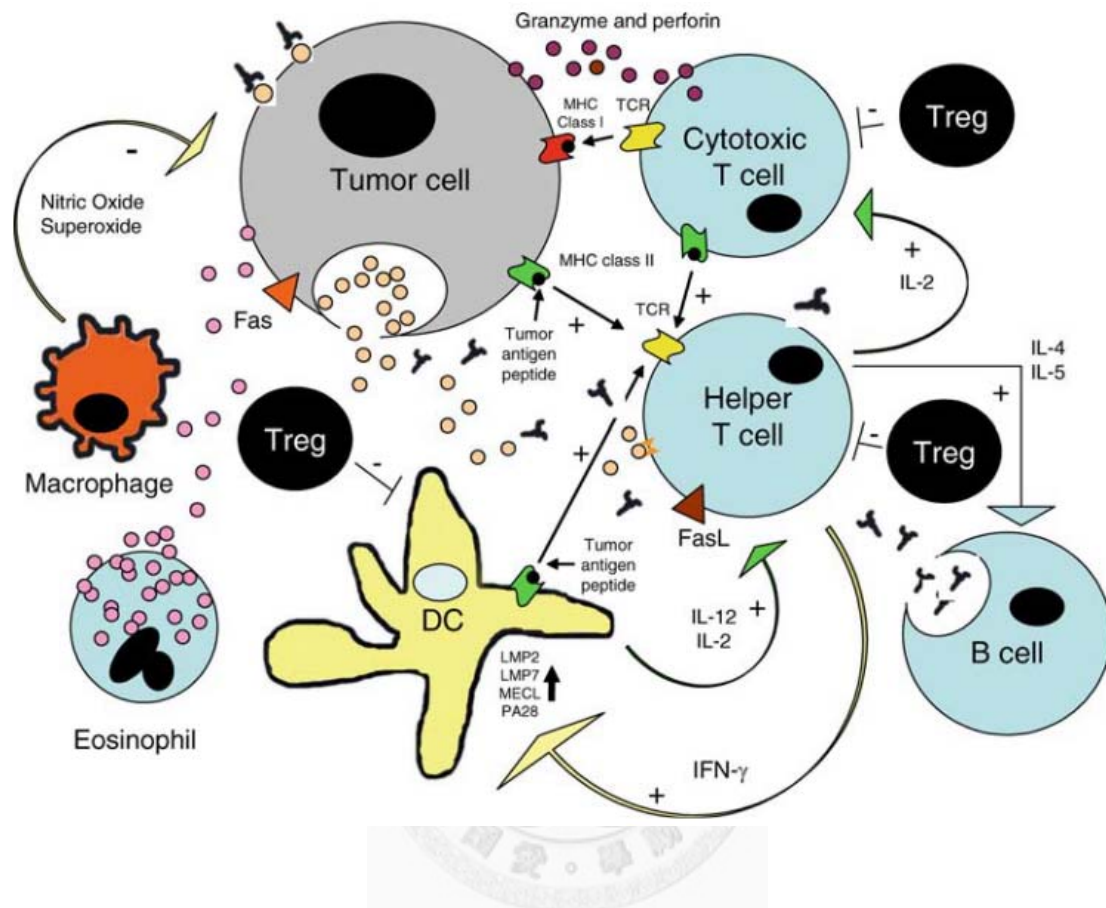


圖 1-4. CD4 細胞在腫瘤微環境中的複雜角色

Figure 1-4. The complex role of the T helper cell in the tumor microenvironment

(Knutson and Disis, 2005).

3. 免疫辨識系統

免疫系統為了有效辨識入侵的微生物或其他抗原，免疫細胞會將大多數微生物具有高度保守性之結構視為辨識目標，此保守性結構稱為病原相關分子模式（pathogen-associated molecular patterns, PAMPs），而免疫細胞辨識這些 PAMPs 則是透過模式辨識受體（pattern recognition receptors, PRRs）。

PRRs 可分成細胞膜上的和細胞質內的。細胞膜上的 PRRs 如 Toll-like receptors (TLRs)、甘露糖受體和 Dectin-1 等；細胞質內的 PRRs 如 NOD-like 受體。真菌能辨識之 PRRs 整理如表 1-5；而不同免疫細胞表面所表現的 PRRs 也有所不同（圖 1-5）。

3.1 TLRs

TLRs 因其與果蠅之 Toll 家族蛋白有高度同源性而得名。在人類與小鼠中，已有 11 種 TLRs 被分類鑑定。基本上，TLR1、6 和 9 廣泛存在於各類免疫細胞，TLR2、4 和 5 分布於除了 T 細胞、B 細胞和 NK 細胞以外的免疫細胞，TLR3 只在樹突細胞上發現，TLR7 和 TLR8 分布於周邊血液淋巴球細胞 (Nishiya and DeFranco, 2004)。

3.2 TLR4

LPS 是格蘭氏陰性細胞壁的主要成分，也是 TLR4 受體專一性的配體，以 LPS 刺激巨噬細胞時，能同時活化 MyD88 依賴（MyD88-dependent pathway）以及 TRIF 依賴（TRIF-dependent pathway）兩種訊息傳遞途徑，活化 NF- κ B 和 AP-1 轉錄因子，產生 TNF- α 、IL-1、IL-6... 等發炎細胞激素 (Takeuchi and Akira, 2001)。

3.3 Dectin-1 (Dendritic-cell-associated C-type lectin-1)

Dectin-1 為一個表現在骨髓細胞上的穿膜受體，具有胞內單一、非典型 C-type-lectin-like 區域，能專一性辨識 β -1,3-和/或 β -1,6-glucan 和未受損之酵母菌

表 1-5. 真菌辨識有關之模式辨識受體

Table 1-5. Pattern-recognition receptors involved in fungal recognition (Brown, 2006).

PRR	Fungal PAMPs	Effect of receptor deletion on fungal infection in mice
Chitinase*	Chitin	ND
Chitotriosidase*	Chitin	No effect (<i>Candida albicans</i>) [‡]
CD14	Glucuronoxylomannan	↑ Susceptibility (<i>Cryptococcus neoformans</i>)
C3	Fungal surfaces	ND
CR3	Mannose, β -glucan, N-acetylglucosamine, methylmannoside, methylglucoside, complement opsonized pathogens	ND
DC-SIGN	Internal mannose, terminal di-mannose	ND
Dectin-1	β -Glucan	↑ Susceptibility (<i>C. albicans</i>) [§]
Lactosylceramide	β -Glucan	ND
Mannose receptor	Terminal mannose	No effect (<i>Pneumocystis carinii</i> , <i>C. albicans</i>)
Mannose-binding lectin	Selected monosaccharides (such as mannose, fucose, glucose)	No effect (<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>)
Pentraxin-3	Galactomannan, zymosan	↑ Susceptibility (<i>A. fumigatus</i>)
SP-A	Selected monosaccharides (such as mannose, fucose, glucose)	↑ Susceptibility (<i>P. carinii</i>)
SP-D	Selected monosaccharides (such as mannose, glucose), β -glucan	Delayed clearance (<i>P. carinii</i>)
TLR2	Phospholipomannan, zymosan, lipoproteins, lipopeptides, glycolipids	↑ Susceptibility (<i>C. neoformans</i>) ↑ Resistance (<i>C. albicans</i>) No effect (<i>A. fumigatus</i>)
TLR4	Mannan, glucuronoxylomannan	No effect (<i>C. neoformans</i>) ↑ Susceptibility (<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>)
TLR9	CpG DNA	No effect (<i>A. fumigatus</i>), No effect on susceptibility but altered cytokine profile and fungal burden (<i>C. albicans</i>)

*Role as PRR not confirmed. [‡]Human studies. [§]P. Taylor, M. Botto, K. Haynes, S. Gordon and G.D.B., unpublished observations.

C3, complement component 3; DC-SIGN, dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin; ND, not determined; SP, surfactant protein; TLR, Toll-like receptor.

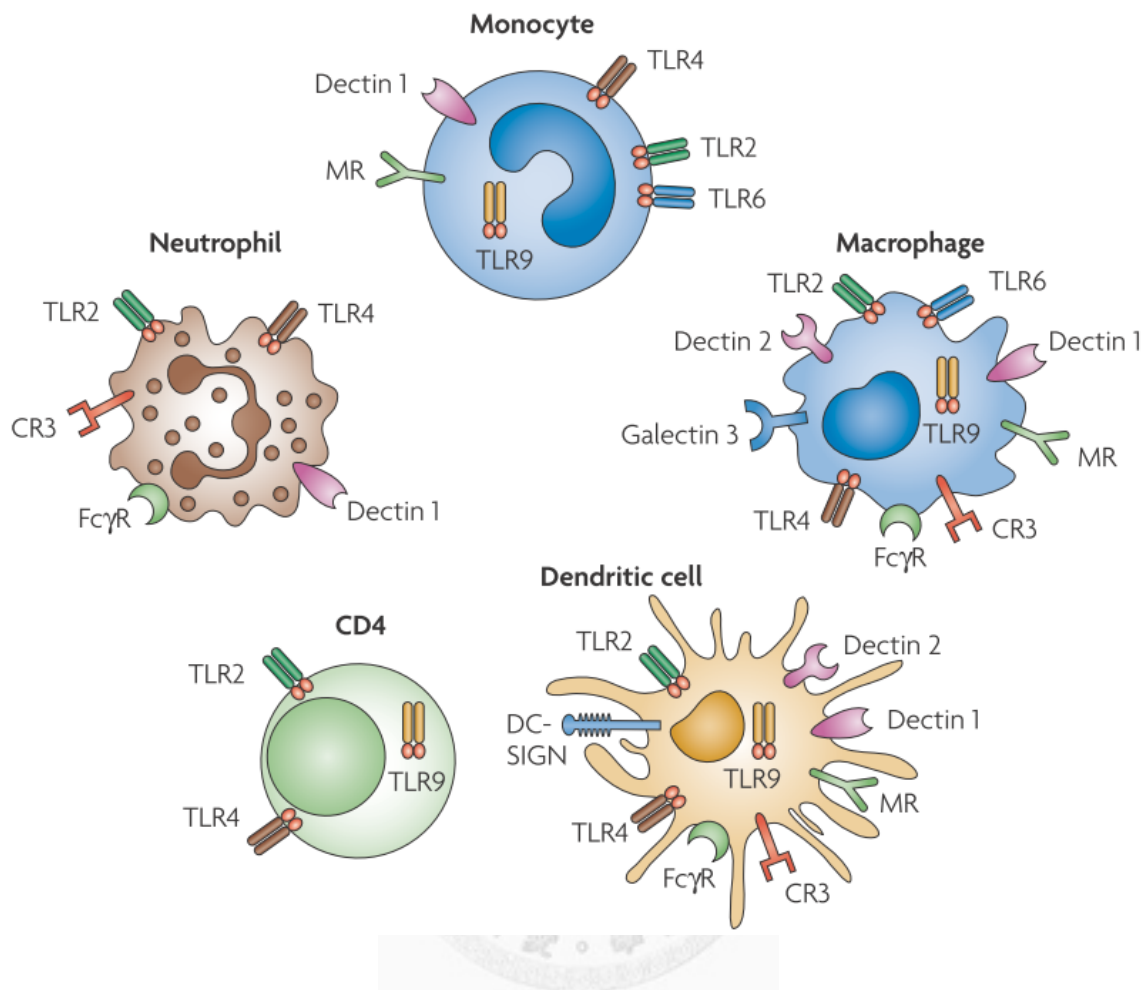


圖 1-5. *Candida albicans* 辨識之免疫細胞及其模式辨識受體

Figure 1-5. Cell populations and pattern-recognition receptors involved in *Candida albicans* recognition (Netea *et al.*, 2008).

The differential expression of PRRs by these cell types is shown. CR3, complement receptor 3; FcγR, Fcγ receptor; MR, mannose receptor; TLR, Toll-like receptors.

(Brown and Gordon, 2001)。Dectin-1 位於胞內尾端具有一個 tyrosine-based activation-like motif (ITAM)免疫受體，經由依賴 spleen tyrosine kinase (Syk)和 caspase recruitment domain protein 9 (CARD9)途徑能夠傳達各種保護反應，產生多種細胞激素，甚至會影響 CD4 細胞和 B 細胞的作用。在配體的作用下，Dectin-1 能引起氧化爆發、產生發炎細胞激素和吞噬作用等反應 (Brown, 2006; Gringhuis *et al.*, 2009)。

3.4 CR3 (Complement receptor type 3; CD11b/CD18)

CR3 是細胞表面糖蛋白的複合體，屬於 β_2 integrin 家族。CR3 的次單位包含兩個結合部位，一個為結合 β -glucan 之凝集素功能區；另一個區域為結合 C3 斷片 iC3b 之功能區。有研究提出酵母菌之 β -1,3-glucan、 β -1,6-glucan 以及分離自大麥之水溶性多醣體 β -1,3-glucan 和 β -1,4-glucan 能與 CR3 結合後，刺激 CR3 受體使白血球細胞毒殺附著 iC3b 之腫瘤細胞 (Vetvicka *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2004)。

4. 訊息傳導路徑 (signaling transduction pathway)

4.1 絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs)

MAPKs 在細胞訊息傳導路徑扮演極重要角色，MAPKs 訊息傳導已知有三條路徑，包括 extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)及 p38-MAPK (p38) (圖 1-6)。活化的 MAPK 是透過磷酸化作用而進行訊息傳導，進而調控細胞增生、細胞分化、壓力反應、細胞凋亡及發炎反應等(Hsu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007)。

4.2 NF- κ B(nuclear factor κ B)

NF- κ B 是一種轉錄因子 (transcription factor)，細胞在未受刺激前，細

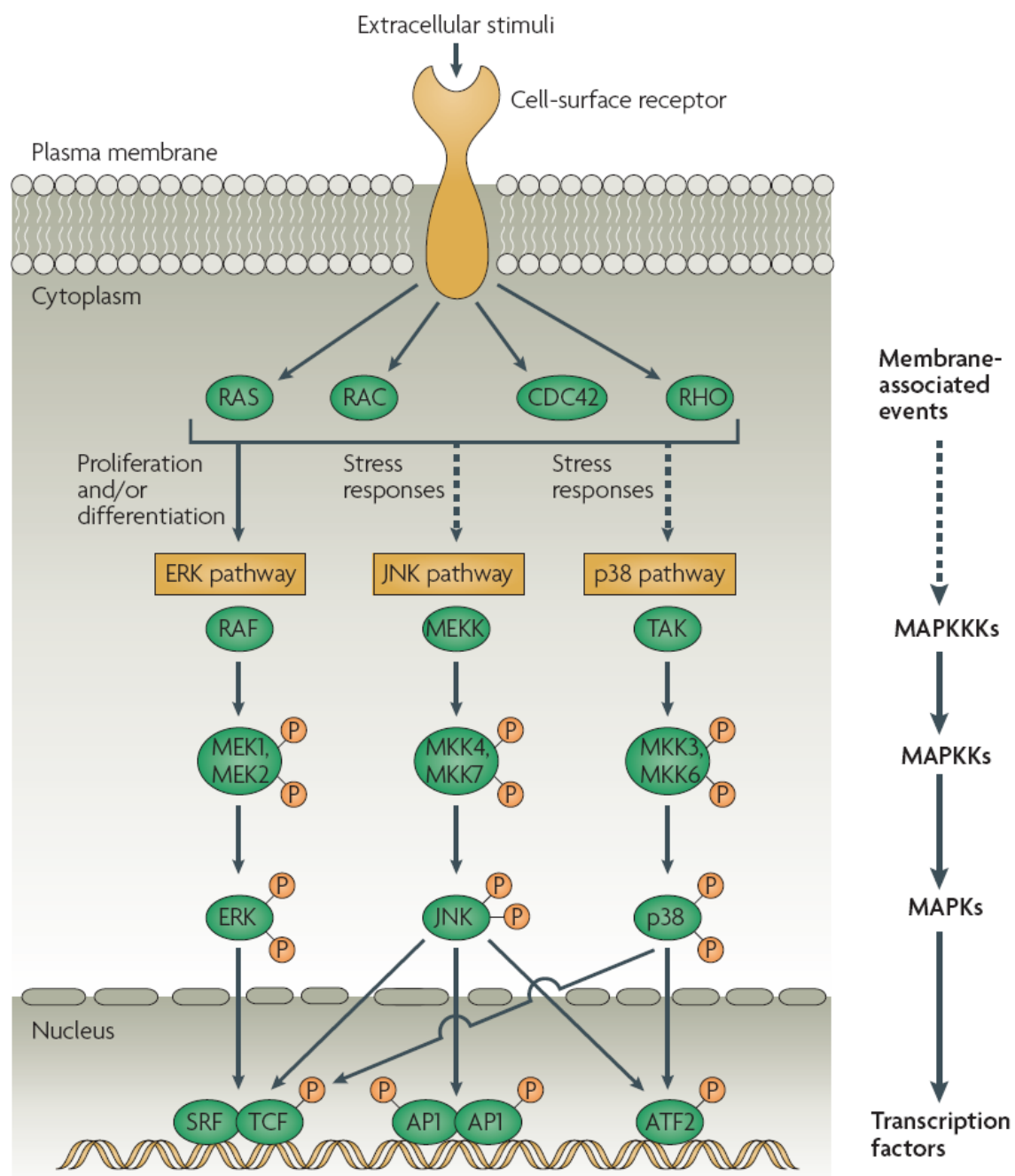


圖1-6. 哺乳動物三種絲裂原活化蛋白激酶訊息傳導途徑簡圖

Figure 1-6. Schematic diagram of the three mammalian mitogen-activated protein kinase signalling pathways (Liu *et al.*, 2007).

胞質的 NF- κ B 與其抑制分子 I- κ B 結合而呈未活化狀態；當細胞受到各種刺激後，I- κ B 受到磷酸化及 ubiquitination，並緊接著被蛋白酶體（proteasome）降解，此時 NF- κ B 被活化並移位至細胞核內，接著誘導相關的基因表現(圖 1-7)(Karin and Lin, 2002; Beinke and Ley, 2004)。當細胞受到細胞激素、細菌或病毒感染或是過氧化物的刺激會藉由 NF- κ B 活化而影響細胞的生長和分化，誘發發炎反應。NF- κ B 的調控於先天性免疫反應（如發炎反應）及後天性免疫反應上，具有重要的功能。

5. 細胞激素

細胞激素（cytokine）是一群負責傳遞各細胞間訊息的分子，由特異性的免疫細胞所分泌，主要成分為蛋白質、胜肽或醣蛋白，如 interferons、interleukins、TNF- α ...等（圖 1-4）。TNF- α 是很重要的發炎因子，在感染或是受傷早期的反應扮演重要的角色，少量 TNF- α 的釋放在免疫反應中具有正向的功能，但是過多及持續的釋放則非正常生理現象 (Beutler, 1995)。

6. 腫瘤的治療

目前的腫瘤治療方法主要有四類：（一）手術療法，直接將腫瘤及周圍可能擴散的地方切除，對擴散性腫瘤效果不佳；（二）放射線療法，以放射線的能量直接照射腫瘤細胞，但是腫瘤附近的正常細胞也會被殺滅；（三）化學療法，全身性療法，同時也會殺滅正常細胞，常搭配手術或放射線治療之輔助性療法，副作用極大；（四）其他療法：生物性療法是指增強自體免疫系統專一性清除腫瘤細胞以達到抗腫瘤的目的，主要是阻斷腫瘤細胞的分裂複製；或是使用激素類藥物阻斷腫瘤細胞生長或分裂之信號（如selective estrogen receptor modulators、

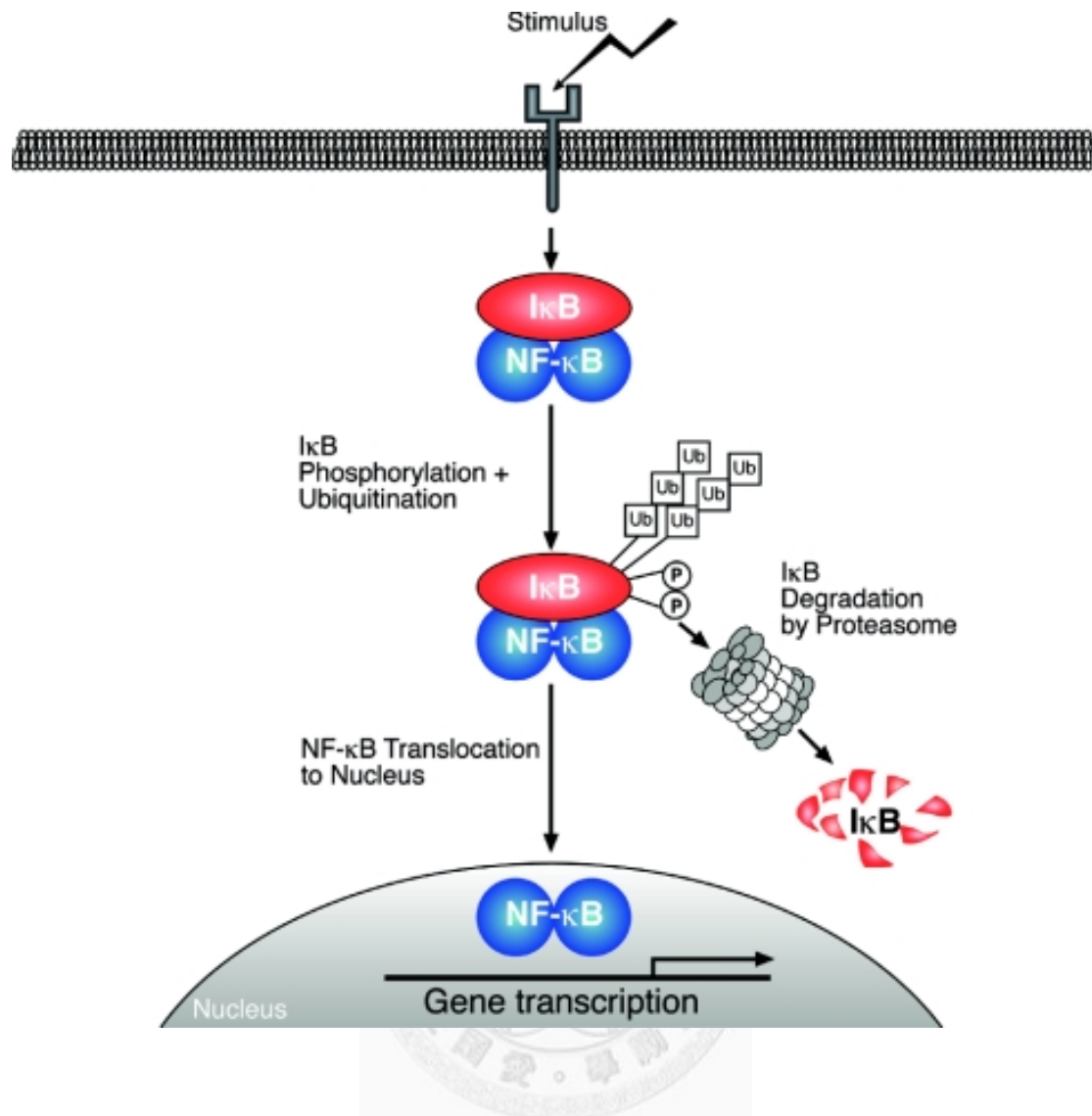


圖1-7. NF-κB的活化路徑

Figure 1-7. Model of the generic NF-κB activation pathway (Beinke and Ley, 2004).

aromatase inhibitors、receptor down- regulators...), 可以降低一般治療的副作用, 例如使用干擾素、細胞激素、colony-stimulating factors、單株抗體、疫苗、基因治療或非專一性的免疫調節劑; **血管增生抑制劑治療**是防止新血管的形成使腫瘤細胞無法得到充分的養分增殖; **骨髓移植或週邊血液幹細胞移植**, 將癌症患者的病變骨髓替換成健康的骨髓, 因為這些免疫細胞, 特別是淋巴細胞對淋巴癌或血癌病患的治療成效良好(Maury *et al.*, 2010); **過高熱治療** (hyperthermia), 讓身體組織暴露在113 °F高溫以上, 以殺死腫瘤細胞; **雷射光的應用**, 以高能量細小的光束雷射精準的去除腫瘤或未成癌 (precancerous) 生長; **光力學治療** (photodynamic therapy, PDT), 光力學治療是結合光敏感藥物及特殊的光, 在細胞附近產生氧以殺死細胞; **標靶癌症治療** (targeted cancer therapy) 則利用藥物或其他可以阻礙癌細胞生長或擴散的物質, 防止腫瘤細胞的生長增生 (<http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types-of-treatment>)。

7. 生物性抗癌療法

生物性療法是屬於比較新的治療方法, 如特異性抑制劑 (targeted therapy) 治療的概念, 將原本作用於生體所有的細胞的藥物改成只專一性攻擊腫瘤細胞, 大大降低過去抗癌藥物的副作用, 這些藥物如 selective estrogen receptor modulators、kinase inhibitors、angiogenesis inhibitors、proteasome inhibitors...等, FDA已核准上市的產品如Fareston[®]、Arimidex[®]、Gleevec[®]、Zolanza[®]、Avastin[®]...等。

抗體治療是將腫瘤細胞視為抗體的標靶細胞, 利用抗體封鎖細胞接收生長所

需的信號，或切斷腫瘤細胞需接收信號之相關受體，甚至直接與腫瘤細胞表面的蛋白質作用，進行標識功能，再由免疫系統加以專一性毒殺，導致腫瘤細胞死亡以達到治療的效果 (Wolchok and Saenger, 2008; Nelson *et al.*, 2010)。其中又以使用人類單株抗體為發展趨勢，人類單株抗體不像噬菌體或小鼠生產的抗體，在人體中不會快速被血液代謝、產生全身的發炎反應或是產生人類抗小鼠抗體等缺點。目前為止有7種人類單株抗體通過FDA審核，另有3種正在審查中，更有7種正進行phase III的試驗，81種在phase I或phase II (Nelson *et al.*, 2010)。將自體腫瘤細胞修飾後製成疫苗、或是轉殖表現細胞激素之基因等，刺激相關細胞分泌細胞激素，進而抑制腫瘤之生長(Abe *et al.*, 1995; Dranoff, 2004)。

腫瘤治療的策略上大致都是直接切除腫瘤組織或細胞、切斷腫瘤細胞生長所需的訊息或養份，或是活化生體自身的免疫機制，最終導致腫瘤細胞死亡為基礎。傳統上，對於腫瘤的處理策略採用化學藥物治療或放射線治療，但是這類的治療方式不具特異性，無法避免對正常的細胞及組織造成傷害，對身體的副作用也較廣泛。近年來對於癌細胞分子生物醫學的瞭解，研究學者已積極轉向以細胞表面抗原為標地的免疫療法，或者利用各種細胞訊息傳遞途徑之作用為目標的治療方式，另一方面也從天然藥材或傳統使用藥草類去篩選藥效佳、副作用低的有效抗腫瘤成分。其中，多醣體是植物、動物及微生物來源的天然成分，以往對多醣體的認識比較偏向能源儲存物質和結構材料上。隨著研究技術的進步，多醣體的純化、組成分析、分子構形和結構解析都有長足的進展，已知多醣體能參與了細胞間的辨識、訊息傳導、活化免疫系統和細胞的分化等生物活性，近年來受到研究人員焦點關注(Schepetkin and Quinn, 2006; Chan *et al.*, 2009; Goodridge *et al.*,

2009; Wang *et al.*, 2009a; Avci and Kasper, 2010), 多醣體在生物醫藥領域新穎功能的開發更是目前熱門的研究題目。

五、菇類之抗腫瘤成分

自古以來，菇類一直被人作為食用及藥用的材料，而菇類的藥用活性成分及運用也陸續被研究，活性之成分更能從子實體、液態培養菌絲體或是液態培養液中純化(Wasser, 2002)。以分子量大小來區分，這些活性成分又可分成小分子和大分子化合物兩大類(圖1-8)。其中多醣體和三萜類是其中較具代表性的藥用活性成分，不同來源多醣體的抗腫瘤和免疫調節功能已是具開發潛力的現代藥物。

1. 低分子量化合物

低分子量化合物主要是菇類的二級代謝產物，像是酚類化合物、聚酮類(polyketides)、三萜類和固醇類等，其中具有抗腫瘤效果的化合物整理如表1-6(Ferreira *et al.*, 2010)。本研究室從台灣紫芝醱酵液之乙酸乙酯萃取出的小分子便發現具有抑制腫瘤細胞株之生長(陳，2006)，其有效成分之實際化合物則需進一步鑑定；靈芝類純化的cerebrosides可抑制真核細胞DNA聚合酶(Zaidman *et al.*, 2005; Paterson, 2006)；洋菇和香菇中的caffeic acid phenyl ester能抑制專一性抑制NF- κ B結合在DNA上。這些小分子容易穿過細胞膜，進入腫瘤細胞中，對特定的分子目標作用，具有殺滅腫瘤細胞的活性(Zaidman *et al.*, 2005; Petrova *et al.*, 2008; Wasser, 2011)。

2. 高分子量化合物

高分子量成分以多醣體或是多醣結合物為主，多醣體以不同形式的糖苷鍵結或是多醣與蛋白質或胜肽殘基結合為多醣體-蛋白質和多醣體-胜肽（表1-7）。已有眾多證據顯示菇類多醣體透過增強巨噬細胞、NK細胞和T細胞的數量或功能 (Zhuang, 2009; Chen *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2010; Rubel *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011)，調控先天性和後天性免疫反應，活化免疫系統達到抗腫瘤的效果。

以GLPS為例，分子量約584.9 KDa，屬於多醣體-胜肽，是由靈芝子實體熱水萃取而來(Cao and Lin, 2002; Cao and Lin, 2004)。GLPS (100、200和400 mg/kg) 管餵接種S180腫瘤小鼠，發現GLPS能有效抑制腫瘤生長，具有劑量的關係(Xu *et al.*, 2011)，增強TNF- α 和IFN- γ 的表現及毒殺型T細胞和NK細胞的活性(Gao *et al.*, 2005a)；結合cyclophosphamide化療藥物處理腫瘤小鼠，可以降低化療藥物的毒性與副作用(Ning *et al.*, 2003)；GLPS作為佐劑時，患者血液IL-2、IL-6和顯著增加，而IL-1和TNF- α 下降，CD3、CD4和CD8細胞顯著性增加(Gao *et al.*, 2003)，其活化機制及免疫調節活性如圖1-9(Xu *et al.*, 2011)，刺激B細胞增生與活化、促進T細胞釋出TNF- α 和INF- γ 、增強並刺激未成熟樹突細胞成熟。對高分子量的多醣體抗腫瘤效果而言，一般認為與高分子量、低分支度和高水溶性有相關性(Ferreira *et al.*, 2010)。

目前很多學者都聚焦在靈芝抗腫瘤的效果，在體內和體外試驗累積了許多成果，靈芝也已經使用在預防或治療人類許多疾病，像是支氣管炎、過敏、肝炎、高血壓、免疫失調和腫瘤等(Yuen and Gohel, 2005; Boh *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2008; Zhuang, 2009; Li *et al.*, 2010c; Xu *et al.*, 2011)，很多研究也顯示靈芝抽出物在體外具有抑制很多腫瘤細胞株的增生作用，如直腸前列腺癌細胞(Berovic *et al.*, 2003)、肺癌細胞(Jiang *et al.*, 2005; Chen, 2006)、急性骨髓白血球癌細胞(Cheng *et*

al., 2007)、乳癌細胞(Thyagarajan *et al.*, 2006)、子宮頸癌細胞、肝癌細胞(Chen, 2006)和膀胱癌細胞(Paterson, 2006)等。



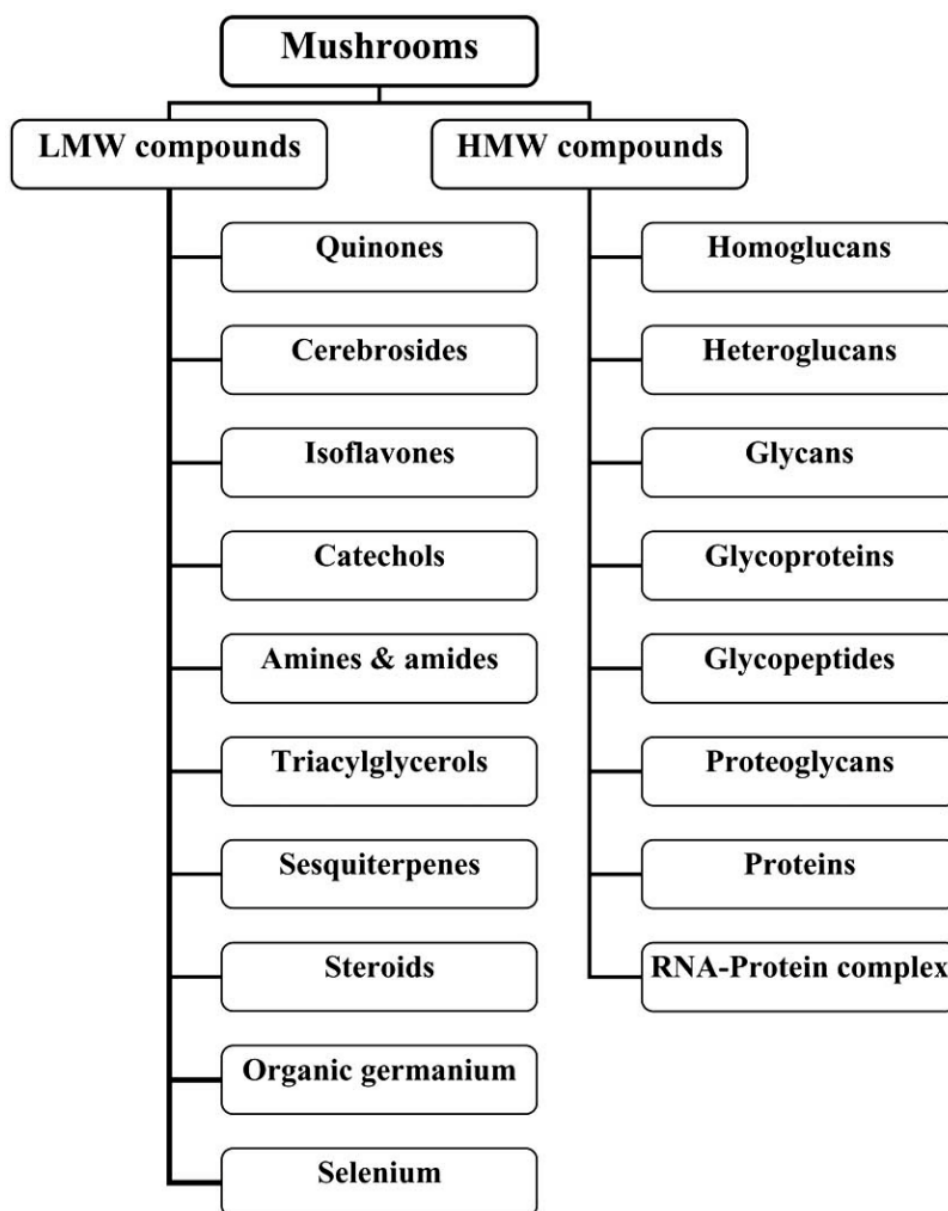


圖1-8. 食用菇菌中具有抗腫瘤功能之有效成分

Figure 1-8. Low-molecular-weight (LMW) and high-molecular-weight (HMW) compounds with antitumor potential found in mushrooms (Ferreira *et al.*, 2010).

表1-6 食用菇菌中小分子之抗腫瘤有效成分

Table 1-6. Low-molecular-weight compounds with antitumor potential in mushrooms (Ferreira *et al.*, 2010)

Class	Antitumor Agents	Mushroom Species	Molecular Targets
Quinones	Panepoxydone	<i>Panus conchatus</i> , <i>P. rudis</i> , <i>Lentinus crinitus</i>	NF-κB inhibitor
	Cycloepoxydon	<i>Xylaria strain 45-93</i>	NF-κB inhibitor
	Clavilactones	<i>Clitocybe clavipes</i>	Tyrosine kinase inhibitors
	490 Quinone (γ-L-glutaminy-4-hydroxy-2,5-benzoquinone)	<i>Agaricus bisporus</i>	DNA polymerase α inhibitor
	(E)-2-(4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl)-hydroquinone	<i>Piptoporus betulinus</i>	MMPs inhibitor
Cerebrosides	(4E,8E)-N-D-2'-hydroxypalmitoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine (4E,8E)-N-D-2'-hydroxystearoyl-1-O-β-D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine	<i>Ganoderma lucidum</i>	DNA polymerase inhibitors
Isoflavones	Genistein	<i>Flammulina velupites</i>	Cdc2 kinase modulator
Catechols	6-(3,4-dihydroxystyryl)-4-hydroxy-2-pyrone (Hispidin)	<i>P. linteus</i> , <i>Gymnopilus marginatus</i> , <i>G. patriae</i> , <i>G. parvisporus</i> , <i>Ionotus hispidus</i>	PKCβ inhibitor
	Gerronemins A-F (9a-f)	<i>Gerronema</i>	COX-2 inhibitors
Amines and amides	2-aminophenoxazin-3-one	<i>Lepiota americana</i>	Aromatase inhibitor
	Putrescine-1,4-dicinnamide	<i>Pholiota spumosa</i>	inducer of apoptosis and necrosis
Triacylglycerols	1-Oleoyl-2-linoleoyl-3-palmitoylglycerol (12)	<i>Grifola frondosa</i>	Cyclooxygenase inhibitor
Sesquiterpenes	Iludin S and M and derivatives	<i>Omphalotus illudens</i> , <i>Lampteromyces japonicus</i>	DNA-alkylating agents
Steroids	5,8-Epidioxy-24(R)-methylcholesta-6,22-dien-3β-ol	<i>Lepiota americana</i> , <i>Cordyceps sinensis</i>	Sulfatase inhibitor
	5,8-Epidioxy-24(R)-methylcholesta-6,22-dien-3β-D-glucopyranoside, 5,6-Epoxy-24(R)-methylcholesta-7,22-dien-3β-ol	<i>Cordyceps sinensis</i>	Not known
	Ergosterol	<i>Grifola frondosa</i> , <i>Agaricus blazei</i>	Cyclooxygenase inhibitor
	Ergosta-4,6,8, 22-tetraen-3-one	<i>G. frondosa</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. Neo-japonicum</i>	Cyclooxygenase inhibitor
	Lucidenic acid O, Lucidenic lactone, Cerevisterol, Lucidumol A and B, Ganoderiol F, Ganodermanondiol, Ganodermanontriol, Ganoderic acids A, F, H, W, X, Y, T	<i>Ganoderma lucidum</i>	DNA polymerase α and β, RT inhibitors, NF-κB and AP-1 inhibitors, DNA topoisomerase inhibitor
	Polyporenic acid C	<i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Daedalea dickinsii</i>	MMPs inhibitor
	Dehydroebriconic acid	<i>Poria cocos</i>	DNA topoisomerase II inhibitor
	Fomitelic acids A and B	<i>Fomitella fraxinea</i>	DNA polymerase α and β inhibitors
Organic germanium	Bis-β-carboxyethylgermanium sesquioxide: O ₃ (GeCH ₂ CH ₂ COOH) ₂	<i>Ganoderma lucidum</i>	Not known
Trace elements	Selenium	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>	DNA cytosine methyltransferase inhibitor

表 1-7 菇類中具抗腫瘤活性之高分子化合物

Table 1-7. High-molecular-weight compounds with antitumor potential in higher Basidiomycetes mushrooms (Wasser, 2002; Ferreira *et al.*, 2010).

Class	Antitumor Agents	Mushroom Species	Functions
Glycoproteins(Polysaccharide-protein complexes)	ATOM	<i>Agaricus blazei</i>	Immunomodulatory; pre-clinical animal models
	AB-FP	<i>Agaricus blazei</i>	Immunomodulatory; clinical trials
	PSPC	<i>Tricholoma lobayense</i>	Immunomodulatory; pre-clinical animal models
	Galactoxyloglucan-protein complex	<i>Hericium erinaceus</i>	Immunomodulatory; <i>in vitro</i> cell lines
	Glucosylated-protein complex	<i>Hericium caput-medusae</i>	Immunomodulatory; <i>in vitro</i> cell lines
	Ganoderans	<i>Ganoderma lucidum</i>	Immunomodulatory; <i>in vitro</i> cell lines
Glycopeptides(Polysaccharide-peptide complexes)	PSP	<i>Trametes versicolor</i>	Immuno-enhancing activity; clinical trials
	PSK or krestin	<i>Trametes versicolor</i>	Immuno-enhancing activity; clinical trials
	KS-2	<i>Lentinus edodes</i>	Immunomodulatory; <i>in vitro</i> cell lines
	Glycopeptide complexes	<i>Ganoderma lucidum</i>	Immunomodulatory; pre-clinical animal models
Proteoglycans	GLIS	<i>Ganoderma lucidum</i>	Immunomodulatory; pre-clinical animal models
	PL	<i>Phellinus edodes</i>	Immunomodulatory; pre-clinical animal models
Mixture of polysaccharides and lignin	LEM	<i>Lentinus edodes</i>	Immunomodulatory; pre-clinical animal models
Proteins	Flammulin	<i>Flammulina velutipes</i>	Immunomodulatory; <i>in vitro</i> cell lines
	LZ-8	<i>Ganoderma lucidum</i>	Immunomodulatory; pre-clinical animal models
	Clitocybin	<i>Clitocybe nebularis</i>	Cysteine proteinase inhibitor; <i>in vitro</i> enzyme inhibition assays
	Lectins	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Boletus satans</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Tricholoma mongolicum</i> , <i>Volvariella volvacea</i>	Immunomodulatory and antiproliferative; <i>in vitro</i> cell lines
RNA-protein complex	FA-2-b-Md	<i>Agaricus blazei</i>	Immunomodulatory; <i>in vitro</i> cell lines

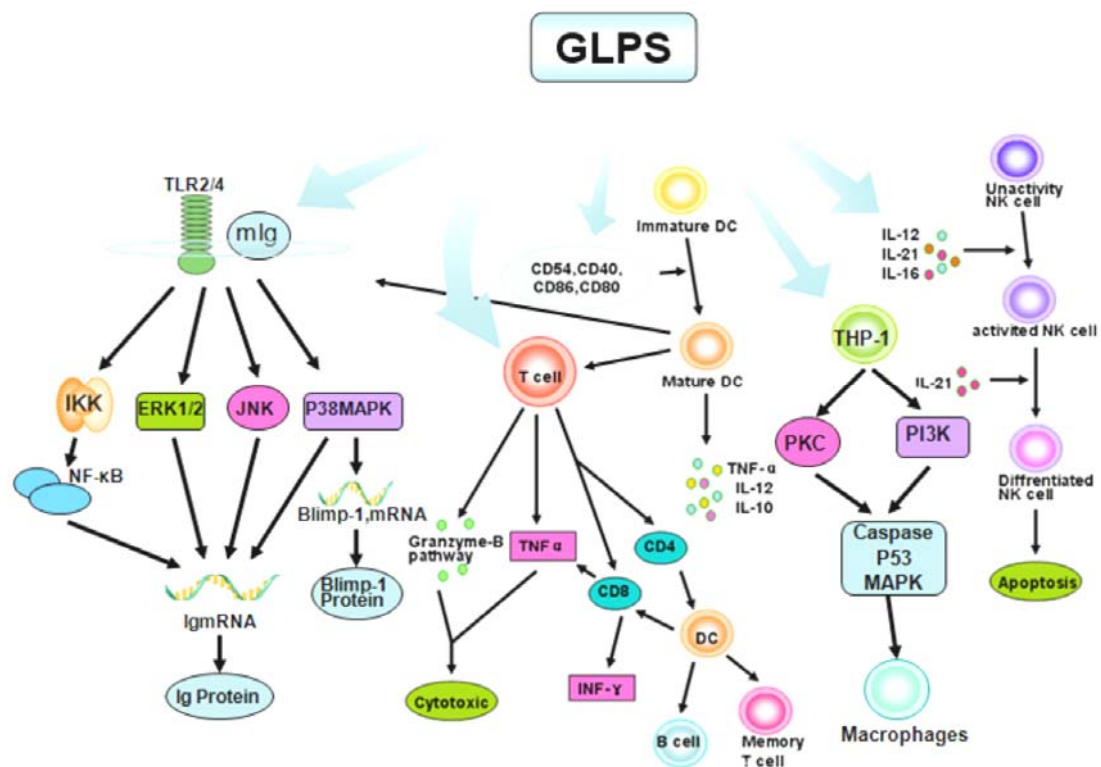


圖 1-9．靈芝多醣體 GLPS 對免疫細胞之免疫調節機制

Fig. 1-9. The immunomodulatory of GLPS on immune cells (Xu *et al.*, 2011).

六、研究架構

1. 動機與目的

近年來有關多醣體之藥理研究均顯示對於調節免疫、抗腫瘤、降血壓、降血脂、降膽固醇、保肝解毒及抗病毒等有良好的效果，也有相當多的產品量產銷售，為保健食品中的明星產品。目前對於靈芝功效之研究主要以赤芝為主，本研究使用的台灣紫芝 (*Ganoderma formosanum*) 雖可人工栽培但尚未大量推廣，而利用深層醱酵培養技術大量生產食藥用菇類，具有高產率、所需空間小、不受季節影響、低成本、品質穩定易控制及加工簡易的優點 (Zhong and Tang, 2004; Sanodiya *et al.*, 2009)，在靈芝、巴西蘑菇、樟芝、冬蟲夏草、猴頭菇及舞茸等食藥用菇類的應用已有相當豐碩之成果 (Fang and Zhong, 2002; Zhong and Tang, 2004; Boh *et al.*, 2007; Sanodiya *et al.*, 2009)，顯示以深層液態醱酵培養技術對於生產食藥用菇類菌絲體及生物活性代謝產物的重要性，對於開拓食藥用菇類商業化生產是最佳方式。

目前以赤芝的生理活性成分及功能被研究的最多，同時也是最早栽培量產之靈芝，而台灣紫芝是張東柱博士於桃園山區之楓香樹發現，為台灣原生種(Chang, 1982)。而神農本草經中記載的紫芝：甘溫無毒，主治耳聾，利關節，安神，益精氣，堅筋骨，悅顏色，久食輕生延年。特徵是菌傘褐色，紫黑色至近黑色，菌肉為均勻褐色至栗褐色，其擔孢子較一般赤芝為大。

由於不同品種靈芝之功效不同，而有關台灣紫芝之生物活性代謝產物的分離鑑定及其功能性研究則尚無科學化之探討。本實驗室曾以五公升醱酵槽探討台灣紫芝菌絲體及胞外多醣體之最適醱酵生產條件，並以人類肝癌細胞 (Hep 3B cell) 確定台灣紫芝菌絲體醱酵液生物活性代謝產物之肝臟保健功能(陳，2006)。利用

液態醱酵培養靈芝菌絲體雖不可產生完整靈芝之成份，但仍產生大量的靈芝多醣體，本研究將以實驗室已建立之台灣紫芝液態醱酵條件生產胞外多醣體，進一步進行胞外多醣體的分離與純化，以小鼠巨噬細胞（RAW 264.7 cells）模式，探討台灣紫芝多醣體是否能刺激活化巨噬細胞之免疫調節的功能、及免疫調節作用之相關機制、刺激免疫細胞之訊息傳遞途徑，同時也進行體內抗腫瘤功能之驗證和抗腫瘤機制之探討，以期待利用液態醱酵培養方法生產台灣紫芝多醣體，開發成為具免疫調節功能之保健食品。

2. 研究架構

本研究之基本架構如圖 1-10 所示，其架構分述如下：

2.1 台灣紫芝多醣體的純化與性質

2.1.1 台灣紫芝活性多醣體的分離與純化

2.1.2 台灣紫芝多醣體性質之探討

2.1.3 台灣紫芝多醣體 PS-F2 醣基鍵結之分析

2.2 台灣紫芝多醣體免疫調節機制之探討

2.2.1 評估 PS-F2 刺激巨噬細胞 RAW 264.7 的活性

2.2.2 探討 PS-F2 刺激巨噬細胞 RAW 264.7 的訊息傳遞途徑

2.2.3 探討 PS-F2 活化巨噬細胞 RAW 264.7 的免疫受體

2.3 評估台灣紫芝多醣體的抗腫瘤活性

2.3.1 管餵 PS-F2 對 C57BL/6 和 BLAB/c 小鼠的影響

2.3.2 PS-F2 對接種 S-180 腫瘤小鼠之影響

2.3.3 PS-F2 對接種 B16 腫瘤小鼠之影響

2.3.4 PS-F2 對接種 C26 腫瘤小鼠之影響

2.3.5 PS-F2 抗腫瘤機制之探討



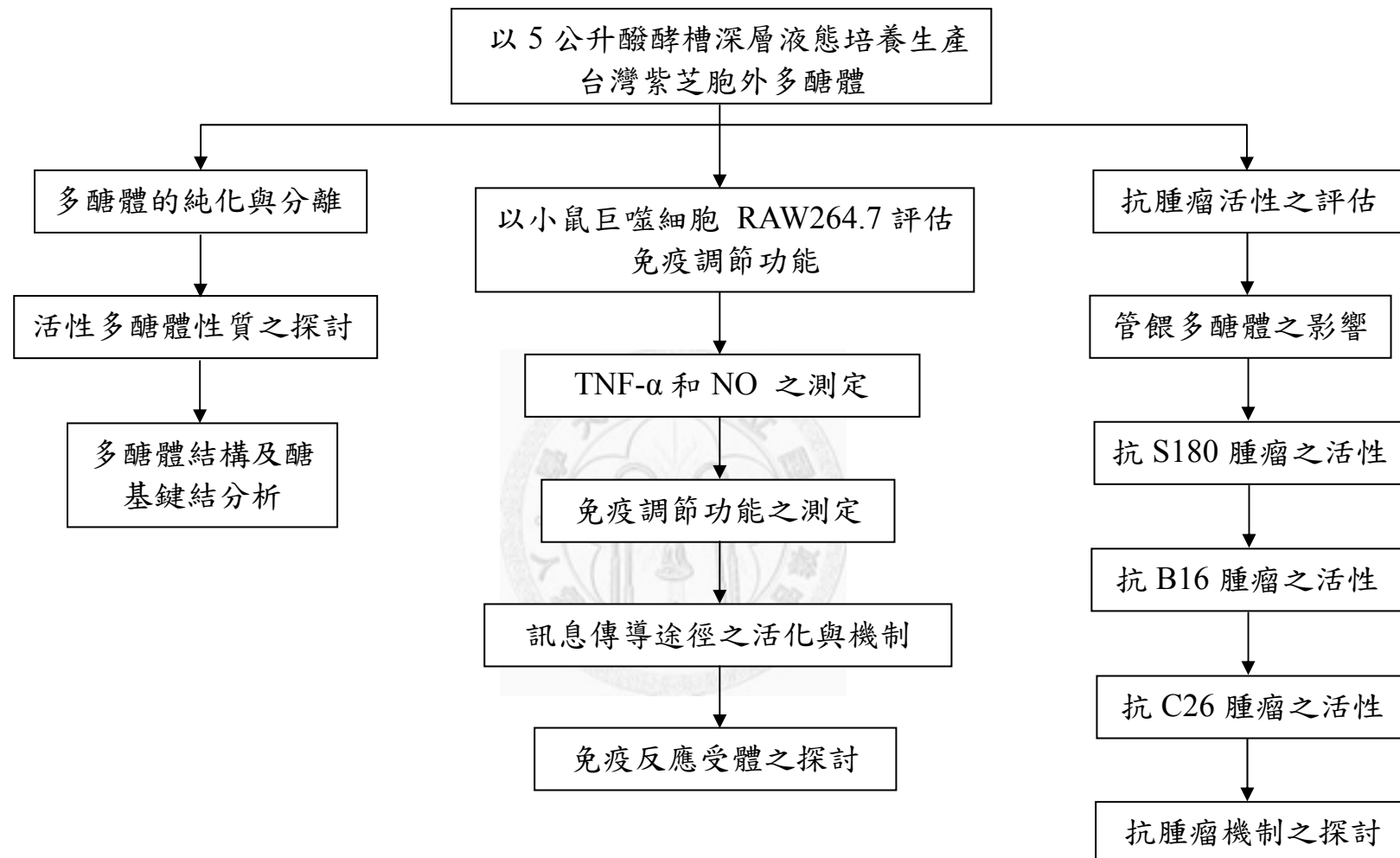


圖 1-10. 本研究之基本架構

Figure 1-10. The scheme of this study.

