

國立台灣大學生物資源學系暨農學院

園藝暨景觀學研究所

碩士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

茯苓免疫調節蛋白活化樹突細胞及調節  $T_H1$  免疫反應

*Poria cocos* Immunomodulatory Protein Induces  $T_H1$  Immune Response by Activated Dendritic Cells

紀柏羽

Po-Yu Chi

指導教授：許輔 博士

Advisor: Fuu Sheu, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書




茯苓免疫調節蛋白活化樹突細胞及調節  $T_H1$  免疫  
反應

*Poria cocos* Immunomodulatory Protein Induce  $T_H1$   
Immune Response by Activated Dendritic Cells

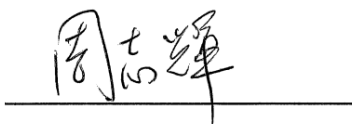
本論文係紀柏羽 (R01628204) 在國立臺灣大學園藝暨景觀學系、所完成之碩士學位論文，於民國一百零三年七月十一日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：



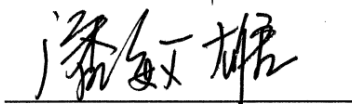
許 輔 博士

國立臺灣大學園藝暨景觀學系 教授  
本論文指導教授



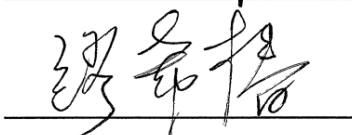
周志輝 博士

國立中興大學食品暨應用生物科技學系 特聘教授



潘敏雄 博士

國立臺灣大學食品科技研究所 教授



繆希椿 博士

國立臺灣大學醫學院免疫學研究所 副教授

## 致謝



首先要感謝的是許輔老師，老師提供了金費、資源及相當好的實驗環境供我們研究生進行各種試驗，並教導我們如何審論文、做研究生報告，除此之外也時常叮嚀我們注意如何規劃時間、自我約束和團隊合作，使我們的研究生能力及人生中的處事能力大有進展。也由衷感謝周志輝老師、潘敏雄老師及繆希椿老師撥空修改論文及參加口試，使這份碩士畢業論文能變得更完整。

而在研究生生活中，感謝淑幸助理姊姊在我們的研究室生活中常常提供好吃的餐飲、點心，以及璨哥的幫助，讓我們就算在忙碌的試驗期也能夠安心、愉快的度過。感謝雅婷及千育學姐當我的實驗啟蒙者，讓我的實驗能力進步！感謝志良學長及小白學姊在做試驗、進度報告及投影片上的諸多專業指導，以及佳琳、映柔、偉齊、英誌、沛樺、香萍、思辰及伊如準備口試之場佈及餐點，也一起感謝幫大家修改論文的所有室友們！此外也要謝謝慧欣學姊詳細的研究資料，以及美如、育靈學姊的論文格式和試驗相關資訊，幫助我完成論文。

謝謝一路陪伴我度過重重難關的同屆同伴們-季霖、瑜珊、雅玲和宛真，在實驗室的各種活動如中秋烤肉、尾牙及室遊等，或是在學校事務中各種紙本文件的填表繳交上，都能發揮絕佳團隊精神來完成它，也很高興我們終於順利畢業了！


十分感謝我的家人，不但提供了金費使我能有念研究所的機會，也在我遇到實驗挫折等人生低潮期的時候在身旁陪伴。最後也感謝所有給予過我幫助的人們，誠摯的獻上我的感謝之意！