第二章 台灣紫芝多醣體刺激 小鼠巨噬細胞活化及樹突細胞成熟

一、前言

免疫系統是保護生物體免於受到細菌、病毒或寄生蟲等病原直接的侵襲，而免疫系統就是靠著先天性免疫與後天性免疫兩種彼此互相作用的系統。先天性免疫反應是依靠 PRRs 辨認微生物的保守結構 PAMPs。吞噬細胞對微生物病原的辨認是啟動先天性免疫反應很重要的步驟，可以很快對侵入物做出反應。而吞噬細胞有單核球、巨噬細胞、樹突細胞、嗜中性球和肥大細胞 (mast cell)；這些細胞中，巨噬細胞和樹突細胞是吞噬細胞，在清除影響宿主的細胞或分子以及做為抗原呈現上扮演很關鍵的功能。

一般而言，巨噬細胞是第一線抵禦細菌的感染或是腫瘤細胞生長的主要免疫細胞，巨噬細胞表現相當多的 PRRs，讓巨噬細胞足以與很多類病原的保守結構相結合作用，消化結合的微生物成囊泡 (Aderem and Underhill, 1999)。巨噬細胞同時也是具有抗原呈現功能的吞噬細胞，能夠分泌前發炎物質及抗菌中介物，如細胞激素、一氧化氮、活性氧和趨化素 (chemokines) 等。巨噬細胞經由細胞激素及抗原呈現，誘導 T 細胞走向 Th1 反應，活化 CD8 細胞殺死感染細胞，或是活化 CD4 細胞和 B 細胞加速抗體的生成，引發後天性免疫反應(Schnare *et al.*, 2001)。

樹突細胞是從單核球分化而來，受 PRRs 辨認的觸動而活化，隨即抗原的呈現連接後天性免疫反應。樹突細胞成熟活化，細胞表面及共激分子 CD40、CD80、

CD86 和 MHC II 的表現會增加，並且會移動到淋巴組織，在淋巴組織與 T 細胞和 B 細胞作用，啟動適當的後天性免疫反應，這些被活化的細胞依序與已活化的巨噬細胞合作，增強巨噬細胞殺滅外侵病原的效果(Cao and Lin, 2002; Lin *et al.*, 2006b)。

參與反應的 PRRs 能促進先天性免疫反應，這些受體如 TLRs、Dectin-1 和其他等。除了 TLRs 外，已有一些 PRRs 能活化巨噬細胞（圖 1-4），產生細胞激素。因此，真菌多醣體可能可以作為 PAMPs（表 1-5），受到適當的 PRRs 所辨識，如 Dectin-1、CR3、scavenger receptors、lactosylceramide (LacCer) 和 TLRs (Herre *et al.*, 2004; Akramiene *et al.*, 2007)。近年來，Dectin-1 這個特殊的受體被認為是辨識真菌結構成分 β -glucan 的主要受體，刺激巨噬細胞產生 TNF- α (Brown and Gordon, 2001; Taylor *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2008; Kankkunen *et al.*, 2010)。 β -glucan 受到辨識後，Dectin-1 能影響吞噬作用，活化後誘導呼吸爆發 (respiratory burst)，產生 TNF- α (Underhill *et al.*, 2005; Gringhuis *et al.*, 2009)。已知 β -glucan 能透過 Dectin-1 刺激單核球、巨噬細胞、嗜中性球和 langerhans 細胞(Herre *et al.*, 2004)。

台灣紫芝是分離自桃園山區的台灣原生種，雖然已發現二十幾年，期間僅有一篇有關自由基清除與護肝活性的文獻發表 (Lin *et al.*, 1995)。鑑於預防醫學意識的提升，天然靈芝相關之多醣體產品供應有限，利用深層液態發酵培養生產活性多醣體將可解決廣大市場的需求。目前對於台灣紫芝多醣體是否具有免疫調節活性完全不清楚。本研究將以深層液態發酵培養台灣紫芝，生產純化胞外活性多醣體，以小鼠細胞模式探討其免疫調節活性及活化機制。

二、材料與方法

1. 實驗菌株、細胞株及動物

本研究使用台灣紫芝(*Ganoderma formosanum*) ATCC 76538 菌株，培養於菌株保存用培養基。6-8 週齡之公 C57BL/6、BALB/c 和 C3H/HeN 小鼠購自國家實驗動物中心 (National Laboratory Animal Center)，C3H/HeJ (TLR4 mutant) 由林兆東博士提供 (National Health Research Institutes, Taiwan)，飼養於台大生科院動物房，溫度控制在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、溼度 $50 \pm 5\%$ 及 12/12 小時光暗循環。

小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 培養於含 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, Hyclone, Logan, UT 或 PAA Laboratories, Pasching, Australia) 之 DMEM (HyClone, Logan, UT)；THP-1 培養於含 10 % 胎牛血清之 RPMI1640 (HyClone) (RPMI10)。所有細胞均培養於 5 % CO_2 、 37°C 培養箱，每 2-3 天繼代細胞以維持於對數期生長。

2. 培養基組成

2.1. 菌株保存用培養基：potato dextrose broth dehydrated powder 2.4 %，agar 1.5 % (PDA 培養基)，pH 7.0。

2.2. 種菌培養基：potato dextrose broth dehydrated powder 2.4 % (PDB 培養基)，pH 7.0。

2.3. 醱酵槽培養基：malt extract 1.5 %，yeast extract 0.5 %，glucose 5.0 %，pH 4.5 (ME-YE 培養基) (陳，2006)。

3. 培養方法

3.1. 種菌培養

將台灣紫芝菌絲接種至 PDA 培養基，於 25 °C 下恆溫培養 7 天，自培養基取 4 平方公分大小之菌絲塊，接於含 100 mL 種菌培養基之 500 mL Hinton 氏三角瓶中，於 25 °C 下振盪培養 72 小時(迴轉半徑 7 公分，轉速 120 rpm)。

3.2. 五公升醱酵槽之培養 (陳，2006)

生產種菌培養 72 小時之後，接種於五公升醱酵槽 (Model KMJ-5B, Mitsuwa Rikagaku, Osaka, Japan)，內含三公升 ME-YE 培養基，於 25 °C 下培養 7 天。接種量 10 %，攪拌速度 150 rpm，通氣量 1 vvm。

4. 胞外多醣體之回收及純化

將醱酵培養液以抽氣過濾收集培養上清液，加入 3 倍體積之 95 %酒精沉澱多醣體，於 4 °C 下靜置過夜後，以 8,000 ×g 4 °C 下離心 10 分鐘(HIMAC centrifuge CR21，Hitachi)，所得沉澱經冷凍乾燥後即為胞外粗多醣 (cEPS)。將 cEPS 以 0.1 N Tri-HCl 緩衝液 (pH 7.0) 於 100 °C 加熱一小時溶解，並離心去除不溶的多醣體。溶解之粗多醣以 Sephaose CL-6B (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)進行管柱膠體過濾色層分析 (90×2.6 cm)，流洗液為 0.1 N Tri-HCl 緩衝液 (pH 7.0)，以流速 0.5 mL/min 每管流洗 7.5 mL 收集分劃。

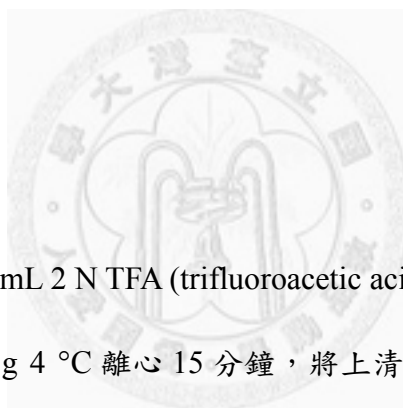
管柱層析之各分劃以酚硫酸法 (phenol-sulfuric acid) 分析總醣含量。並以 OD 280 nm 測定蛋白質含量。為排除多醣體樣品在製備過程中受到 LPS 的汙染，樣品經由去內毒素管柱 (Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel, Thermo Scientific, Rockford, IL) 處理，並使用 LAL (Limulus amoebocyte lysates) Pyrogen kit (detection limit 0.03 EU/mL, Associates of Cape cod, Inc. , Falmouth, MA)試驗測定內毒素的

含量，推估多醣體樣品之 LPS 含量皆低於 0.03 EU/mg。

5. 測定總醣及蛋白質含量

總醣含量以酚硫酸法 (Dubois *et al.*, 1951) 進行分析，以 D-glucose (0-200 $\mu\text{g/ml}$) 製作標準曲線。分析方法修正於 96 孔盤內進行，取 40 μl 的樣品與 40 μl 5 % 酚溶液混合後添加 200 μl 濃硫酸。混合後於室溫靜置 5min，產生橘黃色反應液於 ELISA plate reader (Dynex, Chantilly, VA) 測定 490 nm 吸光值。

蛋白質濃度以 Bio-Rad protein assay dye reagent 或以 BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) 進行分析，並以 BSA (0-2000 $\mu\text{g/ml}$) 製作標準曲線。



6. 單糖組成分析

取多醣樣品，加入 5 mL 2 N TFA (trifluoroacetic acid)，於 100 °C 下作用 8 小時，待冷卻後以 11,000 $\times g$ 4 °C 離心 15 分鐘，將上清液以抽氣法去除 TFA，再以 1 mL 蒸餾水復溶，適當稀釋後以 0.45 μm 過濾膜 (Millipore, Billerica, MA) 過濾，再以 HPAEC-PAD (high-performance anion-exchange chromatography-pulse amperometric detector, Dionex Bio-LC system 300, Dionex Co., Chelmsford, USA) 分析單糖組成 (Marry *et al.*, 2002)。分析管柱為 CarboPac PA-1 (4 $\times$ 250 mm²)，以 16 mM NaOH 進行流洗，流洗速率為 1.0 mL/min，注入管柱之樣品量為 25 μL ，使用 PAD 偵測器，設定偵測電壓為 E1 = +0.05 V (t1 = 420 ms)、E2 = +0.75 V (t2 = 180 ms)、E3 = -0.15 V (t3 = 360 ms) 及 SISC 32 Chromatography data station Model 9724-4 積分介面卡 (訊華公司，台北，台灣)

7. 醣鍵結分析

以 2 M TFA (121°C, 2 h) 水解，製備 methylated alditol acetates 甲基化衍生物，再以 NaBD₄ (10 mg/ml, 室溫, 2 h) 還原，acetic anhydride (100°C, 1 h) 乙醯化製備樣品。樣品溶解於 hexane 在 GC-MS (Hewlett-Packard Gas Chromatograph 6890 配備 HP 5973 Mass Selective Detector) HP-5MS fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm I.D. 60°C, Hewlett-Packard, East Lyme, CT) 分析，管柱壓力維持在 8.2 psi，以氦氣 (1 mL/min) 為 carrier gas，溫度於 60°C, 1 min，之後增加到 90°C, 1 min，接著以 8°C/min 於 25min 升溫至 290°C。

8. 分子量測定

多醣體的分子量是利用膠體過濾層析測定。Sephadex CL-6B 膠體以 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0, 7.5 ml/15min) 流洗平衡，利用葡萄聚醣標準品(分子量 11, 28, 50, 145, 235 和 1105 KDa; American Polymer Standards Co. Ltd., OH, USA) 流洗之分劃管數與標準葡萄聚醣分子量對數值製作標準曲線；多醣體樣品在相同條件下流洗，由流洗分劃管數計算分子量。

9. β -1,3-glucan 含量分析

將樣品溶於 3 ml 0.3 N 的 NaOH 中，再以 1 N HCl 調整 pH 至 11.5 ± 0.05 ，並以 Na₂HPO₄-NaOH 緩衝液(pH 11.5)定容至體積 10 ml，取 0.2 ml 樣品與 0.2 ml 的 0.1 % (w/v) aniline blue (Ferak, Berlin, Germany)混合後於室溫反應 2 小時，形成 β -1,3-glucan-fluorochrome complex。產生的螢光反應以 fluorescence microplate reader (Beckman Counter, DTX-880 multimode detector)進行檢測。設定測定激發波長與發射波長分別為 395 和 495 nm，檢測其螢光讀值(Ko and Lin, 2004)。

標準檢量線是以 laminarin (0-50 μ g/ml, Sigma L9634) 製作，標準品同樣品

先調整 pH 值後再與 aniline blue 反應呈色。

10. 多醣體刺激小鼠巨噬細胞產生腫瘤壞死因子

RAW 264.7 細胞 (1×10^5 cells/well) 加入 96 孔盤中培養過夜，刺激前更換新的培養基，加入多醣體樣品刺激 20 小時後，收集培養液以 ELISA 法進行 TNF- α 分析(PeproTech, NJ, USA 或 eBioscience, San Diego, CA)。

ELISA 分析 TNF- α 參考產品使用說明書，於 96 孔 ELISA 微量盤中加入 100 μ l 0.8 μ g/ml capture antibody，置於室溫下過夜。以 wash buffer 清洗三次，加入 200 μ l/well blocking buffer，室溫下處理一小時，再以 wash buffer 清洗三次，加入細胞培養上清液或 TNF- α 標準溶液(0-2000 pg/ml) 100 μ l，於室溫下反應 2 小時後，以 wash buffer 清洗三次。接著加入 100 μ l detection antibody 於室溫下作用 2 小時後，以 wash buffer 清洗三次，加入 Avidin-HRP 100 μ l，避光作用 30 分鐘後，最後加入 TMB 基質液反應 20 分鐘，再以 ELISA Reader 偵測波長 650 nm 吸光值。

11. 多醣體刺激小鼠巨噬細胞產生一氧化氮

NO 是由 NO synthase 合成，其半衰期很短，在產生後很快的就會氧化成亞硝酸鹽及硝酸鹽，因此測定細胞培養液中的 sodium nitrite 濃度來代表 NO 的濃度。NO 產生量的測定也用來評估巨噬細胞被活化的重要指標之一。

RAW 264.7 細胞 (1×10^5 cells/well) 加入 96 孔盤中培養過夜，刺激前更換新的培養基，將 RAW 264.7 細胞以不同濃度之胞外多醣體刺激後，取 50 μ l 培養上清液加 100 μ l 的 Griess 試劑(1 % sulfanilamide 和 0.1 % naphthylendiamine 之 5 % 磷酸溶液 1:1 混合) 混合，反應 5 分鐘後以 ELISA plate Reader 偵測波長 550 nm

吸光值。形成的產物主要以穩定的 nitrite 存在，故以 sodium nitrite 反應製作標準曲線代表 NO 的生成量(Ding *et al.*, 1988)。

12. 多醣體刺激小鼠巨噬細胞增生之影響

細胞的增生是以 MTT 比色法 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma]測定。將 RAW 264.7 cells(5×10^5 cells/well)置於 96 孔盤，以各種 PS-F2 濃度於 37 °C 處理，測定前先添加 20 μ L MTT (5mg/mL) 於 37 °C 下反應 3 h，反應後先離心，吸取上層液後添加 100 μ L DMSO 以溶解形成的 formazan 藍色結晶，再於 ELISA plate reader 測定 570 nm 吸光值。以未刺激之細胞作為控制組，定為 100 %計算。

13. 製備小鼠骨髓細胞分化之樹突細胞

先以 5 mL RPMI10 洗出犧牲小鼠之腿骨內骨髓細胞至 6 cm 平皿，收集細胞於 25 °C、300 $\times$ g 離心 5 分鐘，吸除上清液後以 2 mL ACK lysis buffer 作用 45 秒，加 10 mL RPMI10 中止反應，離心後計數培養。取 2.5×10^6 細胞於 10 cm 養菌用平皿，於 10 mL RPMI10 中添加 10 ng/mL murine GM-CSF，於含 5 % CO₂ 之 37 °C 恆溫箱中培養，培養第 3 天另添加含 10 ng/mL GM-CSF 之 10 mL RPMI10 培養基；第 6 天，於 25 °C、300 $\times$ g 離心 5 分鐘，細胞培養於 10 mL 含 10 ng/mL GM-CSF 之 RPMI10 培養基，第 7 天收集未貼附之細胞即為未成熟之 BMDCs (Lutz *et al.*, 1999)。

14. BMDCs 成熟標記之分析

取未成熟之 BMDCs (1×10^6 cells/mL)接種於 6-well 培養盤，分別以紫芝多

醣體 PS-F2 及 LPS 刺激 24 小時，再以流式細胞儀(flow cytometry)分析 BMDC 表面上之成熟標記。刺激過的細胞先以 rat anti-CD16/32 mAb (clone 2.4G2, BD Pharmingen)處理 30 分鐘以封鎖 FcγRIIB/III receptor。接著再以各種 mAbs [PE-Cy5 anti-MHC II (M5/114.15.2), Biotin anti-CD40 (1C10), APC anti-CD80 (B7-1), PE anti-CD86 (B7-2)及 FITC anti-CD11c (N-418), eBioscience] 於 4 °C 染色 30 分鐘，PBS 清洗後，有些樣品再以二抗 streptavidin-PE-Cy7 於 4 °C 染色 30 分鐘，最後以 FACSCano II Flow Cytometer (BD Biosciences)進行測定，使用 FlowJo software (Tree Star, Inc)分析數據。

15. 巨噬細胞吞噬作用分析

15.1. 製備 FITC-*E. coli*

將熱致死的 *E. coli*(5×10^8 cell)懸浮在 5 mL 0.2 M sodium carbonate buffer (pH 9.6)，加入 5 mL 的 FITC 溶液(0.2 mg/mL, Sigma, F4272)於 37 °C 下反應 30 分鐘，再以 0.1 M sodium carbonate buffer 清洗 5 次，將菌體懸浮於 5 mL 胎牛血清，於 37 °C 調理 30 分鐘，清洗 2 次後冷凍乾燥，於 4 °C 暗處儲存備用。

15.2. RAW 264.7 細胞吞噬活性分析

將不同濃度的多醣體樣品與 RAW 264.7 細胞於 37 °C、5 % CO₂ 培養箱培養 24 小時，再與 1 mg FITC-*E. coli* 於 37 °C 下反應 1 小時。以冰浴終止反應，加入 0.1 % trypan blue 清除細胞外的螢光反應，清洗後以 FACS Cano II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA)測定被吞噬 *E. coli* 的螢光強度。使用 FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, MA)分析 RAW 264.7 細胞吞噬 *E. coli* 情形(Perticarari *et al.*, 1994)。

16. 西方轉漬法及抑制劑試驗

為了探討 PS-F2 刺激免疫細胞活化的訊息傳遞途徑，利用西方轉漬法及專一性抑制劑測試 PS-F2 是否會透過 MAPKs 和 NF- κ B 途徑刺激 RAW 264.7 cells 產生 TNF- α 。

MAPKs 是否活化是透過偵測 MAPKs 的磷酸化情形確認。將 RAW 264.7 細胞(1×10^6 cells/mL)於 PS-F2 刺激前先以不含血清之 DMEM 培養基於 37 °C 培養 2 小時，再以 PS-F2 刺激不同時間後取樣。刺激之細胞以 200 μ L SDS sampler buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, pH 6.8)製備細胞抽出物，95 °C 加熱 10 min，離心後進行 12.5 % SDS-PAGE 電泳，接著轉漬到 nitrocellulose 膜上。以含 5 % skim milk 的 TBS 緩衝液於室溫作用 1 小時，再分別以初級抗體 (anti-p-JNK, anti-p-Erk, anti-p-p38, anti-JNK, anti-Erk 和 anti-p38, Cell Signaling, Danvers, MA; β -actin, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA 或 HDAC1, Upstate Biotechnology, Waltham, MA) 在 4 °C 反應過夜，以含 0.1 % Tween-20 之 TBS 緩衝液清洗三次，再加入標示 HRP 之二次抗體於室溫下反應 1 小時，以含 0.1 % Tween-20 之 TBS 緩衝液清洗三次，使用 enhanced chemluminescence kit (ECL, VisGlow, Taiwan)和 chemiluminescence imaging system (UVP Autochemi, Upland, CA)檢測。色帶的濃度強弱以 ImageJ software (National Institutes of Health)分析

NF- κ B 的活化同樣以西方轉漬法偵測 NF- κ B 的核移位(nuclear translocation)及 I- κ B 的降解。將 RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/mL)於 6 cm 平皿中以 PS-F2 刺激不同時間後，取樣製備細胞質抽出物及細胞核抽出物。再以 anti-I- κ B α (Cell Signaling, #9242)及 anti-NF- κ B p65 (Santa Cruz, SC-372) 之初級抗體進行西方轉

漬。使用 enhanced chemluminescence system 檢測。

抑制劑試驗是取 RAW 264.7 細胞(1×10^6 cells/mL)接種於 96 孔盤，先以 MAPKs 之專一性抑制劑 (JNK 抑制劑 SP600125, p38 抑制劑 SB203580 和 ERK 抑制劑 UO126) 或 NF- κ B 之專一性抑制劑(MG132 及 Calbiochem No. 481406)，在 PS-F2 刺激前處理 30 分鐘，再以 PS-F2 刺激 20 小時後取上層液分析 TNF- α 產生量之變化。

17. 製備西方轉漬法細胞質與細胞核萃取液

將在 6-cm dish 的 RAW 264.7 細胞先以 PBS 清洗後刮起置於 1.5 ml 離心管，離心後($1,500 \times g$ 、3 min)懸浮於 200 μ l buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)，於冰上溫和混合 15 min 後添加 10 μ l 10 % Nonidet P-40 破菌。離心後取上層液為細胞質萃取液。

細胞核沉澱物再懸浮於 50 μ l buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)充分混合後於 4 °C 靜置 15 min，離心後上層液為細胞核萃取液。樣品可置於-80 °C 保存待測。

18. 參與細胞膜受體之分析

分別將細胞膜受體中和抗體 (Anti-Dectin-1、Anti-CR3) 或受體專一性抑制劑 (mannan、laminarin、piceatannol) 先與 RAW 264.7 細胞反應一小時，再以 PS-F2 刺激 20 小時後取上層液分析 TNF- α 之產生量。

19. 製備小鼠骨髓分化巨噬細胞

以 5 mL RPMI10 洗出犧牲小鼠腿骨內骨髓細胞至 6 cm 平皿，收集細胞於 25

°C、300×g 離心 5 分鐘，吸除上清液後以 2 mL ACK lysis buffer 作用 45 秒，加 10 mL RPMI10 中止反應，離心後計數培養。取 2.5×10^6 細胞於 10 cm 養菌用平皿，於 7 mL RPMI10 中添加 3 mL L-929 cell-conditioned medium，於含 5 % CO₂ 之 37 °C 恆溫箱中培養，培養第 3 天另添加 5 mL 培養基(RPMI10 含 30 % L929 medium)，第 7 天收集貼附於盤底之小鼠骨髓分化巨噬細胞(bone marrow-derived macrophages; BMDM) (Celada *et al.*, 1984)。

20. 統計分析

所有實驗至少重複三次，每次處理均三重複，實驗結果以平均值±標準偏差表示，資料統計採用 two-tailed Student's *t*-test 檢定各實驗組間的差異，若組間 $p < 0.05$ 視為顯著差異。



三、結果

1. 以膠體過濾層析分離純化台灣紫芝多醣體

本實驗室曾利用 5 L 醱酵槽深層液態培養台灣紫芝菌絲體，培養 7 天可以生產最多量胞外多醣體，醱酵濾液添加三倍體積 95 % 酒精，靜置於 4 °C 下可回收胞外粗多醣體 (cEPS)。其菌絲體乾重及胞外粗多醣體重分別為 7.6 g/L 和 2.2 g/L (陳，2006)。

為了分離並確認台灣紫芝深層醱酵培養液中之多醣體是否具有免疫刺激活性，將酒精沉澱後之 cEPS 以高溫熱萃溶解於 Tris-HCl (0.1N, pH 7.0) 緩衝液後，接著以膠體過濾層析 Sepharose CL-6B 管柱進行分離純化。以 Tris-HCl (0.1 M, pH 7.0) 為流洗液，測定各分劃之總醣含量。結果如圖 2-1 所示，台灣紫芝 cEPS 根據分子量大小可分離成 PS-F1 (分劃 15-21)、PS-F2 (分劃 33-44) 和 PS-F3 (分劃 45-55) 三個主要分劃，其各分劃之相對比例分別為 $16.24 \pm 2.19 \%$ 、 $55.81 \pm 2.97 \%$ 和 $27.95 \pm 2.11 \%$ 。以 OD280 nm 檢測各分劃顯示純化之多醣體含有蛋白質成分。此外，cEPS 含有約 $6.88 \pm 0.26 \%$ (wt/wt) 的蛋白質。

2. 台灣紫芝多醣體之單糖組成及分子量

為解析台灣紫芝多醣體之單糖組成，將 PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 以 TFA 水解，於 HPAEC-PAD (Dionex Bio-LC system 300) 分析其單糖組成，所得之分析圖譜如圖 2-2，以各種標準單糖製作檢量線計算單糖組成如表 2-1 所示，PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 多醣體的主要單糖成分均是 D-mannose (Man)、D-galactose (Gal) 和 D-glucose (Glc)，這三種單糖就佔了 8 成以上，其中 PS-F2 各單糖的莫耳百分比

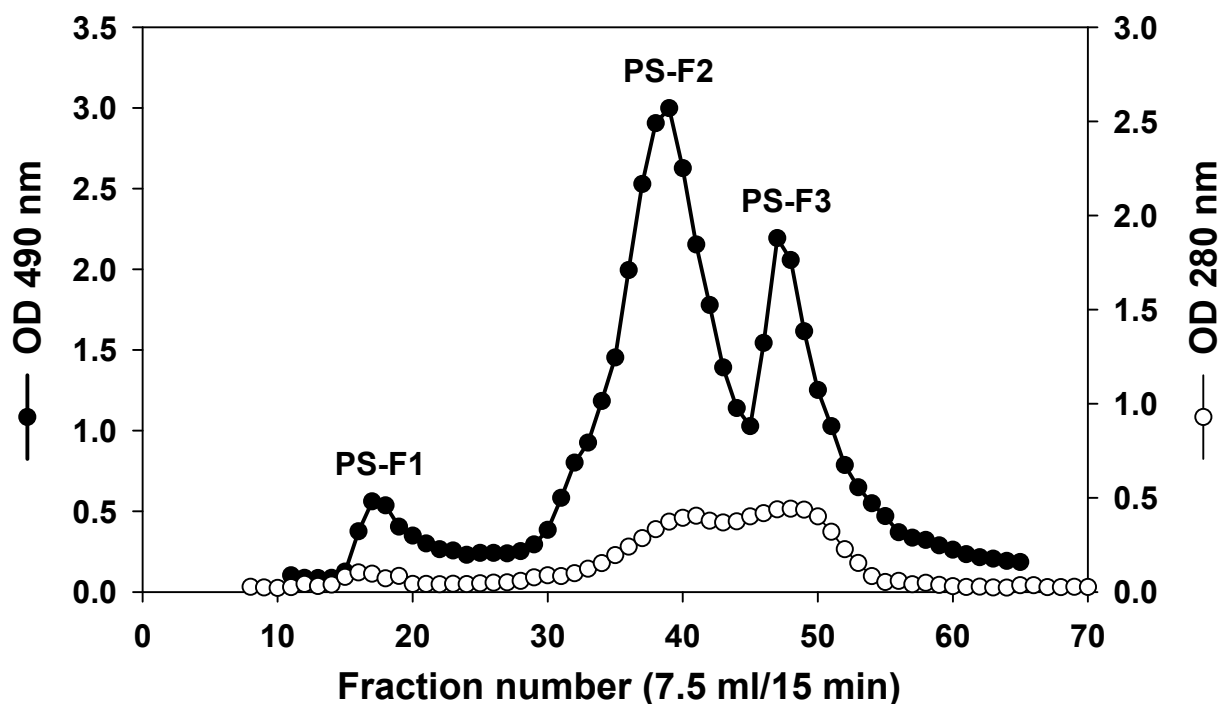


圖 2-1. 台灣紫芝粗多醣體之 Sepharose CL-6B 層析圖

Figure 2-1. Sepharose CL-6B chromatography profile of cEPS from *G. formosanum*.

The obtained cEPS powder was dissolved in PBS buffer (pH 7.0) and passed through a Sepharose CL-6B gel filtration column (2.6×90 cm). Fractionation was carried out at the flow rate of 0.5 ml/min with Tris buffer (100 mM, pH 7.0), and 7.5 ml per fraction was collected. Fractions were pooled according to polysaccharide distribution to obtain 3 major polysaccharide fractions (PS-F1, PS-F2, and PS-F3), and pooled fractions were concentrated by ethanol precipitation. Fractions were assayed colorimetrically for sugar content (●, OD 490 nm) by the phenol-sulfuric acid method and for protein content (○, OD 280 nm) by UV absorbance at 280 nm.

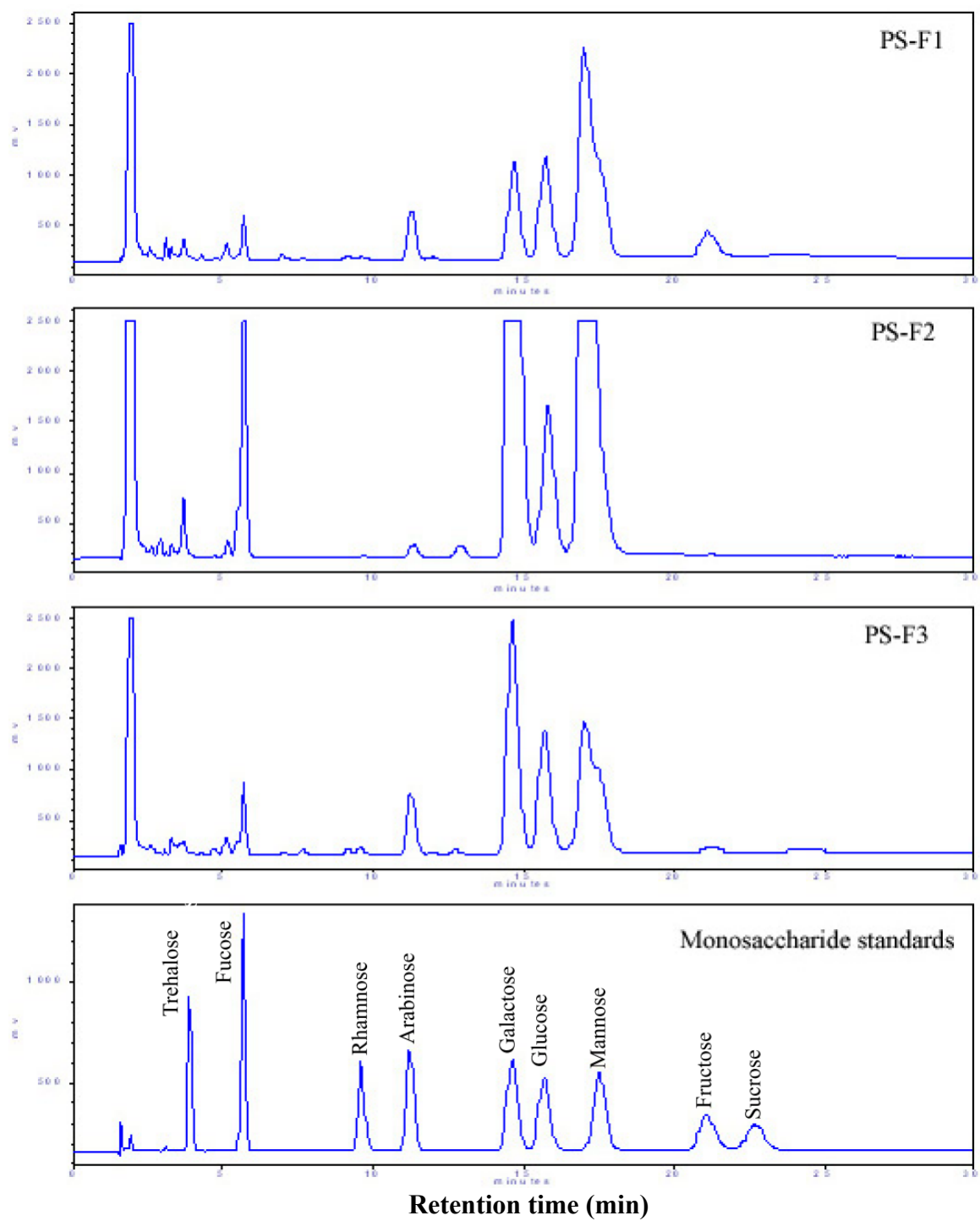


圖 2-2. PS-F1、PS-F2 與 PS-F3 之 HPAEC-PAD 層析圖譜

Figure 2-2. HPAEC-PAD chromatography profiles of PS-F1, PS-F2, and PS-F3.

表 2-1. PS-F1、PS-F2 與 PS-F3 之單糖組成

Table 2-1. Carbohydrate compositions of PS-F1, PS-F2, and PS-F3.

Sugar component	Molar percentage (%)		
	PS-F1	PS-F2	PS-F3
D-Mannose	50.13	44.91	33.35
D-Galactose	13.1	38.64	30.84
D-Glucose	17.47	8.26	20.52
D-Arabinose	6.94	0.08	8.78
L-Fucose	2.71	8.02	4.44
D-Fructose	0.45	0.09	0.74
L-Rhamnose	9.21	ND	1.33

ND: not detected



為 44.91: 38.64: 8.26: 8.02: 0.08: 0.09 (Man:Gal:Glc:Fuc:Ara:Rha)，Man 和 Gal 就佔了 8 成以上，推測為 Mannogalactan 為主。並可測得被認為是活性成份的 D-fucose (Fuc) (Wang *et al.*, 2002)。

單糖組成與自 *G. lucidum* 子實體分離的 F3、GI-PS 或 GLPP 多醣體組成比較時，來自 *G. lucidum* 子實體的多醣體主要為 D-glucose 有明顯的不同 (Cao and Lin, 2002; Cao and Lin, 2004)，顯示靈芝類生產之多醣體因品種差異及培養方式不同會有顯著的差異，而本研究生產純化的 PS-F2 為一新穎之多醣體。

為進一步瞭解 PS-F2 之性質，以膠體過濾層析 Sepharose CL-6B 管柱進行 PS-F2 分子量之測定，透過已知分子量之葡聚糖標準品建立標準檢量線(圖 2-3)，顯示 PS-F2 最高總醣之分劃(分劃 39)分子量為 14 KDa，回收之 PS-F2 (分劃 33 至 44) 大小介於 6 到 52 KDa 之間。

3. PS-F2 醣基鍵結分析

為了解析 PS-F2 的結構及醣基間的鍵結，委請中研院生化所邱繼輝博士以 GC-MS 進行分析醣基間的鍵結。PS-F2 的 GC-MS 分析圖譜(圖 2-4)與 isomaltotriose 和酵母 mannan 標準鍵結樣品比對時，顯示 PS-F2 的醣基間鍵結主要以 6-Gal 和 t-Man 為主(表 2-2)，而單糖組成與 HPAEC-PAD (表 2-1) 分析的結果是一致的。但其中 t-Man 與 t-Glc 的鍵結滯留時間很接近，6-Man 與 6-Glc 的滯留時間很接近，在判斷上仍有疑慮，需比對更多的資料庫，應可更精確的辨別每個波峰所代表的鍵結。

4. β -1,3-glucan 的含量

β -1,3-glucan 已知為多醣體生物活性之有效結構(Brown *et al.*, 2003;

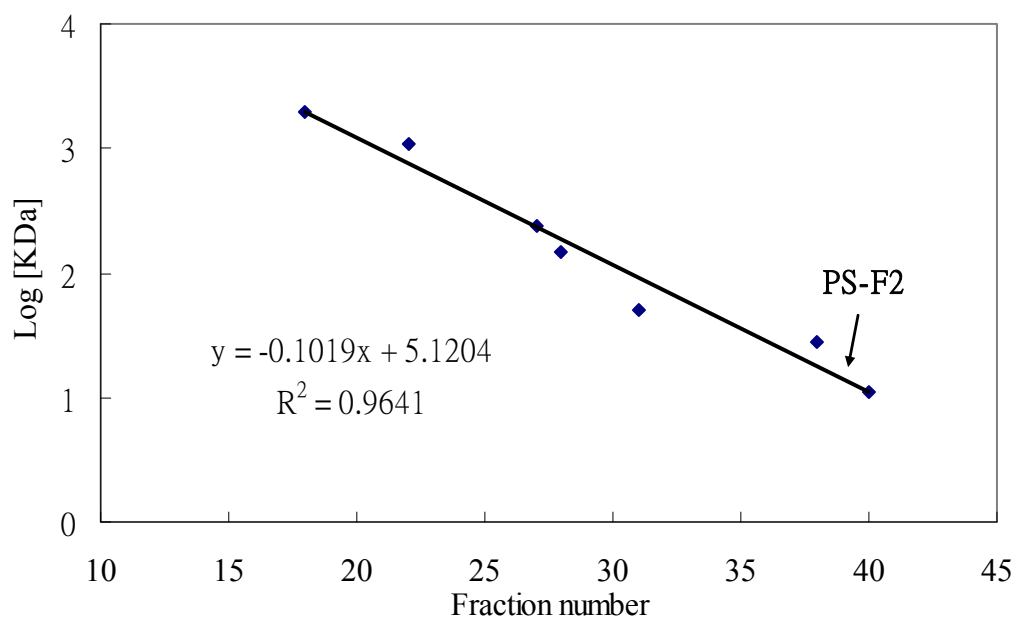


圖 2-3. 以 Sepharose CL-6B 層析管柱測定 PS-F2 分子量

Figure 2-3. Plot of fraction number of standard dextrans on gel filtration column against their Log [KDa].

The regressions function of determination of sugar standard on Sephadex CL-6B column.

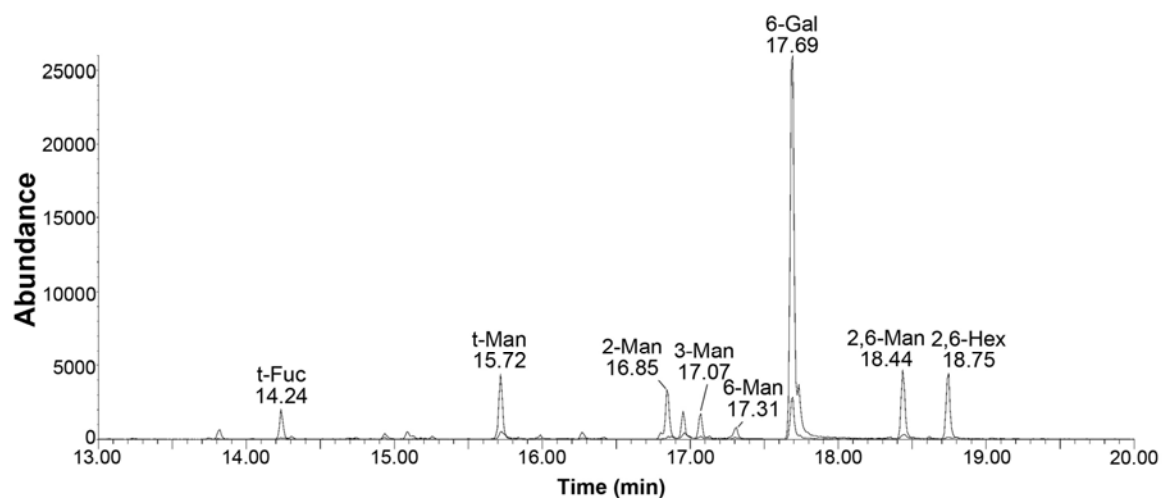


圖 2-4. PS-F2 之 GC-MS 圖譜

Figure 2-4. GC-MS linkage analysis of the PS-F2 fraction.

Superimposed extracted ion chromatograms are based on m/z 130 for 2-linked and 2,6-linked hexoses, and m/z 118 for all other residues. Identification of the individual partially methylated alditol acetates was based on the afforded characteristic EI-mass spectra and their respective elution times with reference to separately prepared standards. 2,6-Gal and 2,6-Glc standards were not readily available for further identification of the peak labeled as 2,6-Hex.

表 2-2. 以 GC-MS 分析 PS-F2 之醣基鍵結及滯留時間

Table 2-2. Glycosyl linkages and retention times in GC-MS of PS-F2 glycosyl residues.

Carbohydrate residue	Retention times
t-Fucose	14.241
t-Mannose	15.726
2-Mannose	16.85
3-Mannose	17.073
6-Mannose	17.312
6-Galactose	17.694
2,6-Mannose	18.442
2,6-Hexose	18.747

t-: terminal

Goodridge *et al.*, 2009), 本研究利用簡單、便宜的螢光呈色法來測定 β -1,3-glucan 的含量, 由於 β -1,3-glucan 結構會與 aniline blue 專一性結合形成弱的螢光物質 sirofluor, 透過螢光物質的生成即可回推 β -1,3-glucan 的量。

以 0-50 μ g/ml laminarin (β -1,3-glucan) 作為標準品製作標準檢量線 (圖 2-5A, $y = 25435x + 83156$, $R^2 = 0.997$), β -1,3-glucan 含量以佔總醣量之百分比計算表示, PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 的 β -1,3-glucan 含量分別為 $2.44 \pm 0.28\%$ 、 $1.36 \pm 0.17\%$ 和 $1.77 \pm 0.29\%$ (圖 2-5B)。

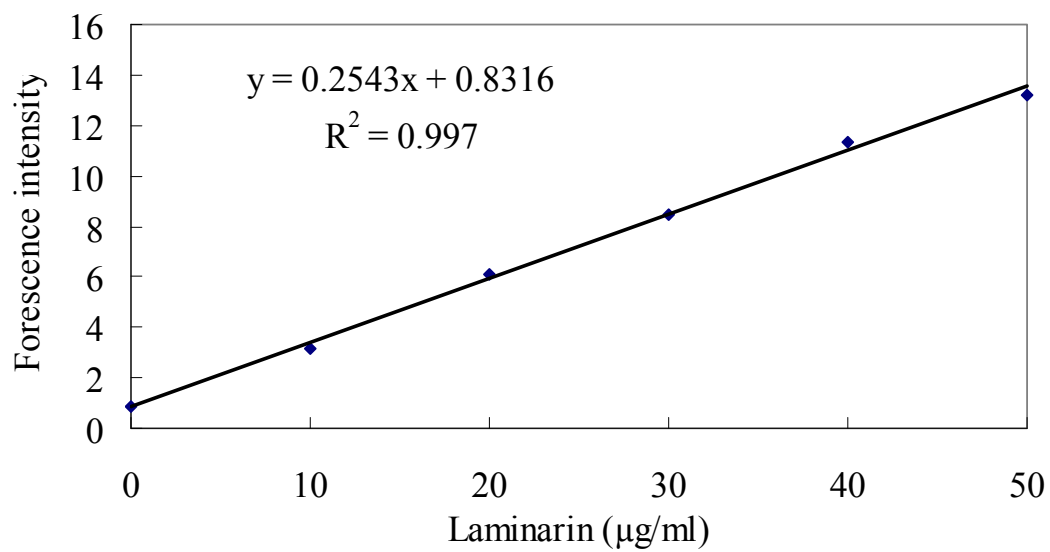
5. PS-F2 刺激巨噬細胞產生 TNF- α

TNF- α 是單核球與巨噬細胞受到細菌、病毒、絲裂原及其他細胞激素刺激後產生的一種重要的細胞激素, 被認為在發炎及一些免疫反應扮演很關鍵的角色 (Gaur and Aggarwal, 2003)。因此本研究利用 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞, 透過巨噬細胞受刺激後是否產生 TNF- α 來評估台灣紫芝多醣體之免疫調節活性。

首先以 cEPS 刺激 RAW 264.7 細胞, 當與未刺激的控制組比較時, cEPS 刺激 RAW 264.7 細胞的細胞培養液中可測得 TNF- α 之產生 (圖 2-6A)。另外分別以 PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 刺激 RAW 264.7 細胞, 三個分劃也都會刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α , 其中又以 PS-F2 的活性最高 (圖 2-6B)。且其產生量會隨著多醣體刺激劑量之增加而增加, 具有劑量效應 (圖 2-6C)。

以 OD280 nm 吸光測定 cEPS 膠體層析分劃 (圖 2-1) 的蛋白質含量, 顯示在 PS-F2 及 PS-F3 有較高的蛋白質反應, 為了排除多醣體刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 是透過多醣體中蛋白質部分。先將 cEPS 及 PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 以 proteinase K 作用去除蛋白質後, 再將去蛋白質的多醣體樣品刺激 RAW 264.7

(A)



(B)

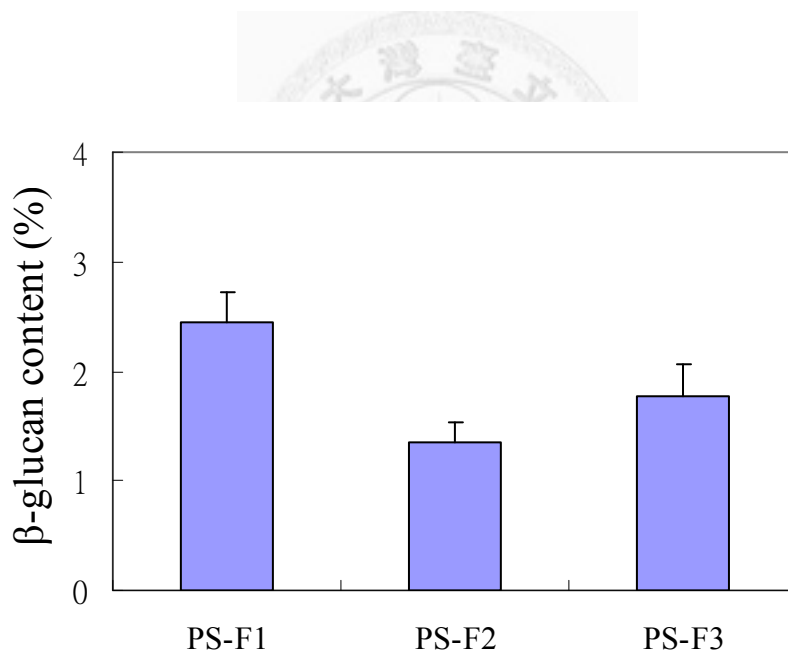
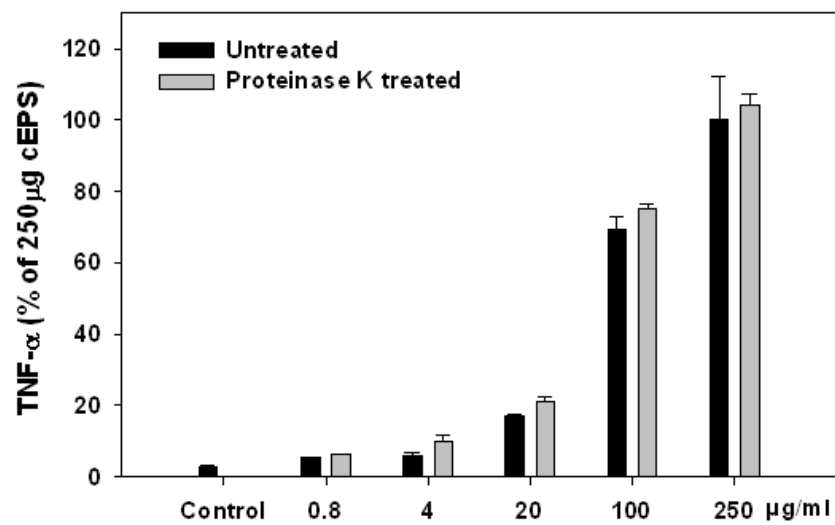


圖 2-5. 以 aniline blue 方法測定 β-1,3-glucan 含量

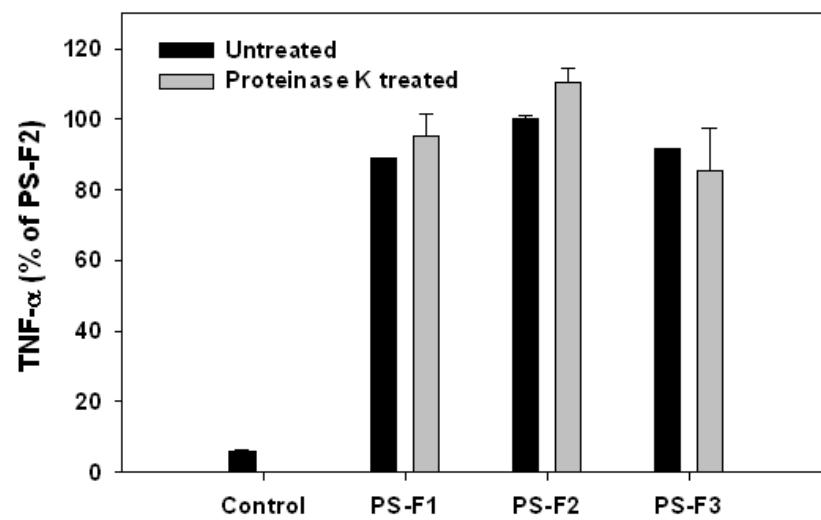
Figure 2-5. Aniline blue dye-binding curve of laminarin standard (A) and β-1,3-glucan content in three fractions (B).

It represents the percentage of β-1,3-glucan in total sugar for each fraction.

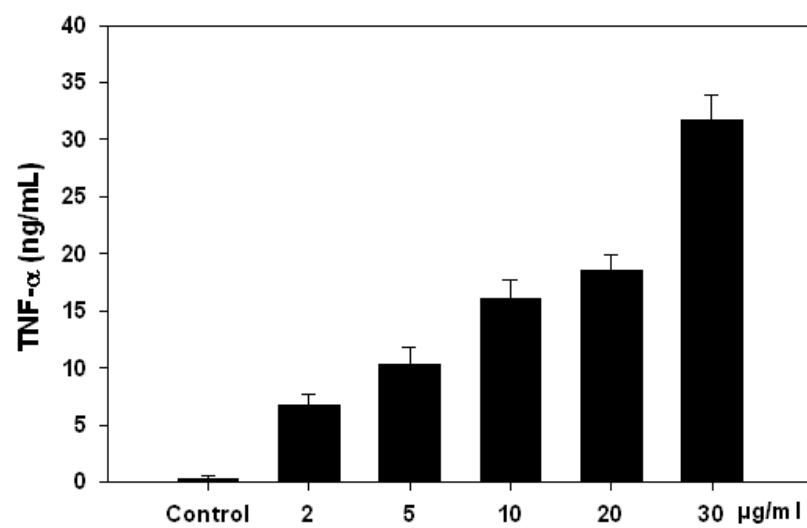
(A)



(B)



(C)



(D)

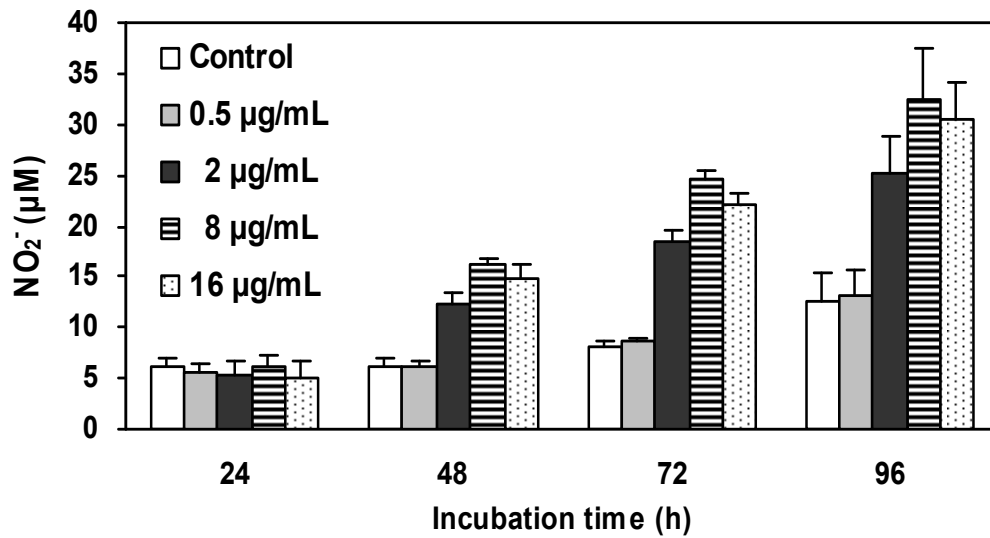


圖 2-6. 台灣紫芝多醣體會誘導 RAW 264.7 細胞產生 $\text{TNF-}\alpha$ 和 NO

Figure 2-6. PS from submerged culture of *G. formosanum* induced $\text{TNF-}\alpha$ and NO production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were stimulated with untreated or protease K-treated cEPS (A), or PS-F1, -F2, -F3 (15 $\mu\text{g/ml}$) (B), PS-F2 (0-30 $\mu\text{g/ml}$) (C) in the presence of polymyxin B (10 $\mu\text{g/ml}$), and $\text{TNF-}\alpha$ and NO production (D) were measured as described in the Materials and Methods. Data shown are representative of three independent experiments.

細胞，發現去蛋白多醣體之刺激效果並不受到影響，顯示具免疫刺激活性之成分全來自多醣體部分(圖 2-6A, 2-6B)。

為了排除本研究所使用的多醣體受到 LPS (lipopolysaccharide) 的汙染而干擾了測定的結果，PS-F2 先以 LAL test 試驗測定樣品中細菌內毒素的含量，確認所有樣品的內毒素含量都在 0.03 EU/mg 以內。已知 polymyxin B 能與 LPS 的 lipid A 部分結合進而抑制其作用 (Morrison and Jacobs, 1976)，在刺激細胞時，也特別於細胞培養基中添加了 LPS 拮抗劑 polymyxin B (10 μ g/mL)，結果顯示 TNF- α 的產生也不受 polymyxin B 所抑制(圖 2-15)。而 LPS tolerance 效應 (Nomura *et al.*, 2000)是指細胞對於第二次的 LPS 刺激具有耐受效果，因此先以 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞 5 小時後，經 PBS 清洗細胞後再以 LPS 處理細胞 20 小時，受 LPS tolerance 的效應影響下，第二次的 LPS 刺激如預期不再產生 TNF- α (圖 2-7)；而以 PS-F2 或 LPS 先處理細胞 5 小時後，再以 PS-F2 處理細胞 20 小時，TNF- α 的產生並未因第一次刺激而受抑制，顯示 PS-F2 不具有 LPS tolerance 效應，PS-F2 的刺激機制也與 LPS 不同，亦證明台灣紫芝多醣體在實驗中測得之刺激巨噬細胞的活性絕對是來自多醣體，並非受 LPS 汙染所干擾。

6. PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生一氧化氮

一氧化氮 (NO) 主要是由 iNOS 所合成，當巨噬細胞受到刺激時，會促使 iNOS 大量表現，催化 arginine 生成 NO 及 citrulline，所產生的 NO 與活性氧物質結合後形成攻擊性強的自由基，為巨噬細胞對抗病原菌的重要武器，具有直接狙擊外侵物的能力，可以抑制細胞代謝生長，具有抗腫瘤的功能，也是評估巨噬細胞受活化程度的重要指標之一 (Kwak *et al.*, 2005)。巨噬細胞所產生的 NO 大部

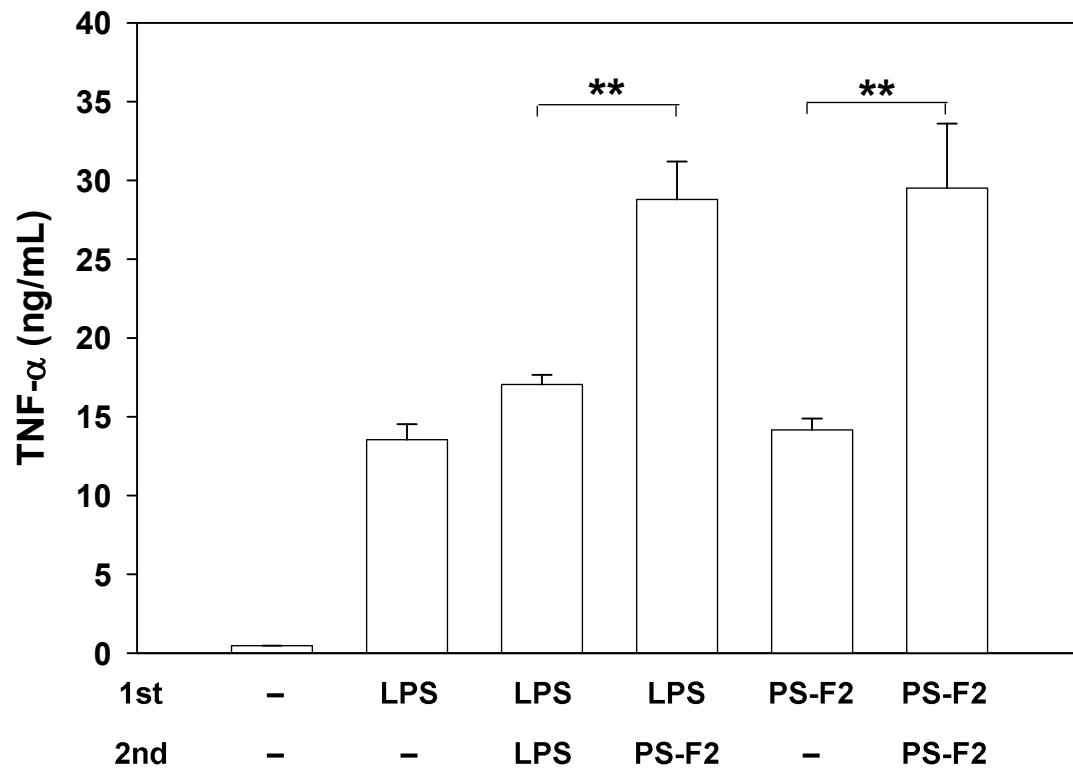


圖 2-7. PS-F2 不具 LPS tolerance 效應

Figure 2-7. LPS tolerance not existed in PS-F2-treated macrophages.

RAW264.7 cells were treated with PS-F2 (15 $\mu\text{g/ml}$) or LPS (0.5 $\mu\text{g/ml}$). After 5 h, cells were washed and restimulated with PS-F2 or LPS for an additional 20 h. TNF- α levels in the supernatants were assayed by ELISA ($n = 3$). Data shown are representative of three independent experiments.

分很快會被氧化成亞硝酸鹽和硝酸鹽，因此測定細胞培養液的亞硝酸鹽 (NO_2^-) 濃度來代表。當 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞，PS-F2 (2-16 $\mu\text{g/mL}$) 在 24 小時後未能明顯刺激細胞產生 NO；而刺激 48 小時後即顯著刺激 RAW 264.7 細胞產生 NO (圖 2-6D)，且產生量隨著添加劑量及處理時間而增加，具有劑量與時間上的效應，惟 8 $\mu\text{g/mL}$ PS-F2 以上則沒有明顯增加 NO。

由於 PS-F2 是 cEPS 三個主要多醣體分劃中含量最多 ($55.81 \pm 2.97\%$)，活性也最高 (圖 2-6B)，因此本研究後續的研究便以 PS-F2 為材料，研究台灣紫芝多醣體之免疫調節功能、活化機制並評估其抗腫瘤活性。

7. PS-F2 可增強 RAW 264.7 細胞的吞噬作用

吞噬作用能讓細胞獲得營養成分，對於免疫系統的巨噬細胞而言，則能透過吞噬作用排除病原體及細胞碎片，吞噬能力的提升有助於生體防禦的能力。為了瞭解 PS-F2 的免疫調節功能，接著探討 PS-F2 是否會增強 RAW 264.7 細胞對 FITC-*E. coli* 的吞噬能力。將 RAW 264.7 細胞與 PS-F2 培養一天後，加入有螢光標示的 *E. coli* 讓其吞噬，結果發現隨著 PS-F2 刺激劑量 (0-8 $\mu\text{g/ml}$) 的增加而使 RAW 264.7 細胞產生更好的吞噬活性 (圖 2-8)，顯示 RAW 264.7 細胞受 PS-F2 刺激後對於吞噬如細菌等病原體，將有更強的吞噬能力。

8. PS-F2 會刺激 RAW 264.7 細胞的增生

為了確定以 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞是否會對 RAW 264.7 細胞刺激增生或傷害，將 PS-F2 (0-30 $\mu\text{g/ml}$) 處理過的 RAW 264.7 細胞，添加 MTT 試劑檢測 RAW 264.7 細胞的增生情形，評估 PS-F2 對巨噬細胞的免疫調節活性。結果顯示以 5-20 $\mu\text{g/ml}$ 的 PS-F2 劑量處理 RAW 264.7 細胞不僅不會傷害 RAW 264.7 細胞，

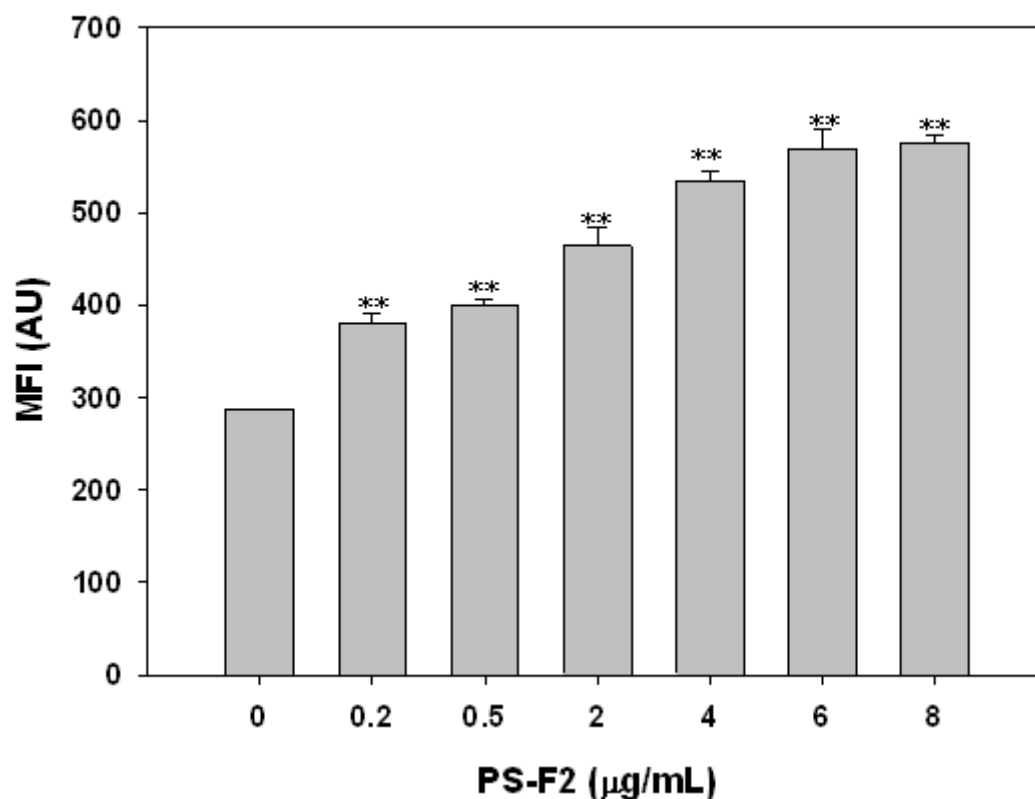


圖 2-8. PS-F2 刺激對 RAW 264.7 細胞吞噬作用之影響

Figure 2-8. Effect of PS-F2 stimulation on phagocytosis of RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were preincubated with PS-F2 (0-8 µg/ml) for 20 h, then challenged with FITC-*E. coli* particles at 37 °C for another 1 h. Phagocytosis of FITC-*E. coli* particles by RAW 264.7 cells was examined by flow cytometry as described in the Materials and Methods (n = 3). ** $P < 0.01$ compared to unstimulated group.

PS-F2 的添加還具有使 RAW 264.7 細胞增生活化之效果(圖 2-9),其中以 15 $\mu\text{g/ml}$ PS-F2 刺激增生的效果最好,增生效果達 $15\% \pm 13.35$ ($P=0.004$),但是更高的劑量效果則趨緩,高劑量 (30 $\mu\text{g/ml}$) 的 PS-F2 對 RAW 264.7 細胞刺激增生效果 ($97.4\% \pm 22.3$) 則比低劑量的差,顯示 5-15 $\mu\text{g/ml}$ 的 PS-F2 具有顯著性刺激巨噬細胞增生之能力。

9. PS-F2 刺激未成熟樹突細胞成熟

樹突細胞為免疫系統中主要之抗原呈現細胞,被認為是銜接先天性免疫反應及後天性免疫反應之間的重要免疫細胞,受到刺激時會進行成熟化,並移動至淋巴組織中,將抗原呈現給 T 細胞與 B 細胞,以活化調控下一步適當的免疫反應 (Lanzavecchia and Sallusto, 2001)。為評估台灣紫芝多醣體是否具有刺激樹突細胞成熟之能力,評估 PS-F2 作為免疫佐劑之可行性,由培養小鼠骨髓細胞分化為未成熟樹突細胞,再以 PS-F2 進行刺激。

CD40、CD80、CD86 及 MHC II 為樹突細胞表面上的成熟標誌 (maturation marker),當樹突細胞成熟時,已知這些成熟標誌的表現量會隨之增加。當 PS-F2 (8 $\mu\text{g/ml}$) 添加於誘導分化未成熟之 BMDCs 一起培養,與未受刺激的 BMDCs 控制組比較,發現 PS-F2 能促進 CD40、CD80、CD86 及 MHC II 這些 BMDCs 表面的成熟標誌表現量增加 (圖 2-10),顯示 PS-F2 具有刺激樹突細胞成熟之功能,未來應可進一步評估 PS-F2 作為免疫佐劑之可能性。

10. PS-F2 會誘發小鼠體內發炎反應

發炎反應是生體或組織受傷時所產生的一種保護反應,這樣的反應發生於減緩、消除或圍堵引起發炎刺激和受傷的組織,對生體是種警示功能。為了探討

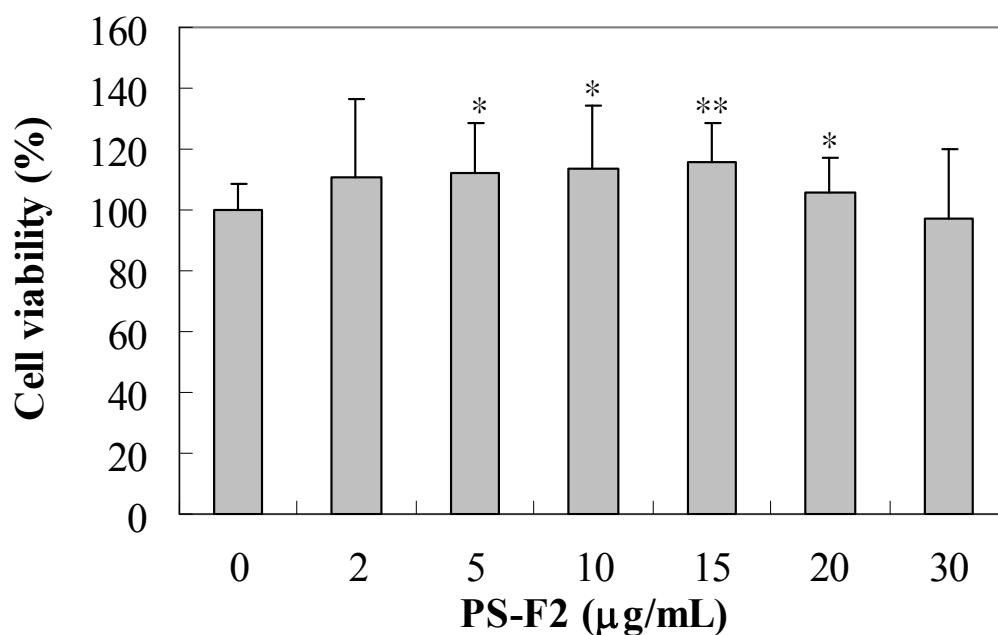


圖 2-9. PS-F2 刺激對 RAW 264.7 細胞增生之影響

Figure 2-9. Effect of PS-F2 stimulation on cell proliferation of RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with PS-F2 (0-30 μg/ml) for 20 h in 96 wells plate, then added MTT solution at 37 °C for another 4 h. The absorbance of the DMSO solution was measured at 570 nm (n = 3). Results represent one of three independent experiments with similar results. Value are expressed as mean ± SD, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to unstimulated group.

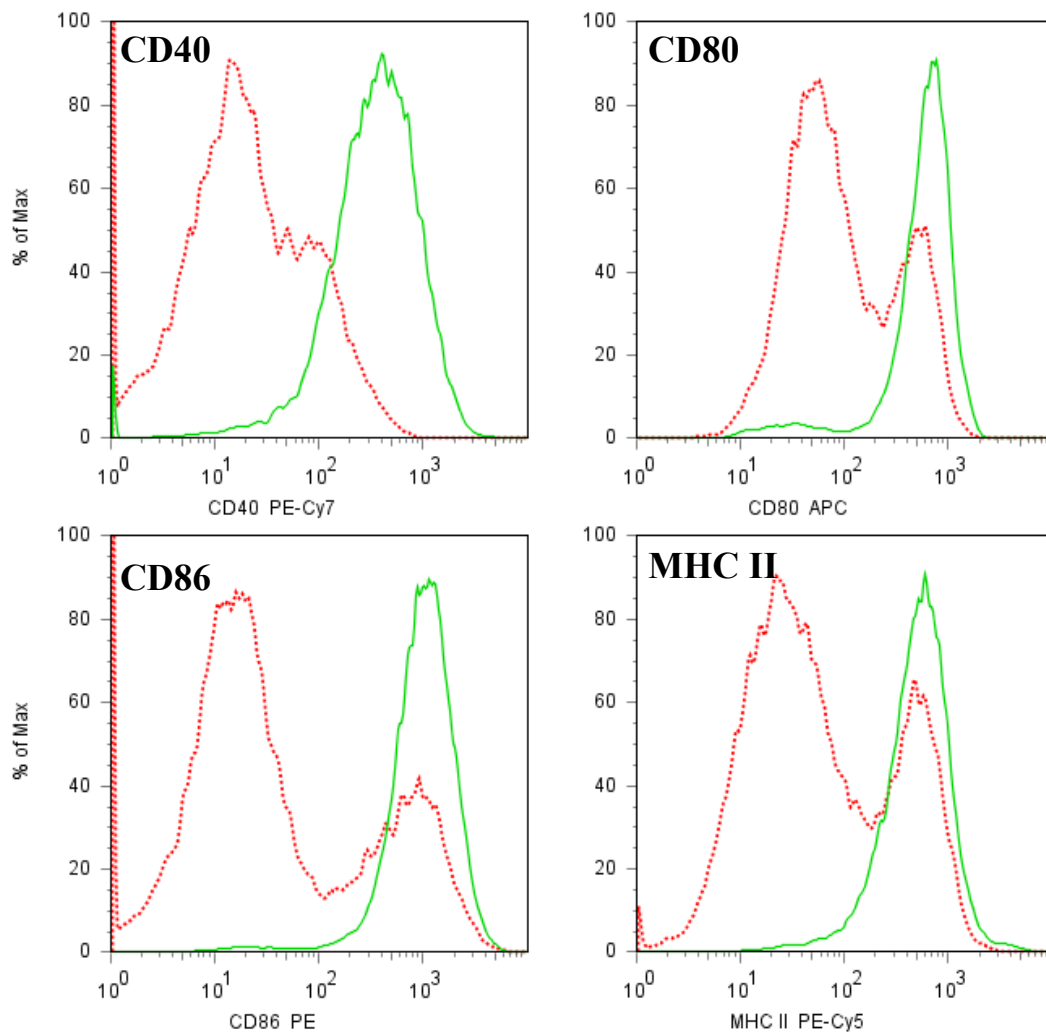


圖 2-10. PS-F2 會誘導 C57BL/6 小鼠骨髓分化樹突細胞表面成熟標誌之表現

Figure 2-10. PS-F2-induced phenotype changes of BMDC.

C57BL/6 bone marrow cell were cultured in GM-CSF (10 ng/ml) for 7 day, then stimulated without (dot line) or with (straight line) 8 µg/ml PS-F2, or 1 µg/ml LPS for 1 day, and cell surface markers on BMDC were stained with mAbs. The cell surface expression of CD40, CD80, CD86, and MHC II was then examined by flow cytometry as shown by fluorescence intensity. DCs were gated on CD11c⁺ cells. The results are representative of three independent experiments.

PS-F2 是否會刺激活化小鼠體內巨噬細胞活化，誘發小鼠體內急性發炎反應，將 PS-F2 (50 mg/kg) 腹腔注射至 C57BL/6 小鼠，16 小時後分析腹腔沖洗液中細胞的組成變化。

在預備實驗中，分別以 20 和 50 mg/kg PS-F2 腹腔注射小鼠，發現 20 mg/kg PS-F2 劑量並不能有效誘發急性發炎反應，與注射 PBS 控制組的小鼠相似。而當以 50 mg/kg PS-F2 及等體積的 PBS 腹腔注射小鼠，16 小時後比較 PBS 與 PS-F2 腹腔沖洗液中的細胞則有明顯變化。

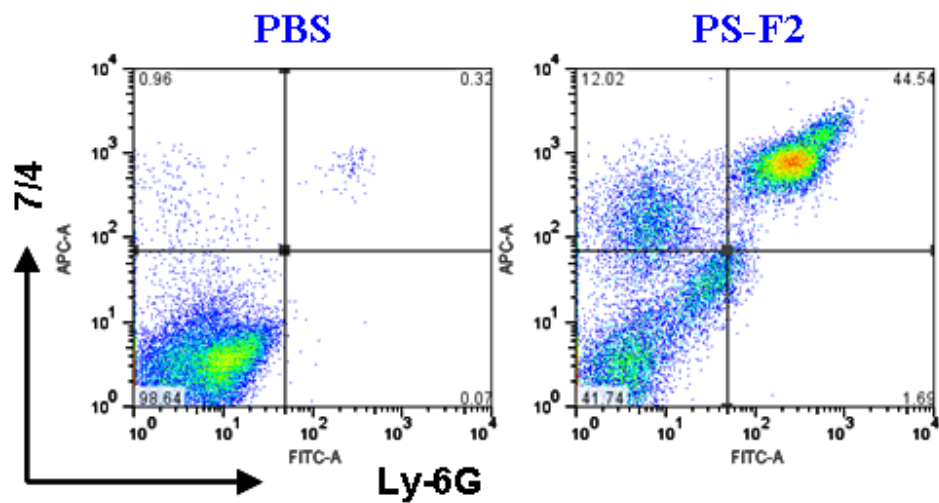
結果顯示單核球 (Ly-6G⁻ 7/4⁺) 和嗜中性球 (Ly-6G⁺ 7/4⁺) 的比例分別由 1.47 % ± 1.21 和 1.56 % ± 3.10 增加到 7.76 % ± 3.77 和 38.20 % ± 15.49 (圖 2-11A)；實際細胞數從 4.7×10^4 和 1.2×10^4 增加到 1.9×10^5 和 1.2×10^6 (圖 2-11B)，單核球的數目增加了 4.1 倍，嗜中性球數目更增加了 106.8 倍。腹腔注射 PS-F2 使腹腔的嗜中性球及單核球數量都有顯著性增加，能聚集小鼠先天性免疫細胞來到腹腔，誘發發炎反應。

11. PS-F2 誘導絲裂原活化蛋白激酶磷酸化

MAPKs 於細胞生長及分化時扮演重要的調節功能，調控著細胞對細胞激素及壓力刺激的反應。MAPKs 主要包含 ERK、JNK 及 p38 三條蛋白激酶路徑。前面結果已確認 PS-F2 會刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α ，為了進一步探討 PS-F2 是透過何種途徑進行訊息傳遞 (signal transduction) 產生 TNF- α ，先以西方轉漬法檢測 JNK、ERK 及 p38 三種激酶磷酸化之情形。

當以 PS-F2 (8 μ g/ml) 處理 RAW 264.7 細胞，再分別檢測不同時間 MAPKs 磷酸化的情形。由圖 2-12 顯示 ERK 在 20 分鐘開始磷酸化，於 40 分鐘時達到最

(A)



(B)

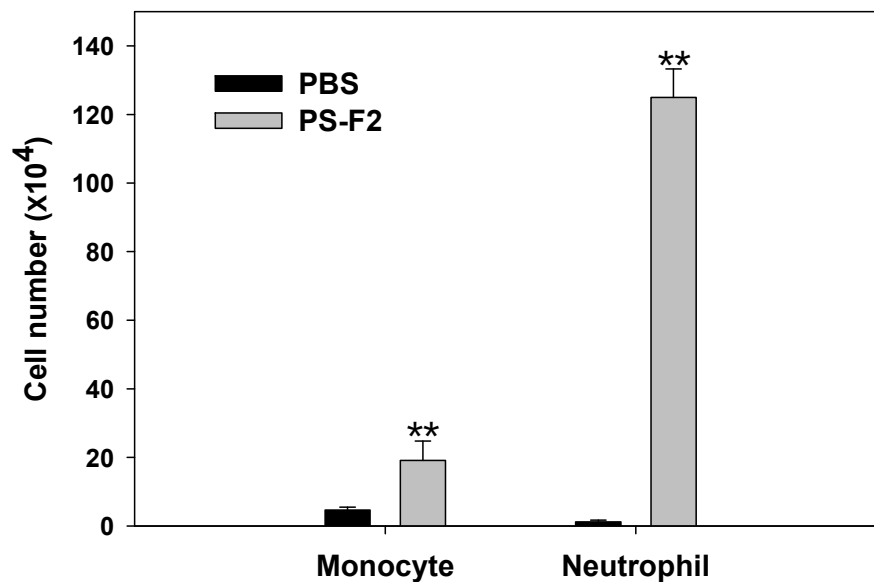


圖 2-11. PS-F2 會刺激小鼠產生急性發炎反應

Figure 2-11. PS-F2-induced acute inflammatory responses in mice.

C57BL/6 mice were challenged i.p. with 50 mg PS-F2 in PBS. Mice challenged with PBS used as negative controls. (A) Representative dot plots of Ly-6G (Ly-6G-FITC, BD Biosciences) and 7/4 (7/4-biotin, AbD Serotec) expression on peritoneal exudate cell in C57BL/6 mice injected 16 h earlier with PBS or PS-F2, the Ly-6G⁺ 7/4⁺ gate represents neutrophils. (B) Neutrophil percentages in the PECs (n=5) after i.p. with PBS or PS-F2. The results are from three independent experiments.

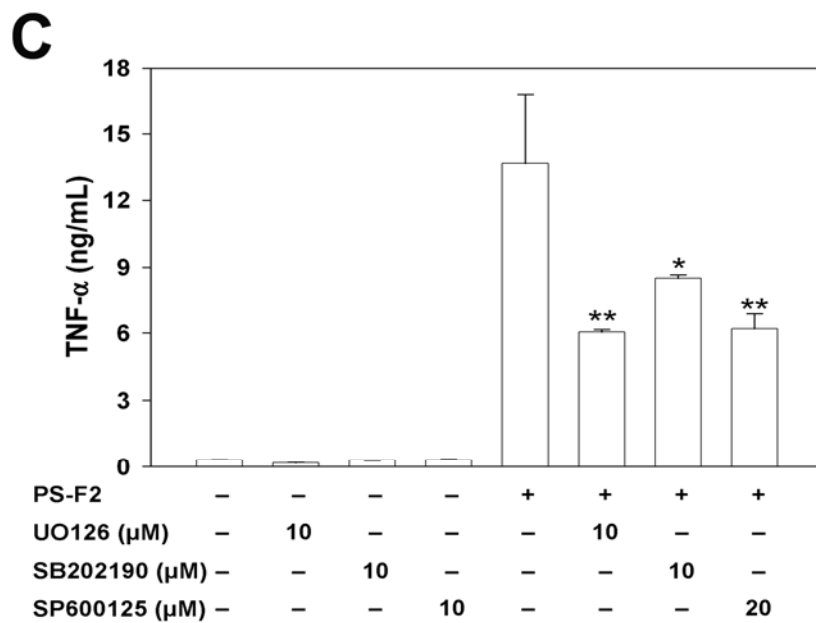
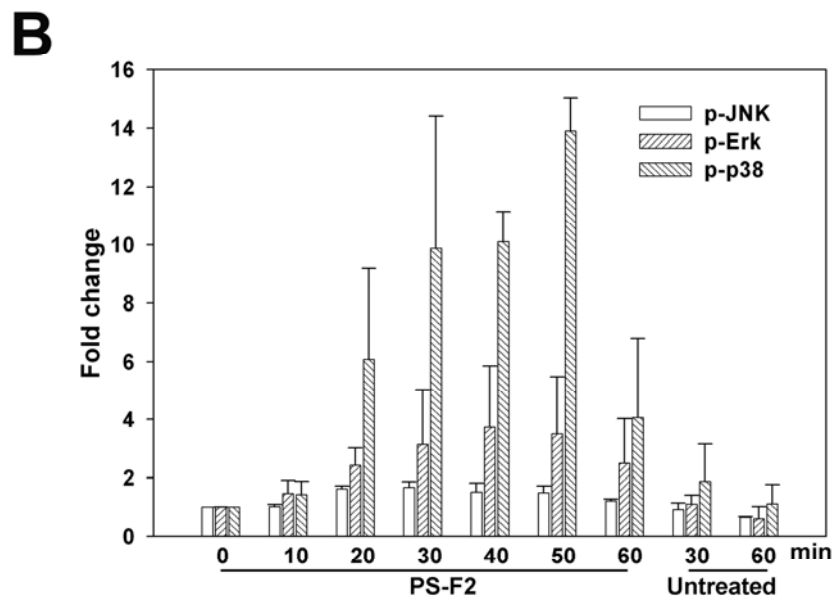
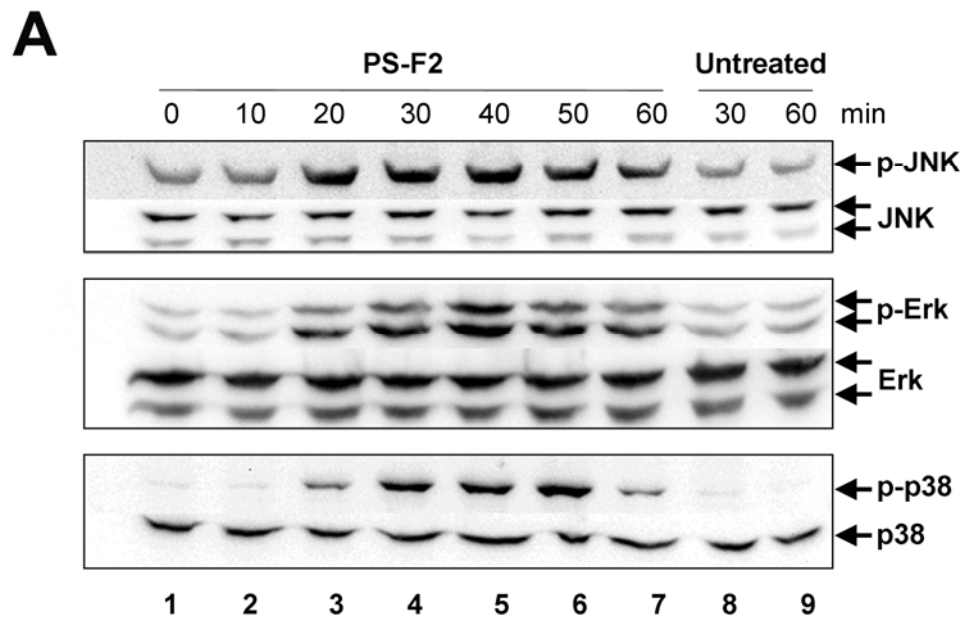


圖 2-12. PS-F2 誘導絲裂原活化蛋白激酶磷酸化

Figure 2-12. PS-F2 induced phosphorylation of MAPKs.

(A) RAW 264.7 cells were stimulated with PS-F2 (8 $\mu\text{g/ml}$), and cell lysates were prepared at different times after stimulation and subjected to Western blot analysis with antibodies specific for phosphorylated and total JNK, Erk and p38. (B) Amounts of MAPKs in panel A were quantified by densitometric analysis (ImageJ). Phosphorylated MAPKs were normalized against total MAPKs. Bars indicate the ratio of phosphorylated MAPK amounts at indicated time points to those at 0 min. The data shown are representative of three independent experiments. (C) Effects of MAPK inhibition on PS-F2-stimulated TNF- α in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-incubated with various MAPK inhibitors for 30 min and stimulated with PS-F2 (15 $\mu\text{g/ml}$) for additional 20 h in the presence of inhibitors. TNF- α levels in the supernatants were assayed by ELISA ($n = 3$). Data shown are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

高（約增加 3 倍）；JNK 與 p38 也於 PS-F2 刺激 20 分鐘時開始磷酸化，分別在 30 分鐘及 50 分鐘時達到最高(圖 2-12A, 2-12B)，增加約 1.7 倍與 14.7 倍，又以 p38 的磷酸化最為明顯。

為了進一步確認 PS-F2 對 MAPKs 途徑之影響，接著以各種 MAPKs 途徑專一性抑制劑前處理細胞，觀察對 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之影響。先將各種專一性抑制劑與細胞培養 30 分鐘後，抑制劑存在下再添加 PS-F2 (15 $\mu\text{g/ml}$) 刺激細胞，20 小時後取細胞上清液分析 TNF- α 產生的變化情形。結果如圖 2-12C 所示，TNF- α 的產生均明顯受到 U0126 (ERK 抑制劑)、SB202190 (p38 抑制劑)及 SP600125 (JNK 抑制劑)的抑制。綜合以上結果顯示 PS-F2 是透過活化 MAPKs 路徑的 JNK、ERK 及 p38 等激酶，刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 。

12. PS-F2 刺激 NF- κ B 的活化

除了 MAPKs 途徑外，另探討 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α ，是否透過 NF- κ B 訊息傳遞的活化途徑。NF- κ B 是調控基因表現的轉錄因子，在細胞接受到刺激活化後，NF- κ B 進入細胞核中引發特定基因的轉錄及表現，產生後續的發炎反應。

將 PS-F2 處理過的 RAW 264.7 細胞，分別製備細胞核及細胞質萃取液進行西方轉漬，檢測細胞質中 I- κ B 之降解及 NF- κ B 核移位之情形。在 PS-F2 的處理下，於細胞質萃取液部分，發現在處理 20-50 分鐘時偵測到 I- κ B 有明顯的降解(圖 2-13A)；而於 I- κ B 降解的同時，細胞核萃取液部分可偵測到 NF- κ B 的增加(圖 2-13A)，顯示 PS-F2 的刺激下，I- κ B 脫離而被降解減少(圖 2-13B)，而 NF- κ B 活化核移位到細胞核，進而引發 TNF- α 基因的轉錄及表現。

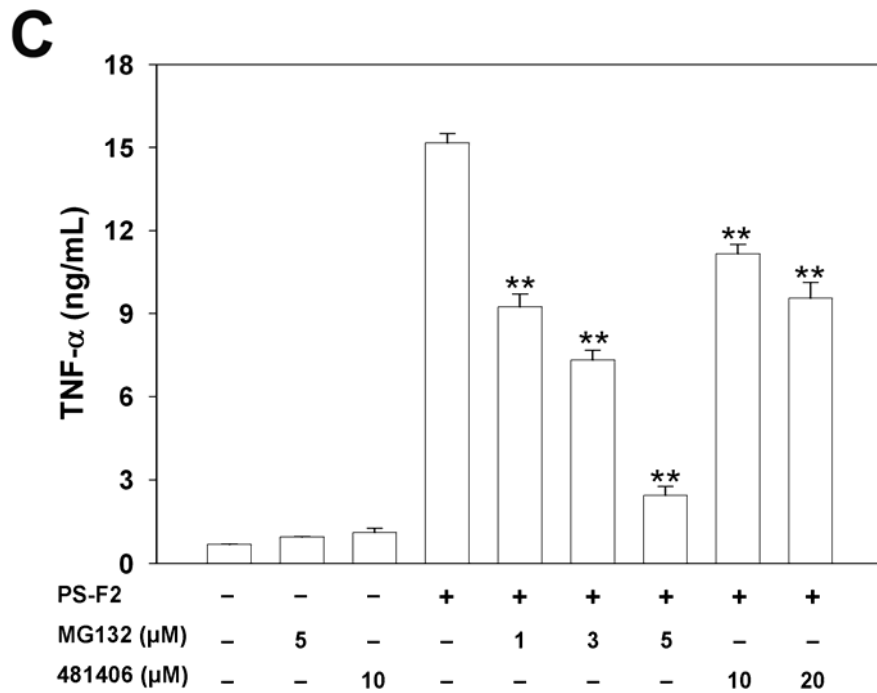
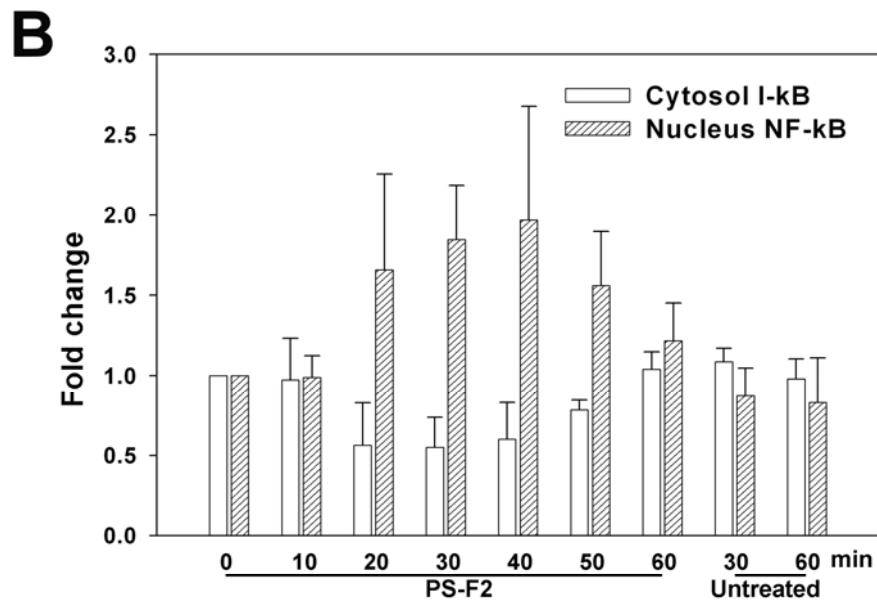
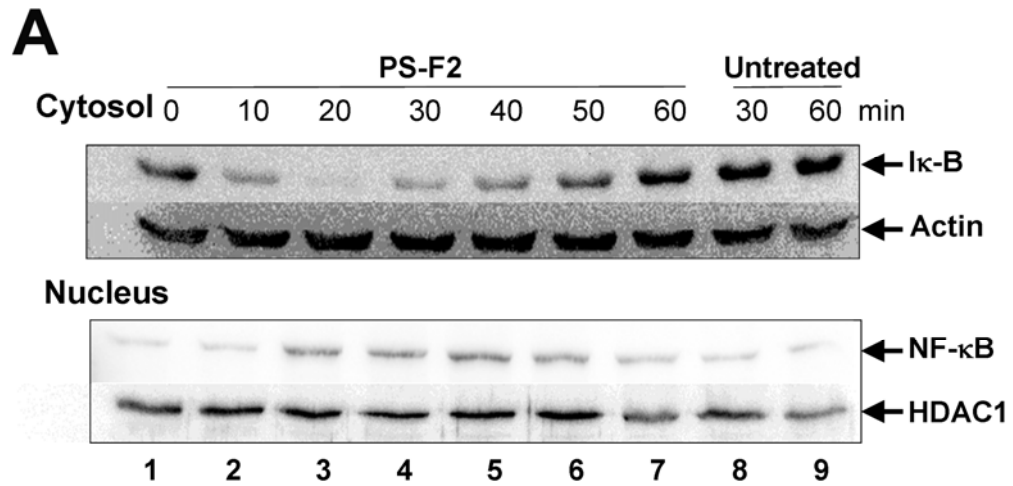


圖 2-13. PS-F2 誘導 I- κ B 的降解及 NF- κ B 之核移位

Figure 2-13. PS-F2 induced I- κ B degradation and NF- κ B translocation.

(A) RAW 264.7 cells were stimulated with PS-F2 (8 μ g/ml), and the cytosolic and nuclear fractions were prepared at indicated time points. Lysates were then subjected to Western blotting with anti-I- κ B and anti-NF- κ B monoclonal antibodies. Data shown are representative of three independent experiments. (B) Amounts of I- κ B and NF- κ B in panel A were quantified by densitometric analysis (ImageJ). I- κ B amounts were normalized against actin and NF- κ B amounts were normalized against HDAC-1. Bars indicate the ratio of I- κ B and NF- κ B amounts at indicated time points to those at 0 min (n = 3). (C) Effects of NF- κ B inhibition on PS-F2-stimulated TNF- α in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-incubated with NF- κ B inhibitors for 30 min and stimulated with PS-F2 (15 μ g/ml) for additional 20 h in the presence of inhibitors. TNF- α levels in the supernatants were assayed by ELISA (n = 3). Data shown are representative of three independent experiments. ** p <0.01 compared to control.

接著進一步確認與 NF- κ B 途徑相關，實驗中以 NF- κ B 的專一性抑制劑 481406 和蛋白酶體抑制劑 MG132 前處理 RAW 264.7 細胞 30 分鐘，先專一性抑制 NF- κ B 之活化，隨即添加 PS-F2 刺激細胞，發現 PS-F2 (15 μ g/ml) 誘發 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之活性也都明顯受到抑制 (圖 2-13C)。

綜合以上結果，可以得知 PS-F2 會透過 MAPKs 及 NF- κ B 訊息傳導途徑的活化，使 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 。

13. 甘露糖受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色

PS-F2 是水溶性的多醣體，推測 PS-F2 刺激巨噬細胞是透過細胞表面能與醣結合的某些受體作用，c-type lectin 是一種醣類結合蛋白，蛋白上具有特定鈣依賴的醣類辨認區域 (carbohydrate recognition domain)，很多骨髓細胞就有表現 c-type lectin 類受體作為辨識醣類 (Robinson *et al.*, 2006)。為了探討 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 時，PS-F2 與細胞上各種受體互相作用之關係，首先假設 PS-F2 會透過甘露糖受體 (mannose receptor) 刺激細胞，所以先以甘露聚醣 (mannan) 前處理 RAW 264.7 細胞，結合封鎖甘露糖受體來測試是否會影響 PS-F2 誘導產生 TNF- α 的能力，結果顯示 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 並不受甘露糖受體被封鎖影響 (圖 2-14)，顯示 PS-F2 並未透過甘露糖受體刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 。

14. Dectin-1 受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色

Dectin-1 亦屬於 C-type lectin 類受體，已證實為辨認 β -glucan 的受體之一 (Underhill *et al.*, 2005; Gringhuis *et al.*, 2009)，酵母菌細胞壁的 zymosan 多醣體便透過 Dectin-1 受體誘導樹突細胞和巨噬細胞產生像 TNF- α 等細胞激素，對於免

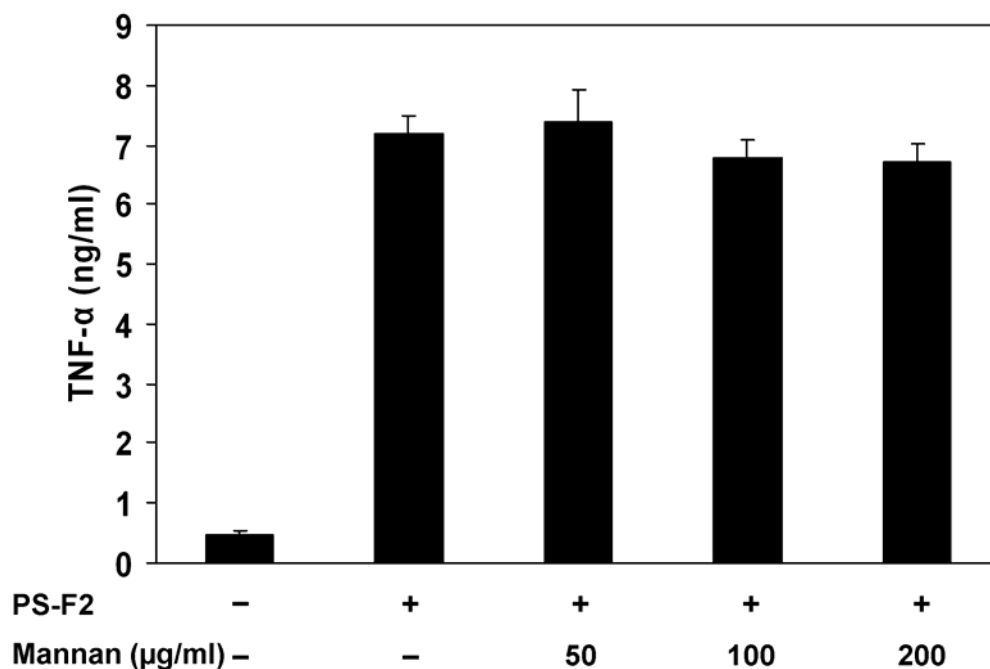


圖 2-14. 甘露聚糖對 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之影響

Figure 2-14. Effect of mannan on the TNF- α production in PS-F2 stimulated RAW 264.7 cells.

The RAW 264.7 cells were pre-treated with or without mannan (0-200 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h and further stimulated with PS-F2 (10 $\mu\text{g/mL}$) for 20 h in the presence of mannan. The TNF- α levels in the supernatants were assayed by ELISA ($n = 3$). Data shown are representative of three independent experiments.