紀柏羽 謹誌於

國立臺灣大學園藝暨景觀學研究所

中華民國一百零三年七月二十四日

## 中文摘要



茯苓蛋白 PCP (*Poria cocos* protein) 為由茯苓菌核萃取出的蛋白二聚體，分子量為 35.6 kDa，包含 14.3 kDa 單元及 21.3 kDa 含醣基單元。PCP 具有活化 RAW264.7 巨噬細胞及小鼠腹腔巨噬細胞的能力，在 anti-CD3/CD28 mAbs 存在的環境與 T 細胞共同培養可活化 T 細胞並分泌  $T_H1$  細胞素 IFN- $\gamma$  (interferon-gamma)，且於異位性皮膚炎之貼膚試驗中可抑制  $T_H2$  免疫反應。因為 PCP 無法直接活化  $CD90.2^+$  T 細胞，故本研究推測 PCP 必須利用脾細胞中的抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells, APCs)，如樹突細胞 (dendritic cells, DCs) 使輔助型 T 細胞分化成  $T_H1$  型，並設計試驗驗證之。首先，在探討 PCP 是否能活化 DCs 的研究中，PCP (100  $\mu$ g/mL) 可增加小鼠 DCs 之 CD40、CD80 及 CD86 表現及 IL-6 及 IL-12p70 分泌量，證明 PCP 可活化 DCs。由 TLR (toll-like receptor)  $2^{-/-}$  及  $TLR4^{-/-}$  基因剔除鼠之 DCs 表面分子表現及 IL-6 細胞素分泌試驗結果推測 PCP 不完全透過 TLR2 或 TLR4 路徑活化 DCs。接著，在探討樹突細胞調節  $T_H$  免疫反應之試驗中，預先與 PCP 及 OVA 抗原培養過的 DCs 可增加對 OVA 有特異性之 DO11.10  $CD90.2^+$  T 細胞增生及分泌 IFN- $\gamma$ ，並減少 IL-4 分泌量，顯示 PCP 有助於 DCs 呈現 OVA 並使免疫反應導向  $T_H1$ 。最後，於 OVA 誘導之小鼠氣喘試驗中，餵食 PCP (100  $\mu$ g/day) 可增加支氣管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) IFN- $\gamma$  濃度及血清 OVA-specific IgG2a 含量，並降低 BALF 嗜酸性球 (eosinophils) 數、 $T_H2$  細胞素 (IL-4、IL-5、IL-13) 濃度、血清 OVA-specific IgE 含量及肺部組織的發炎細胞浸潤情形。由以上試驗結果證明 PCP 可透過活化樹突細胞使  $T_H1$  型細胞分化，並抑制  $T_H2$  型細胞分化，減少動物氣喘模式之小鼠  $T_H2$  免疫反應。

關鍵字：茯苓、免疫調節蛋白、樹突細胞、輔助型 T 細胞、呼吸道過敏

## Abstract

*Poria cocos* protein (PCP), which is purified from dried sclerotium of *Poria cocos*, is a 35.6 kDa heterodimer protein including 14.3 and 21.3 kDa glycosyl subunits. In our previous results, PCP could active RAW264.7 cells and mouse peritoneal macrophages. This protein could also up-regulate murine T cells to secrete IFN- $\gamma$  in the presence of anti-CD3/CD28 mAbs and inhibit T<sub>H</sub>2 immune-response in patch test for atopic dermatitis. However, PCP could not directly activate the differentiation of CD90.2<sup>+</sup> T cells to T<sub>H</sub>1 cells, suggesting antigen-presenting cells as dendritic cells (DCs) could be responsible for the activation of PCP on T<sub>H</sub>1 cells.

In this study, we first found that PCP could up-regulate the expression of CD40, CD80, and CD86 and induce secretion of IL-6 and IL-12p70 on murine DCs. In the results of PCP incubated with DCs of TLR2<sup>-/-</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> mice, we found that PCP might induce DCs activation through neither TLR2 nor TLR4 pathway. Second, PCP significantly increased the antigen-presenting ability of murine DCs to promote cell proliferation and IFN- $\gamma$  secretion of OVA-specific DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T cells. Meanwhile, these DCs could inhibit the OVA-specific IL-4 secretion by DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T cells. According to the results, we suggested that PCP can help DCs presenting antigen and skewing immune-response to T<sub>H</sub>1. Finally, in OVA-induced asthma mouse model, oral administration of PCP (100  $\mu$ g/day) could increase the production of IFN- $\gamma$  in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and OVA-specific IgG2a in serum. Oral administration of PCP could also down-regulate the amount of eosinophils and T<sub>H</sub>2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13) in BALF, OVA-specific IgE in serum, and cell infiltration in mouse lung sections. In conclusion, PCP can activate DCs to promote differentiation of T<sub>H</sub>1 cells and suppress T<sub>H</sub>2 immune-response in mouse model of asthma.

Keywords: *Poria cocos*; immunomodulatory protein; bone marrow-derived dendritic cell; T helper cell; allergic airway inflammation



## 總目錄



口試委員會審定書.....	I
致謝.....	II
中文摘要.....	III
Abstract.....	IV
總目錄.....	VI
圖目錄.....	X
縮寫對照表.....	XI
第一章 緒論.....	1
1.1 茯苓之前人研究.....	1
1.1.1 簡介.....	1
1.1.2 茯苓之生長與栽種.....	1
1.1.3 茯苓之成分.....	2
1.1.3.1 多醣類.....	2
1.1.3.2 三萜類.....	3
1.1.4 茯苓之生物活性.....	3
1.1.4.1 抗腫瘤活性.....	3
1.1.4.2 抗發炎.....	4
1.1.4.3 抗氧化.....	5
1.1.4.4 抗菌.....	5
1.1.4.5 降血糖.....	5
1.1.4.6 腎保護作用.....	6
1.2 茯苓蛋白之研究.....	7
1.2.1 茯苓蛋白 PCP 之生化特性.....	7



1.2.2 茯苓蛋白 PCP 之生物活性.....	7
1.2.2.1 PCP 於 APCs 之影響.....	7
1.2.2.2 PCP 於 T 細胞之影響.....	8
1.3 樹突細胞.....	9
1.3.1 樹突細胞簡介.....	9
1.3.2 樹突細胞之活化.....	10
1.3.3 樹突細胞之表面分子.....	10
1.3.4 樹突細胞活化路徑.....	10
1.3.5 樹突細胞分泌之細胞素及功能.....	11
1.4 輔助型 T 細胞.....	11
1.4.1 輔助型 T 細胞之活化.....	11
1.4.2 $T_H1$ 型及 $T_H2$ 型輔助 T 細胞簡介.....	12
1.5 過敏性氣喘與 $T_H$ 免疫反應之相關性.....	13
1.5.1 過敏反應介紹.....	13
1.5.2 過敏反應之免疫發生步驟.....	13
1.5.3 過敏性氣喘簡介.....	14
1.5.4 如何透過調控 $T_H$ 免疫反應抑制過敏反應.....	15
1.6 研究動機與目的.....	15
第二章 材料與方法.....	17
2.1 茯苓蛋白之萃取與分子量檢測.....	17
2.1.1 茯苓蛋白粗萃取.....	17
2.1.2 DE-52 管柱層析.....	18
2.1.3 蛋白去醣試驗.....	20
2.1.4 SDS 電泳.....	20
2.1.5 PAS 醣蛋白染色.....	22



2.2 茯苓蛋白與脾細胞、CD90.2 <sup>+</sup> T 細胞之培養與免疫活性試驗.....	23
2.2.1 脾細胞之取得.....	25
2.2.2 由脾細胞中分離 CD90.2 <sup>+</sup> T 細胞.....	25
2.2.3 茯苓蛋白與脾細胞、CD90.2 <sup>+</sup> T 細胞之培養.....	26
2.2.4 MTT 細胞活性試驗.....	26
2.2.5 ELISA 酵素免疫分析法測定 IFN- $\gamma$ .....	26
2.3 茯苓蛋白與樹突細胞之培養與樹突細胞活化 T 細胞能力試驗.....	27
2.3.1 骨髓衍生樹突細胞之取得方式.....	29
2.3.2 茯苓蛋白與樹突細胞之培養.....	30
2.3.3 樹突細胞與 DO11.10 CD90.2 <sup>+</sup> T 細胞之培養.....	30
2.3.4 樹突細胞之表面分子檢測.....	30
2.3.5 CFSE 細胞增生試驗.....	31
2.3.6 IL-4、IL-6 及 IFN- $\gamma$ 細胞素之 ELISA 酵素免疫分析法測定.....	31
2.4 動物氣喘模式試驗.....	32
2.4.1 小鼠致敏步驟.....	33
2.4.2 小鼠餵食方式.....	34
2.4.3 支氣管肺泡灌洗液 (BALF) 取得方式.....	34
2.4.4 劉氏細胞染色.....	35
2.4.5 IL-4、IL-5、IL-13 及 IFN- $\gamma$ 細胞素之 ELISA 測定.....	35
2.4.6 血液之取得及 OVA 特異性 IgE、OVA 特異性 IgG2a 之測定.....	35
2.4.7 肺部切片之取得及染色.....	36
2.5 統計方式.....	36
第三章 結果.....	37
3.1 PCP 無法直接活化 T 細胞.....	37
3.1.1 PCP 之製備.....	37