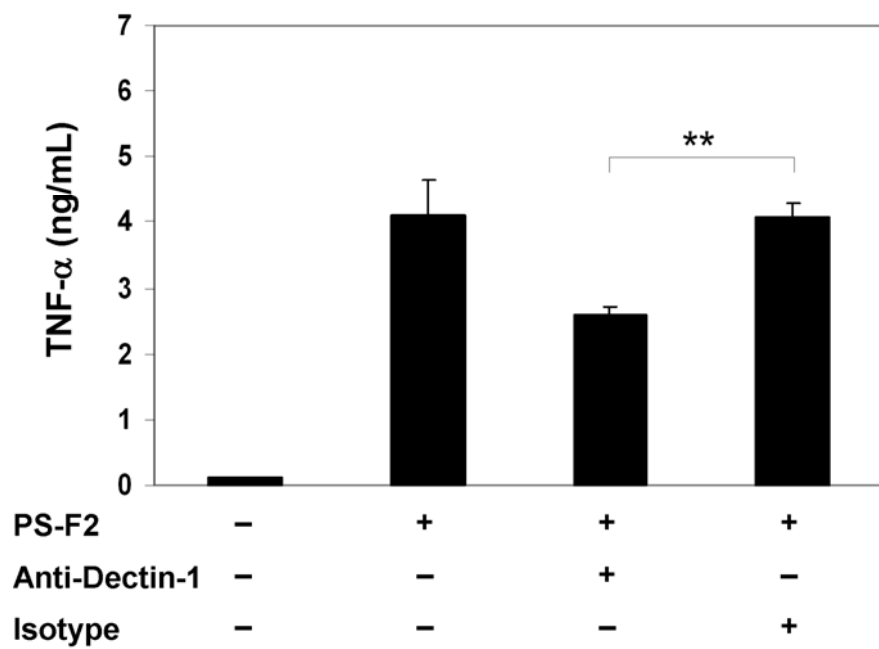
疫系統辨識致病性真菌的感染具有重要的功能 (Saijo *et al.*, 2007)。為了探討 Dectin-1 受體是否參與了 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α ，分別使用了 Dectin-1 受體中和抗體、laminarin 和 piceatannol 抑制劑前處理細胞後，觀察不同抑制劑對 TNF- α 產生的影響。

當以 Dectin-1 受體中和抗體處理 RAW 264.7 細胞一小時，將 RAW 264.7 細胞表面的 Dectin-1 受體封鎖，再以 PS-F2 刺激，結果如圖 2-15A 顯示，PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的活性明顯受到 anti-Dectin-1 抗體 (2 μ g/ml) 封鎖受體而減少。當以 Dectin-1 受體的抑制劑 laminarin 前處理，也顯示 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的活性明顯受抑制，laminarin 則不會抑制 LPS 的刺激活性 (圖 2-15B)，此結果也證明 PS-F2 的活性絕非來自於 LPS 的污染所致，因為 LPS 的活化受體不是 Dectin-1 受體。此外，piceatannol 已知也是抑制 Dectin-1 受體下游 Syk 磷酸化的專一性抑制劑 (Underhill *et al.*, 2005)，當以 Syk 的抑制劑 piceatannol 前處理，也一樣導致 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的活性明顯受到抑制 (圖 2-15C)。綜合以上使用三種 Dectin-1 受體相關抑制劑的結果顯示，PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 必須透過 Dectin-1 受體及受體下游 Syk 的活化刺激，Dectin-1 受體扮演相當重要的角色。

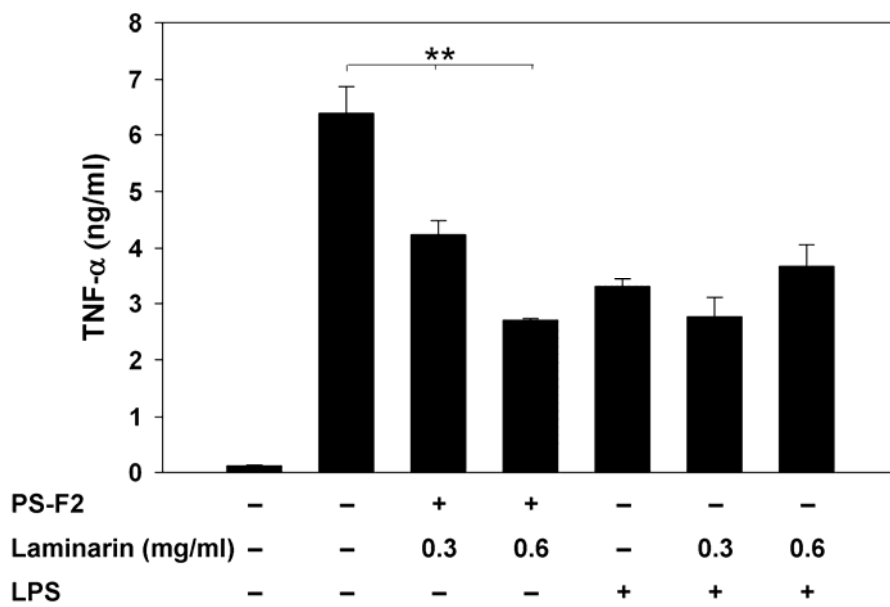
15. PS-F2 透過 Dectin-1 受體下游的 NF- κ B 和 ERK 活化

確認 PS-F2 能透過 Dectin-1 受體刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 後，接下來探討當 Dectin-1 受體下游 Syk 的活化受到抑制時，PS-F2 活化 RAW 264.7 細胞的訊息傳導路徑受影響的情形，受抑制的訊息傳導途徑即 Dectin-1 受體的活化路徑。

(A)



(B)



(C)

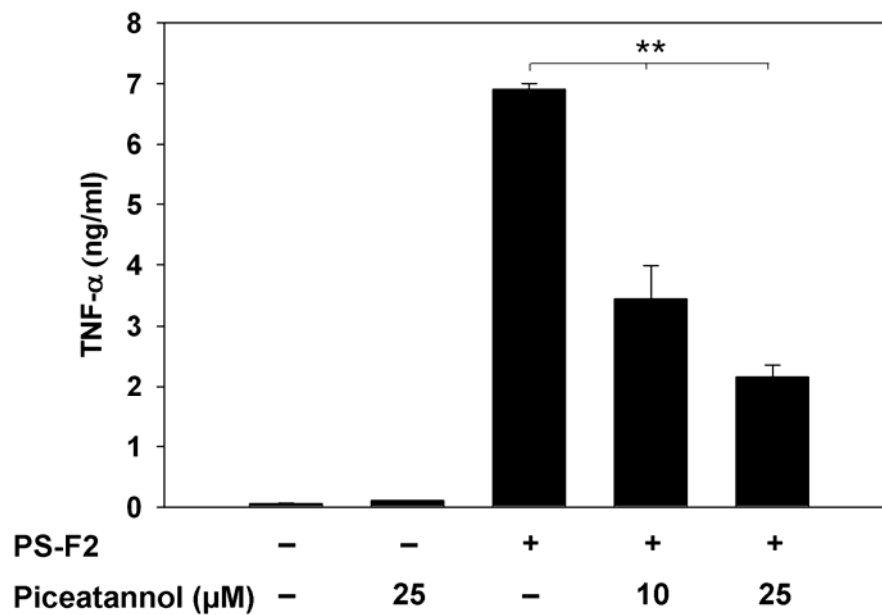


圖 2-15. Dectin-1 受體抑制劑對 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之影響

Figure 2-15. The inhibitors of dectin-1 receptor and Syk suppress the TNF- α production in PS-F2 stimulated RAW 264.7 cells.

The RAW 264.7 cells were pre-treated with or without various inhibitors: neutralization mAb of anti-Dectin-1. (R&D, MAB17561) (A), laminarin (B), or piceatannol(C) for 1 h and further stimulated with PS-F2 (10 μ g/mL) for 20 h in the presence of inhibitors. The TNF- α levels in the supernatants were assayed by ELISA (n = 3). Data shown are representative of three independent experiments. ** p <0.01 compared to control.

當 piceatannol 抑制劑處理後再以 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞，發現原本 I- κ B 的降解由原本的 0.56 倍回升為 0.83 倍，即 NF- κ B 訊息傳導途徑受到抑制；另外 ERK 的磷酸化由原本的 4.90 倍減少為 2.72 倍，明顯受到抑制。但是 MAPKs 另兩條路徑 JNK 和 p38 的磷酸化卻並未受到 piceatannol 抑制劑影響（圖 2-16）。綜合以上結果顯示，PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 會透過 Dectin-1 受體活化，而且 Dectin-1 受體活化是透過 NF- κ B 和 ERK 的訊息傳導路徑刺激細胞產生 TNF- α 。

16. CR3 受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色

CR3 受體 (Mac-1, CD11b/CD18) 是另一個被認為 β -glucan 的受體 (Thornton *et al.*, 1996)。因此也使用封鎖 CR3 受體專一性的中和抗體，探討 CR3 受體在 PS-F2 活化 RAW 264.7 細胞扮演之角色。

RAW 264.7 細胞先與中和抗體培養 1 小時，再以 PS-F2 刺激 20 小時後測定 TNF- α 產生受影響的情形。當與添加 IgG2a 抗體控制組比較，使用 20 μ g/ml 的 anti-CR3 中和抗體前處理能顯著性抑制 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的能力（圖 2-17）。推測 CR3 受體也參與 PS-F2 活化 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 。

17. TLR4 受體在 PS-F2 誘導產生 TNF- α 上扮演的角色

除了探討 C-type lectin 相關的受體外，有報告也指出多醣體刺激免疫細胞也會經由 TLRs 受體 (Slack *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2009)，因此也探討 TLR4 受體是否也參與了 PS-F2 刺激巨噬細胞。

C3H/HeJ (TLR4^{-/-}) 是 TLR4 基因缺陷小鼠，誘導缺陷小鼠骨髓細胞分化為無法正常表現 TLR4 受體之巨噬細胞 (BMDM)，本試驗利用 C3H/HeJ 小鼠 BMDM

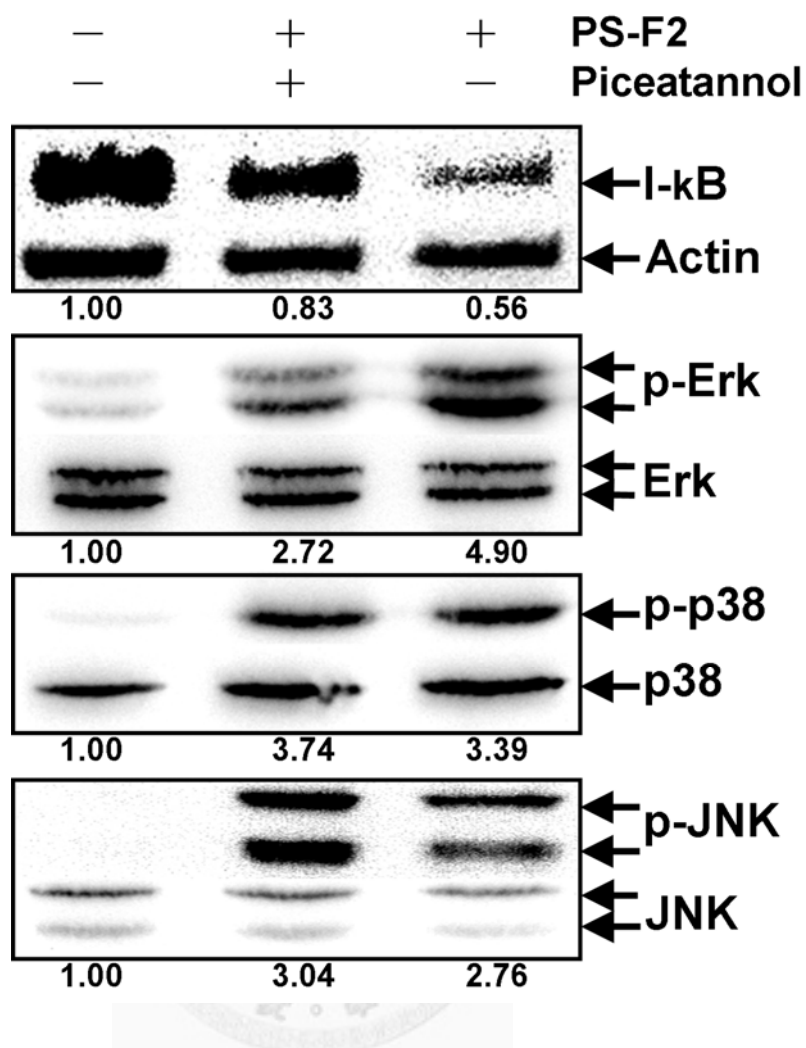


圖 2-16. piceatannol 對 PS-F2 誘導 MAPKs 磷酸化及 I-κB 降解之影響

Figure 2-16. Effect of piceatannol on PS-F2 induced phosphorylation of MAPKs and degradation of I-κB.

The RAW 264.7 cells were pre-incubated with or without piceatannol (25 μM) for 1 h and cell lysates were prepared at 30 min after PS-F2 (8 μg/ml) stimulation at 37 °C. Total lysates were separated on SDS-PAGE and immunoblotted with specific antibodies, as described above.

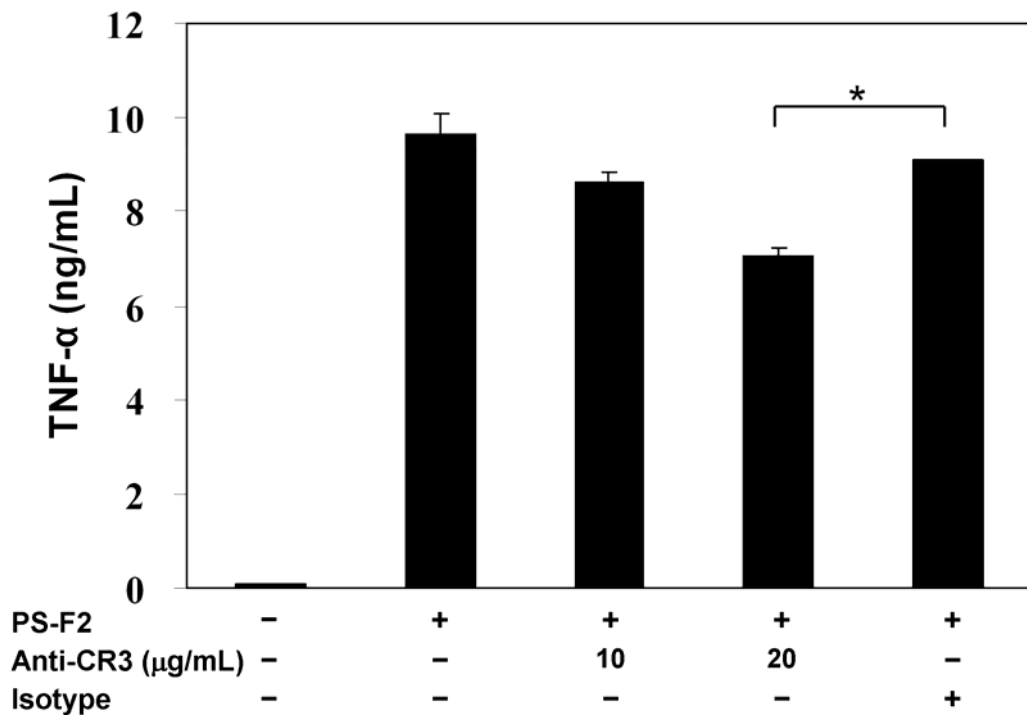


圖 2-17. anti-CR3 中和抗體對 PS-F2 誘導 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 之影響

Figure 2-17. The blocking antibody of CR3 inhibition the TNF- α production in PS-F2 stimulated RAW 264.7 cells.

The RAW 264.7 cells were pre-treated with isotype control (IgG2a, eBioscience, 16-4321-81) and neutralization mAb of anti-CR3. (eBioscience, 16-0112-81) for 1 h and further stimulated with PS-F2 (10 μ g/mL) for 20 h in the presence of antibody. The TNF- α levels in the supernatants were assayed by ELISA (n = 3). Data shown are representative of three independent experiments. * p <0.05 compared to control.

探討 TLR4 受體在 PS-F2 活化 BMDM 上扮演的角色。另以 C3H/HeN 正常小鼠 BMDM 為控制組，Poly I:C 為透過 TLR3 受體的負控制組。

當以 PS-F2 刺激 BMDM (5×10^4 cells/well) 24 h 後，取培養上層液分析 BMDM 產生 TNF- α 的變化情形。結果如圖 2-18 所示，已知經由 TLR3 受體刺激的 Poly I:C 如預期不受抑制，與 C3H/HeN 正常小鼠 BMDM 比較時，TNF- α 的產生不因 BMDM 的 TLR4 基因缺陷而被抑制，顯示這個 C3H/HeJ 小鼠 BMDM 模式可以正常運作。

當以 15 及 30 $\mu\text{g/ml}$ PS-F2 刺激 C3H/HeN 正常小鼠 BMDM 時，結果顯示隨著 PS-F2 刺激劑量增加，TNF- α 的產量也增加，具有劑量關係；而刺激 C3H/HeJ 缺陷小鼠 BMDM 產生的 TNF- α 雖也隨著 PS-F2 刺激劑量增加，TNF- α 的產生也增加，具有劑量關係。但在 PS-F2 相同劑量刺激下，TLR4 缺陷小鼠 BMDM 與正常小鼠 BMDM 比較時，缺陷小鼠 BMDM 產生的 TNF- α 有顯著性受到抑制，顯示 TLR4 缺陷的 BMDM 會影響 PS-F2 的刺激效果，推測 PS-F2 也會經 TLR4 受體刺激巨噬細胞產生 TNF- α 。

另外添加 Dectin-1 受體抑制劑於高劑量 PS-F2 (30 $\mu\text{g/ml}$) 的刺激細胞時，正常小鼠 BMDM 與 piceatannol 對 RAW 264.7 細胞 (圖 2-15C) 一樣有顯著性的抑制效果，而處理 TLR4 缺陷 BMDM 時，則發現可將原本已受抑制的活性降至與背景值相當。推測 PS-F2 至少同時透過 Dectin-1 及 TLR4 等受體活化巨噬細胞產生 TNF- α 。

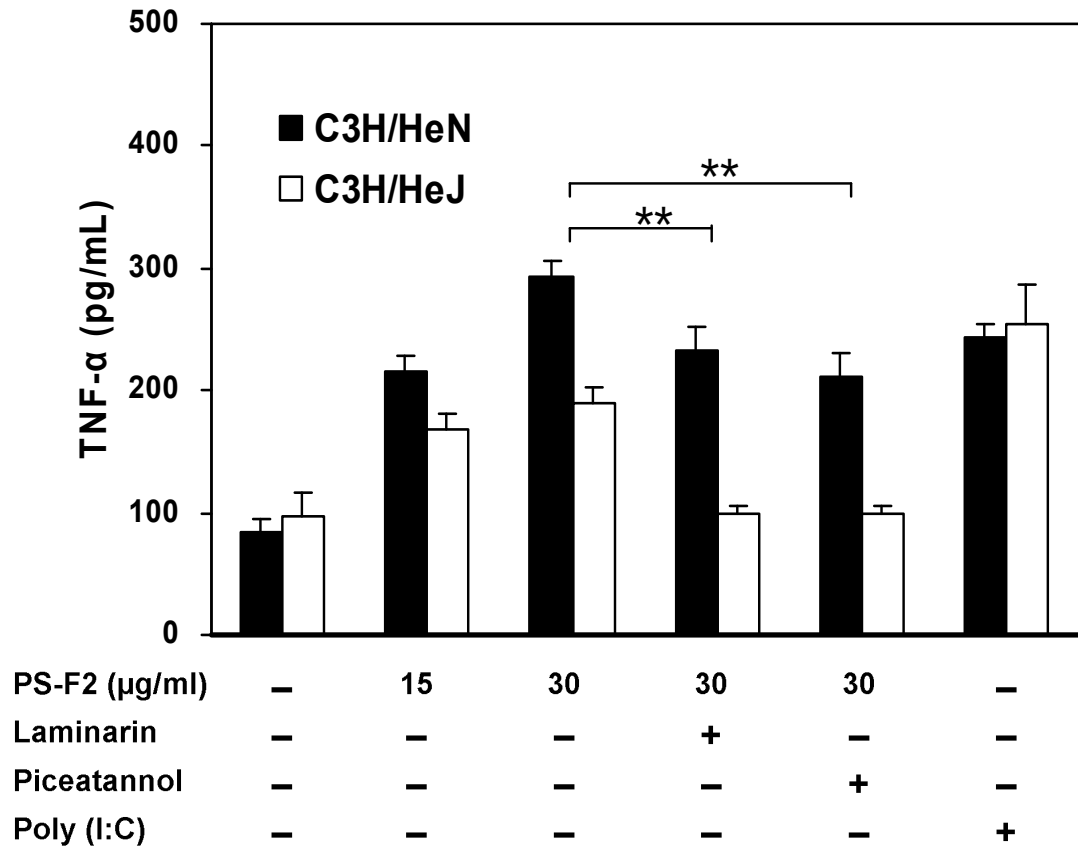


圖 2-18. TLR 4 和 Dectin-1 參與 PS-F2 活化骨髓分化巨噬細胞產生 TNF- α

Figure 2-18. TLR4 and Dectin-1 receptors participate in the PS-F2-mediated TNF- α production.

BMDM (5×10^4 cells/ml) from C3H/HeN (WT) and C3H/HeJ (TLR4^{-/-}) mice were pretreated with the laminarin (0.3 mg/ml) and piceatannol (25 μ M/ml) for 1 h and then stimulated with PS-F2 (15, 30 μ g/ml) or Poly (I:C) (10 μ g/ml). After 24 h, the culture supernatants were then collected and TNF- α levels were measured using ELISA (n = 3). Data are presented as mean $\pm$ SD. **, $p < 0.01$ compared with control.

四、討論

很多研究已經證實具有生物活性多醣體普遍存在於高等擔子菌類，菌類所產生的多醣體會因菌種不同及培養環境差異而有不同的性質，不同來源的多醣體在結構上便有顯著的變異，這樣的差異也直接影響多醣體表現的生物活性 (Volman *et al.*, 2008)。對於靈芝類而言，早在中國古代藥典即記載依外觀顏色的不同而有不同的生理功效，其子實體水煎萃取物，主要是水溶性多醣體，已廣泛用於身體保健、延年益壽、提升免疫功能...等醫療或老年保健用途。近年來從科學的角度驗證才對靈芝多醣體具有免疫調節及抗腫瘤等功效、多醣體結構與生物活性的關係 (Miyazaki and Nishijima, 1981; Ukai *et al.*, 1983; Bao *et al.*, 2002a; Bao *et al.*, 2002b)或是刺激免疫細胞活化產生各種細胞激素 (Wang *et al.*, 1997) 的作用有更深的認識。有鑑於此，本研究對於分離自桃園山區的台灣原生種靈芝：台灣紫芝所具有的生物活性成分、免疫調節功能、抗腫瘤效果及其相關作用機制具有高度的興趣與期待。

本研究採用具經濟效益之深層液態培養於五公升發酵槽快速大量生產台灣紫芝胞外多醣體，藉由各項實驗證實生產的胞外多醣體也具有免疫調節功能。多醣體生物活性功能的探討常因為其巨大的分子結構、水溶性及複雜性而有相當的難度，本研究之台灣紫芝胞外多醣體以膠體過濾層析分離得到三個主要的分劃 (圖 2-1)，依據分子量大小純化分離胞外粗多醣體，其中 PS-F2 為回收 33-44 分化的多醣體，其分子量介在 6 到 52 KDa，佔了胞外粗多醣體 50 % 以上，因此探討台灣紫芝多醣體的功能性就選擇以 PS-F2 為研究對象。純化的三個分劃多醣體

其單糖組成均以 mannose、galactose 和 glucose 為主要單糖(表 2-1)，其中 mannose 就佔了 3-5 成，屬於 heteropolysaccharide，與最常被研究的赤芝多醣體是 glucose (58.1%) 為主的組成完全不同 (Wang *et al.*, 2002)，相較於其他已被研究發表的靈芝多醣體也不同(表 2-3)，顯示純化分離的台灣紫芝胞外多醣體為一新穎的多醣體。此外，台灣紫芝在唯一已發表的文獻顯示，台灣紫芝比其他靈芝品種具有更佳的自由基清除能力及最高的保肝活性 (Lin *et al.*, 1995)，本研究室之前的研究也顯示其醱酵槽培養液萃取物小分子對人類腫瘤細胞的生長有抑制的效果 (陳，2006)，讓我們更期待探知這新穎多醣體的生物活性及其作用機制。有關台灣紫芝多醣體的免疫調節活性及其刺激產生相關細胞激素的訊息傳導途徑都尚未被研究過，本研究將是第一次探討有關台灣紫芝多醣體的免疫調節活性。

巨噬細胞是免疫系統對抗細菌或各種病原感染最前線的免疫細胞，藉由吞噬作用保護宿主，誘發產生許多發炎的細胞激素，同時將抗原呈現給 T 淋巴細胞，對於後天性免疫反應的起始扮演相當重要的角色 (Aderem and Underhill, 1999)。為了確定台灣紫芝多醣體是否能夠活化巨噬細胞，以台灣紫芝多醣體處理小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 細胞，探討台灣紫芝多醣體是否會使 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 來判斷其免疫調節活性之功效，這個細胞模式已常被用於篩選評估免疫調節功能，像是舞菇純化之多醣體 grifolan (GRN) 能刺激 RAW 264.7 細胞產生 IL-6、IL-1 和 TNF- α (Adachi *et al.*, 1994; Okazaki *et al.*, 1995)，而酵母細胞壁的主要成分 zymosan 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α (Young *et al.*, 2001; Sato, 2003; Nonaka *et al.*, 2006)。利用本實驗室之前建立之生產台灣紫芝多醣體方法

表 2-3. 不同靈芝來源多醣體之單糖組成

Table 2-3. The monosaccharides compositions of various polysaccharides from *Ganoderma*.

	Mannose	Galactose	Glucose	Fucose	Rhamnose	Arabinose	Fructose	Xylose	MW(KDa)	Reference
PS-F1	50.13	13.1	17.47	2.71	9.21	6.94	0.45	—	>2000	This study
PS-F2	44.91	38.64	8.26	8.02	N.D.	0.08	0.09	—	14	
PS-F3	33.35	30.84	20.52	4.44	1.33	8.78	0.74	—	2-4	
F3	15.1	13.5	58.1	7.1	0.7	—	—	3.1	>788	(Wang <i>et al.</i> , 2002; Lai <i>et al.</i> , 2010)
PL-1	—	21	73	—	6	—	—	—	—	(Bao <i>et al.</i> , 2002a)
PL-3	—	—	100	—	—	—	—	—	—	
PL-4	7	—	93	—	—	—	—	—	—	
GI-PS	2.9	1.3	60.2	—	6.0	—	22.3	7.3	584.9	(Cao and Lin, 2002; Shao <i>et al.</i> , 2004; Chan <i>et al.</i> , 2007)
GLPP	—	3.8	46.6	—	3.7	—	21.4	24.5	512.5	(Cao and Lin, 2004; Ho, 2007)
GLPC W-II	—	66.2	16.2	17.6	—	—	—	trace	12	(Ye, 2008)

表 2-3. (續) 各種從靈芝純化之多醣體單糖組成

	Mannose	Galactose	Glucose	Fucose	Rhamnose	Arabinose	Fructose	Xylose	MW(KDa)	Reference
GL-F	11.1	2.5	36.0	—	2.4	41.8	—	2.4	461.8, 1.7	(Yue <i>et al.</i> , 2008)
EXP	48.4	3.9	40.9	trace	—	3.0	—	1.7	—	(Jeong <i>et al.</i> , 2008)
GLP_{L1}									5.2	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
GLP_{L2}	3.1	5.7	91.2	—	—	—	—	—	15.4	
GLP	—	—	12.8	—	—	—	14.4	0.4	—	(Yang <i>et al.</i> , 2010)

(陳, 2006), 經由膠體過濾純化分離之 PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 多醣體分劃發現都能夠刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α (圖 2-6B)。為了排除刺激活性來自多醣體上的蛋白部份, 進一步以蛋白水解酵素處理去除多醣體上的蛋白質部份, 確認刺激巨噬細胞的活性的確是來自於多醣體部份 (圖 2-6A、2-6B)。來自赤芝之多醣體去除蛋白質部份後一樣會刺激 Con A 處理過之脾臟細胞, 使脾臟細胞有增生的活性 (Wang *et al.*, 2002), 顯示免疫調節活性都是多醣體的效果。

Wang 等人發現醣蛋白中的 fucose 是赤芝多醣體生物活性之關鍵成分, 以 α -1,2-fucosidase 水解結構外端的 fucose 時, F3 的免疫調節活性會受到抑制 (Wang *et al.*, 2002), 台灣紫芝多醣體的三種分劃 PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 都發現有 fucose 單糖組成 (表 2-1), 由鍵結分析也顯示台灣紫芝多醣體的 fucose 也是結構外端的鍵結單糖 (表 2-2), 推測 fucose 的存在對台灣紫芝多醣體免疫調節活性也應該有所影響。分析台灣紫芝多醣體的結構組成 (表 2-1、表 2-2), 推測 PS-F2 應為以 mannan 為主幹的多醣體結構, 與赤芝多醣體的結構 (圖 2-19) 也有顯著的差異, 在酵母細胞壁純化的 mannan 也顯示會刺激人類單核細胞產生 TNF- α (Bajtay *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2000; Cutler, 2001; Tada *et al.*, 2002), 具有免疫調節功能。為探討 PS-F2 的生物活性與結構鍵結的關係, 實驗中假設 β -1,3-glucan 鍵結會影響活性, 曾以水解 β -1,3-glucan 鍵結的專一性酵素 laminarinase (Sigma, L-5272) 水解 PS-F2, 惟 laminarinase 本身就會強烈刺激 RAW 264.7 細胞產生大量 TNF- α , 無法確認 PS-F2 的免疫調節活性是否因水解酵素處理後而減低, 證實 β -1,3-glucan 鍵結結構所扮演的角色, 未來如在經費允許下, 應可購買其他純度較高具專一性的水解酵素, 如 α -1,2-fucosidase 或 α -1,3/4-fucosidase (Wang *et al.*,

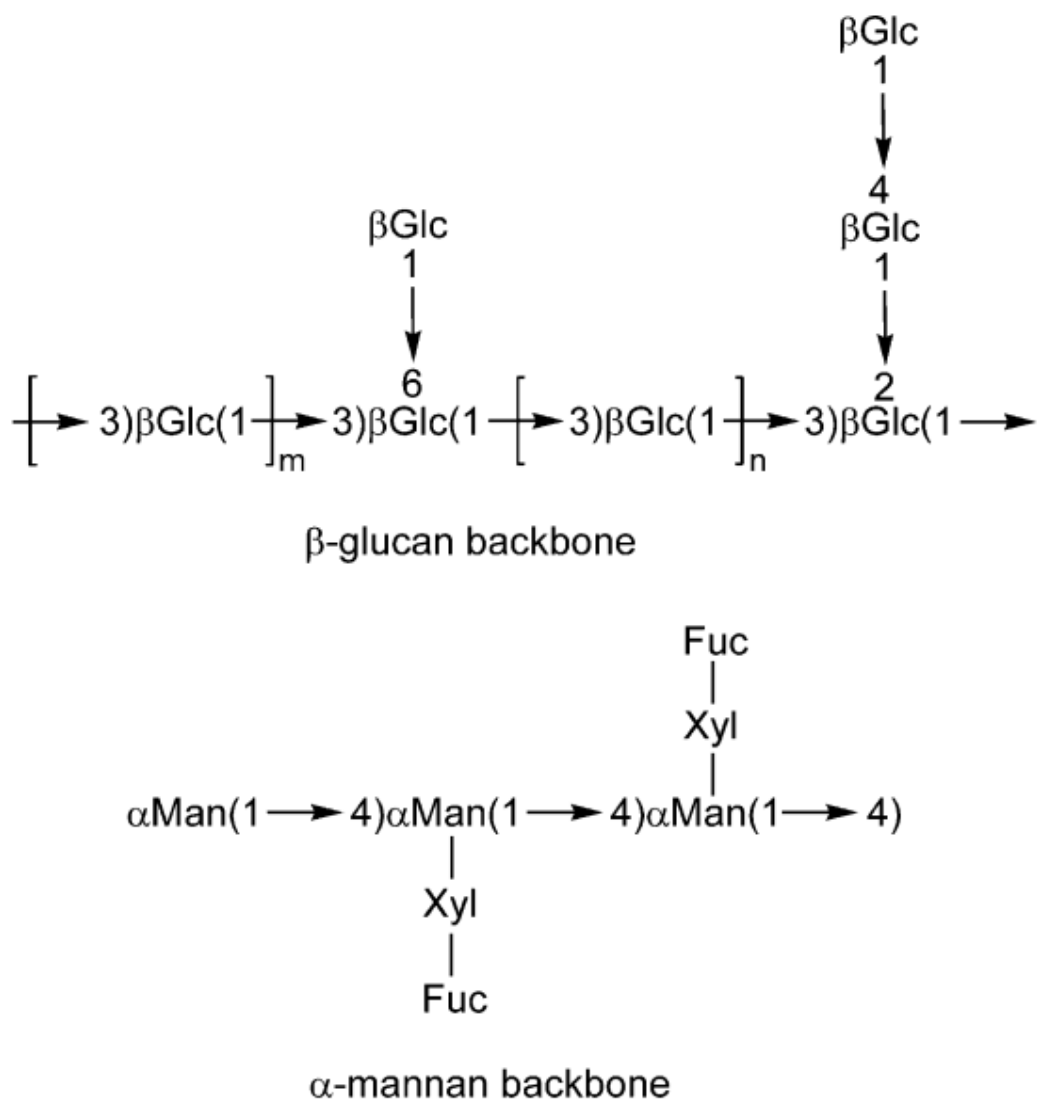


圖 2-19. 赤芝多醣體的骨架

Figure 2-19. The backbones of Reishi polysaccharides (Wang *et al.*, 2002).

2002)來探討多醣體結構之鍵結與免疫調節活性之關係。

樹突細胞是抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells)，可以啟動先天性反應及抗原專一性的後天性免疫。未成熟的樹突細胞分布於非淋巴組織 (nonlymphoid tissues) 進行抗原的捕獲及加工，當未成熟的樹突細胞被活化後，樹突細胞會移動到有 T 細胞的淋巴器官，在此會失去抗原呈現的活性，同時成熟為具有免疫刺激能力的細胞 (Cella *et al.*, 1997)。不同來源的多醣體已證實在人類樹突細胞具有不同的免疫調節功效，樹突細胞可作為篩選不同來源材料治療效果的篩選平台 (Chan *et al.*, 2007)。以 PS-F2 處理從小鼠骨髓細胞分化而來的未成熟樹突細胞，發現未成熟樹突細胞上的成熟標記 CD40、CD80、CD86 和 MHC class II 表現量因此而增加 (圖 2-10)，同時也發現 PS-F2 能增進成熟樹突細胞分泌 TNF- α 、IL-10、IL-12 p40 和 IL-6 等細胞激素 (Pi, 2009)，顯示台灣紫芝多醣體 PS-F2 具有刺激樹突細胞之免疫調節活性。由於樹突細胞抗原呈現的活性可應用於癌症治療上新穎的疫苗佐劑 (vaccine adjuvant)，在藥學領域的研究上也可深入的探討，而有關 PS-F2 作為免疫佐劑的用途探討也已由實驗室其他成員同時進行確認，探討 PS-F2 作為免疫佐劑的可行性。另外推測台灣紫芝多醣體 PS-F2 能活化樹突細胞應也可以活化 T 細胞，進而具有抑制腫瘤生長能力等免疫功能，有關 PS-F2 的抗腫瘤活性評估將於下一章探討。

發炎反應是生體在受傷、感染或是刺激 (irritation) 時所產生的生理反應，也是受傷組織表現的宿主反應。發炎的過程會使受傷或微生物入侵的部位發生小動脈和微血管擴張，增加微血管管壁的通透性，使體液和細胞由充血的血管進入組織，開始細胞內的消化反應，屬於一種保護反應，讓生體自然啟動修復機制

(Aggarwal *et al.*, 2006)。前面的結果已經證實 PS-F2 能刺激活化巨噬細胞，為了探討體內的刺激是否也會誘發發炎反應，活化巨噬細胞，實驗以 PS-F2 腹腔注射刺激小鼠，16 小時後發現腹腔沖洗液內的嗜中性球及單核球比以 PBS 刺激的控制組有顯著性的增加（圖 2.11），顯示 PS-F2 聚集活化先天性免疫細胞（如巨噬細胞）移動到腹腔，推測也會產生發炎細胞激素，誘發生體的發炎反應。

活化的巨噬細胞會釋放一些像是 NO 的細胞因子和吞噬入侵的微生物及細胞膜內吞之抗原 (Watford *et al.*, 2003)，NO 的釋放與活化巨噬細胞的寄主防禦機制有關，具有毒殺外侵微生物的功能 (Kwak *et al.*, 2005)。實驗中以 PS-F2 (2-16 $\mu\text{g/ml}$) 處理 RAW 264.7 細胞會顯著性的產生 NO，具有劑量的依存關係（圖 2-6C）。此外，PS-F2 能夠增強巨噬細胞的吞噬活性（圖 2-8）及細胞增生（圖 2-9），並引發小鼠體內的急性發炎反應（圖 2-11），這些結果均顯示台灣紫芝多醣體 PS-F2 具有免疫調節的功能。

為了排除內毒素 LPS 的汙染而干擾實驗結果，實驗中以偵測極限在 0.06 EU/ml 以下的 LAL Pyrogen kit 測試多醣體中受 LPS 汙染的情形，測試結果顯示使用的多醣體樣品其 LPS 的含量都在 0.3 EU/mg (1 EU 相當於 100 pg 的 LPS) 以下。polymyxin B 已知為內毒素 LPS 的拮抗劑 (Duff and Atkins, 1982)，結構上同時具有親水和親油區域，與內毒素的活性區域 Lipid A 結合而抑制其活性，添加 LPS 的抑制劑 polymyxin B (10 $\mu\text{g/ml}$) 於多醣體樣品也不會降低 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的量。另一方面，LPS tolerance 現象是指以 LPS 再次的刺激會降低發炎細胞激素產生的現象 (Nomura *et al.*, 2000)，也就是先以 LPS 刺激巨噬細胞 5 小時；清洗後再以 LPS 處理 20 h 時，第二次的 LPS 刺激不會刺激巨

噬細胞產生更多的細胞激素。利用 LPS tolerance 這特性，先以 LPS 及 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞，5 小時後先以 PBS 清洗細胞，再以 LPS 或 PS-F2 第二次刺激細胞。PS-F2 重複處理 RAW 264.7 細胞顯示持續的活化產生 TNF- α ；而 LPS tolerance 效應的存在使得 LPS 第二次刺激沒有更多的 TNF- α 產生（圖 2-7）。最後以 Dectin-1 受體抑制劑 laminarin 的前處理，僅 PS-F2 的刺激被抑制，LPS 控制組則完全不受影響（圖 2-14B）。這結果都證明本研究所使用的多醣體樣品可以有效避免 LPS 的污染，避免干擾實驗的結果，PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的活性完全排除是 LPS 污染所引起的可能性。

確認了 PS-F2 具有免疫調節功能後，進一步想瞭解 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的機制，實驗中分別探討 PS-F2 刺激免疫調節活性及活化的訊息傳導路徑及與細胞表面受體作用之情形。因此，實驗中也探討巨噬細胞上哪些 PRRs 參與了 PS-F2 活化的過程，發現 Dectin-1（圖 2-14）、TLR 4（圖 2-16）及 CR3（圖 2-17）等受體都與 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 有關。 β -glucan 是真菌、植物和一些細菌中結構組成的多醣體成分，目前已證實具有抑制腫瘤生長及延長罹癌後的存活時間。而 β -glucan 的抗腫瘤活性一般認為是藉由提升身體的免疫能力，如增加白血球的胞殺活性、活化白血球的能力、增強吞噬能力及產生像 TNF- α 的細胞激素 (Tsoni and Brown, 2008)。此外，巨噬細胞與真菌成分之間的作用至少透過了多種受體：如 CR3、甘露糖受體和 β -glucan 受體等，而 Dectin-1 受體已被證實為 β -glucan 的受體之一 (Ariizumi *et al.*, 2000; Brown and Gordon, 2001; Brown *et al.*, 2002)，同時也確認真菌細胞壁 β -glucan 會刺激產生免疫細胞各種細胞激素，對啟動複雜的先天性免疫反應扮演重要的角色 (Slack

et al., 2007)。

實驗中分別使用 Dectin-1 受體中和抗體、中和 β -glucan 受體的可溶性 laminarin (Brown *et al.*, 2002)及 Dectin-1 受體下游的專一性抑制劑，確認 PS-F2 會經由 Dectin-1 受體作用 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 。以 Dectin-1 中和抗體、laminarin 和 piceatannol 先處理 RAW 264.7 細胞，將 Dectin-1 受體相關路徑封鎖住，可以確認 TNF- α 的產生被明顯抑制 (圖 2-14)。此外，RAW 264.7 細胞先以 piceatannol 處理後，再利用西方轉漬檢測訊息傳導路徑受影響的情形，進一步探討 PS-F2 經由 Dectin-1 受體活化的下游路徑。當 Dectin-1 受體下游的路徑受到抑制時，發現 ERK 和 NF- κ B 的活化被明顯影響 (圖 2-15)。相似的結果也在 Parsa 等人發表的結果看到，*Francisella* 的吞噬作用受到 Syk 和 ERK 的影響 (Parsa *et al.*, 2008)；zymosan 刺激小鼠樹突細胞產生 IL-2 和 IL-10 需要透過 Syk 介導的 ERK 路徑 (Slack *et al.*, 2007)，最近更發現 zymosan 刺激人類巨噬細胞也透過了 ERK 路徑活化的 calcium-mediated 訊息路徑 (Kelly *et al.*, 2010)；而 CEK1 介導的 MAPK 途徑參與了真菌 β -glucan 的刺激路徑，影響依賴 Dectin-1 免疫細胞的辨認、Sky、Raf-1 和 ERK 的活化及 I- κ B 的降解 (Galan-Diez *et al.*, 2010)。這些結果都顯示多醣體透過 Dectin-1 受體刺激免疫細胞，而 Dectin-1 受體下游的活化路徑需經由 ERK 和 NF- κ B 路徑傳導，與 PS-F2 的活化路徑結果相同。

Thornton 等人也以螢光標示的多醣體，探討 CR3 受體與 β -glucan 結合的專一性，發現酵母、菇類、藻類或大麥來源的 β -glucan 都能與 CR3 受體結合，而 mannan 則無法與 CR3 受體結合 (Thornton *et al.*, 1996)，另外也有報告指出水溶性酵母 β -glucan 經由 CR3 作用活化巨噬細胞、嗜中性球和 NK 細胞，能殺滅 iC3b

調理的酵母和腫瘤細胞(Thornton *et al.*, 1996; Vetvicka *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010a)。這些研究結果與 PS-F2 會經由 CR3 受體刺激巨噬細胞（圖 2-17），卻不受 mannan 抑制的結果（圖 2-14）類似。推測 PS-F2 的 β -glucan 結構也能與 RAW 264.7 細胞上的 CR3 受體結合，進而刺激細胞產生 TNF- α 。

已知巨噬細胞和樹突細胞上的甘露糖受體可以辨認致病性微生物細胞表面的多醣體，呈現 lipoglycan 抗原產生細胞激素 (Stahl and Ezekowitz, 1998)，令人特別印象深刻的是發現酵母的 mannan 能明顯減少卡氏肺囊蟲 (*Pneumocystis carinii*) 吸附到巨噬細胞，卻不影響 TNF- α 的產生；但是改以 β -glucan 處理時，除了明顯減少卡氏肺囊蟲吸附到巨噬細胞外，也會抑制 TNF- α 的釋放，推測卡氏肺囊蟲的 β -glucan 成分有助其感染能力 (Hoffman *et al.*, 1993)。而甘露糖雖是 PS-F2 的主要單糖（表 2-1），mannan 可能是 PS-F2 的主要骨架，卻也未受到添加 mannan 而減弱其刺激 RAW 264.7 細胞的活性（圖 2-14），推測 mannan 不是 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞的活性結構。Zymosan 是富含 β -glucan 和 mannan 的顆粒，Brown 也曾證實 CR3 是巨噬細胞主要作用的受體，而不是甘露糖受體 (Brown *et al.*, 2002)，這與本研究的結果相同。

細胞受到外來刺激中的訊息傳導及細胞相對應產生的反應，MAPKs 是其過程中很重要的路徑之一，對於核內調控基因轉錄扮演相當重要的角色。已知 MAPKs 有三條訊息傳導路徑，分別是 ERK1/ERK2、JNK 和 p38 MAPK。這三條路徑在發炎疾病上扮演不同的角色，參與免疫或發炎反應的調控與表現 (Turjanski *et al.*, 2007)。MAPKs 路徑的活化是透過一連串磷酸化作用，MAPKs

的 tyrosine 和 threonine residues 受到上游的 MAP kinase 磷酸化而活化，接著活化下游的轉錄因子，如 NF- κ B 和 AP-1，最後表現相關的目標蛋白 (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999)，由磷酸化的程度可以判斷活化的情形。而 NF- κ B 轉錄因子在免疫調控和發炎反應也扮演很重要的角色，NF- κ B 路徑活化過程可以看到 I- κ B 的磷酸化，緊接著 I- κ B 從 p65/p50 脫離，進而被蛋白酶體降解，而由 p65/p50 組成的 NF- κ B 會轉位到細胞核內，促進前發炎相關基因的轉錄。實驗中就以西方轉漬方法檢測 RAW 264.7 細胞受 PS-F2 處理時，細胞內 MAPKs 磷酸化和 NF- κ B 核移位的情形來探討 PS-F2 活化 RAW 264.7 細胞的訊息傳導路徑。結果發現以 PS-F2 處理 RAW 264.7 細胞，三條 MAPKs 訊息傳導路徑 ERK、JNK 和 p38 均有顯著性的磷酸化現象 (圖 2-12A)；此外，細胞質中的 I- κ B 短暫減少，而同時間在核內的 NF- κ B 顯著增加(圖 2-13A)，顯示 I- κ B 被磷酸化接著被蛋白酶體降解減少，同時 NF- κ B 轉位到細胞核內開始表現 TNF- α 。

除了西方轉漬方法，另外以 NF- κ B 和 MAPKs 藥理上專一性的拮抗抑制劑處理細胞，探討對 PS-F2 處理 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 是否受到影響。圖 2-12C 和圖 2-13C 分別顯示在各種 ERK、JNK、p38 及 NF- κ B 路徑抑制劑處理後，PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生的 TNF- α 明顯的被專一性的抑制劑所抑制；另以蛋白酶體的抑制劑 MG132 來抑制 I- κ B 的降解時，間接抑制 NF- κ B 的活化與核移位，MG132 也明顯抑制了 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α (圖 2-13C)。綜合以上結果發現 ERK、JNK 和 p38 路徑明顯磷酸化、I- κ B 降解與 NF- κ B 核移位，顯示 PS-F2 作用 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 的訊息傳導路徑是經由 MAPKs 和 NF- κ B 的活化，對於調控細胞激素的產生具有重要的角色。Chan 等也發表 peptidoglycan 會

透過 NF- κ B 及 p38 的活化刺激巨噬細胞表現 COX-2 (Chen *et al.*, 2009)；肉豆蔻 (*Myristica fragrans*) 萃取的多醣體 macelignan 則在微膠細胞(microglia)會透過 NF- κ B 及 MAPKs 的路徑抑制 LPS 引起的發炎現象 (Ma *et al.*, 2009)；屬於格蘭氏陽性的金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，其細胞壁的 peptidoglycan 也會刺激 RAW 264.7 細胞產生 IL-6，這過程是透過 PKC、p38、p65 磷酸化和 NF- κ B 的活化 (Chen *et al.*, 2006)。酵母菌細胞壁中的多醣體 zymosan 則透過 p38 MAPK 和 NF- κ B 的活化產生 IL-8 (Friedland *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2001)，經由 ERK MAPK 誘導產生 IL-10 (Dillon *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2010)。菇類來源的多醣體也被證實會經由 MAPK 和 NF- κ B 的活化產生各種細胞激素 (Hsu *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2007)。

綜合以上結果確認 PS-F2 能經由 Dectin-1、TLR4 和 CR3 受體等 PRRs 刺激 RAW 264.7 細胞，經由 MAPKs 和 NF- κ B 的訊息傳導途徑產生細胞激素，同時也會刺激 RAW 264.7 細胞產生 NO、促進 RAW 264.7 細胞增生、增強 RAW 264.7 細胞的吞噬活性及刺激樹突細胞成熟等免疫調節活性，顯示 PS-F2 在體外的細胞模式能活化免疫系統，而腹腔注射也會誘發免疫細胞的聚集，推測 PS-F2 在體內應該也具有活化宿主的免疫調節能力，活化先天性免疫反應，降低宿主受感染，降低罹患疾病的機率。而過去已有很多研究指出，多醣體能活化宿主免疫反應而具有抗腫瘤之功效 (Wasser, 2002; Sanodiya *et al.*, 2009)，因此在下一章將探討 PS-F2 在小鼠體內是否能活化免疫系統，評估 PS-F2 抗腫瘤之效果與其作用機制。

第三章 評估台灣紫芝多醣體之抗腫瘤活性

一、前言

來自真菌或植物細胞壁的多醣體已證實能刺激非特異性的宿主抵抗力及專一性的免疫反應，活化宿主免疫系統，對移植性腫瘤具有良好的抑制效果 (Zjawiony, 2004; Masuda *et al.*, 2009)，但是對於靈芝多醣體的抗腫瘤活性及其作用機制還不是很瞭解。從第二章的結果顯示 PS-F2 在 *in vitro* 的試驗中具有多種免疫調節功能，顯示 PS-F2 對於先天性免疫系統的活化具有很好的效果，推測活化先天性免疫系統後同時也會活化後天性免疫系統；在細胞模式上有顯著的免疫調節功能，推測在動物模式也會有活性。

癌症一直是世界各國死亡的主要原因，即使各類新穎性方法的開發與新藥物的發展，癌症罹患率及死亡率仍居高不下，在台灣一直是死亡原因的第一名。如診斷為後期黑色素腫瘤之病患，其五年存活率只有 5-10 %，如為第一期患者其五年存活率則高於 80 % (Wolchok and Saenger, 2008)。腫瘤細胞因為是由正常細胞發生異常病變而分化，往往在免疫原性 (immunogenic) 較差，其抗原特徵上與正常細胞的差異並不大，也就不易活化免疫系統，產生需要的警示信號，不足以啟動免疫系統的偵測及攻擊。此外，腫瘤細胞還會分泌產生抑制免疫反應的因子，使免疫系統功能降低 (Leach *et al.*, 1996)。一般而言，生體內的腫瘤抗原如受到免疫系統辨認，會啟動發炎反應，這中間依賴著免疫相關細胞上 PRRs 的辨識，PRRs 是細胞表面上主要表現的共激分子，釋放不同的細胞激素，所以只有在適

當或活化的免疫反應下，腫瘤細胞才會被偵察到而被殲滅 (Chen *et al.*, 1994)。

生物反應修飾劑對生體不會造成傷害，產生額外的壓力，使生體更易於適應各種環境變化及生物性壓力，發揮生體各項非特異性的作用，如神經系統、荷爾蒙分泌及免疫系統運作，透過免疫系統辨識受體與特殊病原相關分子模式的作用，增強免疫調節功能 (Wasser and Weis, 1999)。已知多醣體可活化生體的免疫功能作為生物反應修飾劑，而生物反應修飾劑概念的運用在腫瘤治療上可以提高患者的抗腫瘤免疫力，或是預防抗癌治療對身體免疫系統的損傷，因而可提高腫瘤的治療效果。生產自菇類的 PSK、lentinan 和 krestin 多醣體做為生物反應修飾劑，在日本已經成功運用在臨床的腫瘤治療，結合手術治療、化學治療和放射線治療，提升患者受細菌和病毒感染的抵抗力 (Akagi and Baba, 2010; Chihara *et al.*, 1970; Masuda *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2010)。

本章將以動物模式探討餵食 PS-F2 小鼠對非特異性的免疫調節活性之影響；利用皮下移植小鼠之腫瘤細胞，在小鼠身上形成易於觀察的固體腫瘤，建立小鼠腫瘤模式，以腹腔注射 PS-F2 給予接種腫瘤細胞的小鼠，評估 PS-F2 在同種異體 (allogeneic) 及同種 (syngeneic) 小鼠腫瘤模式的抗腫瘤活性。同時分析接種腫瘤小鼠脾臟免疫細胞族群的變化，探討 PS-F2 對小鼠體內免疫調節功能之影響，及抗腫瘤活性與機制，評估台灣紫芝多醣體作為免疫調節功效的機能性食品及生物反應修飾劑於腫瘤治療之潛力與應用。

二、材料與方法

1. 菌株、細胞株及動物

Sarcoma 180 (S180)、C26 肉瘤細胞與 B16 melanoma (B16) 黑色素瘤細胞株。S180 (CCRC 60337) 由新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心購得。S180 及 B16 腫瘤細胞株培養於含 10 % FBS 之 DMEM 中；C26 細胞株培養於含 RPMI10 中，皆培養於含 5 % CO₂ 之 37 °C 培養箱。

使用的 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠屬於近親品系。C57BL/6 小鼠對移植自 C57BL/10J 的腫瘤有排斥性，18 月齡後很少出現其他型態的腫瘤，與其他品系相較，C57BL/6J 最適合動脈粥狀硬化傷害的研究。BALB/c 小鼠施用 DMBA 可誘發子宮腫瘤和白血病。