3.1.2	PCP 無法直接活化 CD90.2+ T 細胞.....	37
3.2	PCP 可活化樹突細胞.....	38
3.2.1	PCP 可促進 DC 表面分子之表現.....	39
3.2.2	PCP 提高樹突細胞分泌 IL-6 及 IL-12p70.....	39
3.3	PCP-DC 抑制 DO11.10 T 細胞之 T <sub>H</sub> 2 免疫反應.....	40
3.3.1	T 細胞之 CFSE 細胞增生試驗結果.....	40
3.3.2	細胞上清液 IFN- $\gamma$ 及 IL-4 濃度測定結果.....	40
3.4	PCP 活化 DC 之路徑研究.....	41
3.4.1.1	PCP 刺激 TLR2-/- 小鼠樹突細胞.....	42
3.4.1.2	PCP 刺激 TLR4-/- 小鼠樹突細胞.....	42
3.5	餵食 PCP 於動物氣喘模式試驗.....	43
3.5.1	BALF 嗜酸性球及 T <sub>H</sub> 2 細胞素.....	43
3.5.2	BALF T <sub>H</sub> 1 細胞素.....	44
3.5.3	血清 OVA-specific-IgE 及 OVA-specific-IgG2a.....	44
3.5.4	肺部切片 H&E 染色結果.....	45
第四章	討論.....	46
4.1	PCP 活化樹突細胞之討論及其與 TLR4 路徑之相關性.....	46
4.2	PCP 透過活化樹突細胞誘導 T <sub>H</sub> 1 反應.....	47
4.3	餵食 PCP 於小鼠氣喘動物模式之討論.....	48
4.4	結論.....	50
第五章	參考文獻.....	51
附圖	.....	60



## 圖目錄

圖一、PCP 之 DE-52 層析、SDS-PAGE 及 PAS 醣染分析結果。.....	60
圖二、PCP 與脾細胞及 CD90.2 <sup>+</sup> T 細胞培養後之細胞活性。.....	61
圖三、PCP 刺激 BALB/c 脾細胞及 CD90.2 <sup>+</sup> T 細胞 IFN- $\gamma$ 分泌之活性。.....	62
圖四、PCP 可增加 BALB/c BMDCs 表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現量。.....	63
圖五、PCP 活化之 BMDCs 可提升 IL-6 及 IL-12p70 分泌結果。.....	64
圖六、PCP 預培養之 BMDCs 可促 DO11.10 T 細胞增生。.....	65
圖七、DO11.10 T 細胞與 PCP 預培養之 BMDCs 培養後 IFN- $\gamma$ 及 IL-4 分泌量。.....	66
圖八、與 PCP 共培養之 TLR2 <sup>-/-</sup> BMDCs 表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現。.....	67
圖九、與 PCP 共培養之 TLR4 <sup>-/-</sup> BMDCs 表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現。.....	68
圖十、與 PCP 共培養之 TLR2 <sup>-/-</sup> 及 TLR4 <sup>-/-</sup> 樹突細胞 IL-6 分泌量。.....	69
圖十一、動物氣喘模式之試驗步驟。.....	70
圖十二、餵食 PCP 可降低 BALB/c 小鼠 BALF 之嗜酸性球數。.....	71
圖十三、口服 PCP 之氣喘小鼠 BALF T <sub>H</sub> 2 細胞素 IL-4、IL-5 及 IL-13 分泌。.....	72
圖十四、口服 PCP 氣喘小鼠 BALF 之 T <sub>H</sub> 1 細胞素 IFN- $\gamma$ 分泌。.....	73
圖十五、口服 PCP 氣喘小鼠血清之 OVA 特異性 IgE 及 IgG2a 分泌。.....	74
圖十六、H&E 染色之小鼠肺部切片。.....	75