2. 非特異性免疫反應評估

餵食 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠 PBS 或台灣紫芝多醣體 PS-F2 (50 mg/kg)，實驗期間測量體重變化，餵食一個月後，犧牲小鼠採集血液樣本，並取小鼠脾臟秤重。測定血清中 IgM 及 IgG 抗體之含量，並以流式細胞儀分析脾臟中 T、B 淋巴球與 NK 細胞之比例含量變化。

3. 抗腫瘤活性之評估

將腫瘤細胞以皮下注射接種於小鼠大腿背部，24 小時後分別以 PBS 及台灣紫芝多醣體 PS-F2 (50 mg/kg) 進行管餵或腹腔注射，每兩天餵食或注射一次，實驗期間測量體重變化及腫瘤大小，持續三週後，犧牲小鼠採集血清樣本，取出

腫瘤及脾臟並秤重，另以流式細胞儀分析脾臟中 T、B 淋巴球與 NK 細胞之比例含量變化。

腫瘤大小計算公式為： $(\text{最長直徑}) \times (\text{最短直徑})^2 / 2$ 。

4. 血清中抗體之測定

以眼窩採血或心臟採血方式採集血液，離心後取上層血清，儲存 -80 °C 待分析。血清以 ELISA 法進行抗體含量分析(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX. E90-101 和 E90-131)。

96 孔 ELISA 平底盤中加入 100 μ l capture antibody，置於室溫下 1 h。以 wash buffer 清洗四次，加入 200 μ l/well blocking solution，室溫下半小時，再以 wash buffer 清洗四次，加入經適當稀釋之待測血清或標準溶液(0-2000 pg/ml) 100 μ l，於室溫下反應一小時後，以 wash buffer 清洗四次。接著加入 100 μ l detection antibody 於室溫下作用 2 小時後，以 wash buffer 清洗四次，加入 HRP conjugated affinity purified antibody 100 μ l，避光作用 30 分鐘後，最後加入 TMB 基質液避光反應，再以微量盤分析儀偵測波長 650 nm 吸光值，將樣品吸光值帶入標準曲線，求得血清中抗體的濃度。

5. 脾臟細胞製備

於無菌操作下取出犧牲小鼠脾臟，秤重後置於含 RPMI10 之 6 cm 平皿，以針筒尾端將脾臟磨碎，將磨碎之脾臟細胞懸浮液置於 15 ml 離心管靜置 5 min，取出上層細胞液，以 300 $\times$ g 離心 5 min，將沉降細胞以 1 ml ACK buffer 去除紅血球，加入 5 ml RPMI10 中止反應，離心後再以 PBS 清洗，最後以適量 RPMI10 懸浮脾臟細胞，計數後調整至所需細胞密度。

6. 脾臟細胞族群比例分析

將脾臟細胞分別以螢光標記之 CD3、CD4、CD8、CD19 及 CD49b 抗體進行染色，並以流式細胞儀來分析各細胞族群之比例變化情形。

將脾臟細胞 (1×10^6 cells) 先以 rat anti-CD16/32 mAb (clone 2.4G2, BD Pharmingen)處理 30 分鐘，接著再以各種抗體 (FITC anti-CD3, PE anti-CD4, APC anti-CD8, PE anti-CD19 及 PE anti-CD49b, eBioscience) 於 4 °C 染色 30 分鐘，以 PBS 清洗後，最後以 FACSCano II Flow Cytometer (BD Biosciences)進行測定，使用 FlowJo software (Tree Star, Inc) 分析數據。

7. NK 細胞毒殺活性之測定

標靶細胞(target cell, YAC-1)是由林璧鳳老師實驗室所提供，培養於 RPMI10 培養基。脾臟細胞做為作用細胞 (effectors cell)，YAC-1 做為標靶細胞。將作用細胞與標靶細胞以不同比例 (100:1、50:1、25:1) 混合反應，於 37 °C 培養 24 小時後，NK 細胞對 YAC-1 的細胞毒性以 MTT 法或 LIVE/DEAD® Cell-Mediated Cytotoxicity Kit (L7010, Molecular Probes, Eugene, USA) 測定。

8. MTT 法分析細胞存活

以 MTT 法分析細胞存活的多寡，已知活細胞粒腺體能將 MTT 中的 tetrazolium 環打斷，形成藍色之 formazan 化合物，藍色愈深表示活細胞愈多 (Yuan *et al.*, 2006)。於 96 孔盤培養細胞加入 10 μ l MTT 試劑 (5 mg/ml)，再培養 3 小時後離心，小心移除培養上清液，加入 100 μ l DMSO 將溶解藍色 formazan 結晶，測定 570 nm 之吸光值。

NK 細胞毒殺活性計算公式如下：

$$\text{NK 細胞毒殺活性(\%)} = [\text{OD}_T - (\text{OD}_S - \text{OD}_E) / (\text{OD}_T)] \times 100\%。$$

控制組分別為標靶細胞 T、空白組 S 及作用細胞 E。

9. 細胞介導毒殺活性分析

根據 Cell-Mediated Cytotoxicity Kit 使用方法，將標靶細胞 YAC-1 (1×10^6 cells/ml) 先添加 4 μ l/ml DiOC18 溶液，於 37 °C 培養 20 分鐘，以 PBS 清洗三次後懸浮於 PBS 待用。將作用細胞與標靶細胞以不同比例 (100:1、50:1、25:1) 混合作用，37 °C 培養 24 小時，分析細胞存活前 30 分鐘添加 propidium iodide (PI) 標定死細胞，再以細胞流式儀分析。

先檢測有標定 DiOC18 的標靶細胞群 (T)，再以 PI 的表現判斷標靶細胞群細胞的死活，計算死細胞 ($\text{DiOC18}^+ \text{PI}^+$; Td) 及活細胞 ($\text{DiOC18}^+ \text{PI}^-$) 實際數目。

$$\text{NK 細胞毒殺活性 \% Td} = (\text{Td}/\text{T}) \times 100 \%$$

10. 免疫細胞純化

將 C57BL/6 小鼠皮下接種 B16 腫瘤細胞 (1×10^6 cells/mice)，24 小時後以 PS-F2 (50 mg/kg) 腹腔注射處理，每兩天一次，在第 6 天及第 12 天犧牲小鼠取脾臟。各種免疫細胞的純化是以 EasySep® 細胞純化套組 (StemCell Technologies, Canada) 進行。根據純化套組操作手冊 CD4 (Cat 18752)、CD8 (Cat 18753) 和 CD49b (Cat 18745) 細胞分別純化自小鼠脾臟細胞。

脾臟細胞調整為 5×10^7 cells/ml 於 12×75 mm 試管，不要超過 2 ml，添加建議之抗體 cocktail 量，4 °C 作用 15 min，清洗後懸浮於培養基 ($2-8 \times 10^7$ cells/ml)

加入 100 μ l anti-biotin tetrameric antibody complexes/mL，充分混合後，4 °C 下作用 15 min，加入磁珠，4 °C 下作用 15 min，將試管置於磁座靜置 10 min，清洗 3-5 次，並以流式細胞儀分析確認。

11. adoptive transfer

分別將第 6 天及第 12 天犧牲的 C57BL/6 小鼠脾臟免疫細胞 CD4 T 細胞 (1.2×10^7 cells/mice)、CD8 T 細胞 (7.5×10^6 cells/mice) 和 CD49b NK 細胞 (1.6×10^6 cells/mice) 以靜脈注射從 C57BL/6 小鼠尾巴注入，另一組靜脈注射小鼠血清 (200 μ l/mice)，控制組不注射任何細胞或血清，每組 5 隻小鼠，24 小時後在小鼠右後腿處皮下注射 B16 腫瘤細胞 (1×10^6 cells/mice)，每兩天記錄腫瘤生長情形。

12. SCID mice 之抗腫瘤模式

SCID (severe combined immune deficiency) mice 是嚴重缺乏 T 和 B 淋巴細胞的自發性免疫缺陷小鼠。小鼠購買自台大醫學院實驗動物中心，八週大小鼠，飼養於台大生命科學院 SPF (specific pathogen free) 動物房。

將 B16 腫瘤細胞 (1×10^6 cells/mice) 皮下注射於 SCID mice，24h 之後開始腹腔注射 PS-F2 (50 mg/kg)，每兩天腹腔注射 PS-F2 一次，實驗期間紀錄腫瘤大小。

13. 統計分析

所有實驗至少都重複三次，每次處理均三重複，實驗結果以平均值 $\pm$ 標準偏差 (SD) 表示；而在動物實驗的數據則均以平均值 $\pm$ 標準誤差 (SE) 表示，資料統計採用 Student's t test 檢定各實驗組間的差異，若組間 $p < 0.05$ 視為顯著差異。

三、結果

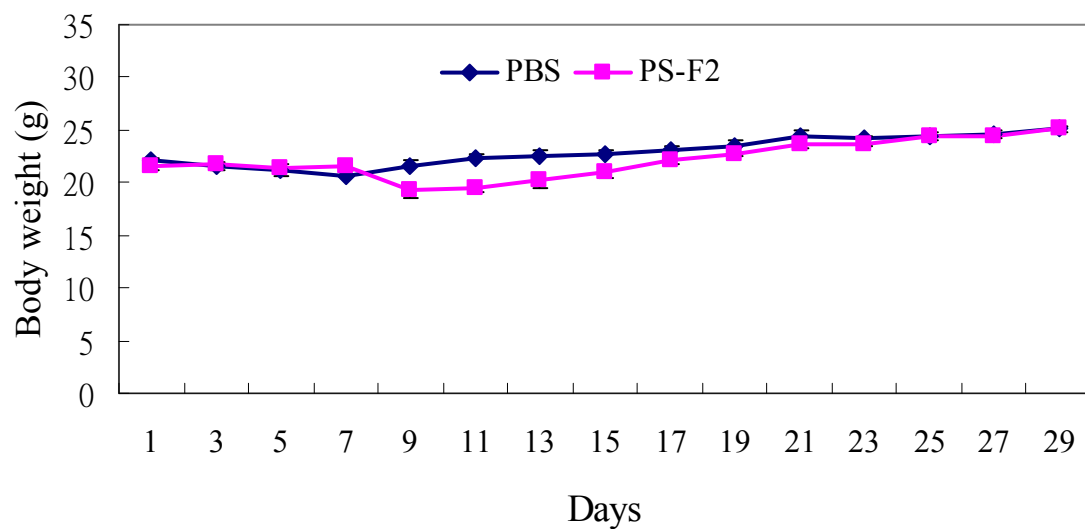
1. 台灣紫芝多醣體於動物體內引起之非特異性免疫反應

由第二章結果已顯示台灣紫芝多醣體 PS-F2 具有免疫調節的活性，為了進一步評估 PS-F2 於動物體內之免疫調節功能及對免疫調節活性之影響，本試驗以 PS-F2 餵食 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠進行探討是否引起之非特異性免疫反應。實驗小鼠每兩天管餵給予 50 mg/kg PS-F2，持續一個月後犧牲小鼠，實驗期間紀錄體重變化，分析各項免疫反應指標。

以 PS-F2 餵食 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠期間，所有小鼠的體重均在正常速度下增加，兩種品系小鼠均不會因為餵食 PS-F2 而有體重減少或增加的影響（圖 3-1），各組間並無明顯差異，確定餵食 PS-F2 對小鼠的生長沒有不良影響或明顯急性毒性。

分析 C57BL/6 小鼠脾臟細胞之細胞族群比例變化，管餵 PS-F2 之小鼠較管餵 PBS 控制組之脾臟中 T 細胞（CD3）族群比例由 $31.91 \pm 0.93 \%$ 增加到 $34.58 \pm 1.13 \%$ （圖 3-2A）；其中 CD4 細胞比例由 $17.61 \pm 1.10 \%$ 增加到 $20.90 \pm 1.31 \%$ ，CD8 細胞比例由 $8.20 \pm 0.57 \%$ 增加到 $9.10 \pm 0.64 \%$ ，細胞比例皆有增加（圖 3-2B）。NK 細胞（CD49b）之比例亦由 $7.96 \pm 0.72 \%$ 增加到 $9.70 \pm 1.04 \%$ （圖 3-3A），且細胞毒殺活性也有增加（圖 3-3B），但與控制組相較均未達顯著差異。雖然管餵 PS-F2 之小鼠脾臟中 B 細胞（CD19）族群比例 $51.01 \pm 0.82 \%$ 下降至 $48.62 \pm 1.25 \%$ （圖 3-2A），但在血清中 IgM 及 IgG 抗體濃度發現均有顯著增加之情形（圖 3-6），推測 PS-F2 會活化 B 細胞產生抗體，結果顯示管餵 PS-F2 會引起 C57BL/6 小鼠非特異性之免疫反應，對 BALB/c 小鼠則不會。

(A) C57BL/6 mice



(B) BALB/c mice

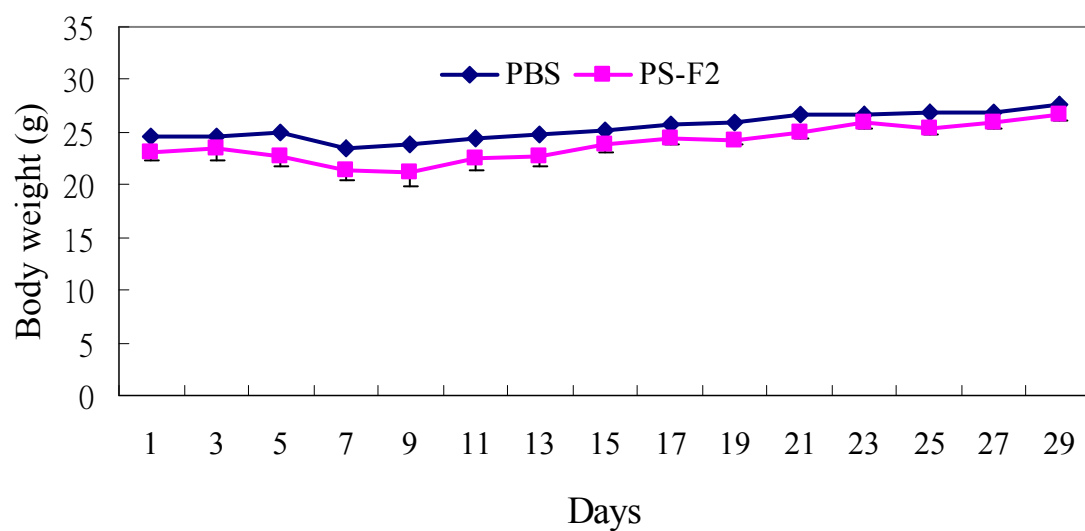
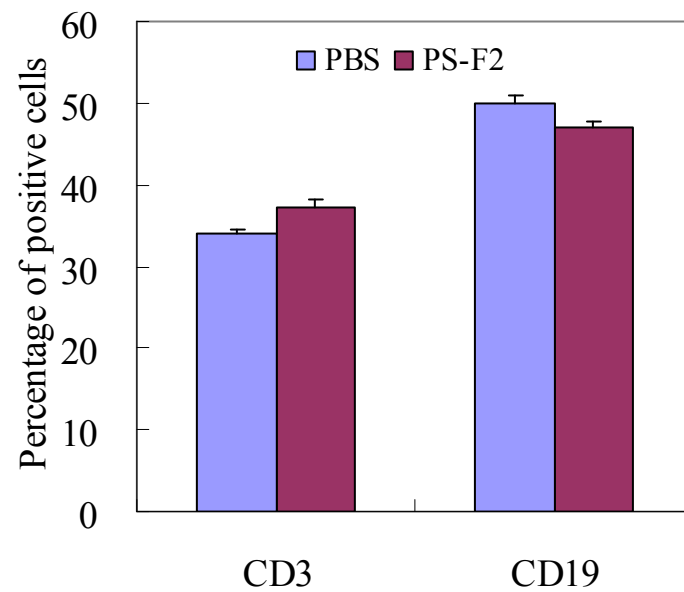


圖 3-1. 以 PS-F2 管餵小鼠四週期間之體重變化

Figure 3-1. Effect of oral administration of PS-F2 on the body weight in C57BL/6 (n=5) (A) and BALB/c (n=7) (B) mice.

The data are the means $\pm$ SE for each group (n=5-7).

(A)



(B)

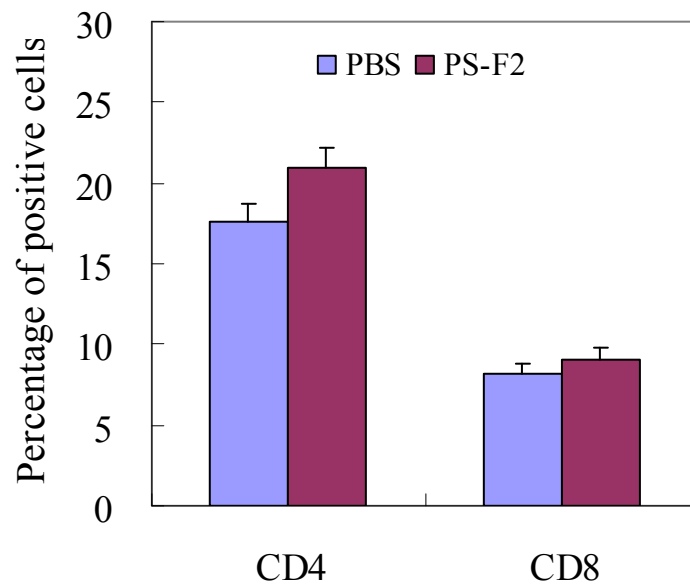
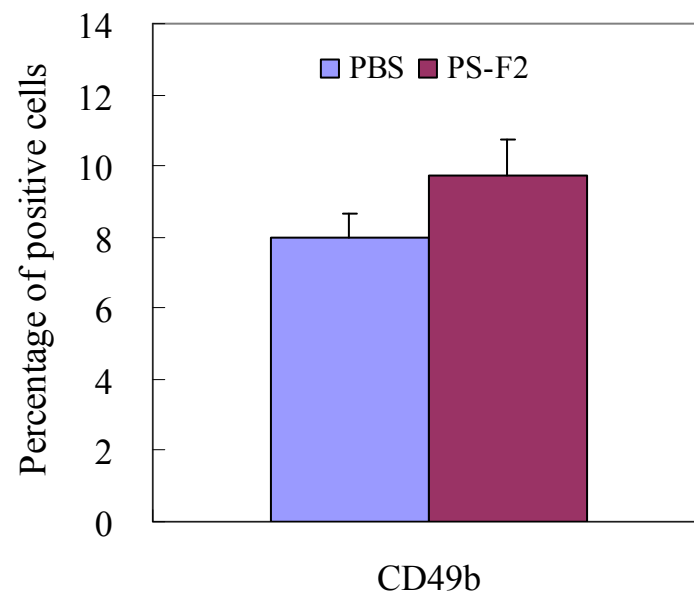


圖 3-2. 以 PS-F2 管餵 C57BL/6 小鼠對脾臟中細胞比例之影響

Figure 3-2. Effect of oral administration of PS-F2 on the T cells and B cells (A) and CD4 and CD8 T cells (B) populations in C57BL/6 spleens.

The data are the means $\pm$ SE for each group (n = 5).

(A)



(B)

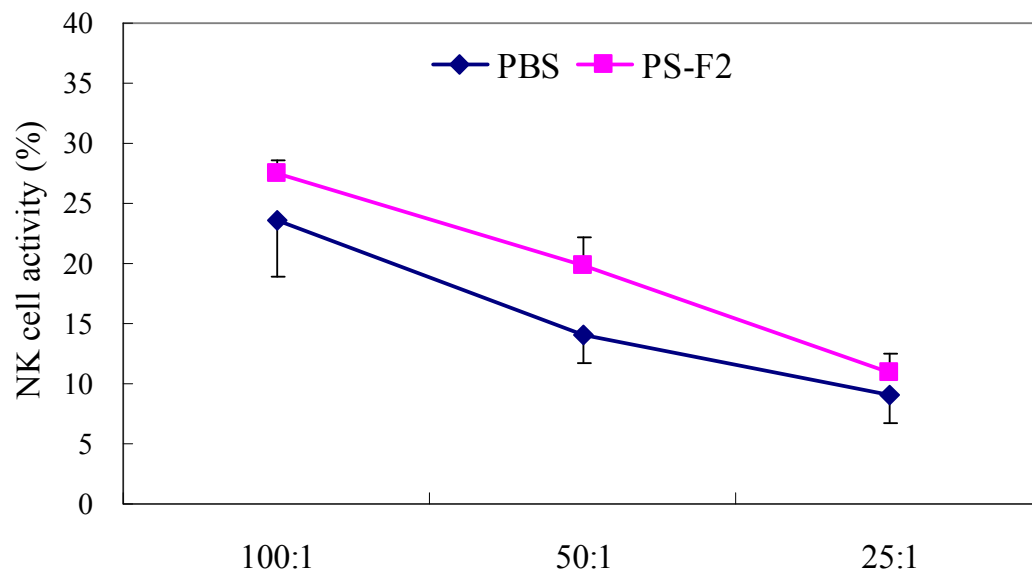
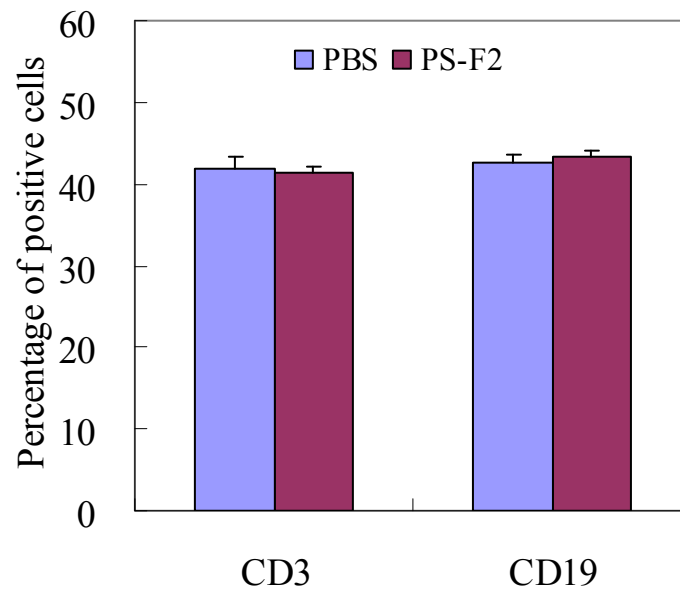


圖 3-3. 以 PS-F2 管餵 C57BL/6 小鼠對脾臟中 NK 細胞之影響

Figure 3-3. Effect of oral administration of PS-F2 on the CD49b population (A) and NK cell activities (B) in C57BL/6 mice.

NK cell activities were assessed by measuring the killed of the target YAC-1 cells mediated by splenocytes. The data are the means $\pm$ SE for each group (n = 5).

(A)



(B)

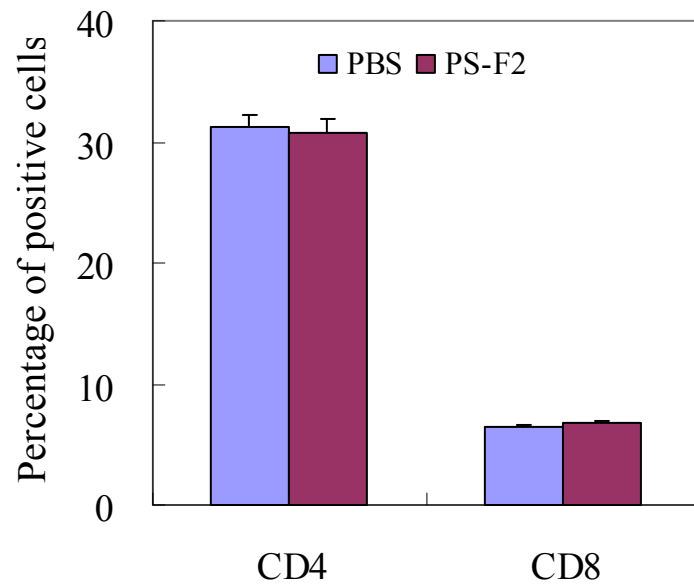
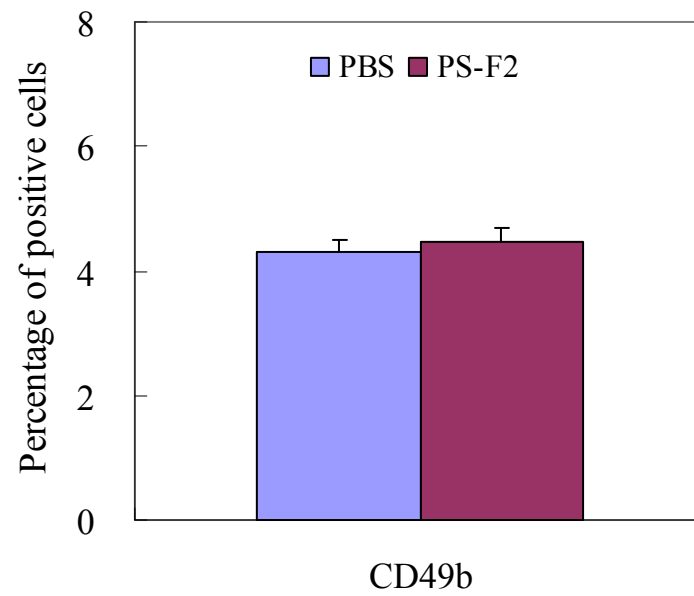


圖 3-4. 以 PS-F2 管餵 BALB/c 小鼠對脾臟中細胞比例之影響

Figure 3-4. Effect of oral administration of PS-F2 on the T cells and B cells (A) and CD4 and CD8 T cells (B) populations in BALB/c spleens.

The data were expressed as mean $\pm$ SE (n=7).

(A)



(B)

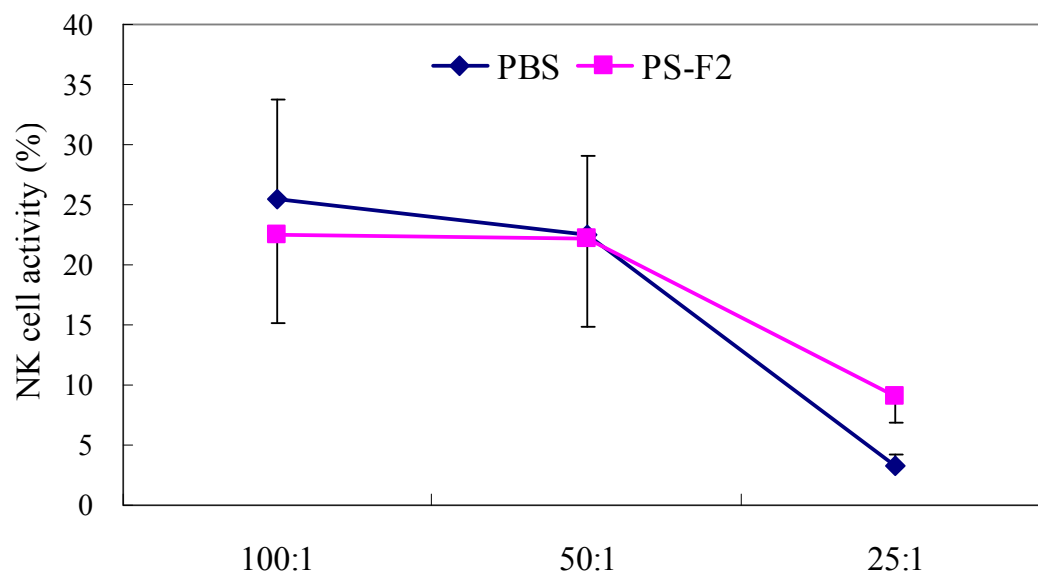
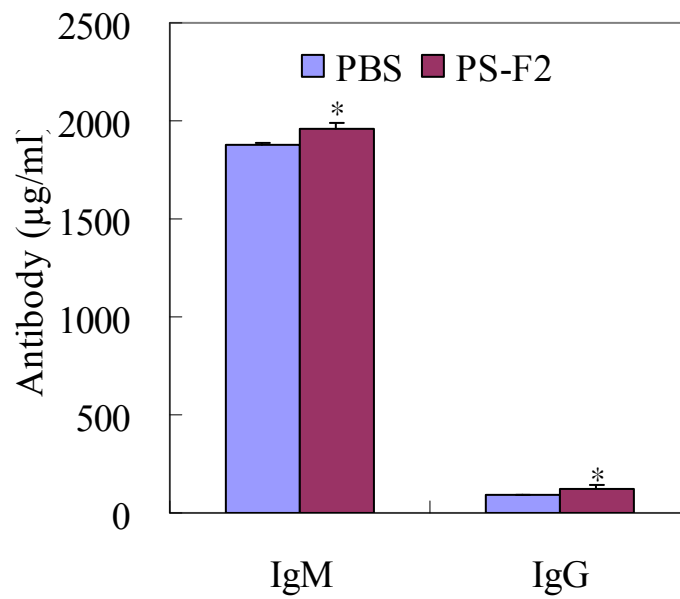


圖 3-5. 以 PS-F2 管餵 BALB/c 小鼠對脾臟中 NK 細胞之影響

Figure 3-5. Effect of oral administration of PS-F2 on the CD49b population (A) and NK cell activities (B) in BALB/c mice.

NK cell activities were assessed by measuring the killed of the target YAC-1 cells mediated by splenocytes. The data are the means $\pm$ SE for each group (n=7).

(A)



(B)

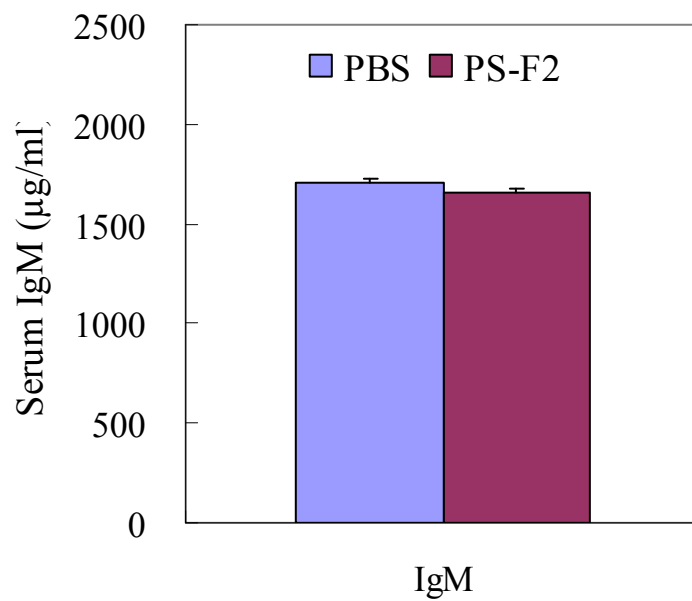


圖 3-6. 以 PS-F2 管餵小鼠對血清中抗體濃度之影響

Figure 3-6. Effect of oral administration of PS-F2 on the serum antibody levels in C57BL/6 (n=5)(A) and BALB/c (n=7) mice(B).

The data are the means $\pm$ SE for each group (n=5-7). * $P < 0.05$ compared to the control group.

而分析管餵 PS-F2 的 BALB/c 小鼠脾臟細胞，T 細胞和 B 細胞在族群比例上沒有改變(圖 3-4A)，T 細胞中的 CD4 細胞與 CD8 細胞比例也不受影響 (圖 3-4B)。NK 細胞比例(圖 3-5A)、細胞毒殺活性(圖 3-5B)及血清中 IgM 濃度(圖 3-6B)也未受管餵 PS-F2 而增減。

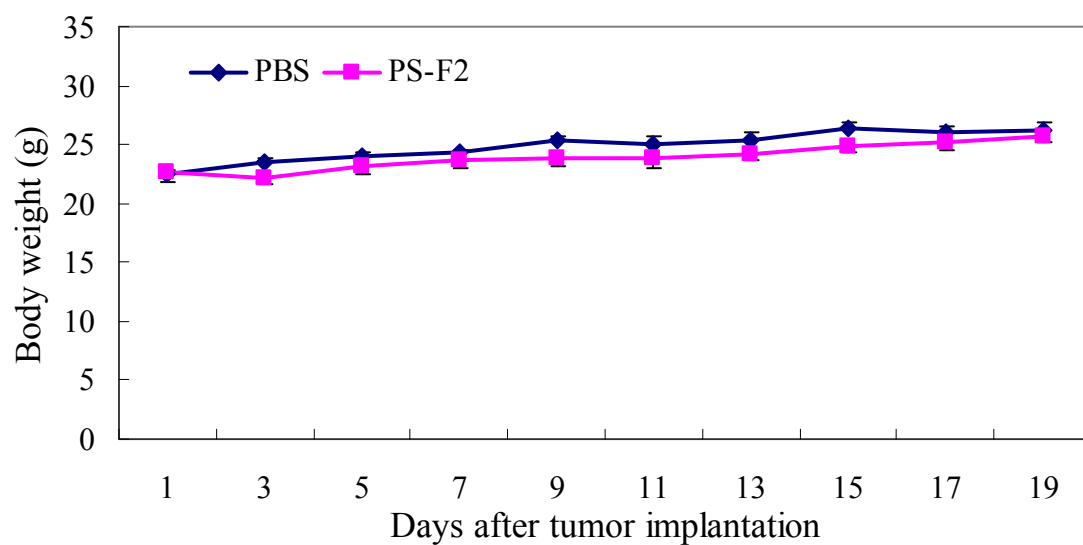
綜合上述結果發現，餵食 PS-F2 在 C57BL/6 小鼠有較強的非特異性免疫反應，而對 BALB/c 小鼠沒有明顯之非特異性免疫反應。

2. 台灣紫芝多醣體抗 S180 腫瘤之活性

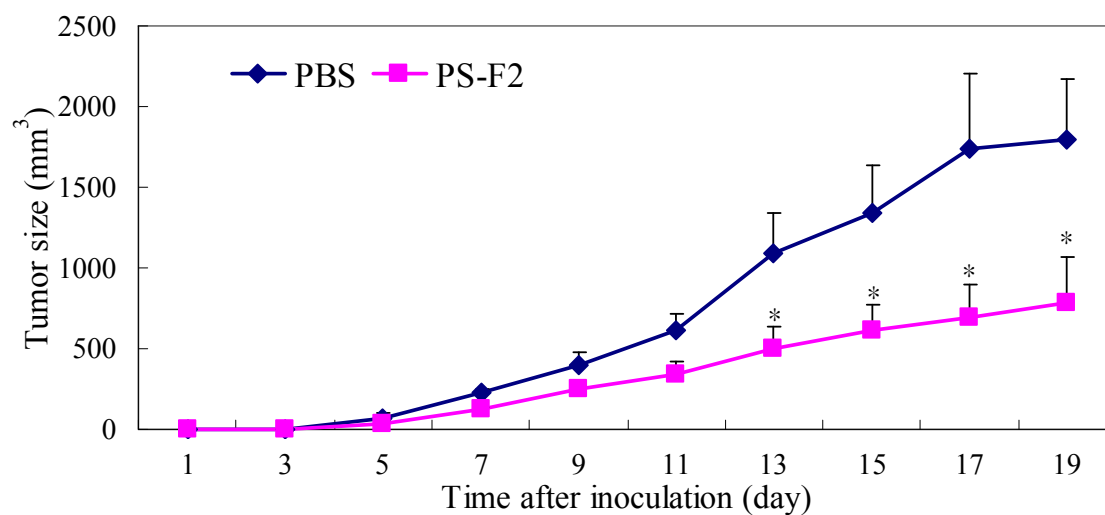
為了確立台灣紫芝多醣體之免疫調節活性是否具有抗腫瘤之效果，首先採用常被用於評估抗腫瘤之動物模式：在 BALB/c 小鼠皮下接種 S180 腫瘤細胞，評估 PS-F2 對腫瘤生長之影響，此腫瘤動物模式屬於同類異體系統 (Nonaka *et al.*, 2006)。

在 BALB/c 小鼠皮下接種 S180 腫瘤細胞 24 小時後，開始第一次腹腔注射 PS-F2 (50 mg/kg)，每兩天腹腔注射 PS-F2 一次，持續三週，實驗期間紀錄體重變化及測量腫瘤生長情形。於試驗 3 週後犧牲動物，採血分析血清抗體含量，取脾臟及腫瘤組織秤重，並分析脾臟其 T 細胞及 B 細胞族群比例之變化。結果顯示給予 PS-F2 對於小鼠體重變化與控制組給予 PBS 的生長相近，對小鼠生長無顯著影響 (圖 3-7A)；但在接種 S180 腫瘤細胞後第十三天，腹腔注射 PS-F2 已有顯著抑制腫瘤生長之效果 (圖 3-7B)，在第十九天犧牲小鼠時，以腫瘤重量計算，相對於給予小鼠 PBS 組，給予小鼠 PS-F2 顯著抑制 S180 之生長 ($p=0.006$)，其抑制率達 67.5 % (圖 3-8)。在另外兩次獨立的抗 S180 腫瘤試驗中，給予小鼠 PS-F2 抑制 S180 生長也達到 73.2 % ($p=0.014$) 和 86.7 % ($p=0.02$)，顯示 PS-F2 對於

(A)



(B)



(C)

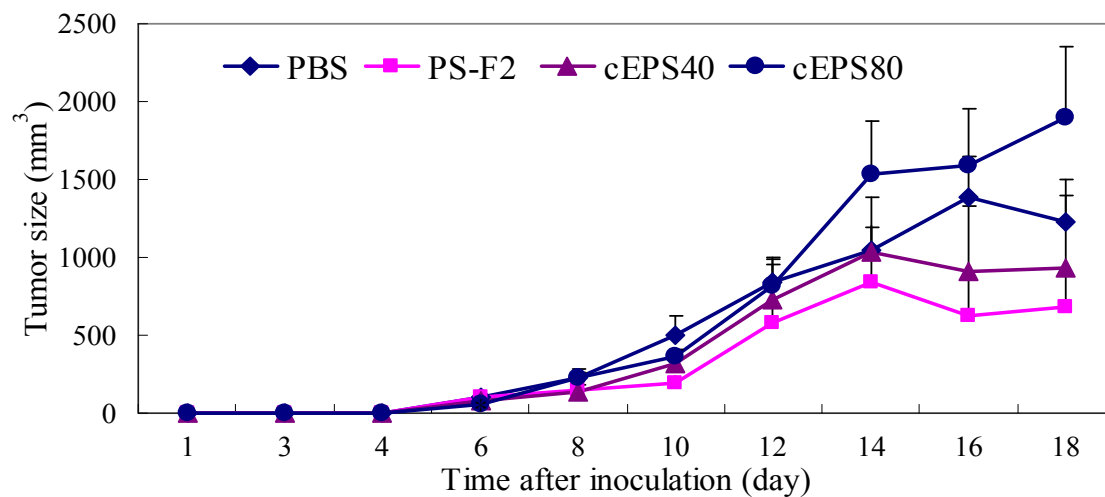


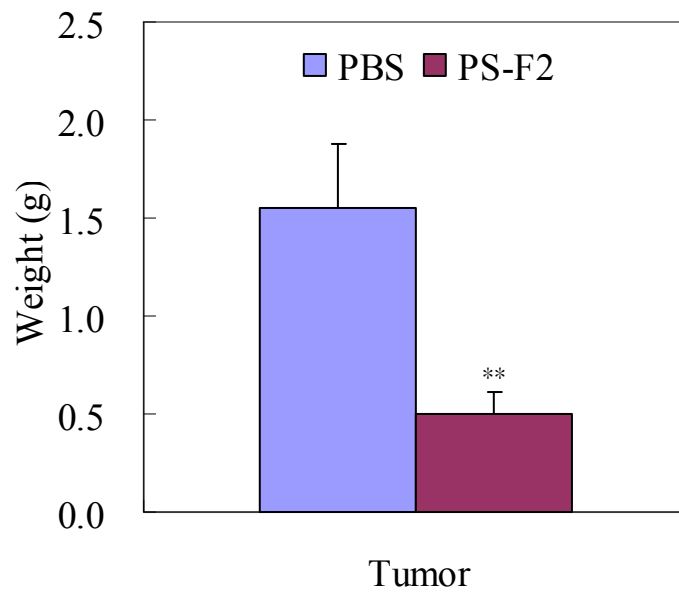
圖 3-7. PS-F2 對 S180 之抗腫瘤效果

Figure 3-7. Antitumor effect of PS-F2 in S180 tumor-bearing mice. The body weight (A) and tumor size (B and C) were monitored after inoculation.

S180 (2×10^6 cells) was subcutaneously implanted into BALB/c mice. PS-F2 (50mg/kg) was i.p. administered to mice (n=10) for 3 weeks starting from 24 h before inoculation (A and B). PS-F2 (50mg/kg), cEPS40 (40 mg/kg) and cEPS80 (80 mg/kg) were oral administered to mice (n=4) for 3 weeks starting from 24 h before inoculation (C). Control mice were treated with equal amounts of PBS alone on the same schedule. Data are the means $\pm$ SE. * $P < 0.05$ compared to the control group.



(A)



(B)

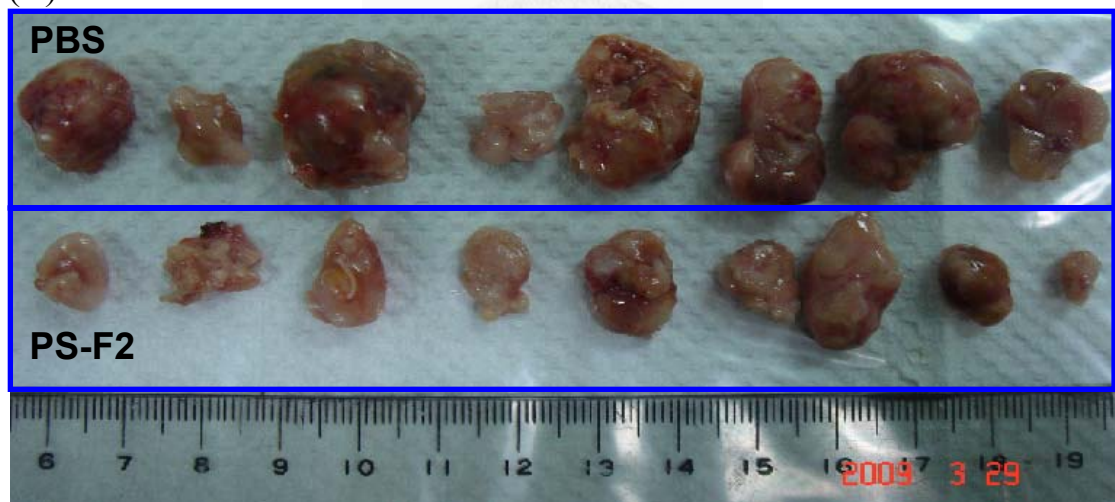


圖 3-8. PS-F2 對 S180 腫瘤生長之影響

Figure 3-8. Anti-tumor effects of PS-F2 in S180 tumor-bearing mice. The change of tumor weights (A) were determined after scarified. (B) is tumor picture after cut off.

S180 (2×10^6 cells) was subcutaneously implanted into BALB/c mice. PS-F2 (50mg/kg) was i.p. administered to mice for 3 weeks starting from 24 h before inoculation. Control mice were treated with equal amounts of PBS alone on the same schedule. Data are the means $\pm$ SE (n=10). * $P < 0.05$ compared to the control group.

S180 腫瘤增殖有極佳的抑制效果。如以管餵方式給予 cEPS 和 PS-F2 (圖 3-7C) 來測試台灣紫芝的口服抗腫瘤效果時，高、低劑量的 cEPS 都沒有抑制腫瘤生長之效果，而 PS-F2 的抑制率仍有 38.9 %。

檢測犧牲小鼠後取出的脾臟，給予 PS-F2 小鼠的脾臟重量沒有增減 (圖 3-9)。分析脾臟細胞族群比例之變化時，CD3 的細胞比例由 $39.76 \pm 2.02\%$ 增加至 $43.73 \pm 1.64\%$ ，給予 PS-F2 小鼠的 T 細胞族群比例顯著提高 (圖 3-10A)，而且其中 CD4 與 CD8 之 T 細胞比例也分別由 $15.44 \pm 1.39\%$ 增加至 $20.73 \pm 2.25\%$ 以及 $6.12 \pm 0.45\%$ 增加至 $7.78 \pm 0.64\%$ ，均有增加之情形 (圖 3-10B)。而 NK 細胞比例 ($5.91 \pm 0.4\%$ 增加至 $6.04 \pm 0.4\%$) 及細胞毒殺活性也有增加，但是沒有達到顯著差異 (圖 3-11)。在給予 PS-F2 之小鼠血清中，發現 IgM 抗體濃度也有顯著增加 (圖 3-12)。

以上結果顯示 PS-F2 對 S180 之抗腫瘤活性推測是透過活化對腫瘤抗原具專一性之 CD4 與 CD8 T 細胞，藉由 CD8 細胞達到毒殺腫瘤細胞之效果，而 CD4 細胞也可能進一步刺激 B 細胞活化產生針對腫瘤抗原之抗體。

3. 台灣紫芝多醣體抗 B16 melanoma 腫瘤之活性

除了以 S180 腫瘤細胞之動物模式評估 PS-F2 抗腫瘤活性外，本研究另採用以 C57BL/6 小鼠皮下接種 B16 黑色素瘤細胞之同種腫瘤移植動物模式，評估台灣紫芝多醣體 PS-F2 之抗腫瘤活性。

C57BL/6 小鼠接種 B16 腫瘤細胞 24 小時後，開始第一次腹腔注射 PS-F2 (50 mg/kg)，每兩天進行腹腔注射 PS-F2 一次，試驗期間紀錄體重變化及測量腫瘤生長情形。於試驗 3 週後犧牲動物，採血分析血清抗體含量，取脾臟及腫瘤組織秤

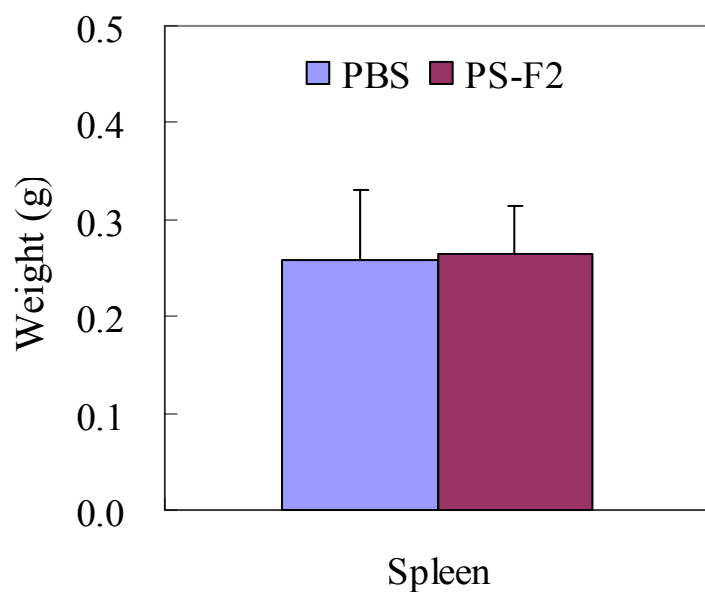


圖 3-9. PS-F2 對接種 S180 小鼠脾臟重量之影響

Figure 3-9. Effect of PS-F2 on spleen weights in S180 tumor-bearing mice.

The spleen weights were determined after scarified. Data are the means $\pm$ SE (n=10).

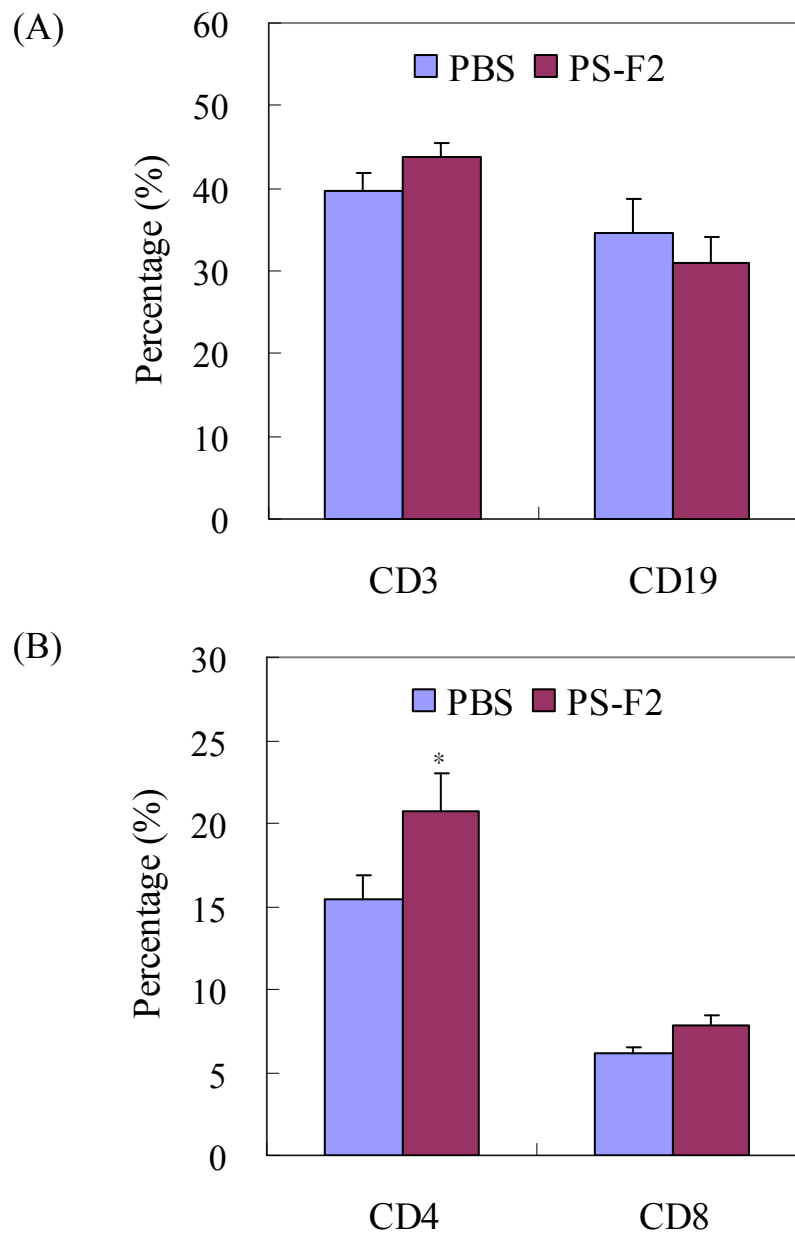


圖 3-10. PS-F2 對接種 S180 小鼠脾臟細胞族群比例之影響

Figure 3-10. Effect of PS-F2 on the populations of T and B cells (A) and CD4 and CD8 T cells (B) in splenocytes of S180-bearing mice.

The data are the means $\pm$ SE for each group (n = 10).