## 縮寫對照表



Alum	aluminum hydroxide
APC	antigen-presenting cell
BALF	bronchoalveolar lavage fluid
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
CD	cluster of differentiation
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
ConA	concanavalin A
DC	dendritic cell
DE-52	diethylaminoethyl cellulose
DI water	distilled water
DMSO	dimethyl sulfate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
FPLC	fast protein liquid chromatography
H&E stain	hematoxylin and eosin stain
HBSS	Hanks' balanced salts
IFN- $\gamma$	interferon-gamma
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
mAb	monoclonal antibody
MACS	magnetic-activated cell sorting



MFI	mean fluorescent intensity
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl) tetrazolium salt
OVA	Ovalbumin
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
PAS	periodic acid-Schiff's stain
PBS	phosphate buffered saline
PCP	<i>Poria cocos</i> proteins
PE	phycoerythrin
RBC	red blood cell
RPMI	Roswell Park Memorial Institutemedium
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
T <sub>H</sub> cell	T helper cell
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor



## 第一章 緒論

### 1.1 茯苓之前人研究

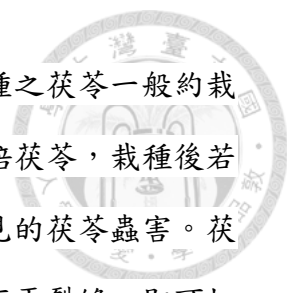
#### 1.1.1 茯苓簡介

茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf]，又名茯靈、茯兔、玉靈、松薯、松苓、松柏芋或萬靈桂，為真菌界 (Fungi) 擔子菌門 (Dikarya) 傘菌綱 (Agaricomycetes) 多孔菌目 (Polyporales) 多孔菌科 (Polyporaceae) 臥孔菌屬茯苓種之乾燥菌核 (sclerotium)，其菌核呈球形或不規則塊狀，表皮呈粗瘤狀皺縮、淡灰棕色或黑褐色，內部則為白色或粉色，而易與之混淆的菝葜科植物土茯苓，其外皮則為黃棕色或黑褐色。產地多分布於中國大陸雲南、河南、山東、安徽、浙江、福建、廣東、廣西、湖南、湖北等地 (張等，2008)。

茯苓屬於藥食兩用的藥材，在《神農本草經》中，茯苓被列為上品，其性平、味甘淡，歸心、脾、肺、腎經，具有利水滲濕、健脾胃、寧心安神之作用 (Ríos, 2011)，適用於水腫尿少、脾虛、消化不良、食慾不振、心神不安、失眠多夢、口焦舌乾者，尤以對婦女及老年人之滋補效果最佳，近年的研究也證明茯苓中富含的茯苓多糖可增強人體免疫功能，提升抗病能力 (張等，2008；趙與林，2004)。市面上常見的產品則有茯苓餅、茯苓糕及茯苓粉等，常見的茯苓料理則為四神湯及茯苓蓮子粥 (張等，2008)。

#### 1.1.2 茯苓之生長與栽種

根據《本草經》、《淮南子》及《本草圖經》之記載，野生茯苓多季生於排水良好、乾燥向陽山地的松科植物根部，例如馬尾松或赤松。而在《藝文類聚》及《抱朴子》兩書中也提到，野生之茯苓常與菟絲共生，因此生有茯苓之松科植物底部土壤面上通常可見有白色菌絲，此特徵為藥農尋找野生茯苓的明顯標誌 (王，2011)。



野生茯苓一般在 7 月到次年 3 月間進入成熟期，而人工栽種之茯苓一般約栽種 8-10 個月後採收 (楊，2013)。藥農通常使用段木及松針栽培茯苓，栽種後若窖面土出現龜裂紋，表示已有茯苓於此生長，黑翅白蟻則是常見的茯苓蟲害。茯苓成熟指標則可藉由以土壤表面裂縫來觀察，若經過一段時間不再裂縫，即可扒開土面觀察菌核表皮是否粗糙並呈黃褐色或棕褐色，並在未出現白色裂紋時即可採收，通常選擇晴天挖出茯苓，去除表面泥土後蓋稻草並放於室內使茯苓脫水，等外皮有皺紋後削皮乾燥而得 (傅等，2002；楊，2013)。

### 1.1.3 茯苓之成分

經現代科學分析，茯苓的植物化學成分 (phytochemical compounds) 包含多醣類 (polysaccharides)、三萜類 (triterpenoids)、固醇類 (steroids)、胺基酸 (amino acids)、膽鹼 (choline)、組氨酸 (histidine)、及鉀鹽 (potassium chloride) 等 (Ríos, 2011; Sun, 2014)，主要成分則包含多醣類，例如  $\beta$ -茯苓聚糖 ( $\beta$ -pachyman)，以及三萜類，例如栓菌酸 (trametenolic acid)、塊苓酸 (tumulosic acid)、齒孔酸 (eburicoic acid)、松苓酸 (pinicollic acid) 及乙醯茯苓酸 (pachymic acid) (Ríos, 2011)。其中多醣類能增加免疫系統刺激物的分泌，並減少免疫抑制分子的產生而刺激免疫反應 (Sun, 2014)，而三萜類則有抑制類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)、牛皮癬 (psoriasis)、自體免疫性葡萄膜炎 (autoimmune uveitis)、膿毒性休克 (septic shock) 以及支氣管過敏 (bronchial asthma) 的能力 (Ríos, 2011)。

#### 1.1.3.1 多醣類

從茯苓分出的多糖結構包括  $\beta$ -糖苷鍵 (glycosidic linkage)、甘露聚糖 (mannan)、 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖 (glucan)、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖或 (1 $\rightarrow$ 6)-branched-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-半乳聚糖 (galactan) (Sun, 2014)。在 1970 年時，Chihara 等人便已從茯苓菌絲體中分離出含  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-線性葡聚糖、具有抗腫瘤活

性之茯苓多醣，其 MW 約為  $1 \times 10^6$  (Chihara *et al.*, 1970)。Wang 等人 (2004) 從茯苓菌核中分離出 6 種多醣，其中以主鏈 (1→3)-β-吡喃葡萄糖 (glucopyranose) 及支鏈 (1→3)-β-D-葡聚糖構成的 β-茯苓聚糖為主，佔乾重 85.4-93% (Wang *et al.*, 2010)，其餘也含有 D-葡萄糖 (D-glucose)、D-甘露糖 (D-mannose)、D-岩藻糖 (D-fucose) 等雜多醣 (heteropolysaccharides) (Wang *et al.*, 1995)。茯苓多醣類的生理活性研究相當廣泛，可抗氧化、抗發炎、抗菌、增強體液免疫、細胞免疫或非特異性免疫，並可於動物試驗中發揮抗腫瘤的作用 (Sun, 2014)。

#### 1.1.3.2 三萜類

茯苓三萜類多為非環狀之碳 30 前驅體 (acyclic 30-carbon precursors) (Xu *et al.*, 2005)。Tai 等人於茯苓菌核表皮中分離出茯苓酸 (poricoic acid) A、茯苓酸 B、羊毛固醇型 (lanostane) 及 3,4-開羊毛固醇型 (secolanostane) 之三萜類化合物 (Tai *et al.*, 1993; Tai *et al.*, 1995a)。Akihisa 等人更於 2007 年在茯苓菌核表皮中分離出 35 種化合物，其中還包含了 15 種新發現的茯苓三萜類，包含 6 個以羊毛固醇型為主的三萜酸類。這些茯苓三萜類能使抗腫瘤活性增加 (Akihisa *et al.*, 2007)，並有抗催吐等作用 (Tai *et al.*, 1995b)。

#### 1.1.4 茯苓之生物活性

##### 1.1.4.1 抗腫瘤活性

茯苓萃取物抑制腫瘤細胞的研究相當廣泛。在多醣類的部分，由茯苓菌絲體中萃取、主成分為 (1→3)-(1→6)-β-D-葡聚糖的茯苓多醣，可抑制人類前骨髓性血癌細胞 HL-60 增生 (Chihara *et al.*, 1970)。不論是體外試驗 (*in vitro*) 或腹腔注射 (intraperitoneally, i.p.) 的體內試驗 (*in vivo*) 中，皆有抑制肝癌細胞 HepG2 的抗癌活性 (Jin *et al.*, 2003)。Huang 等人則是發現茯苓菌絲體的水溶性磷酸化



(1→3)- $\alpha$ -D-葡聚糖可抑制肉瘤細胞 Sarcoma 180 及肝癌細胞 HepG2 的增生，並使 HepG2 細胞凋亡 (Huang *et al.*, 2006 ; Huang and Zhang, 2011)。