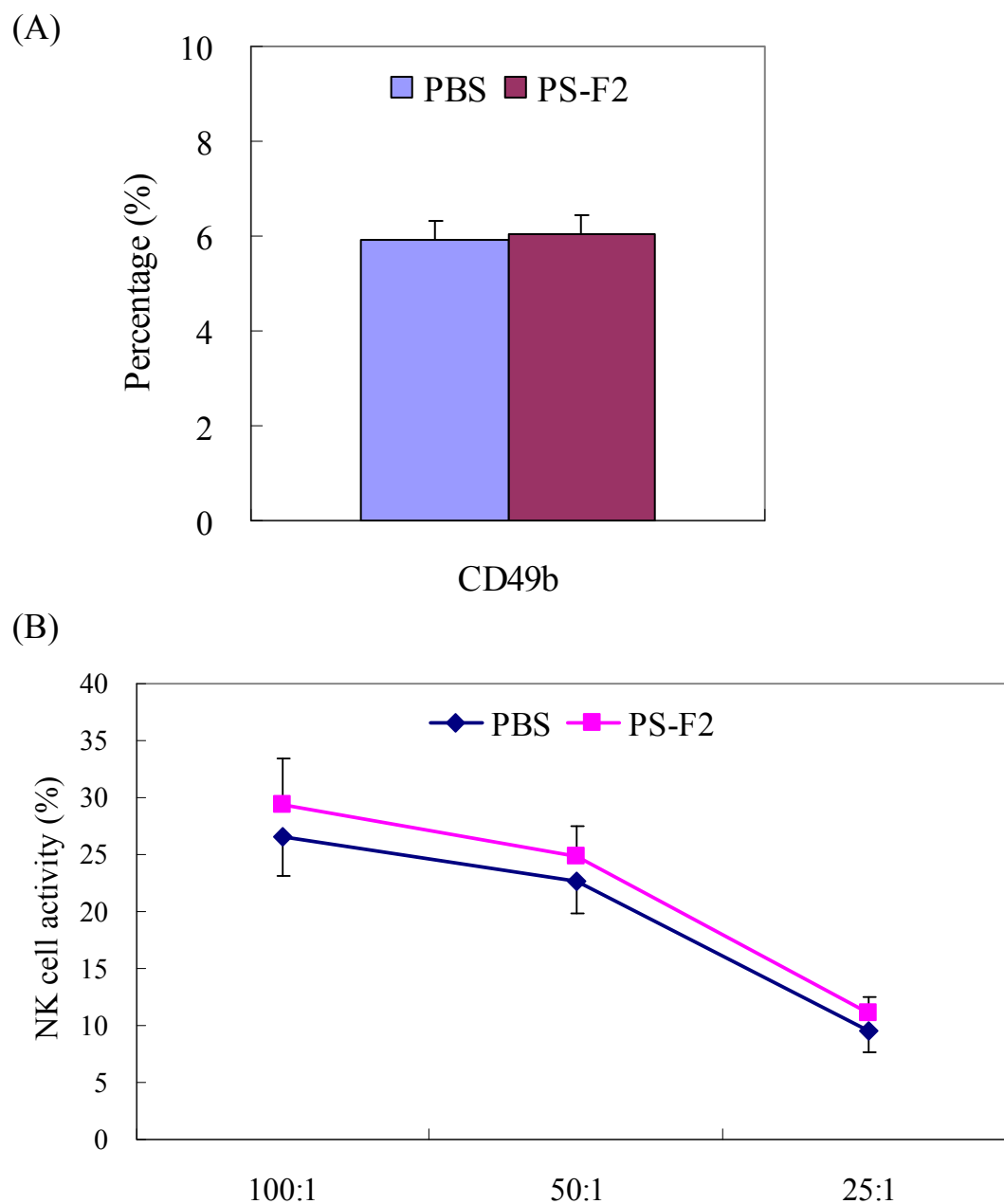


圖 3-11. PS-F2 對接種 S180 小鼠脾臟中 NK 細胞之影響

Figure 3-11. Effect of PS-F2 on the CD49b population (A) and NK cells activities (B) in S180 tumor-bearing mice.

Cytotoxicity of NK cells were assessed by measuring the lysis of the target YAC-1 cells mediated by splenocytes from tumor implanted mice. Data are the means $\pm$ SE (n=10).

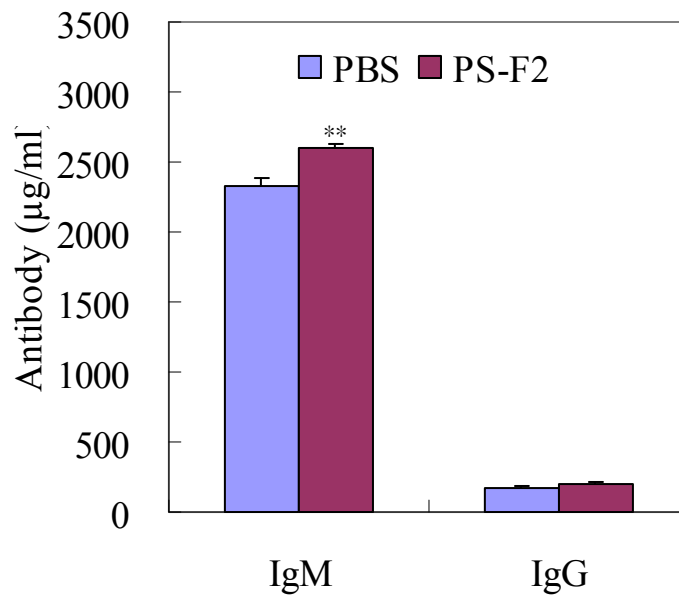


圖 3-12. PS-F2 對接種 S180 小鼠血清抗體濃度之影響

Figure 3-12. Effect of PS-F2 on serum IgM and IgG in S180 tumor-bearing mice.

The antibody levels were determined by ELISA. Data are the means $\pm$ SE (n=10).

** $P < 0.01$ compared to the PBS group.

重，並分析脾臟其 T 細胞及 B 細胞族群比例之變化。在小鼠體重方面，腹腔注射 PS-F2 小鼠體重雖比控制組輕，但扣除腫瘤重量時，腹腔注射 PS-F2 對於小鼠體重變化無顯著影響 (圖 3-13A)；在接種 B16 腫瘤細胞後第十一天，腹腔注射 PS-F2 對 B16 腫瘤已有顯著抑制生長之效果 (圖 3-13B)，而於第二十天犧牲小鼠時，以腫瘤重量計算，腹腔注射 PS-F2 可抑制 B16 腫瘤生長達 23.5 % ($p = 0.035$) (圖 3-14A)。在另外兩次個別的 B16 腫瘤試驗中，給予小鼠 PS-F2 抑制 B16 腫瘤生長分別是 43.1 % ($P = 0.039$) 和 23.7 % ($P = 0.024$)，PS-F2 對 B16 黑色素腫瘤細胞亦有良好之抑制效果。

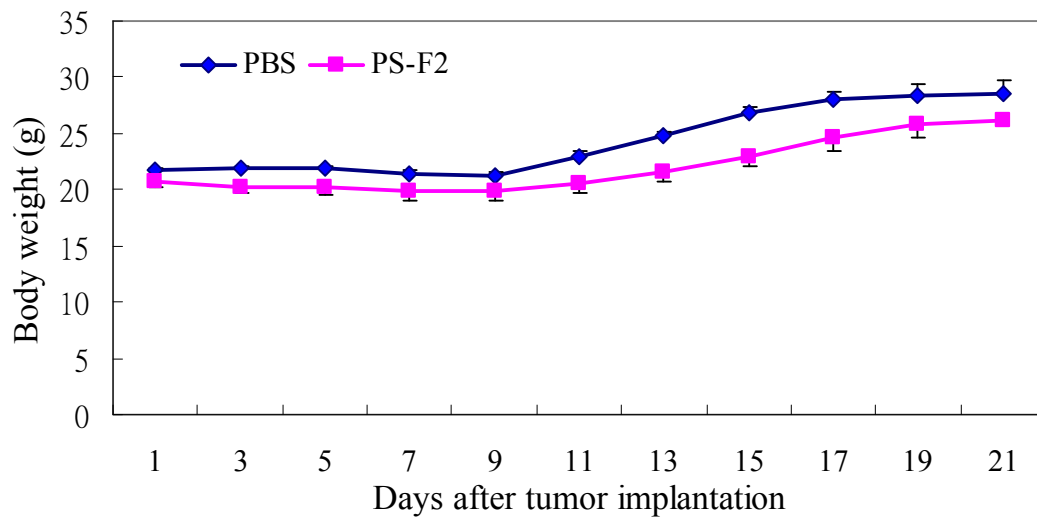
觀察犧牲後小鼠脾臟，給予小鼠 PS-F2 的脾臟重量顯著變大 (圖 3-15)。分析脾臟細胞族群比例之變化，CD3 的細胞比例由 $53.34 \pm 2.28\%$ 增加至 $57.24 \pm 2.87\%$ ，腹腔注射 PS-F2 使 T 細胞族群比例增加，但 B 細胞反而減少 (圖 3-16A)。T 細胞中的 CD4 比例也從 $15.15 \pm 0.77\%$ 增加到 $17.12 \pm 1.28\%$ (圖 3-16B)。在 NK 細胞比例及細胞毒殺活性有些微增加，但是沒有達到具顯著差異 (圖 3-17)。在給予 PS-F2 之小鼠血清中，發現 IgM 抗體濃度顯著比控制組 PBS 增加 (圖 3-18)。

綜合以上結果顯示 PS-F2 之抗 B16 黑色素瘤活性推測也是透過活化對腫瘤抗原具專一性之 T 細胞，藉由 CD4 T 細胞活化進一步刺激 B 細胞產生針對腫瘤抗原之抗體，達到抑制腫瘤生長之效果。

4. 台灣紫芝多醣體抗 C26 腫瘤之活性

前面結果顯示 PS-F2 對 S180 及 B16 腫瘤細胞均有顯著性的抑制效果，為了評估 PS-F2 對各種腫瘤細胞生長抑制之廣度，另外以 BALB/c 小鼠皮下接種 C26 腫瘤細胞之同種腫瘤移植動物模式，評估台灣紫芝多醣體 PS-F2 之抗腫瘤活性。

(A)



(B)

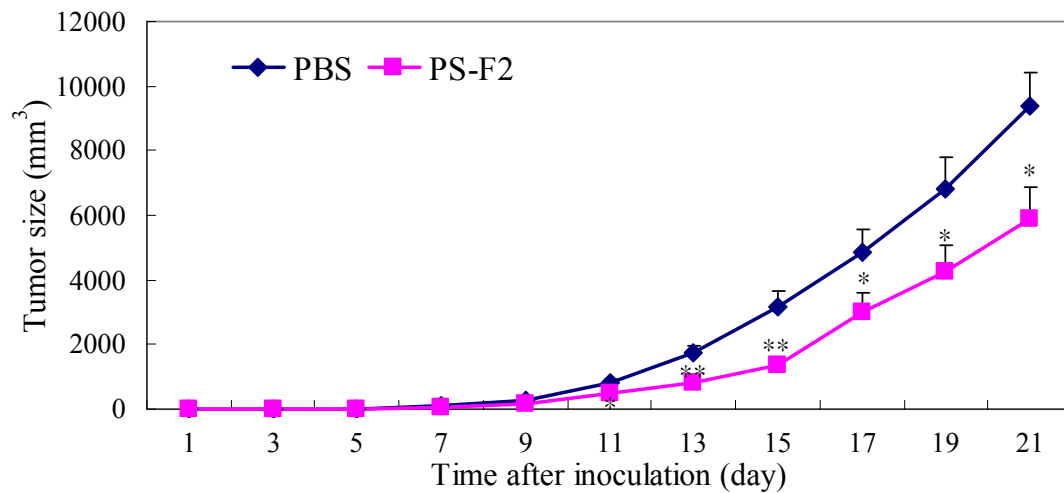
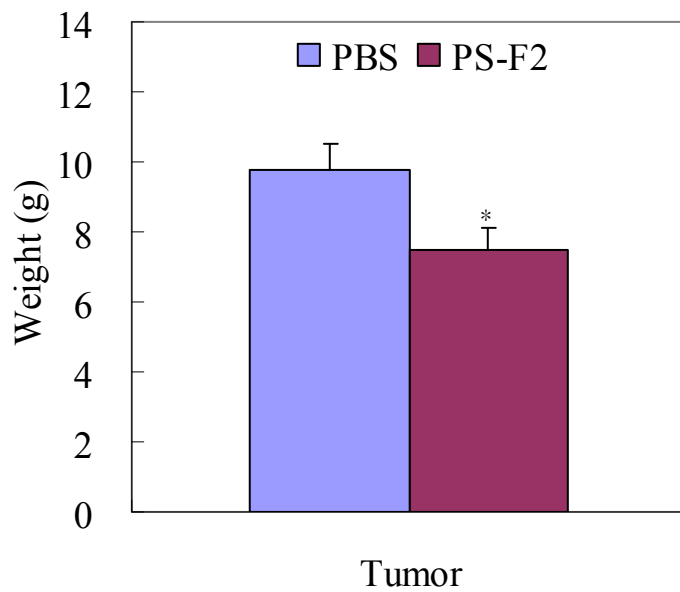


圖 3-13. PS-F2 對 B16 抗腫瘤之效果

Figure 3-13. Antitumor effect of PS-F2 in B16 tumor-bearing mice. The body weight (A) and tumor size(B) were monitored.

B16 (1×10^6 cells) was subcutaneously implanted into C57BL/6 mice. PS-F2 (50mg/kg) was i.p. administered to mice for 3 weeks starting from 24 h before inoculation. Control mice were treated with equal amounts of PBS alone on the same schedule. Data are the means $\pm$ SE (n=10). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to the PBS group.

(A)



(B)

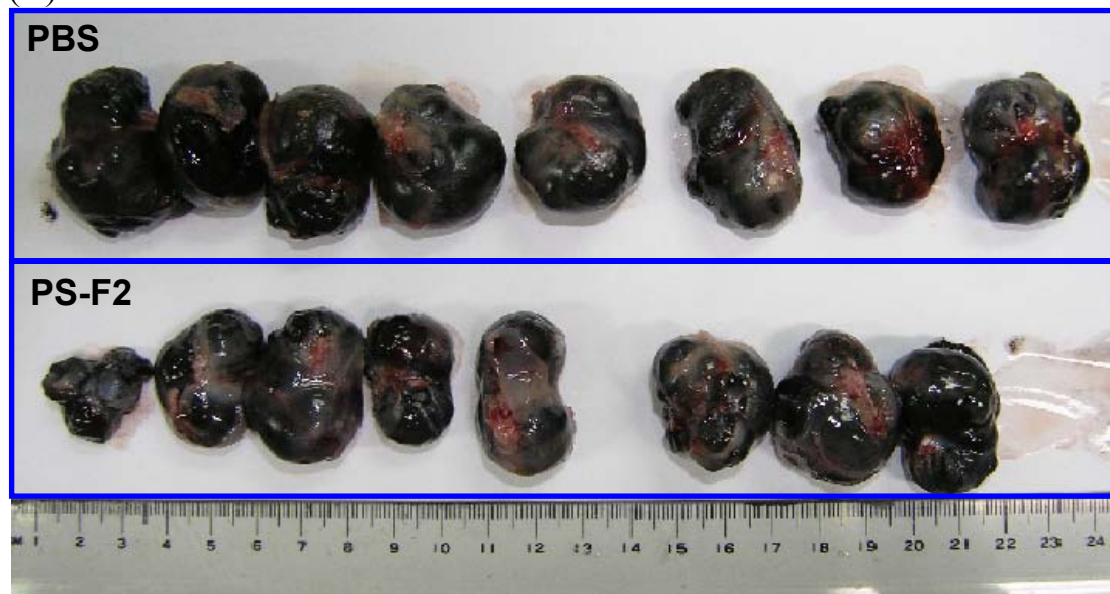


圖 3-14. PS-F2 對 B16 腫瘤生長之影響

Figure 3-14. Anti-tumor effects of PS-F2 in B16 tumor-bearing mice. The change of tumor weight(A) was determined on day 21. (B) is tumor picture after cut off.

B16 (1×10^6 cells) was subcutaneously implanted into C57BL/6 mice. PS-F2 (50mg/kg) was i.p. administered to mice for 3 weeks starting from 24 h before inoculation. Control mice were treated with equal amounts of PBS alone on the same schedule. Data are the means $\pm$ SE (n=10). * $P < 0.05$ compared to the control group.

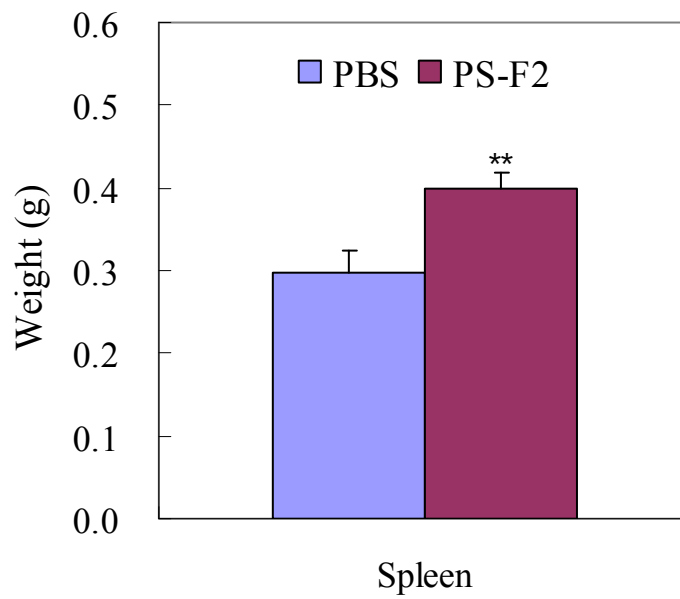
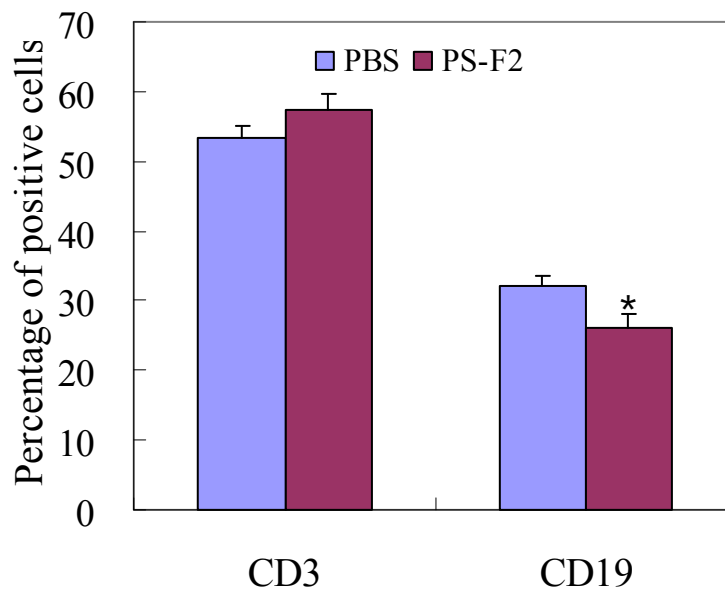


圖 3-15. PS-F2 對接種 B16 小鼠脾臟重量之影響

Figure 3-15. Effect of PS-F2 on spleen weights in B16 tumor-bearing mice.

Data are the means $\pm$ SE (n=10).

(A)



(B)

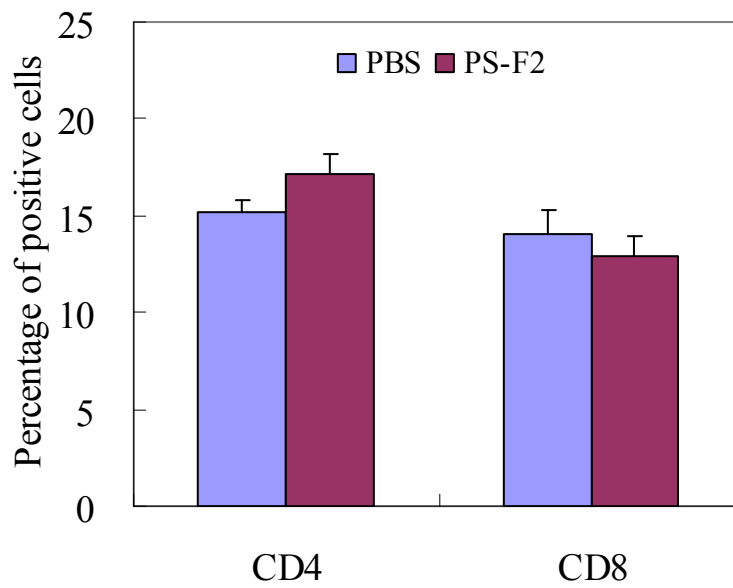
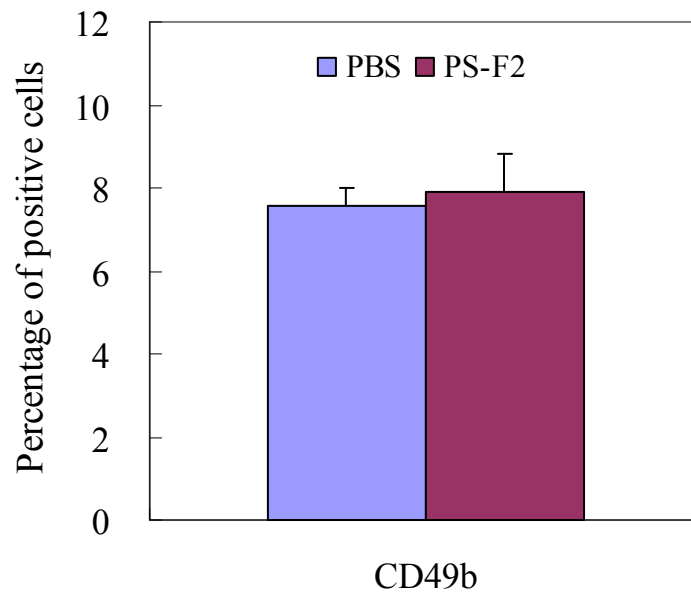


圖 3-16. PS-F2 對接種 B16 小鼠脾臟細胞族群比例之影響

Figure 3-16. Effect of PS-F2 on the populations of T and B cells (A) and CD4 and CD8 T cells (B) in splenocytes of B16 melanoma-bearing mice.

The data are the means $\pm$ SE for each group (n = 10). * $P < 0.05$ compared to the PBS group.

(A)



(B)

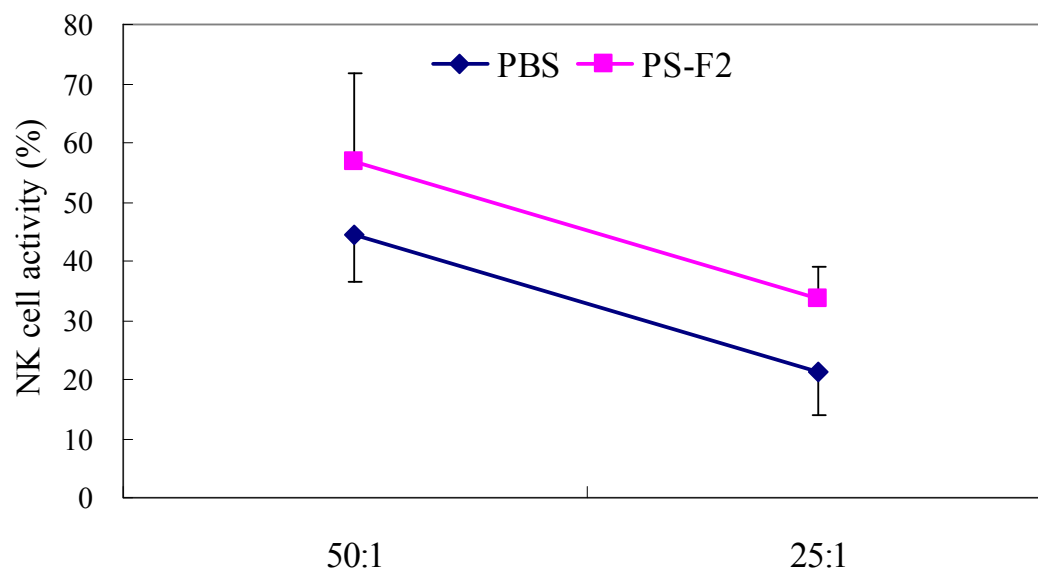


圖 3-17. PS-F2 對接種 B16 小鼠脾臟 NK 細胞之影響

Figure 3-17. Effect of PS-F2 on the CD49b population (A) and NK cells activities (B) in B16 tumor-bearing mice.

Cytotoxicity of NK cells were assessed by measuring the lysis of the target YAC-1 cells mediated by splenocytes from tumor implanted mice. Data are the means $\pm$ SE (n=10).

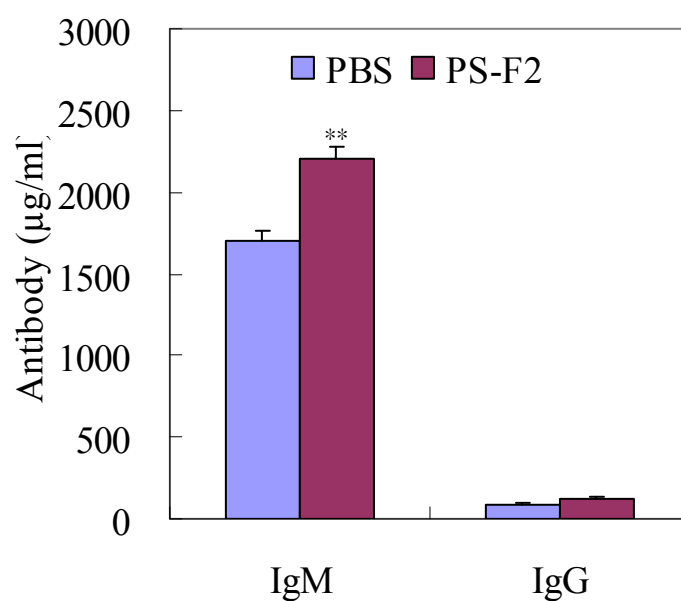


圖 3-18. PS-F2 對接種 B16 小鼠血清抗體濃度之影響

Figure 3-18. Effect of PS-F2 on serum IgM and IgG in B16 tumor-bearing mice.

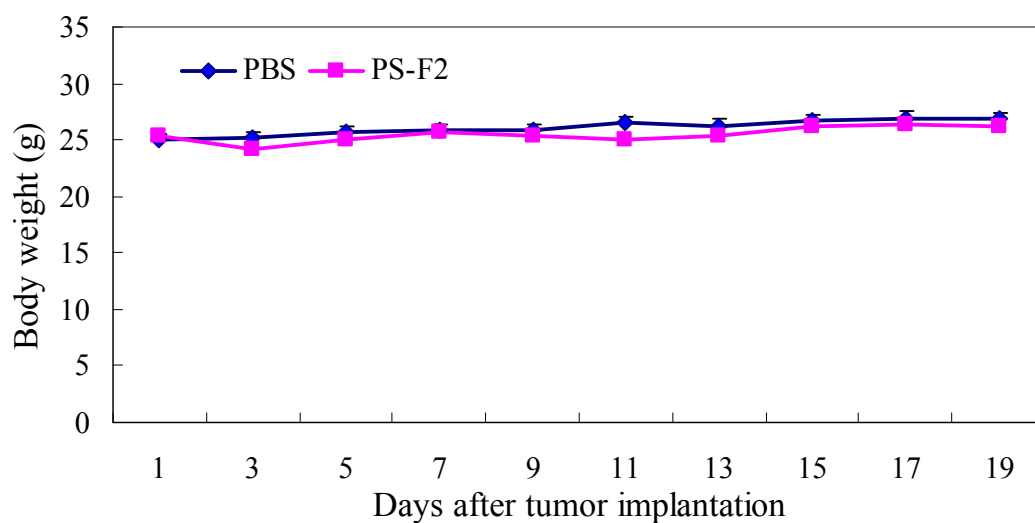
The antibody levels were determined by ELISA. Data are the means $\pm$ SE (n=10).

** $P < 0.01$ compared to the PBS group.

BALB/c 小鼠接種 C26 腫瘤細胞 24 小時後，進行第一次腹腔注射 PS-F2 (50 mg/kg)，每兩天進行腹腔注射 PS-F2 一次，試驗期間紀錄體重變化及測量腫瘤生長。於試驗 3 週後犧牲動物，採血分析血清抗體含量，取脾臟及腫瘤組織秤重，並分析脾臟其 T 細胞及 B 細胞族群比例之變化。結果顯示以腹腔注射 PS-F2 對於體重變化無顯著影響 (圖 3-19A)；在接種 B16 腫瘤細胞後第十三天，腹腔注射 PS-F2 對 C26 腫瘤生長已有顯著抑制之效果 (圖 3-19B)，而於第二十四天犧牲小鼠，以腫瘤重量計算抑制率，在兩次個別的 C26 腫瘤試驗中，給予小鼠 PS-F2 抑制 C26 生長達 43.3 % ($P = 0.034$) 和 53.2 % ($P = 0.049$) (圖 3-20A)，PS-F2 對 C26 腫瘤細胞也具有良好之抑制效果。

觀察犧牲後小鼠脾臟，給予小鼠 PS-F2 的脾臟重量也顯著變大 (圖 3-21)。分析脾臟細胞族群比例之變化，CD3 細胞比例從 $15.13 \pm 1.30\%$ 增加至 $19.27 \pm 1.74\%$ (naïve 小鼠 $21.79 \pm 1.40\%$)，CD19 細胞比例從 $21.82 \pm 1.26\%$ 增加至 $28.71 \pm 0.02\%$ (naïve 小鼠 $41.42 \pm 1.20\%$)，結果顯示腹腔注射 PS-F2 使 T 細胞和 B 細胞族群比例均有增加 (圖 3-22A)。CD4 細胞比例從 $11.27 \pm 0.66\%$ 增加至 $13.55 \pm 0.10\%$ (naïve 小鼠 $15.72 \pm 0.40\%$)，CD8 細胞比例從 $4.51 \pm 0.28\%$ 增加至 $4.95 \pm 0.46\%$ (naïve 小鼠 $5.71 \pm 0.26\%$)，T 細胞中的 CD4 和 CD8 T 細胞比例也同時都有增加之情形 (圖 3-22B)。對 NK 細胞毒殺活性影響上，腹腔注射 PS-F2 跟給予 PBS 的控制組沒有明顯的增減，只與沒有接種 C26 腫瘤的 naïve 小鼠比有較高的毒殺活性 (圖 3-23)。為了觀察給予 PS-F2 試驗期間小鼠血清中抗體的變化情形，本次試驗另在第十二天以眼窩採血分析血清中抗體濃度。在第十二天時，給予 PS-F2 的小鼠血清 IgM 濃度已高於 PBS 控制組和 naïve 小鼠；在第二十四天時，

(A)



(B)

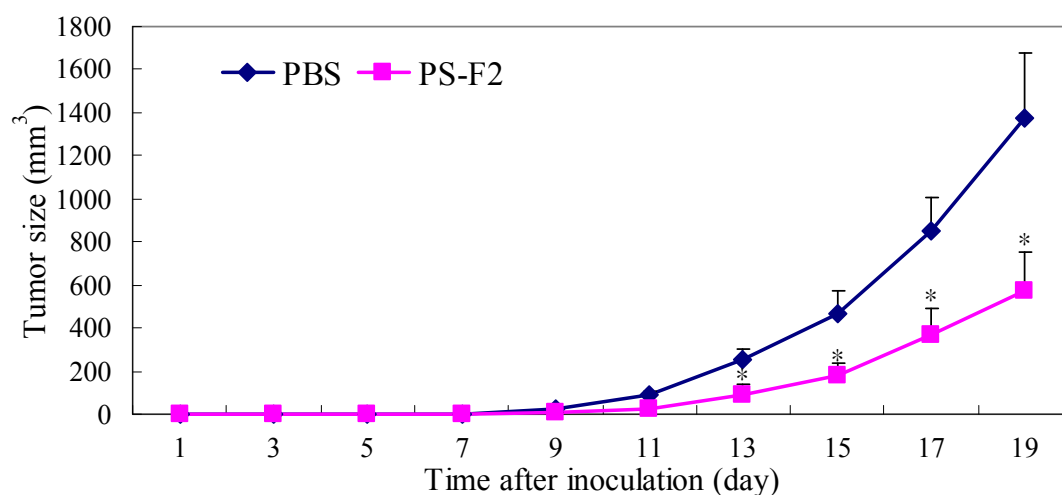
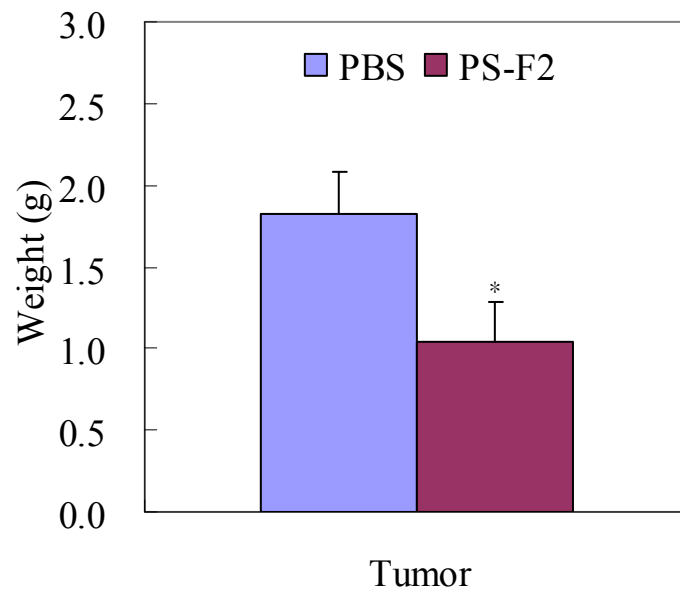


圖 3-19. PS-F2 對 C26 抗腫瘤之效果

Figure 3-19. Antitumor effect of PS-F2 in C26 tumor-bearing mice. The body weight (A) and tumor size (B) were monitored.

C26 (1×10^5 cells) was subcutaneously implanted into BALB/c mice. PS-F2 (50mg/kg) was i.p. administered to mice for 3 weeks starting from 24 h before inoculation. Control mice were treated with equal amounts of PBS alone on the same schedule. Data are the means $\pm$ SE (n=10). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to the PBS group.

(A)



(B)



圖 3-20. PS-F2 對 C26 腫瘤生長之影響

Figure 3-20. Anti-tumor effects of PS-F2 in C26 tumor-bearing mice. The change of tumor weight (A) was determined on day24. (B) is tumor picture after cut off.

C26 (1×10^5 cells) was subcutaneously implanted into BALB/c mice. PS-F2 (50mg/kg) was i.p. administered to mice for 3 weeks starting from 24 h before inoculation. Control mice were treated with equal amounts of PBS alone on the same schedule. Data are the means $\pm$ SE (n=10). * $P < 0.05$ compared to the control group.

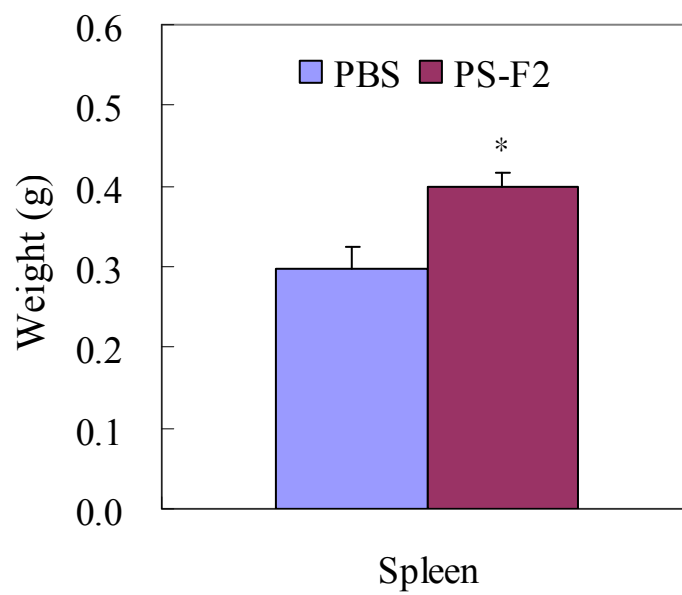
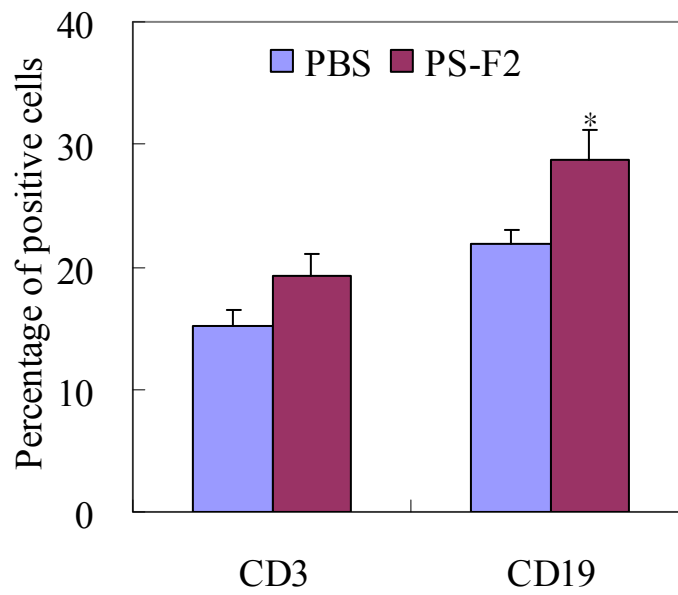


圖 3-21. PS-F2 對接種 C26 小鼠脾臟重量之影響

Figure 3-21. Effect of PS-F2 on spleen weights in C26 tumor-bearing mice.

Data are the means $\pm$ SE (n=10). * P <0.05 compared to the control group.

(A)



(B)

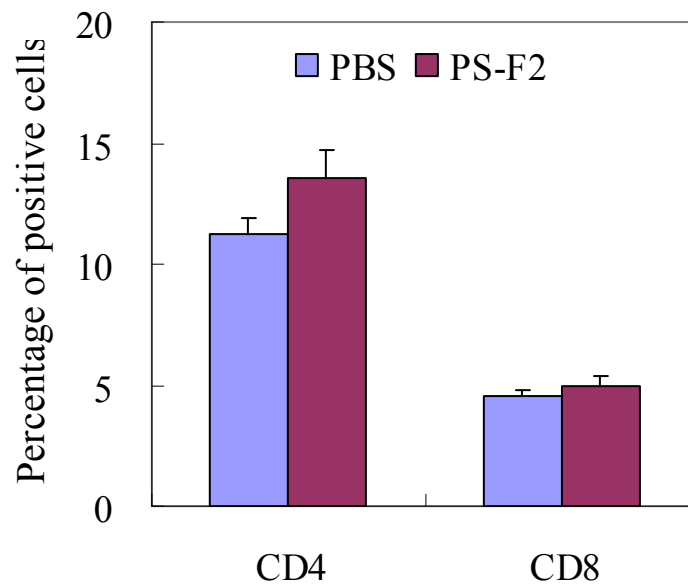


圖 3-22. PS-F2 對接種 C26 小鼠脾臟細胞族群比例之影響

Figure 3-22. Effect of PS-F2 on the populations of T and B cells (A) and CD4 and CD8 T cells (B) in splenocytes of C26-bearing mice.

The data are the means $\pm$ SE for each group (n = 10).

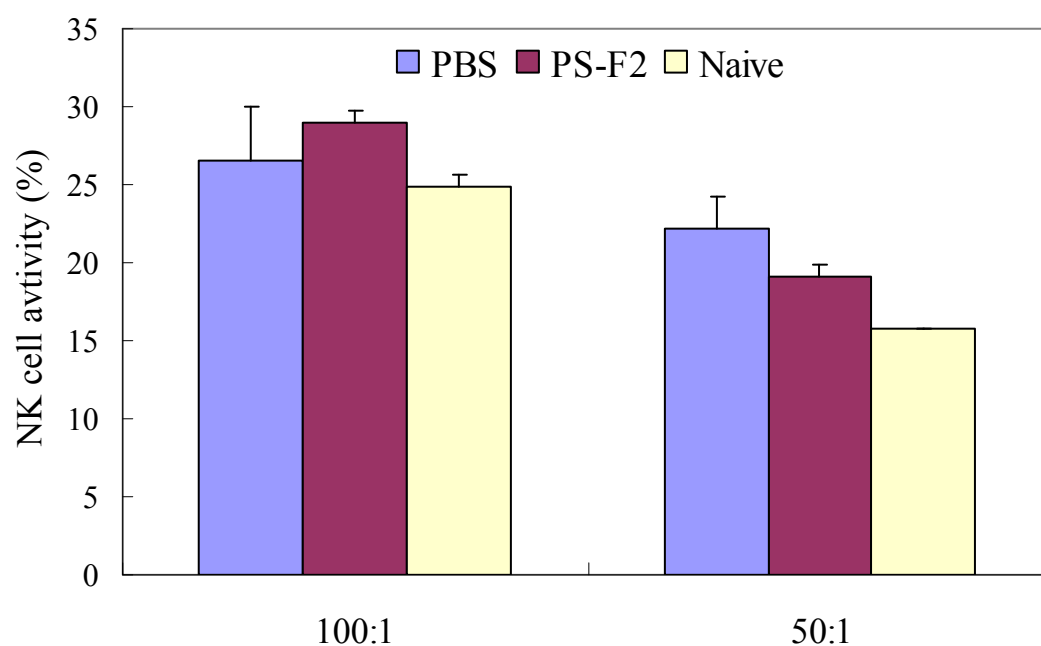


圖 3-23. PS-F2 對接種 C26 小鼠脾臟 NK 細胞毒殺活性之影響

Figure 3-23. Effect of PS-F2 on NK cells activities in C26 tumor-bearing mice.

Cytotoxicity of NK cells were assessed by measuring the lysis of the target YAC-1 cells mediated by splenocytes. Data are the means $\pm$ SE (n = 10).

給予 PS-F2 的小鼠血清 IgM 濃度則顯著高於 PBS 控制組和 naïve 小鼠，其中 PBS 組比 naïve 小鼠低(圖 3-24)。

綜合三種不同的腫瘤模式的結果均顯示 PS-F2 之抗腫瘤活性可能是透過增加脾臟 T 細胞的比例，活化對腫瘤抗原具專一性之 CD4 與 CD8 T 細胞，藉由 CD8 T 細胞達到毒殺腫瘤細胞之效果，而 CD4 T 細胞的活化能進一步刺激 B 細胞活化產生針對腫瘤抗原之抗體，在血清中的 IgM 抗體濃度同時也檢測到顯著性增加，符合假設。這中間的抗腫瘤機制含括了細胞介導免疫反應和體液免疫。

5. PS-F2 促進 T 細胞活化

從三種腫瘤模式腹腔注射 PS-F2 結果可知，PS-F2 能使脾臟細胞中的 T 細胞比例顯著增加，其中的 CD4 也是顯著增加，而 CD8 只有些微增加，推測 PS-F2 的抗腫瘤效果是透過 T 細胞的活化，參與抗腫瘤的作用。為了確認 T 細胞是否活化，以 C26 腫瘤模式中進一步檢測 T 細胞活化標誌 CD44 和 CD62L 的表現情形，另外也探討 Treg 細胞是否有參與抗腫瘤的反應。

T 細胞的活化時，已知 T 細胞表面活化標誌 CD44 的表現會增加，CD62L 的表現會減少(Hanson *et al.*, 2009)。naïve 組小鼠 (n=2) 是沒有接種 C26 腫瘤的小鼠。在 C26 移植小鼠發現，給予 PS-F2 之腫瘤小鼠的脾臟細胞，不同組 (PBS 和 PS-F2) 的 $CD4^+CD44^{High}$ 及 $CD8^+CD44^{High}$ 細胞比例沒有很大變化(圖 3-25A)，但是 $CD4^+CD44^{High}$ 平均螢光強度 (MFI，圖 3-25B) 有顯著性增加，顯示 PS-F2 處理過的小鼠 CD4 T 細胞已被活化。

另一個 T 細胞的活化標誌 CD62L，也可以發現腫瘤小鼠脾臟細胞的 CD62L 細胞比例沒有變化 (圖 3-26A)，但在 $CD4^+CD62L^{High}$ 細胞的平均螢光強度 (圖

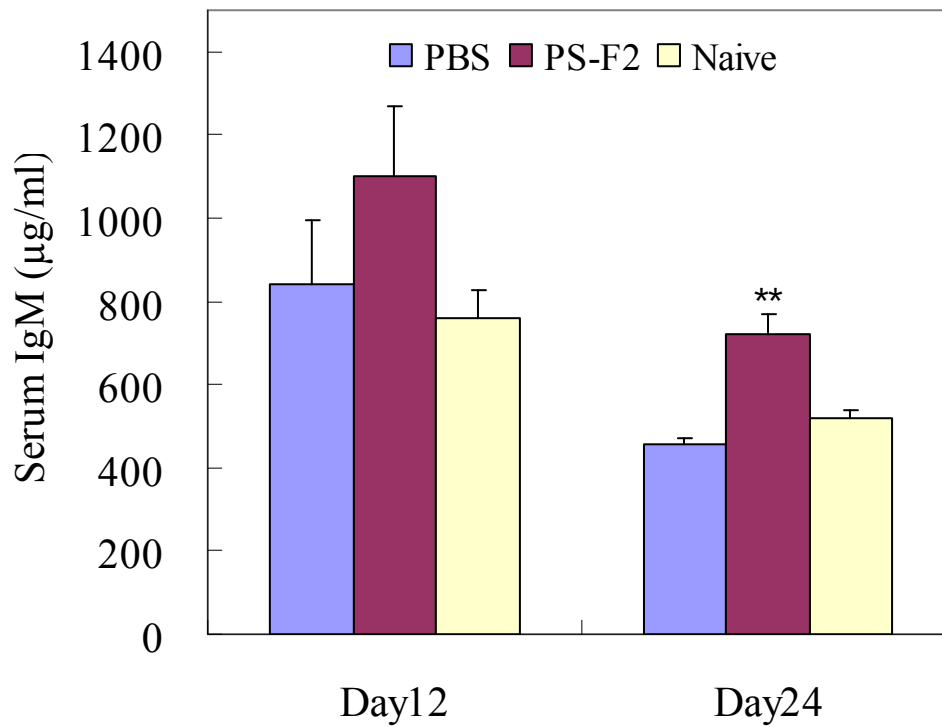


圖 3-24. PS-F2 對接種 C26 小鼠血清 IgM 濃度之影響

Figure 3-24. Effect of PS-F2 on serum IgM level in C26 tumor-bearing mice.

Data are the means $\pm$ SE (n = 10). ** $P < 0.01$ compared to the PBS group.

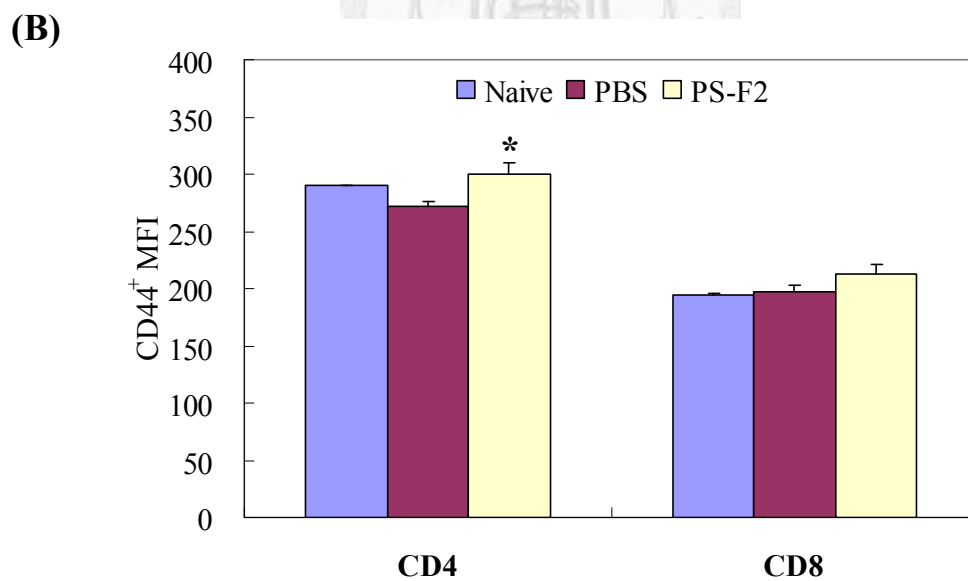
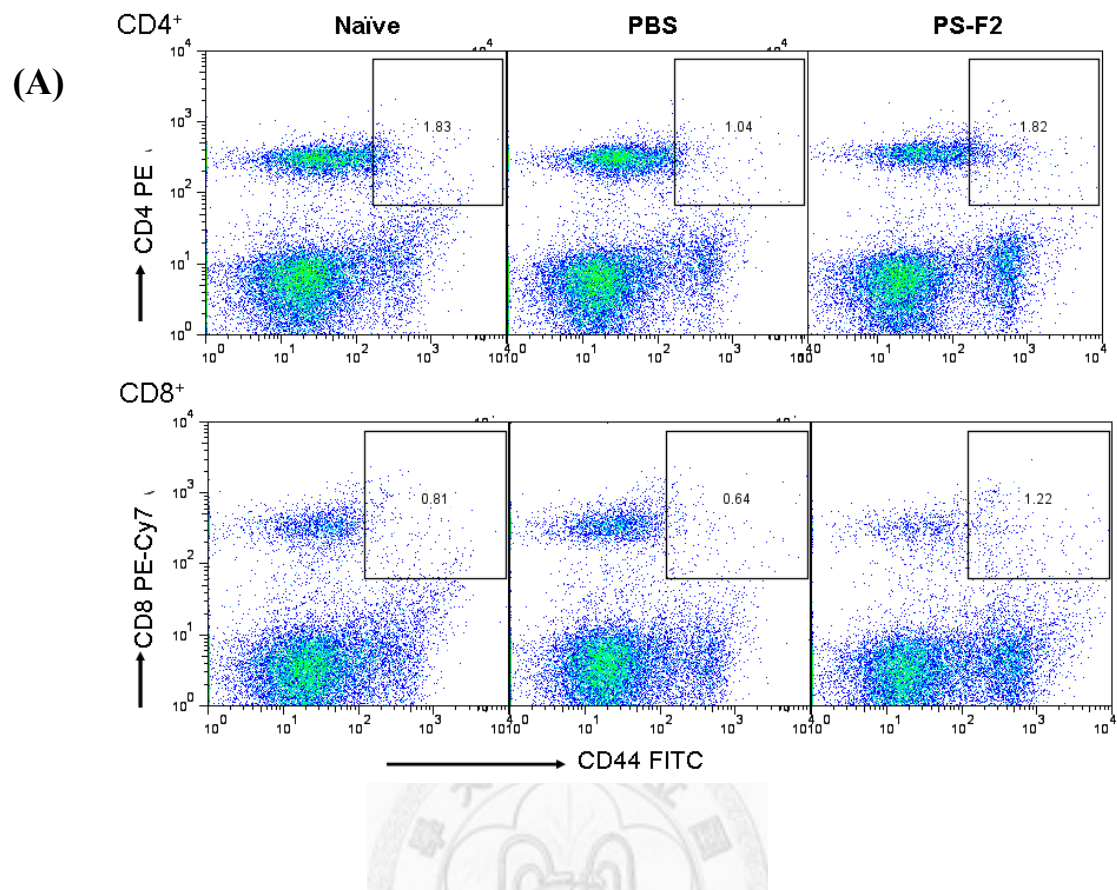


圖 3-25. 接種 C26 小鼠 T 細胞 CD44 的表現情形

Figure 3-25. Effect of PS-F2 on CD44^{High} expression in C26 tumor-bearing mice. Expression profiles of CD44 activation marker (A) and MFI of CD44^{High} (B) in C26 tumor-bearing mice.