在三萜類的部分，由茯苓菌核皮層萃取之 25-甲氧基茯苓酸 A (25-methoxyporicic acid A) 可抑制淋巴瘤細胞 (Raji cells) 中人類疱疹病毒 (Epstein-Barr virus) 早期抗原活化，在體內試驗也可抑制皮膚癌腫瘤細胞的生長 (Akihisa *et al.*, 2009)。乙醯茯苓酸則是透過磷酸化 Bcl-2 及活化 caspases-9 和 caspases-3 使得前列腺癌細胞粒線體產生功能障礙，讓前列腺素和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 的合成受抑制而造成癌細胞凋亡 (Gapter *et al.*, 2005)。茯苓開羊毛固醇型的三萜類則可抑制肺癌細胞 A549 及前列腺癌細胞 DU145 之增生 (Zhou *et al.*, 2008)。茯苓三萜類萃取物也可透過下調金屬蛋白酶-7 (metalloproteinase-7) 之作用以抑制胰臟癌細胞系 Panc-1、MiaPaca-2、AsPc-1 及 BxPc-3 的增生 (Cheng *et al.*, 2013)。

#### 1.1.4.2 抗發炎

茯苓的抗發炎成分多為三萜類，研究指出使用乙醇萃取之茯苓菌核粉可透過抑制 NF- $\kappa$ B 之路徑以減少受 LPS (lipopolysaccharide) 刺激之 Raw 264.7 巨噬細胞產生 NO、prostaglandin E2 (PGE2)、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )，抑制發炎反應 (Jeong *et al.*, 2014)。Lu 等人由茯苓菌絲體多糖中分離出對內皮細胞 (endothelial cells) 無毒性的水溶性 (1→6) 支鏈 (1→3)- $\alpha$ -D-半乳糖，其以劑量效應趨勢抑制 IFN- $\gamma$  的產生，減少發炎反應，而對癌細胞的細胞毒性或抗血管生成活性則無影響 (Lu *et al.*, 2010)。Fuchs 等人由茯苓菌核中以甲醇萃出包含塊苓酸、開羊毛固醇及茯苓酸之三萜類萃取物，並將此萃取物塗抹於皮膚炎患者進行人體試驗，以為期 4 天的反覆測試後，發現此茯苓萃取物可減少患者皮膚發炎反應強度 (Fuchs *et al.*, 2006)。



#### 1.1.4.3 抗氧化

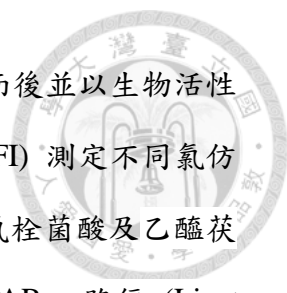
由茯苓菌核中以不同濃度的過氧化氫 (dihydrogen dioxide,  $H_2O_2$ ) 萃取之三種雜多醣具有可清除烴基自由基、ABTS 自由基與鐵離子的活性，且可防止 DNA 受到 UV 輻照及雙氧水的破壞 (Tang *et al.*, 2014)。以熱水或乙醇萃取之茯苓萃取物則皆有 DPPH 自由基清除能力 (Lee *et al.*, 2010)。茯苓中的 (1→3)- $\beta$ -D-葡聚醣 (glucan) 氧化後，其水溶性會提升，並可增加體外試驗之自由基清除活性 (radical scavenging activity) (Wang *et al.*, 2010)。茯苓水萃物 (*Poria cocos* water extract, PCW) 5-125  $\mu$ g/mL 則可抑制與 20  $\mu$ M  $\beta$ -澱粉狀蛋白 (amyloid) 培養 48 小時而造成的 PC12 細胞氧化壓力，證明 PCW 具有抗細胞凋亡 (antiapoptotic) 之功能，達到保護細胞的目標 (Park *et al.*, 2009)。

#### 1.1.4.4 抗菌

茯苓菌絲萃取物可抑制四種格蘭氏陽性菌 (gram-positive bacteria) 金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)，枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 及鏈球菌 (*S. faecalis*) 之生長 (Lee *et al.*, 1982)。而將茯苓之乙醇萃取物與煙麴黴 (*Aspergillus fumigatus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、鮑氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及金黃色葡萄球菌培養後，發現茯苓乙醇萃取物有抑制以上菌種之活性 (Zhang *et al.*, 2013)。證明茯苓具有抑制細菌及真菌生長的能力。

#### 1.1.4.5 降血糖

於體外試驗中，分別使用茯苓熱水萃取物、乙醇萃取物及超音波萃取物進行酵素抑制試驗，發現茯苓的熱水萃取物及超音波萃取物具有較好的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (glucosidase) 抑制作用，乙醇萃取物則可抑制  $\alpha$ -澱粉酶 (amylase) 之活性 (Lee *et al.*, 2010)。用第二型糖尿病小鼠 (db/db mice) 餵食 50 mg/kg 茯苓三萜類粗萃取



物，發現其餐後血糖值 (postprandial blood glucose) 明顯降低，而後並以生物活性導向分離法 (bioactivity-directed fractionation and isolation, BDFI) 測定不同氯仿 (chloroform) 分餾成分之抗高血糖效能，發現脫氫塊苓酸比脫氫栓菌酸及乙醯茯苓酸具有更好的抗高血糖能力，但此三萜類萃取物無法活化 PPAR- $\gamma$  路徑 (Li *et al.*, 2011)。於松苓新酸 (dehydrotrametenolic acid) 餵食第二型糖尿病小鼠的研究中，則發現茯苓新酸可透過增加胰島素之敏感性使小鼠之餐後血糖值下降，且此刺激路徑也不屬於 PPAR- $\gamma$  路徑，故茯苓之三萜類萃取物能透過非 PPAR- $\gamma$  之路徑增強胰島素敏感性，以減少餐後血糖值 (Sato *et al.*, 2002)。

#### 1.1.4.6 腎保護作用

茯苓菌核水萃物 WPC 與小鼠腎集合管上皮細胞 IMCD-3 培養之體外試驗中，可減少細胞的高滲透壓力及水通道蛋白 Aquaporin-2 (AQP2) 之 mRNA 表現量，提升張力應答增強結合蛋白 (Tonicity-responsive enhancer binding protein, TonEBP) mRNA 的表現，以減緩腎細胞受高滲透壓影響而死亡的情形 (Lee *et al.*, 2012)。餵食茯苓多醣給腎發炎之大鼠 10 天後，發現其可降低尿蛋白排泄量以及血清膽固醇之上升情形，並使血清補體 (serum complement) CH50 下降，於腎小球 (glomeruli) 之病理組織切片中也可觀察到餵食茯苓多醣能減少腎小囊中的細胞黏附情形，故茯苓多醣具有抗原始型腎發炎之活性 (Hattori *et al.*, 1992)。餵食 200 mg/kg 茯苓菌核皮層之乙醇萃取物 FLP (Fu-Ling-Pi) 則可透過降低體內排尿量及腎重指標、提升血細胞比容 (hematocrit) 來抑制腺嘌呤誘導的慢性腎臟病 (Zhao *et al.*, 2013b)。以 UPLC Q-TOF/HSMS (quadrupole time-of-flight high-sensitivity mass spectrometry) 及 MS<sup>E</sup> (mass spectrometry<sup>Elevated Energy</sup>) 則可知乙醇萃取物 FLP 透過參與脂肪酸代謝、磷脂代謝、嘌呤代謝及色胺酸代謝等主要代謝途徑，來增強腎保護作用，預防早期腎損傷 (Zhao *et al.*, 2013a)。



## 1.2 茯苓蛋白之前人研究

### 1.2.1 茯苓蛋白 PCP 之生化特性

本實驗室之張慧欣學姊經由硫酸銨蛋白沉澱、透析、DEAE-52 陰離子交換管柱及 FPLC (fast protein liquid chromatography) 層析，由茯苓菌核中萃取出茯苓免疫調節蛋白 PCP (*Poria cocos* protein)，跑 native-PAGE 電泳及 FPLC 後觀察到一波峰，由蛋白通過 FPLC 管柱的時間推測 PCP 分子量約 35.6 kDa，而以 SDS-PAGE 電泳分析及醣蛋白染色則可知 PCP 包含分子量為 21.3 kDa 之醣蛋白單元及 14.3 kDa 之蛋白單元。由 21.3 kDa 及 14.3 kDa 蛋白片段之胺基酸組成比例結果則可得知