Data are the means $\pm$ SE (n = 10). * P <0.05 compared to the PBS group..

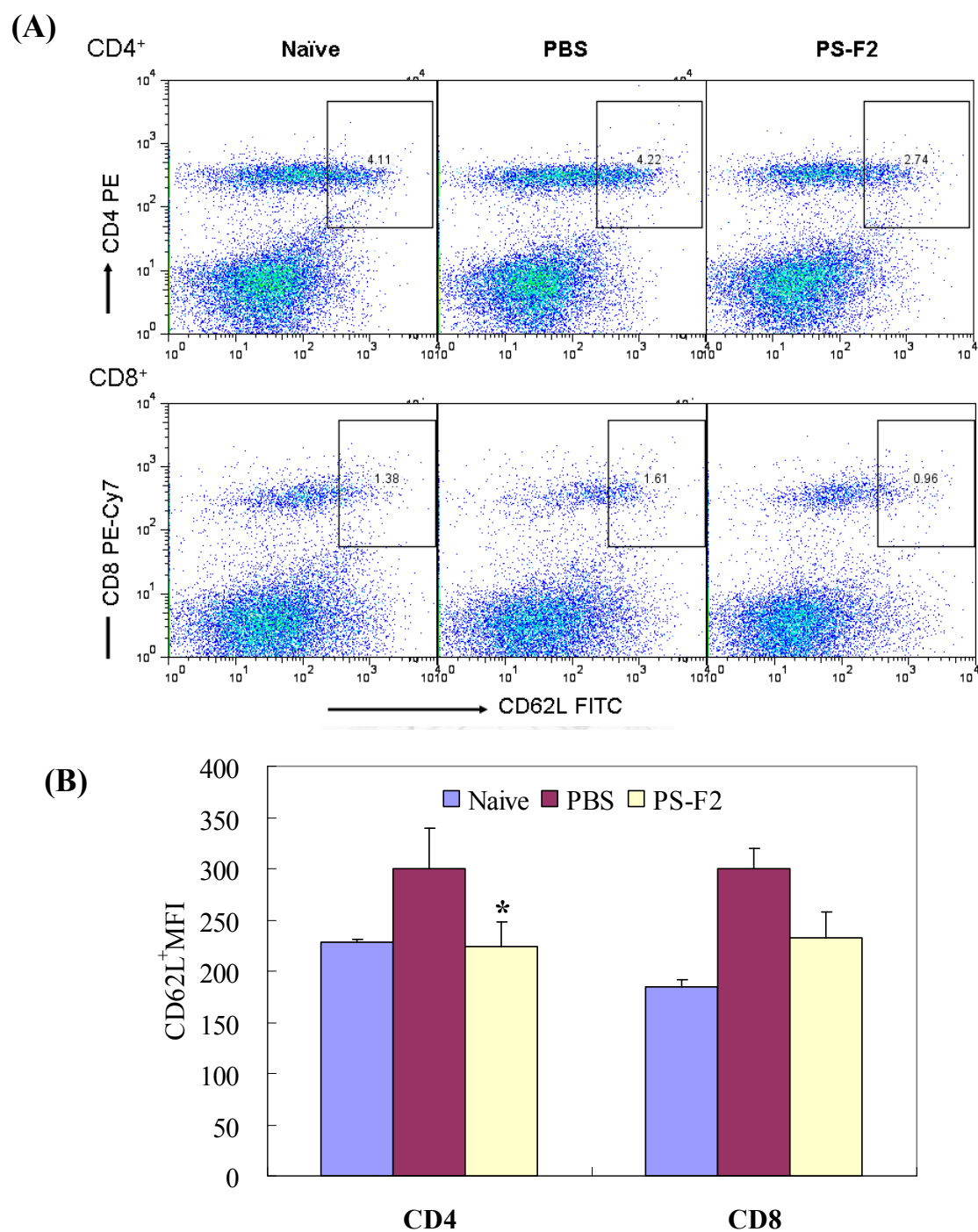


圖 3-26. 接種 C26 小鼠 T 細胞 CD62L 的表現情形

Figure 3-26. Effect of PS-F2 on CD62L^{High} expression in C26 tumor-bearing mice. Expression profiles of CD62L activation marker (A) and MFI of CD62L^{High} (B) in C26 tumor-bearing mice.

Data are the means $\pm$ SE (n = 10). * P <0.05 compared to the PBS group.

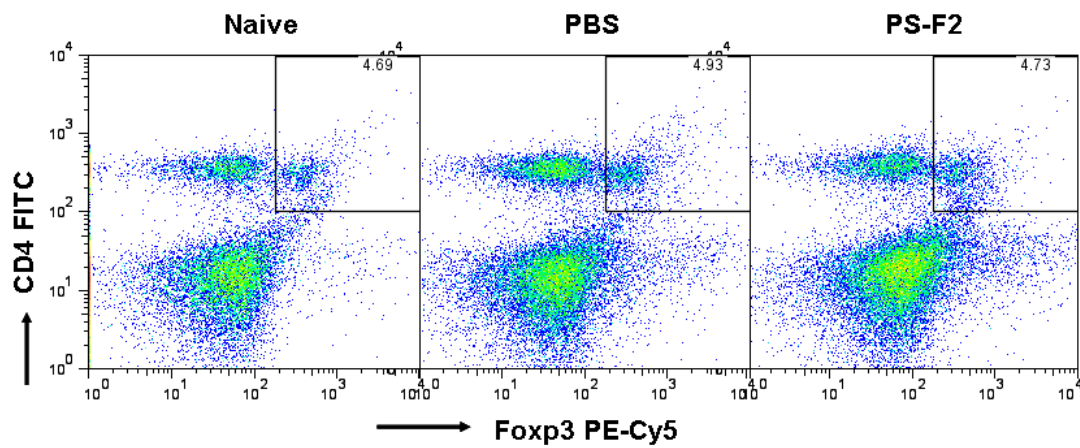
3-26B) 有顯著性增加，再次確認 CD4 細胞有被活化。在 CD8 細胞部份，雖然 PS-F2 處理的小鼠 CD44 和 CD62L 也都有活化的情形，但是都沒有達到顯著性差異，推測 PS-F2 對 CD4 T 細胞的刺激活化效果比 CD8 T 細胞好。

Treg 細胞是一群會抑制免疫反應的 T 細胞亞群，從圖 3-27 顯示 naïve 或腫瘤移植小鼠的所佔比例沒有變化，推測 PS-F2 的抗腫瘤活性與抑制免疫反應的 Treg 細胞沒有相關。

為了進一步確認 PS-F2 透過活化小鼠免疫系統抑制腫瘤生長，分別以 CD4、CD8、CD49b 及小鼠血清進行 adoptive transfer 確認是哪些免疫細胞扮演重要的角色。先將接種腫瘤的小鼠腹腔注射 PS-F2，假設 PS-F2 能提升免疫細胞對腫瘤抗原的呈現，將 PS-F2 處理 6 天和 12 天的免疫細胞靜脈注射到小鼠，觀察 adoptive transfer 不同免疫細胞對腫瘤生長的影響。在第 0 天 adoptive transfer 免疫細胞，每兩天量測腫瘤大小持續三週。圖 3-28 是 B16 腫瘤細胞的生長情形，PS-F2 處理 6 天的免疫細胞與未注射任何免疫細胞的控制組比較（圖 3-28A），靜脈注射 CD4 和 CD8 在實驗前期（5-9 天）有顯著的抑制效果；到了後期，注射 CD8 小鼠上的腫瘤漸漸沒有受到抑制而與控制組接近，而注射 CD4 小鼠持續有抑制腫瘤生長的效果（ $P=0.016$ ），另外在注射血清的小鼠也發現具有抑制腫瘤效果（ $P=0.031$ ），顯示 CD4 和血清中的抗體對小鼠抑制腫瘤生長扮演很重要的角色。

PS-F2 處理 12 天的免疫細胞與未注射任何免疫細胞的控制組比較時（圖 3-28B），靜脈注射 CD4 細胞、NK 細胞和血清的小鼠也發現抑制腫瘤效果，顯示 CD4 和血清中的抗體對小鼠抑制腫瘤生長扮演很重要的角色，與處理 6 天的免疫結果（圖 3-28A）相符。此外，長時間 PS-F2 的免疫對小鼠也許有不同的效果，NK 細胞的注射也發現具有抗腫瘤效果（圖 3-28B）。

(A)



(B)

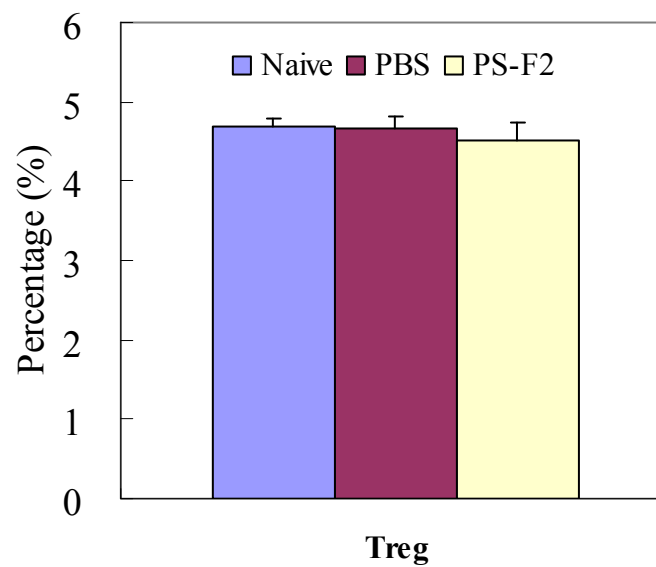
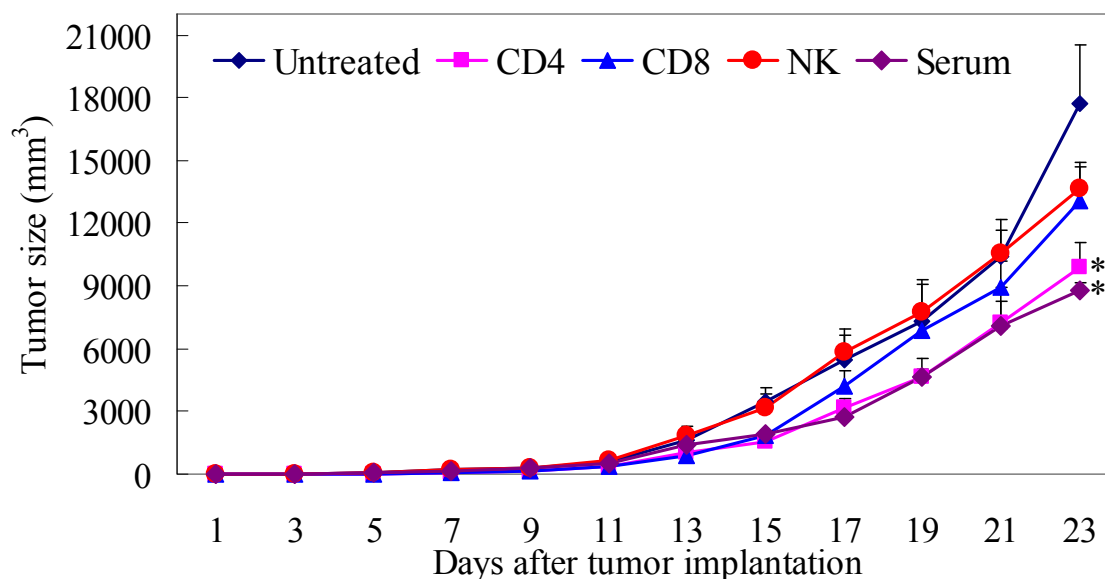


圖 3-27. PS-F2 對接種 C26 小鼠 Treg 細胞比例之影響

Figure 3-27. Effect of PS-F2 on Treg subset in C26 tumor-bearing mice. Expression profiles of Treg (CD4⁺/Foxp3⁺) subset (A) and Treg levels on T cells (B) in C26 tumor-bearing mice.

Data are the means $\pm$ SE (n = 10). * P <0.05 compared to the PBS group.

(A)



(B)

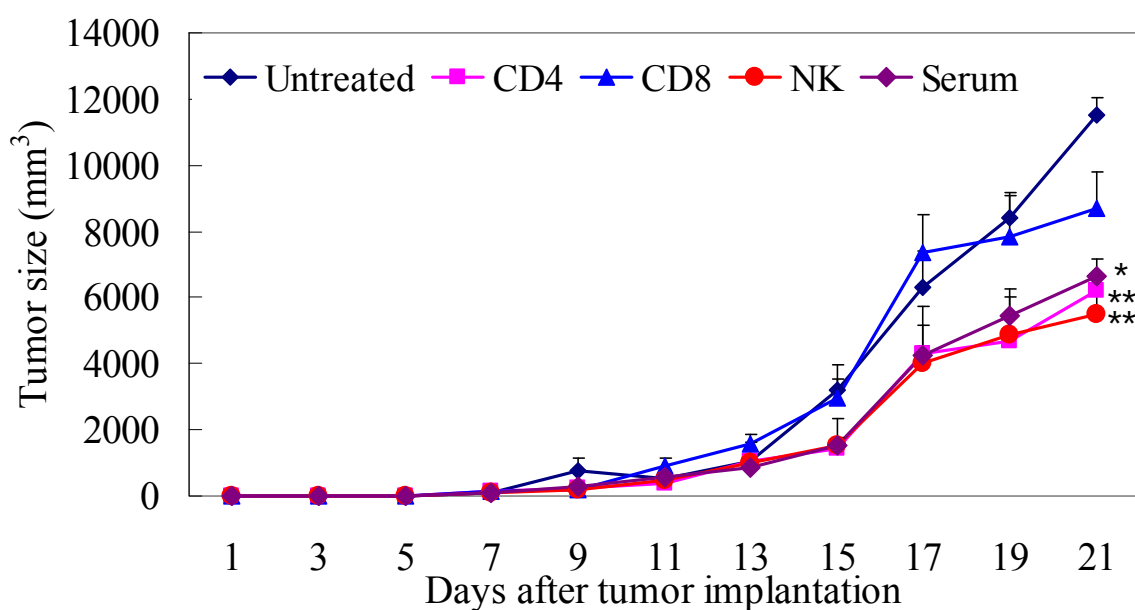


圖 3-28. Adoptive transfer 免疫細胞對 B16 腫瘤生長之影響

Figure 3-28. Effect on B16 tumor growth with adoptive transfer immune cells from PS-F2-treated mice.

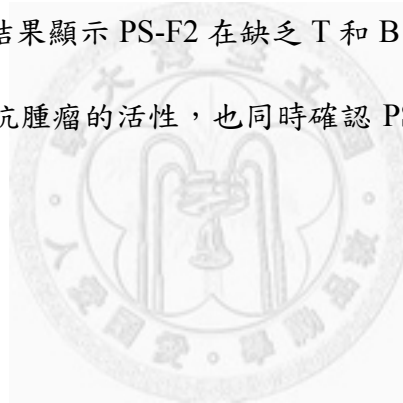
Mice were injected i.p. with 50 mg/kg PS-F2 once every two days and sacrificed on day 6 (A) and 12 (B). On day 0, B16 cells (1×10^6) were injected s.c. onto the right flank of naive C57BL/6 mice. One day later, mice received CD4, CD8, CD49b cells and serum from spleen. Mice that received tumor challenge but without any cell transfer served as control group. Tumor growth pattern in mice with or without adoptive transfer is shown. Data are the means $\pm$ SE ($n = 3-5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the control group.

觀察 adoptive transfer 免疫細胞對接種腫瘤小鼠存活率的影響時，CD8 細胞和 NK 細胞組與控制組的存活率差不多，而 adoptive transfer CD4 和血清的處理都有延長小鼠存活的效果（圖 3-29）。

6. SCID mice 之抗腫瘤模式

為了確認 T 細胞在 PS-F2 抗腫瘤活性所扮演的功能，以嚴重缺乏 T 和 B 淋巴細胞的自發性免疫缺陷 SCID mice 模式進行探討，接種 B16 腫瘤細胞的免疫缺陷 SCID mice 在給予 PS-F2 時，PS-F2 的抗腫瘤效果是否有受到影響。

皮下注射 B16 腫瘤細胞的 SCID mice，每兩天腹腔注射 PS-F2 一次，同時紀錄腫瘤變化（圖 3-30）。結果顯示 PS-F2 在缺乏 T 和 B 淋巴細胞的自發性免疫缺陷 SCID mice 便失去了抗腫瘤的活性，也同時確認 PS-F2 抗腫瘤的活性需要 T 和 B 淋巴細胞的作用。



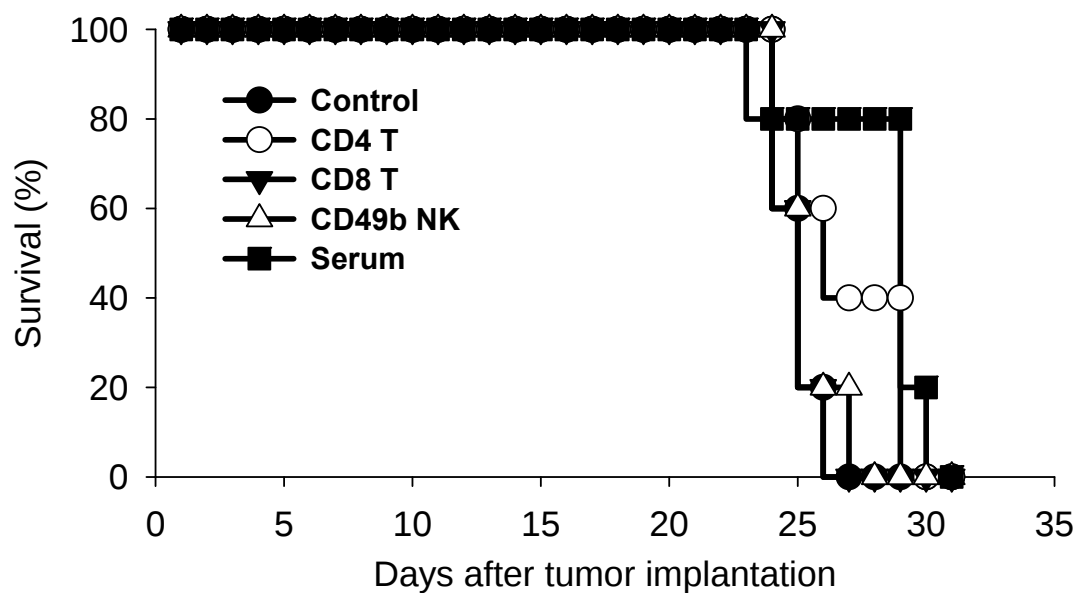


圖 3-29. Adoptive transfer 免疫細胞對小鼠存活率之影響

Figure 3-29. Effect on mice survival rate with adoptive transfer immune cells from PS-F2-treated mice.

Mice were injected i.p. with 50 mg/kg PS-F2 once every two days and sacrificed on day 6. On day 0, B16 cells (1×10^6) were injected s.c. onto the right flank of naive C57BL/6 mice. One day later, mice received CD4, CD8, CD49b cells from spleen and serum antibodies by i.v. Mice that received tumor challenge but without any cell transfer served as control group.

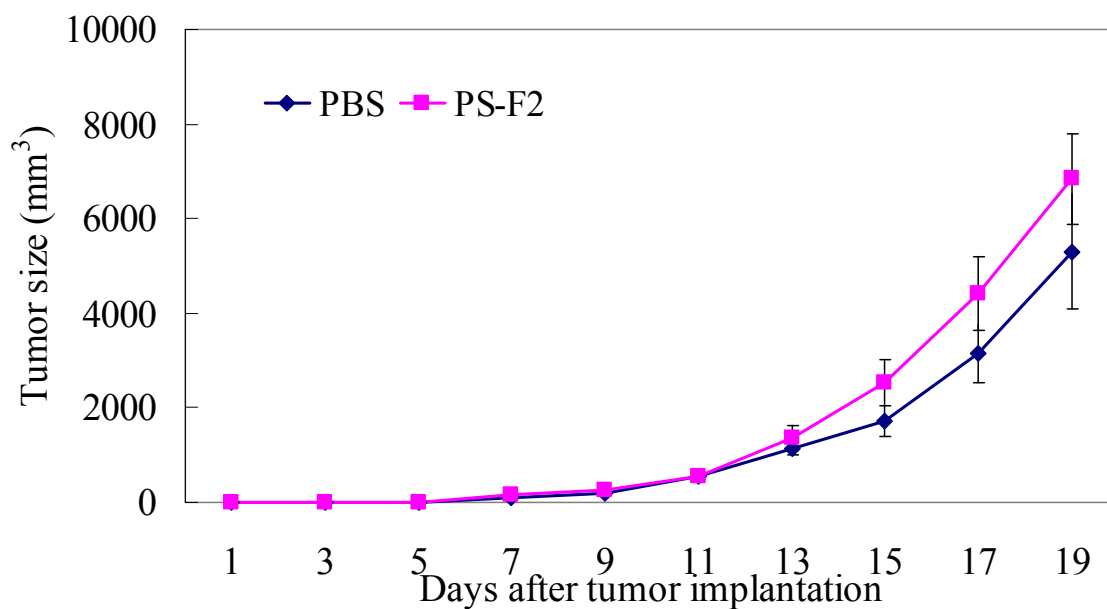


圖 3-30. PS-F2 在 SCID 小鼠抗腫瘤之效果

Figure 3-30. Antitumor effect of PS-F2 in B16 tumor xenografted SCID mice.

B16 (5×10^5 cells) was subcutaneously implanted into SCID mice. PS-F2 (50mg/kg) was i.p. administered to mice for 3 weeks starting from 24 h before inoculation. Control mice were treated with equal amounts of PBS alone on the same schedule. Data are the means $\pm$ SE (n=5). $P=0.322$ compared to the PBS group.

四、討論

癌症一直是台灣近年來國人死亡原因的第一名，也是世界各國死亡的主要原因，儘管各項新穎治療方式與特殊藥物的發展，治療與診斷新方法的開發也抵擋不住癌症的高罹患率及死亡率，對於罹癌後期患者，大多治療的效果僅止於延長生命，最終還是死於癌細胞的轉移惡化及相關併發症。然而，人類在與癌症對抗的過程中，同時也累積了相當豐碩的研究成果與臨床經驗，只要是早期發現，約有九成患者可以治癒。目前研究的重點除了後期的治療外，發現罹癌後的處理、手術後預防癌細胞的復發或轉移及提升患者的免疫功能都是重要的研究課題，而更多研究人員致力於癌症早期診斷新方法的研究。

由於使用抗癌藥物及治療過程往往對免疫系統也會造成相當程度的損害，而生物反應修飾劑的運用可提高患者的免疫力，增強治療腫瘤的效果，因此本研究主要探討台灣紫芝多醣體 PS-F2 的抗腫瘤活性，並解析 PS-F2 抗腫瘤的作用機制，期許台灣紫芝多醣體 PS-F2 在腫瘤治療上能有效應用。本研究主要採用移植性腫瘤動物模式，此模式同時接種等量的腫瘤細胞於小鼠上，生長速率一致，個體差異影響小，易於客觀判斷效果，在腫瘤研究上是常應用的模式。實驗採用一種同種異體動物腫瘤模式（S180 腫瘤移植於 BALB/c 小鼠）及兩種同種動物腫瘤模式（B16 腫瘤移植於 C57BL/6 小鼠和 C26 腫瘤移植於 BALB/c 小鼠）中，給予 PS-F2 都發現可以有效抑制移植腫瘤的生長。

在移植腫瘤的小鼠體重變化上，三種腫瘤模式腹腔注射 PS-F2 處理的小鼠體重都與 PBS 處理控制組相同，沒有差異（圖 3-7A、3-13A 和 3-19A），顯示 PS-F2

並不會對小鼠造成不良的副作用。另以管餵方式給予 S180 腫瘤小鼠 PS-F2 也發現一樣有抑制 S180 腫瘤生長之效果(圖 3-7C)，抑制率分別為 38.9 % (n=4) 和 81.1 % (n=6)，顯示管餵或腹腔注射給予的方式，PS-F2 均能有效抑制腫瘤細胞之生長。但是以未純化的 cEPS 管餵腫瘤小鼠卻發現沒有抑制腫瘤生長的效果(圖 3-7C)，顯示 cEPS 中仍存在影響活性多醣體的抗腫瘤活性。而 PS-F2 處理的小鼠發現其脾臟變大，脾臟 T 細胞的比例增加，血清中 IgM 抗體增加，而 NK 細胞的比例和細胞毒殺活性有些微增加。從以上結果推測 PS-F2 的抗腫瘤活性是透過活化宿主免疫反應，增強細胞免疫介導反應和體液免疫反應，使移植腫瘤細胞生長受到抑制。

在三種移植腫瘤的動物模式中，PS-F2 處理的小鼠脾臟細胞 T 細胞比例均有明顯的增加，特別是 CD4 細胞有顯著的增加，而 CD8 細胞雖有增加但是未達顯著差異。過去對靈芝多醣體的研究發現：小鼠經放射線照射後，小鼠的淋巴細胞會有顯著減少，但靈芝處理具有緩和放射線照射所造成傷害的效果，甚至比雲芝素 (krestin) 的效果還好(Chen *et al.*, 1995)。以發酵培養生產的靈芝多醣體餵食小鼠也確認對淋巴球的增生及活化都有顯著的效用(賀, 2003)；餵食小鼠赤芝子實體 RR 在短時間可以活化脾臟巨噬細胞，長時間服用更可活化 T 細胞(Kohguchi *et al.*, 2004)；馬餵食靈芝也發現能增加 PBLs 中 CD5、CD4 和 CD8 細胞的比例，增加特異性抗體的產生(Lai *et al.*, 2004)。此外，PS-G 多醣體在體外試驗發現能活化巨噬細胞、CD4 細胞、NK 細胞和其他免疫細胞(Wang *et al.*, 1997)；以 PS-F2 刺激脾臟細胞，發現 T 細胞的體積會變大，顯示 PS-F2 會刺激活化某些 T 細胞(Zhuang, 2009)。在其他菇類來源的多醣體也發現脾臟的重量

(Zheng *et al.*, 2005)，活化 T 細胞(Chen *et al.*, 2008; Vetvicka *et al.*, 2008; Masuda *et al.*, 2009)。過去研究都顯示多醣體可以活化免疫細胞，而本研究中的體內模式無論是管餵 PS-F2 可以增加小鼠脾臟細胞的 T 細胞比例(圖 3-2A)，在移植腫瘤小鼠體內也會活化 T 細胞，使 T 細胞增加(圖 3-10A、3-16A 和 3-22A)，與體外的細胞模式結果一致 (Zhuang, 2009)。

以往對於腫瘤免疫比較注意的是 CD8 毒殺型 T 細胞反應，但是愈來愈多證據顯示 CD4 細胞在抗腫瘤免疫反應扮演相同重要的地位(Huang *et al.*, 1994; Pardoll and Topalian, 1998)。CD4 細胞在很多自體免疫疾病的發病過程扮演重要的角色，以免疫療法抗癌，有時候類似刻意去引發自體免疫疾病，導致某一器官或組織的破壞(Shiku, 2003; Muranski and Restifo, 2009)。有報告也已經指出 CD4 細胞對接種腫瘤的實驗動物，在沒有 CD8 細胞的參與就具有保護小鼠抑制腫瘤生長的效果(Muranski and Restifo, 2009)，而在沒有外加細胞激素及接種疫苗下，CD4 細胞比 CD8 細胞能更有效的抑制腫瘤(Perez-Diez *et al.*, 2007)。這在 adoptive transfer 的實驗也發現 CD4 細胞得確就能具有抗腫瘤效果(圖 3-28)。很多腫瘤細胞暴露在 IFN- γ 能促進 MHC II 的表現(Dutta *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007)。有些腫瘤不會表現 MHC II，但是經由抗原呈現細胞直接辨識腫瘤相關抗原也能被 CD4 細胞辨認或殺滅腫瘤細胞，接著再引發各種先天性免疫及後天性免疫反應(Mumberg *et al.*, 1999)。另外也有人提出 CD4 細胞也能直接毒殺腫瘤細胞(Heller *et al.*, 2006)；CD8 細胞沒有 CD4 細胞的協助無法有效清除抗原(Shedlock and Shen, 2003)，這些發現與 adoptive transfer 結果中 CD8 細胞沒有抗腫瘤效果，而 CD4 細胞卻有效抗腫瘤的結果相符(圖 3-28)。Harada 和 Ohno 發現 CD4 中和抗體處

理，能使 SCG 刺激 DBA/2 小鼠脾臟細胞產生 GM-CSF 和 IFN- γ 的活性降低，而以 CD8 中和抗體處理卻不影響，推測 CD4 細胞在刺激產生細胞激素扮演很重要的角色(Harada and Ohno, 2008)。Cheng 等人研究牛樟芝多醣體的功能時，也發現管餵多醣體 AC-PS 會增加脾臟 Th1 CD4 細胞和 B 細胞(Cheng *et al.*, 2008)，這結果與 PS-F2 免疫調節功能相同，也許 PS-F2 也像 AC-PS 能抑制血吸蟲的感染，將來也可以進一步確認 PS-F2 在降低感染方面的活性功能。

近年來也發現活化非專一性的 CD4 細胞可以作為化療前的 chemosensitizer，增強化療藥物的毒殺活性(Radfar *et al.*, 2009)。而靈芝多醣體單獨使用或結合細胞毒性或抗腫瘤藥物使用，可以有效延長腫瘤小鼠生命；配合多醣體使用，化療期間或化療後也發現能增加 CD4 和 T 細胞的數目(Chen *et al.*, 2004)。由本研究結果顯示 PS-F2 在三種腫瘤細胞模式中都能改變小鼠脾臟細胞中的亞群細胞的比例，尤其是提升 CD4 細胞的比例(圖 3-10B、3-16B 和 3-22B)，而分析 T 細胞的活化標誌也發現 CD4 和 CD8 細胞上的 CD44 和 CD62L 都有顯著活化的表現(圖 3-25 和圖 3-26)，顯示 CD4 的活化及細胞比例的增加可能在 PS-F2 抗腫瘤的活性上扮演重要的角色，進一步在 adoptive transfer 的實驗也證實 CD4 和血清中的抗體得確是抗腫瘤的關鍵免疫活性成分，確認 PS-F2 能透過活化腫瘤小鼠的免疫系統，使細胞免疫和體液免疫活化而抑制腫瘤的生長，延長小鼠的生命。

CD4 細胞在腫瘤抗原的刺激下能分化成不同功能的 Th1、Treg 和 Th17 亞群，Treg 是一群會抑制 Th1、CD8、樹突細胞和 Th17 抗腫瘤功能的細胞，這群細胞表現 CD4、CD25 和 Foxp3 特徵(Sugamura *et al.*, 2004; Knutson and Disis, 2005)。

在 C26 腫瘤細胞模式下曾分析脾臟細胞中 Treg 族群比例的變化情形(圖 3-27)，腹腔注射 PS-F2 並不會增減 Treg 的比例，顯示 PS-F2 活化 CD4 細胞而抑制腫瘤的生長並非透過抑制 Treg 的活化。

此外，除了 β -glucan 能誘發免疫調節反應，Carter 等人認為 Dectin-1 受體是免疫細胞的目標，透過 Dectin-1 能增強對特定抗原的抗體產生及 CD4 和 CD8 T 細胞的反應(Carter *et al.*, 2006)，而在第二章結果即顯示 PS-F2 能夠過 Dectin-1 體外刺激巨噬細胞產生細胞激素，誘發免疫調節反應，推測 PS-F2 在小鼠體內也能透過免疫細胞上的 Dectin-1，刺激抗體產生或是活化 T 細胞。

Cheng 等人管餵基因轉殖鼠牛樟芝多醣體的研究發現，脾臟中的 CD4 細胞有顯著增加，走向 Th1 反應(Cheng *et al.*, 2008)。為了確認 PS-F2 引起的是 Th1 或 Th2 的反應，血清除了測定抗體外，也分別測定血清中 IL-4 和 INF- γ 的濃度變化，但是結果並沒有一致性；腹腔注射 PS-F2 的腫瘤小鼠在 IL-4 和 INF- γ 的濃度與控制組沒有顯著性的差異，無法判斷 PS-F2 引起的是 Th1 或 Th2。也許是取樣時間點沒有抓到 Th1 或 Th2 反應最高的時間點。但在本實驗室分析 PS-F2 刺激樹突細胞培養液，發現 PS-F2 刺激樹突細胞產生 IL-12p40 和 TNF- α ，推測 PS-F2 的刺激還是偏向 Th1 反應。

CD8 是細胞毒殺型 T 細胞的膜上標誌之一，CD8 細胞除了對抗病毒感染和細胞內細菌的侵襲，也跟自體免疫疾病的致病有關。naïve CD8 經由抗原、樹突細胞或 CD4 細胞活化，CD8 能靠腫瘤細胞表面上的 MHC I 辨識腫瘤細胞，分泌 granzyme 和 perforin 毒殺腫瘤細胞(圖 1-4)。CD4 細胞在抗原呈現細胞呈現腫

瘤抗原時，CD4 細胞會增加細胞激素的產生，進而刺激 CD8 細胞作用，也會透過 OX40 使 T 細胞增生、移動，增加記憶 T 細胞的存活（圖 3-31）。在 S180 和 C26 腫瘤模式都可以發現脾臟中 CD8 細胞都有些微增加（圖 3-10 和 3-22），但是卻在 B16 腫瘤模式發現有些微減少（圖 3-16）；而在 CD8 的活化標誌表現上，PS-F2 能促進 CD8 活化表現，但是沒有達到顯著性差異。由於 CD8 是抗腫瘤很重要的免疫細胞之一，CD8 細胞沒有 CD4 細胞增加明顯，推測是小鼠移植腫瘤細胞是首次受到腫瘤抗原的刺激，會先由 CD4 細胞的協助才使 CD8 細胞活化，所以 CD4 細胞會顯著性增加，也因此 CD3 T 細胞增加的大多是 CD4 細胞，CD8 細胞只看到些微增加。反觀 B16 腫瘤小鼠卻看到 CD8 細胞呈現減少情形，推測是因為 B16 腫瘤細胞在 C57BL/6 小鼠的生長速度快速，嚴重威脅小鼠的生命，實驗三週後都有小鼠死亡之現象。在第三批的實驗中，PBS 組的存活老鼠分別為 80、80 和 60 %（n=5、10 和 10），平均為 73.3 %，而 PS-F2 組的存活老鼠分別為 100、80 和 80 %（n=5、10 和 10），平均為 86.7 %，顯示能延長小鼠的生命，此結果與 adoptive transfer 的結果也一致（圖 3-29）。在小鼠的生理接近死亡之不良狀態時，推測此時的免疫系統相關細胞表現可能不太正常，即使在 T 細胞的比例有增加，但都增加在 T 細胞中的 CD4 細胞，CD8 反而減少。有趣的是在 CD8 細胞的 adoptive transfer，此組小鼠一開始還有抗腫瘤的活性，但在在九天後就漸漸沒有抑制效果，最後甚至與控制組的腫瘤大小接近（圖 3-28A），顯示 CD8 細胞在抗腫瘤的有效性比 CD4 細胞還差，得確需要 CD4 細胞的協助才能有效持續抗腫瘤活性。

細胞免疫是以 T 細胞為主的免疫反應，當有腫瘤出現時，會使 T 細胞免疫

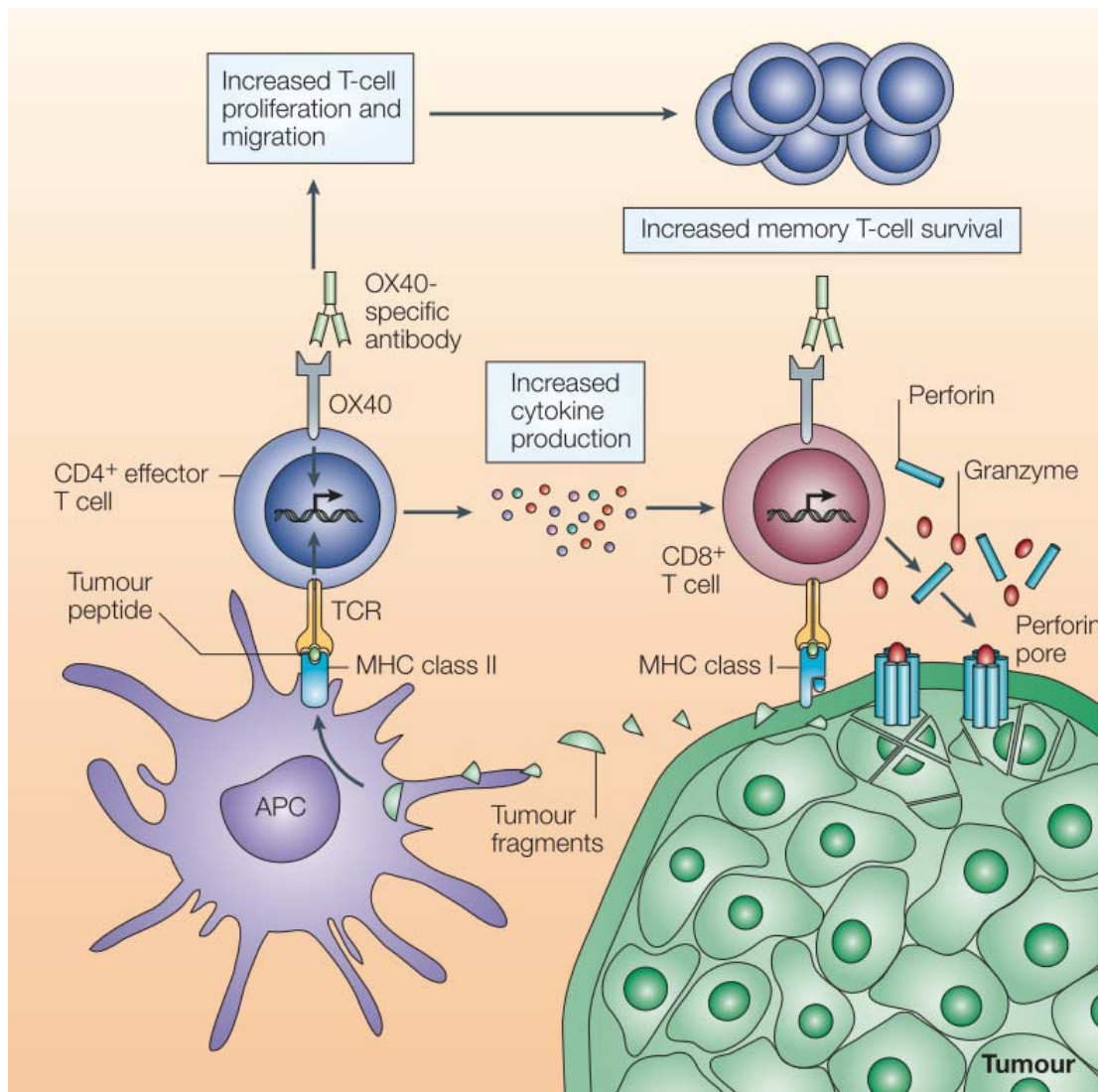


圖 3-31. 腫瘤碎片刺激 CD4 和 CD8 細胞之反應

Figure 3-31. Ligation of OX40 in tumour-bearing mice enhances antitumour immunity, leading to therapeutic effects (Sugamura *et al.*, 2004).

調控的功能紊亂失調，CD3 T 細胞和 CD4 細胞的比率會顯著下降，而 CD8 細胞的比率會有上升的情形，使 CD4/CD8 的值會下降，降低了生體淋巴細胞的轉化作用，進而使刺激 B 細胞產生抗體的輔助作用也減弱，T 細胞的狀態對於細胞免疫是有直接關聯及影響(Chen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010b)。CD4/CD8 比率是評估細胞免疫的主要指標之一，當我們觀察管餵 PS-F2 小鼠及三種腫瘤細胞模式之 CD4/CD8 值變化時（表 3-1），在各批次均可發現 PS-F2 處理後，T 細胞中的 CD4/CD8 值都有增加之現象，顯示 PS-F2 使 T 細胞走向輔助 B 細胞產生抗體的方向，促進包含 CD4 和 B 細胞的後天性免疫反應，這與在血清測到顯著性增加抗體的結果相符合。

Welt 等人曾提出利用抗體已成功偵測腫瘤細胞表面的抗原，並運用於檢驗罹癌及免疫治療(Welt *et al.*, 1994)。利用腫瘤細胞專一性的抗體，藉由抗體依賴性細胞擔任毒殺作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)或由調理作用和吞噬作用來殺滅腫瘤細胞(Carter, 2001; Marasco and Sui, 2007)。在 PS-F2 處理的腫瘤小鼠模式也發現了小鼠血清中 IgM 有顯著的增加，顯示 PS-F2 能刺激活化腫瘤小鼠的 CD4 細胞，接著產生細胞激素活化 B 細胞（圖 1-4）。多醣體增強細胞免疫反應功能也有研究者以 Con A 刺激，探討多醣體對淋巴細胞增生之影響 (Masuda *et al.*, 2009)及相關細胞激素的產生情形 (Nonaka *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Masuda *et al.*, 2009)。在赤芝多醣體 F3 的研究發現，F3 能刺激小鼠脾臟細胞增生並且產生細胞激素 (Wang *et al.*, 2002)；另外也能刺激人類臍帶血單核細胞，增加單核細胞、樹突細胞及 NK 細胞的比例，但是不影響 B 細胞數目(Chien *et al.*, 2004)；但在赤芝子實體純化的 GLIS 卻發現能

表 3-1. PS-F2 對小鼠 CD4/CD8 比率之影響

Table 3-1. Effect of PS-F2 on the ratio of CD4/CD8 subsets in PS-F2-treated-C57BL/6 mice and tumor-bearing mice.

Treatment group	Batch		CD4/CD8 ratio		P value
	No.	Mice number	PBS	PS-F2	
Oral administration	I	5	2.16±0.08	2.34±0.22	0.465
	II	5	1.95±0.09	2.12±0.05	0.095
S180 tumor	I	4	2.88±0.17	3.42±0.12*	0.019
	II	8	2.53±0.11	2.68±0.08	0.319
	III	10	2.95±0.13	3.49±0.15*	0.012
B16 tumor	I	4	1.35±0.16	1.54±0.07	0.079
	II	8	1.13±0.20	1.37±0.23	0.057
	III	6	1.02±0.05	1.64±0.10**	0.0007
C26 tumor	I	1	2.65	3.54	--
	II	10	2.63±0.06	2.65±0.09	0.897

Results are expressed as mean ± SE (n=5-10).

Significance was determined using the Student's *t*-test. *($p<0.05$) and **($p<0.01$) indicated a significant difference vs. PBS control.

刺激 B 細胞活化、增生和分化，表現細胞表面標誌 CD71 和 CD25，增加免疫球蛋白的分泌(Zhang *et al.*, 2002b)。本實驗室也曾利用 PS-F2 體外刺激小鼠脾臟純化的 B 淋巴細胞，發現 PS-F2 會刺激 B 淋巴細胞顯著性的增生並產生大量的 IgM，顯示 PS-F2 能刺激 B 細胞表面某些受體，使得 B 細胞活化並使 B 細胞增生(Zhuang, 2009)。而在本研究的 B 細胞比例雖然比 PBS 控制組低，這是因為脾臟細胞中主要由 T 細胞和 B 細胞所組成，由於 T 細胞顯著性增加，相對上 B 細胞的比例就會減少，但從血清中抗體 IgM 顯著增加，推測 PS-F2 顯著刺激 B 細胞活化產生大量抗體，即使 B 細胞的比例下降也不影響抗體大量的產生，在 adoptive transfer 小鼠血清抗體也發現能顯著性抑制腫瘤生長。因此 PS-F2 的抗腫瘤機制上，從以上結果也確認是透過後天性免疫反應的體液免疫參與，活化 B 細胞產生對抗腫瘤抗原的抗體，專一性的殺滅腫瘤細胞。

很多不同來源多醣體的報告都指出，在體內或體外的實驗中，多醣體的處理可以增加 NK 細胞的比例(Wang *et al.*, 1997; Chien *et al.*, 2003);但是在本研究中，當以 CD49b 去染脾臟細胞中的 NK 細胞，經 PS-F2 處理過的小鼠只有些微增加 CD49b 的比例，沒有達到顯著的差異。當以 YAC-1 細胞混合脾臟細胞共同培養進行毒殺能力試驗，經 PS-F2 處理過的細胞毒殺活性也只略高於控制組，與 CD49b 的細胞比例結果相符，兩者都沒有達到顯著差異，顯示 PS-F2 的抗腫瘤活性並非主要透過活化 NK 細胞，進而有效毒殺腫瘤細胞。

多醣體是真菌、酵母和細菌的細胞壁主要結構成分，也是飲食中很多穀類胚乳細胞壁的成分，很多研究成果已顯示多醣體能刺激免疫細胞，活化免疫系統，作為生物反應修飾劑。多醣體當作生物反應修飾劑，結合抗腫瘤單株抗體治療腫

瘤已經有幾十年的經驗，在小鼠同種腫瘤模式(Yan *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004)和人類腫瘤異種移植模式(xenograft models)(Cheung and Modak, 2002; Cheung *et al.*, 2002; Modak *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Salvador *et al.*, 2008; Radfar *et al.*, 2009)都具有良好的效果。多醣體抗腫瘤的作用機制認為是透過活化與增強宿主免疫反應，在沒有副作用的情況下抑制腫瘤的生長，抗腫瘤免疫作用是透過體液免疫和細胞介導免疫。體液免疫防禦是透過 B 細胞活化產生抗體，特異性的抗體直接與病原結合，中和其作用，或附著其上進行調理作用，使吞噬細胞更易於清除；而細胞免疫則由輔助型 CD4 細胞和毒殺型 CD8 細胞負責專一性的防禦工作。

生物反應器或醱酵槽生產的應用已是快速生產、降低成本、提高品質及產值的量產潮流，本研究以液態醱酵生產 PS-F2 確認具有免疫調節的活性，可開發機能性食品外，從本研究結果也都再再顯示 PS-F2 透過活化與增強宿主免疫反應，具有抗腫瘤活性，可以用於醫療保健用途上，因此 PS-F2 做為生物反應修飾劑之應用將可再深入探討。另外也有報告指出多醣體能抑制血管內皮細胞的生長(Cao and Lin, 2004; Cao and Lin, 2006)，推測也是多醣體抑制腫瘤生長的原因之一，將來也可以進一步確認 PS-F2 對抑制血管內皮細胞生長的功效。

第四章 結論

1. 本研究以台灣紫芝 (*Ganoderma formosanum*, ATCC 76538) 深層液態發酵培養生產胞外多醣體，探討台灣紫芝多醣體免疫調節之功能與機制。以五公升發酵槽培養七天，發酵液經酒精沉澱和 Sephrose CL-6B 膠體過濾層析純化可得 PS-F1、PS-F2 和 PS-F3 三個分劃，分別佔 $16.24 \pm 2.19\%$ 、 $55.81 \pm 2.97\%$ 和 $27.95 \pm 2.11\%$ 。
2. PS-F2 多醣體分子量約 14 KDa，單糖組成為 mannose、galactose、glucose 及 fucose，分別佔了 44.91%、38.64%、8.26% 及 8.02%，醣基鍵結主要以 6-Gal 和 t-Man 為主，PS-F2 的 β -1,3-glucan 含 $1.36 \pm 0.17\%$ 。
3. PS-F2 能夠刺激小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 產生 TNF- α 和 NO，增強巨噬細胞的吞噬能力，並刺激巨噬細胞增生。以 PS-F2 刺激小鼠腹腔能誘發發炎反應，吸引嗜中性球和單核球來到腹腔。另外 PS-F2 亦可刺激小鼠樹突細胞表面 CD40、CD80、CD86 及 MHC II 成熟標誌的表現增加。顯示 PS-F2 具有免疫調節之活性，能刺激活化先天性免疫反應。
4. PS-F2 刺激巨噬細胞產生 TNF- α 會被 anti-Dectin-1 抗體、anti-CR3 抗體和 Dectin-1 受體抑制劑 laminarin 顯著性抑制，TLR4 缺陷小鼠 BMDM 也降低了 PS-F2 的刺激。結果顯示 PS-F2 能經由 Dectin-1、CR3 及 TLR4 受體刺激免疫細胞 (圖 4-1)。
5. 在 PS-F2 活化巨噬細胞作用機制部分，PS-F2 能刺激絲裂原活化蛋白激酶 ERK、JNK 和 p38 之磷酸化、I- κ B 的降解與 NF- κ B 之核移位，添加 ERK、JNK、p38 或 NF- κ B 專一性抑制劑皆可抑制 PS-F2 刺激巨噬細胞產生 TNF- α ，確認 PS-F2 透過活化絲裂原活化蛋白激酶和 NF- κ B 訊息傳遞途徑產生 TNF- α (圖

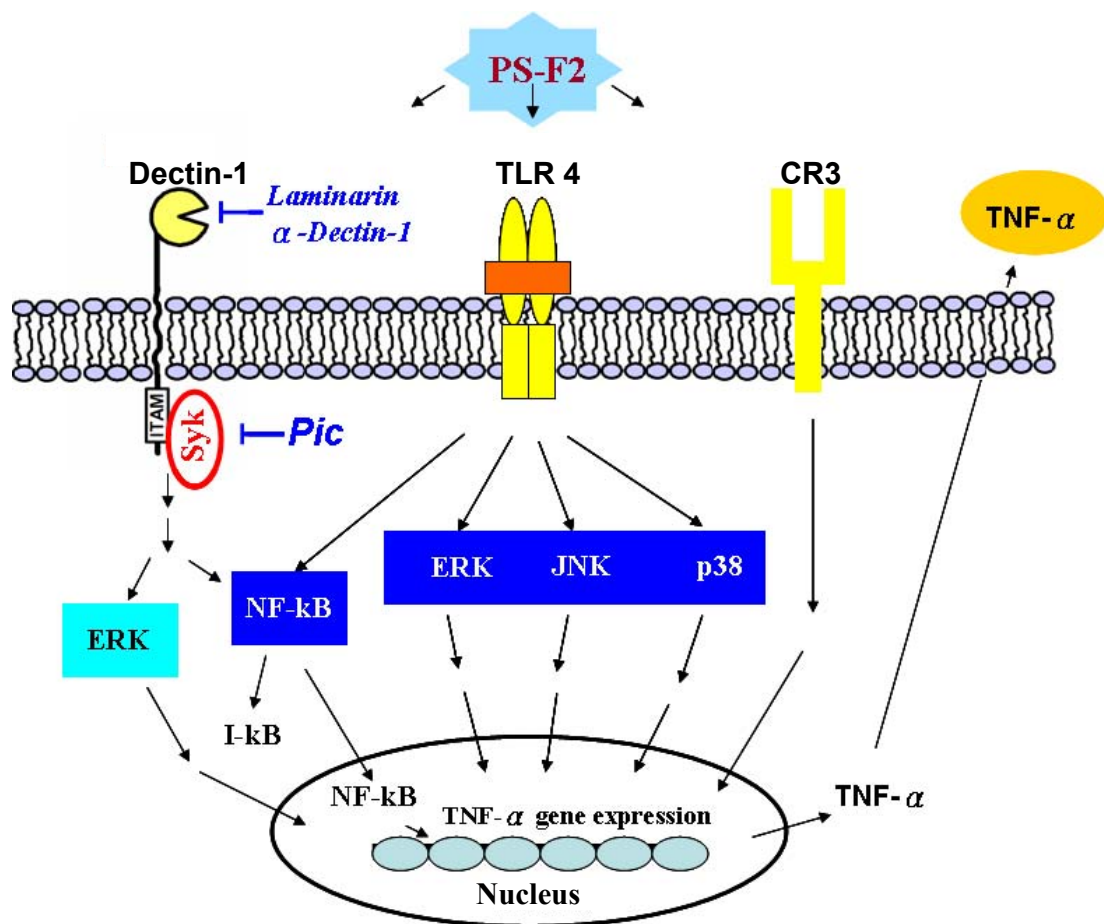


圖 4-1. PS-F2 刺激巨噬細胞產生 TNF- α 之受體及訊息傳導途徑簡圖

Figure 4-1. The proposed PS-F2-mediated receptors and signal transduction pathways in the regulation of TNF- α expression.

Dectin-1, dendritic-cell-associated c-type lectin-1; Syk, spleen tyrosine kinase; ITAM, tyrosine-based activation-like motif; Pic, piceatannol; CR3, complement receptor type 3; I- κ B, inhibitor protein κ B; NF- κ B, nuclear factor κ B; JNK, c-Jun N-terminal kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; TLR 4, Toll-like receptor 4; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

4-1)。

6. 以 Syk 抑制劑 piceatannol 處理後會抑制 PS-F2 刺激 RAW 264.7 細胞產生 TNF- α 、I- κ B 降解和 ERK 磷酸化，顯示 PS-F2 經由 Dectin-1 受體透過 NF- κ B 和 ERK 訊息傳遞途徑刺激 RAW 264.7 細胞 (圖 4-1)。
7. C57BL/6 小鼠以 PS-F2 (50 mg/kg) 每兩天管餵一次持續四週後，小鼠脾臟細胞之 T 淋巴球族群比例提高，血清中之 IgM 及 IgG 抗體濃度均有顯著增加，顯示 PS-F2 會引起體內非特異性免疫反應；對 BALB/c 小鼠則不會引起體內非特異性免疫反應。
8. 在抗腫瘤實驗中，腹腔注射 PS-F2 可抑制 S180、黑色素瘤 B16 細胞和 C26 腫瘤之生長分別達 67.5 %、23.7 % 及 43.3 %；PS-F2 處理小鼠脾臟細胞之 T 淋巴球族群比例顯著提高，其中 CD4 與 CD8 之細胞比例均有增加，CD49b 的 NK 細胞些微增加，血清中 IgM 抗體濃度亦有顯著增加。以管餵給予小鼠 PS-F2 亦有抗腫瘤之效果 (圖 4-2)。
9. 在 C26 腫瘤模式發現 PS-F2 處理之小鼠脾臟 T 細胞上的 CD44 和 CD62L 有顯著性活化，adoptive transfer T 細胞能抑制腫瘤生長 (圖 3-28)，及 PS-F2 在 SCID mice 無法抑制腫瘤，確認 PS-F2 透過活化 T 細胞及 B 細胞抑制腫瘤細胞的生長。
10. 本研究結果顯示液態醱酵培養台灣紫芝生產之胞外多醣體 PS-F2 能刺激活化先天性免疫系統之巨噬細胞和樹突細胞；動物模式之體內試驗也顯示活化後先天性免疫系統，PS-F2 明顯提高移植性腫瘤小鼠的細胞介導免疫功能及體液免疫功能，增強活化小鼠的免疫系統達到抗腫瘤之效果。

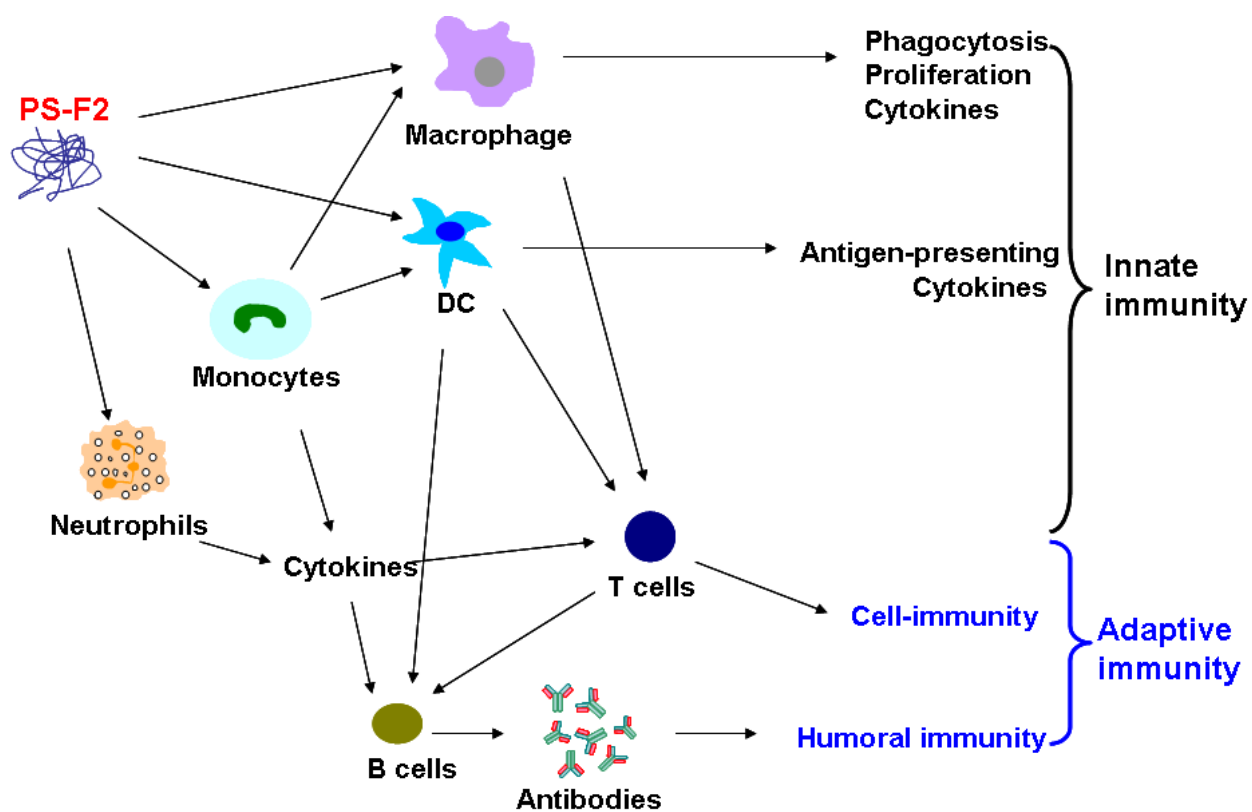


圖 4-2. PS-F2 抗腫瘤之免疫調節功能

Figure 4-2. The immunomodulation functions for PS-F2 in antitumor immunity.

本研究未來繼續研究之方向為：

1.以深層液態發酵培養生產胞外多醣體

探討不同培養條件對生產之胞外多醣體免疫調節活性之影響，及擴大生產條件之最適化，提升生產胞外多醣體之質與量。

2.PS-F2 組成及醣基鍵結對免疫調節活性之影響

解析台灣紫芝多醣體的結構；探討影響 PS-F2 免疫調節活性之關鍵組成、結構或鍵結等因子，並比較不同來源靈芝多醣體或市售多醣體產品之活性優劣。

3. PS-F2 的應用及保健產品之開發

探討 PS-F2 做為免疫佐劑和生物反應修飾劑之可行性，及其抗腫瘤活性於醫療保健用途之應用。



第五章 參考文獻

- 水野卓，川合正允 (賴慶亮)。1997 年。菇類的化學生化學。國立編譯館，台北，台灣。
- 許瑞祥。1993 年。靈芝概論。萬年出版社，台北，台灣。
- 陳明照。2006 年。台灣紫芝生物活性代謝產物之醱酵生產與功能評估。國立臺灣大學微生物與生化學研究所碩士論文
- 賀駿業。2003 年。靈芝多醣體最佳培養條件及對小白鼠之免疫反應研究。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- Abe, J., Wakimoto, H., Yoshida, Y., Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. (1995). Antitumor effect induced by granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor gene-modified tumor vaccination: comparison of adenovirus- and retrovirus-mediated genetic transduction. *J Cancer Res Clin Oncol* **121**, 587-592.
- Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., and Yadomae, T. (1994). Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol Pharm Bull* **17**, 1554-1560.
- Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K., and Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* **72**, 1605-1621.
- Akagi, J., and Baba, H. (2010). PSK may suppress CD57(+) T cells to improve survival of advanced gastric cancer patients. *Int J Clin Oncol* **15**, 145-152.
- Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., and Kevelaitis, E. (2007). Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* **43**, 597-606.
- Ariizumi, K., Shen, G. L., Shikano, S., Xu, S., Ritter III, R., Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P. R., and Takashima, A. (2000). Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275**, 20157-20167.
- Avci, F. Y., and Kasper, D. L. (2010). How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu Rev Immunol* **28**, 107-130.
- Bajtay, Z., Jozsi, M., Banki, Z., Thiel, S., Thielens, N., and Erdei, A. (2000). Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. *Eur J Immunol* **30**, 1706-1713.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Bao, X. F., Wang, X. S., Dong, Q., Fang, J. N., and Li, X. Y. (2002a). Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochem* **59**, 175-181.
- Bao, X. F., Zhen, Y., Ruan, L., and Fang, J. N. (2002b). Purification, characterization, and modification of T lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **50**, 623-629.
- Bao, Y. X., Kwok Wong, C., Kwok Ming Li, E., Shan Tam, L., Chung Leung, P., Bing Yin, Y., and Wai Kei Lam, C. (2006). Immunomodulatory effects of lingzhi and san-miao-san supplementation on patients with rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **28**, 197-200.

- Beinke, S., and Ley, S. C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* **382**, 393-409.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *J Exp Med* **186**, 65-70.
- Berovic, M., Habijanac, J., Zore, I., Wraber, B., Hodzar, D., Boh, B., and Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J Biotechnol* **103**, 77-86.
- Beutler, B. (1995). TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med* **43**, 227-235.
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., and Zhi-Bin, L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev* **13**, 265-301.
- Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (1999). Mushrooms, tumors, and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med* **221**, 281-293.
- Brown, G. D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**, 33-43.
- Brown, G. D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36-37.
- Brown, G. D., and Gordon, S. (2005). Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol* **7**, 471-479.
- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**, 1119-1124.
- Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. A., Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., Wong, S. Y., and Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**, 407-412.
- Bukhman, V. M., Treshchalina, E. M., Krasnopol'skaia, L. M., Isakova, E. B., Sedakova, L. A., Avtonomova, A. V., Leont'eva, M. I., Soboleva, N., Belitskii, I. V., and Bakanov, A. V. (2007). Preparation and biological properties of basidiomycete aqueous extracts and their mycelial compositions. *Antibiot Khimioter* **52**, 4-9.
- Cao, L. Z., and Lin, Z. B. (2002). Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Immunol Lett* **83**, 163-169.
- Cao, Q. Z., and Lin, Z. B. (2004). Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 833-838.
- Cao, Q. Z., and Lin, Z. B. (2006). *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. *Life Sci* **78**, 1457-1463.
- Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **1**, 118-129.
- Carter, R. W., Thompson, C., Reid, D. M., Wong, S. Y., and Tough, D. F. (2006). Preferential induction of CD4⁺ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-1. *J Immunol* **177**, 2276-2284.
- Celada, A., Gray, P. W., Rinderknecht, E., and Schreiber, R. D. (1984). Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med* **160**, 55-74.

- Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **9**, 10-16.
- Chan, G. C., Chan, W. K., and Sze, D. M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol* **2**, 25.
- Chan, W. K., Law, H. K., Lin, Z. B., Lau, Y. L., and Chan, G. C. (2007). Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. *Int Immunol* **19**, 891-899.
- Chang, T. T. (1982). Studies on biology of several species of *Ganoderma* in Taiwan. *National Taiwan University, Master Thesis*.
- Chang, Y. H., Yang, J. S., Yang, J. L., Wu, C. L., Chang, S. J., Lu, K. W., Lin, J. J., Hsia, T. C., Lin, Y. T., Ho, C. C., Wood, W. G., and Chung, J. G. (2009). *Ganoderma lucidum* extracts inhibited leukemia WEHI-3 cells in BALB/c mice and promoted an immune response in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 2589-2594.
- Chen, B. C., Chang, H. M., Hsu, M. J., Shih, C. M., Chiu, Y. H., Chiu, W. T., and Lin, C. H. (2009). Peptidoglycan induces cyclooxygenase-2 expression in macrophages by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J Biol Chem* **284**, 20562-20573.
- Chen, B. C., Liao, C. C., Hsu, M. J., Liao, Y. T., Lin, C. C., Sheu, J. R., and Lin, C. H. (2006). Peptidoglycan-induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, PGE2/PGE4 receptors, protein kinase A, I kappa B kinase, and NF-kappa B. *J Immunol* **177**, 681-693.
- Chen, H. S., Tsai, Y. F., Lin, S., Lin, C. C., Khoo, K. H., Lin, C. H., and Wong, C. H. (2004). Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorg Med Chem* **12**, 5595-5601.
- Chen, L., McGowan, P., Ashe, S., Johnston, J., Li, Y., Hellstrom, I., and Hellstrom, K. E. (1994). Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* **179**, 523-532.
- Chen, W. C., Hau, D. M., Wang, C. C., Lin, I. H., and Lee, S. S. (1995). Effects of *Ganoderma lucidum* and krestin on subset T-cell in spleen of gamma-irradiated mice. *Am J Chin Med* **23**, 289-298.
- Chen, Y. J., Cheng, P. C., Lin, C. N., Liao, H. F., Chen, Y. Y., Chen, C. C., and Lee, K. M. (2008). Polysaccharides from *Antrodia camphorata* mycelia extracts possess immunomodulatory activity and inhibits infection of *Schistosoma mansoni*. *Int Immunopharmacol* **8**, 458-467.
- Cheng, K. C., Huang, H. C., Chen, J. H., Hsu, J. W., Cheng, H. C., Ou, C. H., Yang, W. B., Chen, S. T., Wong, C. H., and Juan, H. F. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharides in human monocytic leukemia cells: from gene expression to network construction. *BMC Genomics* **8**, 411.
- Cheng, P. C., Hsu, C. Y., Chen, C. C., and Lee, K. M. (2008). In vivo immunomodulatory effects of *Antrodia camphorata* polysaccharides in a T1/T2 doubly transgenic mouse model for inhibiting infection of *Schistosoma mansoni*. *Toxicol Appl Pharmacol* **227**, 291-298.
- Cheung, N. K., and Modak, S. (2002). Oral (1-->3),(1-->4)-beta-D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **8**, 1217-1223.
- Cheung, N. K., Modak, S., Vickers, A., and Knuckles, B. (2002). Orally administered beta-glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* **51**, 557-564.

- Chien, C. M., Cheng, J. L., Chang, W. T., Tien, M. H., Tsao, C. M., Chang, Y. H., Chang, H. Y., Hsieh, J. F., Wong, C. H., and Chen, S. T. (2004). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* alter cell immunophenotypic expression and enhance CD56⁺ NK-cell cytotoxicity in cord blood. *Bioorg Med Chem* **12**, 5603-5609.
- Chien, C. M., Cheng, J. L., Chang, W. T., Tien, M. H., Wu, W. Y., Chang, Y. H., Chang, H. Y., and Chen, S. T. (2003). Cell phenotype analysis using a cell fluid-based microchip with high sensitivity and accurate quantitation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **795**, 1-8.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., and Fukuoka, F. (1970). Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res* **30**, 2776-2781.
- Chiu, S. W., Wang, Z. M., Leung, T. M., and Moore, D. (2000). Nutritional value of ganoderma extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. *Food Chem Toxicol* **38**, 173-178.
- Cutler, J. E. (2001). N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**, 75-86.
- Davies, P., and Allison, A. C. (1976). The macrophage as a secretory cell in chronic inflammation. *Agents Actions* **6**, 60-74.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasprowicz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D., and Pulendran, B. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* **116**, 916-928.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., and Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediated and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* **141**, 2407-2412.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 11-22.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**, 167.
- Duff, G. W., and Atkins, E. (1982). The inhibitory effect of polymyxin B on endotoxin-induced endogenous pyrogen production. *J Immunol Methods* **52**, 333-340.
- Dutta, T., Spence, A., and Lampson, L. A. (2003). Robust ability of IFN-gamma to upregulate class II MHC antigen expression in tumor bearing rat brains. *J Neurooncol* **64**, 31-44.
- Evans, S., Dizeyi, N., Abrahamsson, P. A., and Persson, J. (2009). The effect of a novel botanical agent TBS-101 on invasive prostate cancer in animal models. *Anticancer Res* **29**, 3917-3924.
- Fang, Q. H., and Zhong, J. J. (2002). Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Prog* **18**, 51-54.
- Ferreira, I. C., Vaz, J. A., Vasconcelos, M. H., and Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anticancer Agents Med Chem* **10**, 424-436.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O., Andersen, P., and Girardin, S. (1997). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation.

- Clin Exp Immunol* **147**, 227-235.
- Friedland, J. S., Constantin, D., Shaw, T. C., and Stylianou, E. (2001). Regulation of interleukin-8 gene expression after phagocytosis of zymosan by human monocytic cells. *J Leukoc Biol* **70**, 447-454.
- Galan-Diez, M., Arana, D. M., Serrano-Gomez, D., Kremer, L., Casasnovas, J. M., Ortega, M., Cuesta-Dominguez, A., Corbi, A. L., Pla, J., and Fernandez-Ruiz, E. (2010). *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal CEK1-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. *Infect Immun* **78**, 1426-1436.
- Gao, Y., Gao, H., Chan, E., Tang, W., Xu, A., Yang, H., Huang, M., Lan, J., Li, X., Duan, W., Xu, C., and Zhou, S. (2005a). Antitumor activity and underlying mechanisms of Ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, in mice. *Immunol Invest* **34**, 171-198.
- Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J., and Zhou, S. (2004). A Phase I/II Study of Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.rFr.)Lloyd (Aphyllophoromycetideae) Extract in Patients with Type II Diabetes Mellitus. *Int J Medicinal Mushrooms* **6**, 327-334.
- Gao, Y., Tang, W., Dai, X., Gao, H., Chen, G., Ye, J., Chan, E., Koh, H. L., Li, X., and Zhou, S. (2005b). Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *J Med Food* **8**, 159-168.
- Gao, Y., Zhou, S., Wen, J., Huang, M., and Xu, A. (2002). Mechanism of the antiulcerogenic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on indomethacin-induced lesions in the rat. *Life Sci* **72**, 731-745.
- Gao, Y., Zhou, S., Wen, J., Huang, M., and Xu, A. (2003). Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. *Immunol Invest* **32**, 201-215.
- Gaur, U., and Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* **66**, 1403-1408.
- Goldstein, I. M., Malmsten, C. L., Samuelsson, B., and Weissmann, G. (1977). Prostaglandins, thromboxanes, and polymorphonuclear leukocytes: mediation and modulation of inflammation. *Inflammation* **2**, 309-317.
- Goodridge, H. S., Wolf, A. J., and Underhill, D. M. (2009). Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev* **230**, 38-50.
- Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S. C., and Geijtenbeek, T. B. (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* **10**, 203-213.
- Gutcher, I., and Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* **117**, 1119-1127.
- Hanson, E. M., Clements, V. K., Sinha, P., Ilkovitch, D., and Ostrand-Rosenberg, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* **183**, 937-944.
- Harada, T., and Ohno, N. (2008). Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of beta-glucan. *Int Immunopharmacol* **8**, 556-566.
- Heller, K. N., Gurer, C., and Munz, C. (2006). Virus-specific CD4⁺ T cells: ready for direct attack. *J Exp Med* **203**, 805-808.
- Herre, J., Gordon, S., and Brown, G. D. (2004). Dectin-1 and its role in the

- recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* **40**, 869-876.
- Ho, Y. W., Yeung, J. S., Chiu, P. K., Tang, W. M., Lin, Z. B., Man, R. Y. and Lau, C. S. (2007). Ganoderma lucidum polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Mol Cell Biochem* **301**, 173-179.
- Hoffman, O. A., Standing, J. E., and Limper, A. H. (1993). *Pneumocystis carinii* stimulates tumor necrosis factor-alpha release from alveolar macrophages through a beta-glucan-mediated mechanism. *J Immunol* **150**, 3932-3940.
- Hong, F., Hansen, R. D., Yan, J., Allendorf, D. J., Baran, J. T., Ostroff, G. R., and Ross, G. D. (2003). Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res* **63**, 9023-9031.
- Hong, F., Yan, J., Baran, J. T., Allendorf, D. J., Hansen, R. D., Ostroff, G. R., Xing, P. X., Cheung, N. K., and Ross, G. D. (2004). Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol* **173**, 797-806.
- Hsiao, W. L., Li, Y. Q., Lee, T. L., Li, N., You, M. M., and Chang, S. T. (2004). Medicinal mushroom extracts inhibit ras-induced cell transformation and the inhibitory effect requires the presence of normal cells. *Carcinogenesis* **25**, 1177-1183.
- Hsu, H. Y., Hua, K. F., Lin, C. C., Lin, C. H., Hsu, J., and Wong, C. H. (2004). Extract of Reishi polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways. *J Immunol* **173**, 5989-5999.
- Hsu, M. J., Lee, S. S., Lee, S. T., and Lin, W. W. (2003). Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum*. *Br J Pharmacol* **139**, 289-298.
- Hsu, M. J., Lee, S. S., and Lin, W. W. (2002). Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *J Leukoc Biol* **72**, 207-216.
- Hua, K. F., Hsu, H. Y., Chao, L. K., Chen, S. T., Yang, W. B., Hsu, J., and Wong, C. H. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance CD14 endocytosis of LPS and promote TLR4 signal transduction of cytokine expression. *J Cell Physiol* **212**, 537-550.
- Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* **264**, 961-965.
- Huie, C. W., and Di, X. (2004). Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **812**, 241-257.
- Hung, W. S., Fang, C. L., Su, C. H., Lai, W. F., Chang, Y. C., and Tsai, Y. H. (2001). Cytotoxicity and immunogenicity of SACCHACHITIN and its mechanism of action on skin wound healing. *J Biomed Mater Res* **56**, 93-100.
- Hung, W. S., Lai, W. F., Leu, B., Su, C. H., Fang, C. L., and Tsai, Y. H. (2004). Effect of SACCHACHITIN on keratinocyte proliferation and the expressions of type I collagen and tissue-transglutaminase during skin wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **70**, 122-129.
- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G., and Fukuoka, F. (1968). Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155-157.

- Jeong, Y. T., Yang, B. K., Jeong, S. C., Kim, S. M., and Song, C. H. (2008). *Ganoderma applanatum*: a promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. *Phytother Res* **22**, 614-619.
- Ji, Z., Tang, Q., Zhang, J., Yang, Y., Jia, W., and Pan, Y. (2007). Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res* **112**, 445-450.
- Jiang, Y., Wang, H., Lu, L., and Tian, G. Y. (2005). Chemistry of polysaccharide Lzps-1 from *Ganoderma lucidum* spore and anti-tumor activity of its total polysaccharides. *Yao Xue Xue Bao* **40**, 347-350.
- Kabir, Y., Kimura, S., and Tamura, T. (1988). Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **34**, 433-438.
- Kankkunen, P., Teirila, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H., and Hatikainen, S. (2010). (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol* **184**, 6335-6342.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-227.
- Kawagishi, H., Mitsunaga, S., Yamawaki, M., Ido, M., Shimada, A., Kinoshita, T., Murata, T., Usui, T., Kimura, A., and Chiba, S. (1997). A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **44**, 7-10.
- Kelly, E. K., Wang, L., and Ivashkiv, L. B. (2010). Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J Immunol* **184**, 5545-5552.
- Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* **222**, 129-144.
- Knutson, K. L., and Disis, M. L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 721-728.
- Ko, Y. T., and Lin, Y. L. (2004). 1,3-beta-glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. *J Agric Food Chem* **52**, 3313-3318.
- Kohguchi, M., Kunikata, T., Watanabe, H., Kudo, N., Shibuya, T., Ishihara, T., Iwaki, K., Ikeda, M., Fukuda, S., and Kurimoto, M. (2004). Immuno-potentiating effects of the antler-shaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Rokkaku-Reishi). *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 881-887.
- Kuo, M. C., Weng, C. Y., Ha, C. L., and Wu, M. J. (2006). *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF-kappaB. *J Ethnopharmacol* **103**, 217-222.
- Kwak, H. J., Song, J. S., No, Z. S., Song, J. H., Yang, S. D., and Cheon, H. G. (2005). The inhibitory effects of roflumilast on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 cells are mediated by heme oxygenase-1 and its product carbon monoxide. *Inflamm Res* **54**, 508-513.
- Lai, C. Y., Hung, J. T., Lin, H. H., Yu, A. L., Chen, S. H., Tsai, Y. C., Shao, L. E., Yang, W. B., and Yu, J. (2010). Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* in vivo and in vitro. *Vaccine*.
- Lai, K. N., Chan, L. Y., Tang, S. C., and Leung, J. C. (2006). *Ganoderma* extract prevents albumin-induced oxidative damage and chemokines synthesis in cultured human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 1188-1197.
- Lai, N. S., Lin, R. H., Lai, R. S., Kun, U. C., and Leu, S. C. (2001). Prevention of

- autoantibody formation and prolonged survival in New Zealand Black/New Zealand White F1 mice with an ancient Chinese herb, *Ganoderma tsugae*. *Lupus* **10**, 461-465.
- Lai, S. W., Lin, J. H., Lai, S. S., and Wu, Y. L. (2004). Influence of *Ganoderma lucidum* on blood biochemistry and immunocompetence in horses. *Am J Chin Med* **32**, 931-940.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**, 263-266.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734-1736.
- Lee, J. M., Kwon, H., Jeong, H., Lee, J. W., Lee, S. Y., Baek, S. J., and Surh, Y. J. (2001). Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res* **15**, 245-249.
- Lee, S. Y., and Rhee, H. M. (1990). Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*: inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **38**, 1359-1364.
- Li, B., Allendorf, D. J., Hansen, R., Marroquin, J., Cramer, D. E., Harris, C. L., and Yan, J. (2007). Combined yeast beta-glucan and antitumor monoclonal antibody therapy requires C5a-mediated neutrophil chemotaxis via regulation of decay-accelerating factor CD55. *Cancer Res* **67**, 7421-7430.
- Li, B., Cai, Y., Qi, C., Hansen, R., Ding, C., Mitchell, T., and Yan, J. (2010a). Orally Administered Particular beta-Glucan Modulates Tumor-capturing Dendritic Cells and Improves Anti-tumor T Cell Responses in Cancer. *Clin Cancer Res*.
- Li, M., Zhang, S., Zhou, Y., Guo, Y., Jiang, X., and Miao, L. (2010b). Argon-helium cryosurgery for treatment of C6 gliomas in rats and its effect on cellular immunity. *Technol Cancer Res Treat* **9**, 87-94.
- Li, W. J., Nie, S. P., Chen, Y., Xie, M. Y., He, M., Yu, Q., and Yan, Y. (2010c). *Ganoderma atrum* polysaccharide protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation-induced oxidative stress by mitochondrial pathway. *J Cell Biochem* **110**, 191-200.
- Lieu, C. W., Lee, S. S., and Wang, S. Y. (1992). The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Res* **12**, 1211-1215.
- Lin, J. M., Lin, C. C., Chen, M. F., Ujiie, T., and Takada, A. (1995). Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *J Ethnopharmacol* **47**, 33-41.
- Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J., and Lee, S. G. (1993). Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *Am J Chin Med* **21**, 59-69.
- Lin, K. I., Kao, Y. Y., Kuo, H. K., Yang, W. B., Chou, A., Lin, H. H., Yu, A. L., and Wong, C. H. (2006a). Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor Blimp-1. *J Biol Chem* **281**, 24111-24123.
- Lin, Y. L., Lee, S. S., Hou, S. M., and Chiang, B. L. (2006b). Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice. *Mol Pharmacol* **70**, 637-644.
- Lin, Y. L., Liang, Y. C., Lee, S. S., and Chiang, B. L. (2005). Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human

- monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Leukoc Biol* **78**, 533-543.
- Lin, Z. B. (2005). Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *J Pharmacol Sci* **99**, 144-153.
- Liu, J., Yang, F., Ye, L. B., Yang, X. J., Timani, K. A., Zheng, Y., and Wang, Y. H. (2004). Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *J Ethnopharmacol* **95**, 265-272.
- Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., and Gao, X. (2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int J Biol Macromol* **46**, 451-457.
- Liu, X., Yuan, J. P., Chung, C. K., and Chen, X. J. (2002). Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. *Cancer Lett* **182**, 155-161.
- Liu, Y., Shepherd, E. G., and Nelin, L. D. (2007). MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* **7**, 202-212.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**, 77-92.
- Ma, J., Hwang, Y. K., Cho, W. H., Han, S. H., Hwang, J. K., and Han, J. S. (2009). Macelignan attenuates activations of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B induced by lipopolysaccharide in microglial cells. *Biol Pharm Bull* **32**, 1085-1090.
- Marasco, W. A., and Sui, J. (2007). The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol* **25**, 1421-1434.
- Marry, M., Cavalier, D. M., Schnurr, J. K., Netland, J., Yang, Z. Y., Pezeshk, V., York, W. S., Pauly, M., and White, A. R. (2002). Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. *Carbohydr Polym* **51**, 347-356.
- Maruyama, H., Yamazaki, K., Murofushi, S., Konda, C., and Ikekawa, T. (1989). Antitumor activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito and *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *J Pharmacobiodyn* **12**, 118-123.
- Masuda, Y., Matsumoto, A., Toida, T., Oikawa, T., Ito, K., and Nanba, H. (2009). Characterization and antitumor effect of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*. *J Agric Food Chem* **57**, 10143-10149.
- Maury, S., Lemoine, F. M., Hicheri, Y., Rosenzweig, M., Badoual, C., Cherai, M., Beaumont, J. L., Azar, N., Dhedin, N., Sirvent, A., Buzyn, A., Rubio, M. T., Vigouroux, S., Montagne, O., Bories, D., Roudot-Thoraval, F., Vernant, J. P., Cordonnier, C., Klatzmann, D., and Cohen, J. L. (2010). CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med* **2**, 41-52.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298.
- Miyazaki, T., and Nishijima, M. (1981). Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **29**, 3611-3616.
- Mizuno, M., Shiomi, Y., Minato, K., Kawakami, S., Ashida, H., and Tsuchida, H.

- (2000). Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. *Immunopharmacol* **46**, 113-121.
- Modak, S., Koehne, G., Vickers, A., O'Reilly, R. J., and Cheung, N. K. (2005). Rituximab therapy of lymphoma is enhanced by orally administered (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)-D-beta-glucan. *Leuk Res* **29**, 679-683.
- Morrison, D. C., and Jacobs, D. M. (1976). Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochem* **13**, 813-818.
- Muller, C. I., Kumagai, T., O'Kelly, J., Seeram, N. P., Heber, D., and Koeffler, H. P. (2006). *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leuk Res* **30**, 841-848.
- Mumberg, D., Monach, P. A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A. Y., Schreiber, R. D., and Schreiber, H. (1999). CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8633-8638.
- Muranski, P., and Restifo, N. P. (2009). Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. *Curr Opin Immunol* **21**, 200-208.
- Nelson, A. L., Dhimolea, E., and Reichert, J. M. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 767-774.
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., and Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**, 67-78.
- Ning, J., Zhang, W., Yi, Y., Yang, G., Wu, Z., Yi, J., and Kong, F. (2003). Synthesis of beta-(1 $\rightarrow$ 6)-branched beta-(1 $\rightarrow$ 3) glucohexaose and its analogues containing an alpha-(1 $\rightarrow$ 3) linked bond with antitumor activity. *Bioorg Med Chem* **11**, 2193-2203.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**, 252-256.
- Nishiya, T., and DeFranco, A. L. (2004). Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 19008-19017.
- Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., and Akira, S. (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* **164**, 3476-3479.
- Nonaka, Y., Ishibashi, H., Nakai, M., Shibata, H., Kiso, Y., and Abe, S. (2008). Effects of the antlered form of *Ganoderma lucidum* on tumor growth and metastasis in cyclophosphamide-treated mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1399-1408.
- Nonaka, Y., Shibata, H., Nakai, M., Kurihara, H., Ishibashi, H., Kiso, Y., Tanaka, T., Yamaguchi, H., and Abe, S. (2006). Anti-tumor activities of the antlered form of *Ganoderma lucidum* in allogeneic and syngeneic tumor-bearing mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 2028-2034.
- Oh, K. W., Lee, C. K., Kim, Y. S., Eo, S. K., and Han, S. S. (2000). Antiherpetic activities of acidic protein bound polysacchride isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and vidarabine. *J Ethnopharmacol* **72**, 221-227.
- Okazaki, M., Adachi, Y., Ohno, N., and Yadomae, T. (1995). Structure-activity relationship of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production

- from macrophages, in vitro. *Biol Pharm Bull* **18**, 1320-1327.
- Pang, X., Chen, Z., Gao, X., Liu, W., Slavin, M., Yao, W., and Yu, L. L. (2007). Potential of a novel polysaccharide preparation (GLPP) from Anhui-grown *Ganoderma lucidum* in tumor treatment and immunostimulation. *J Food Sci* **72**, S435-442.
- Pardoll, D. M., and Topalian, S. L. (1998). The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 588-594.
- Parsa, K. V., Butchar, J. P., Rajaram, M. V., Cremer, T. J., and Tridandapani, S. (2008). The tyrosine kinase Syk promotes phagocytosis of *Francisella* through the activation of Erk. *Mol. Immunol.* **45**, 3012-3021.
- Paterson, R. R. M. (2006). *Ganoderma*-a therapeutic fungal biofactory. *Phytochem* **67**, 1985-2001.
- Perez-Diez, A., Joncker, N. T., Choi, K., Chan, W. F., Anderson, C. C., Lantz, O., and Matzinger, P. (2007). CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* **109**, 5346-5354.
- Perticarari, S., Presani, G., and Banfi, E. (1994). A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. *J Immunol Methods* **170**, 117-124.
- Petrova, R. D., Reznick, A. Z., Wasser, S. P., Denchev, C. M., Nevo, E., and Mahajna, J. (2008). Fungal metabolites modulating NF-kappaB activity: an approach to cancer therapy and chemoprevention. *Oncol Rep* **19**, 299-308.
- Pi, C. C. (2009). Extracellular polysaccharides derived from *Ganoderma formosanum* fraction as adjuvant and regulate allergic reactions in a murine asthmatic model. *National Taiwan University, Master Thesis*.
- Radfar, S., Wang, Y., and Khong, H. T. (2009). Activated CD4⁺ T cells dramatically enhance chemotherapeutic tumor responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **183**, 6800-6807.
- Robinson, M. J., Sancho, D., Slack, E. C., LeibundGut-Landmann, S., and Reis e Sousa, C. (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* **7**, 1258-1265.
- Robson, N. C., Hoves, S., Maraskovsky, E., and Schnurr, M. (2010). Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced. *Curr Opin Immunol* **22**, 137-144.
- Rubel, R., Dalla Santa, H. S., Bonatto, S. J., Bello, S., Fernandes, L. C., Di Bernardi, R., Gern, J., Santos, C. A., and Soccol, C. R. (2010). Medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Leyss: Fr) Karst. triggers immunomodulatory effects and reduces nitric oxide synthesis in mice. *J Med Food* **13**, 142-148.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S. H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K., and wakura, Y. (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* **8**, 39-46.
- Salvador, C., Li, B., Hansen, R., Cramer, D. E., Kong, M., and Yan, J. (2008). Yeast-derived beta-glucan augments the therapeutic efficacy mediated by anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody in human carcinoma xenograft models. *Clin Cancer Res* **14**, 1239-1247.
- Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B., and Bisen, P. S. (2009). *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol* **10**, 717-742.
- Sasaki, T., Arai, Y., Ikekawa, T., Chihara, G., and Fukuoka, F. (1971). Antitumor polysaccharides from some polyporaceae, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat

- and *Phellinus linteus* (Berk. et Curt) Aoshima. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **19**, 821-826.
- Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, Y. and Kuroki, Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* **171**, 417-425.
- Schepetkin, I. A., and Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* **6**, 317-333.
- Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2**, 947-950.
- Shao, B. M., Hui, D., Xu, W., Lin, Z. B., and Gao, X. M. (2004). Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochem Bioph Res Co* **323**, 133-141.
- Shedlock, D. J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-339.
- Shiao, M. S. (2003). Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem Rec* **3**, 172-180.
- Shiku, H. (2003). Importance of CD4⁺ helper T-cells in antitumor immunity. *Int J Hematol* **77**, 435-438.
- Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y., and Inada, Y. (1985). Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **33**, 3012-3015.
- Shin, D. M., Yang, C. S., Yuk, J. M., Lee, J. Y., Kim, K. H., Shin, S. J., Takahara, K., Lee, S. J., and Jo, E. K. (2008). *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol* **10**, 1608-1621.
- Slack, E. C., Robinson, M. J., Hernanz-Falcon, P., Brown, G. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L., and Reis e Sousa, C. (2007). Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol* **37**, 1600-1612.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and A., M. (1985). Structures and anti-tumor activities of polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric Biol Chem* **49**, 2641-2653.
- Stahl, P. D., and Ezekowitz, R. A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**, 50-55.
- Su, C. H., Liu, S. H., Yu, S. Y., Hsieh, Y. L., Ho, H. O., Hu, C. H., and Sheu, M. T. (2005). Development of fungal mycelia as a skin substitute: characterization of keratinocyte proliferation and matrix metalloproteinase expression during improvement in the wound-healing process. *J Biomed Mater Res A* **72**, 220-227.
- Su, C. H., Sun, C. S., Juan, S. W., Hu, C. H., Ke, W. T., and Sheu, M. T. (1997). Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. *Biomaterials* **18**, 1169-1174.
- Sugamura, K., Ishii, N., and Weinberg, A. D. (2004). Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol* **4**, 420-431.

- Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., Ohno, N., Tamura, H., Shibata, K., Akashi, S., Miyake, K., Sugawara, S., and Takada, H. (2002). Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* **46**, 503-512.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* **1**, 625-635.
- Tanaka, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., and Tsunoo, H. (1989). Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *J Biol Chem* **264**, 16372-16377.
- Tanaka, H., Muguruma, K., Kubo, N., Amano, R., Noda, E., Yamada, N., Yashiro, M., Maeda, K., Sawada, T., Ohira, M., Ishikawa, T., and Hirakawa, K. (2010). Effect of PSK on recurrence of stage II/III gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* **37**, 2258-2260.
- Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S. Y. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* **169**, 3876-3882.
- Thornton, B. P., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R. C., and Ross, G. D. (1996). Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **156**, 1235-1246.
- Thyagarajan, A., Jiang, J., Hopf, A., Adamec, J., and Sliva, D. (2006). Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by *Ganoderma lucidum* is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion. *Int J Mol Med* **18**, 657-664.
- Tsoni, S. V., and Brown, G. D. (2008). beta-Glucans and dectin-1. *Ann NY Acad Sci* **1143**, 45-60.
- Turjanski, A. G., Vaque, J. P., and Gutkind, J. S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**, 3240-3253.
- Ukai, S., Kiho, T., Hara, C., Morita, M., Goto, A., Imaizumi, N., and Hasegawa, Y. (1983). Polysaccharides in fungi. XIII. Antitumor activity of various polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia auricula-judae*, and *Auricularia* species. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **31**, 741-744.
- Underhill, D. M., Rossmagle, E., Lowell, C. A., and Simmons, R. M. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* **106**, 2543-2550.
- Vetvicka, V., Thornton, B. P., and Ross, G. D. (1996). Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest* **98**, 50-61.
- Vetvicka, V., Vetvickova, J., Frank, J., and Yvin, J. C. (2008). Enhancing effects of new biological response modifier beta-1,3 glucan sulfate PS3 on immune reactions. *Biomed Pharmacother* **62**, 283-288.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., and Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune

- function by beta-glucans. *Physiol Behav* **94**, 276-284.
- Wang, C. C., Chen, J. R., Tseng, Y. C., Hsu, C. H., Hung, Y. F., Chen, S. W., Chen, C. M., Khoo, K. H., Cheng, T. J., Cheng, Y. S., Jan, J. T., Wu, C. Y., Ma, C., and Wong, C. H. (2009a). Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 18137-18142.
- Wang, G., Zhang, J., Mizuno, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayuzumi, H., Okamoto, H., and Li, J. (1993). Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom Songshan lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 894-900.
- Wang, J., Zhang, L., Yu, Y., and Cheung, P. C. (2009b). Enhancement of antitumor activities in sulfated and carboxymethylated polysaccharides of *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem* **57**, 10565-10572.
- Wang, P. Y., Wang, S. Z., Lin, S. Q., and Lin, Z. B. (2005). [Comparison of the immunomodulatory effects of spore polysaccharides and broken spore polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* on murine splenic lymphocytes and peritoneal macrophages in vitro]. *Beijing Da Xue Xue Bao* **37**, 569-574.
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. C., Lee, S. S., Shiao, M. S., and Ho, C. K. (1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer* **70**, 699-705.
- Wang, Y. Y., Khoo, K. H., Chen, S. T., Lin, C. C., Wong, C. H., and Lin, C. H. (2002). Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg Med Chem* **10**, 1057-1062.
- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 258-274.
- Wasser, S. P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 1323-1332.
- Wasser, S. P., and Weis, A. L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* **19**, 65-96.
- Watford, W. T., Moriguchi, M., and Morinobu, A. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 361-368.
- Welt, S., Divgi, C. R., Scott, A. M., Garin-Chesa, P., Finn, R. D., Graham, M., Carswell, E. A., Cohen, A., Larson, S. M., and Old, L. J. (1994). Antibody targeting in metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumor stromal fibroblasts. *J Clin Oncol* **12**, 1193-1203.
- Wolchok, J. D., and Saenger, Y. (2008). The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist* **13 Suppl 4**, 2-9.
- Xia, Y., Vetvicka, V., Yan, J., Hanikyrova, M., Mayadas, T., and Ross, G. D. (1999). The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J Immunol* **162**, 2281-2290.
- Xie, J. T., Wang, C. Z., Wicks, S., Yin, J. J., Kong, J., Li, J., Li, Y. C., and Yuan, C. S. (2006). *Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW 480 human

- colorectal cancer cells. *Exp Oncol* **28**, 25-29.
- Xu, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., and Wang, Y. (2011). *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *Am J Chin Med* **39**, 15-27.
- Yan, J., Vetvicka, V., Xia, Y., Coxon, A., Carroll, M. C., Mayadas, T. N., and Ross, G. D. (1999). Beta-glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **163**, 3045-3052.
- Yang, Q., Wang, S., Xie, Y., Sun, J., and Wang, J. (2010). HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *Int J Biol Macromol* **46**, 167-172.
- Yang, X., Guo, D., Zhang, J., and Wu, M. (2007). Characterization and antitumor activity of pollen polysaccharide. *Int Immunopharmacol* **7**, 427-434.
- Ye, L., Zhang, J., Ye, X., Tang, Q., Liu, Y., Gong, C., Du, X. and Pan, Y. (2008). Structural elucidation of the polysaccharide moiety of a glycopeptide (GLPCW-II) from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Carbohydr Res* **343**, 746-752.
- Yin, Y., Fu, W., Fu, M., He, G., and Traore, L. (2007). The immune effects of edible fungus polysaccharides compounds in mice. *Asia Pac J Clin Nutr* **16 Suppl 1**, 258-260.
- You, Y. H., and Lin, Z. B. (2002). Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. *Acta Pharmacol Sin* **23**, 787-791.
- Young, S. H., Ye, J., Frazer, D. G., Shi, X., and Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α production in 1 $\rightarrow$ 3- β -glucan (zymosan)-activated macrophages. *J Biol Chem* **276**, 20781-20787.
- Yuan, H., Song, J., Li, X., Li, N., and Dai, J. (2006). Immunomodulation and antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharides. *Cancer Lett* **243**, 228-234.
- Yue, G. G., Fung, K. P., Leung, P. C., and Lau, C. B. (2008). Comparative studies on the immunomodulatory and antitumor activities of the different parts of fruiting body of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma spores*. *Phytother Res* **22**, 1282-1291.
- Yue, G. G., Fung, K. P., Tse, G. M., Leung, P. C., and Lau, C. B. (2006). Comparative studies of various *Ganoderma* species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities in vitro. *J Altern Complement Med* **12**, 777-789.
- Yuen, J. W. M., and Gohel, M. D. (2005). Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence. *Nutr Cancer* **53**, 11-17.
- Zaidman, B. Z., Yassin, M., Mahajna, J., and Wasser, S. P. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 453-468.
- Zanoni, I., Foti, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Granucci, F. (2005). TLR-dependent activation stimuli associated with Th1 responses confer NK cell stimulatory capacity to mouse dendritic cells. *J Immunol* **175**, 286-292.
- Zhang, G. L., Wang, Y. H., Ni, W., Teng, H. L., and Lin, Z. B. (2002a). Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World J Gastroenterol* **8**, 728-733.
- Zhang, J., Tang, Q., Zimmerman-Kordmann, M., Reutter, W., and Fan, H. (2002b). Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from

- Ganoderma lucidum*. *Life Sci* **71**, 623-638.
- Zhang, J., Wang, G., Li, H., Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Mayuzumi, H., Okamoto, H., and Li, J. (1994). Antitumor active protein-containing glycans from the Chinese mushroom songshan lingzhi, *Ganoderma tsugae* mycelium. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1202-1205.
- Zhang, L., Zhang, M., Zhou, Q., Chen, J., and Zeng, F. (2000). Solution properties of antitumor sulfated derivative of alpha-(1->3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2172-2178.
- Zhao, H., Luo, Y., Lu, C., Lin, N., Xiao, C., Guan, S., Guo, D. A., Liu, Z., Ju, D., He, X., and Lu, A. (2010). Enteric mucosal immune response might trigger the immunomodulation activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide in mice. *Planta Med* **76**, 223-227.
- Zhao, H. B., Lin, S. Q., Liu, J. H., and Lin, Z. B. (2004). Polysaccharide extract isolated from *Ganoderma lucidum* protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *J Pharmacol Sci* **95**, 294-298.
- Zhao, M., Flynt, F. L., Hong, M., Chen, H., Gilbert, C. A., Briley, N. T., Bolick, S. C., Wright, K. L., and Piskurich, J. F. (2007). MHC class II transactivator (CIITA) expression is upregulated in multiple myeloma cells by IFN-gamma. *Mol Immunol* **44**, 2923-2932.
- Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., and Moucheng, W. (2005). Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int Immunopharmacol* **5**, 811-820.
- Zhong, J. J., and Tang, Y. J. (2004). Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **87**, 25-59.
- Zhu, X. L., Chen, A. F., and Lin, Z. B. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *J Ethnopharmacol* **111**, 219-226.
- Zhuang, Y. J. (2009). Immunomodulatory activity of *Ganoderma formosanum* polysaccharides in lymphocytes. *National Taiwan University, Master Thesis*.
- Zjawiony, J. K. (2004). Biologically active compounds from *Aphyllophorales* (polypore) fungi. *J Nat Prod* **67**, 300-310.

個人簡歷

姓名：王正利 (D92B47101)

學歷：

1993-1996 台灣大學農業化學系農產製造組畢業

1996-1998 台灣大學農業化學研究所生物工業化學組碩士班畢業

2003-2011 台灣大學生化科技學系博士班研究生

個人著作：

碩士論文：

紅麴菌麩胺酸去羧基酶之研究 (1998)

博士論文

台灣紫芝多醣體免疫調節機轉與功能評估 (2011)

Journal paper：

1. Liu, WH and CL Wang (2003) Cultural conditions and some properties of glutamate decarboxylase produced by *Monascus purpureus*. *Food Sci. Agric. Chem.*, 4: 15-19.
2. Cheng-Li Wang, Chia-Chen Pi, Chu-Wei Kuo, Yu-Jing Zhuang, Kay-Hooi Khoo, Wen-Hsiung Liu, and Chun-Jen Chen (2011) Polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage activation and protect mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Biotechnol. Lett.* Accepted.

Conference paper：

1. Liu, WH and **CL Wang** (2002) Cultural conditions and some properties of glutamate decarboxylase produced by *Monascus purpureus*. 台灣農業化學學會第 40 次年會。
2. **Wang, CL**, WH Liu, and CJ Chen (2008) Extracellular polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate murine macrophage activation and dendritic cell maturation. Gordon Research Conference: Immunochemistry and Immunobiology. Oxford, UK.
3. **Wang, CL**, WH Liu, and CJ Chen (2008) Extracellular polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate murine macrophage activation and dendritic cell maturation. The 4th Congress of the Federation of Immunology Societies of Asia-Oceania. Taipei, Taiwan.
4. **Wang, CL**, WH Liu, and CJ Chen (2009) Extracellular polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma*

- formosanum* stimulate macrophage and dendritic cell activation and anti-tumor response. Keystone Symposia: Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogens. Banff, Canada.
5. **Wang, CL**, WH Liu, and CJ Chen (2009) Extracellular polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage and dendritic cell activation and anti-tumor response. The 24th Joint Annual Conference of Biomedical Science. Taipei, Taiwan.
 6. **Wang, CL**, WH Liu, and CJ Chen (2009) Extracellular polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage and dendritic cell activation and anti-tumor response. 14th Conference on Biochemical Engineering. Taichung, Taiwan.
 7. **Wang, CL**, WH Liu, and CJ Chen (2009) Extracellular polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage and dendritic cell activation and anti-tumor response. Global Chinese Health (Functional) Food Symposium 2009. Hong Kong.
 8. **Wang, CL**, YJ Zhuang, WH Liu, and CJ Chen (2010) Antitumor and immunomodulating activities of polysaccharide from *Ganoderma formosanum*. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan.

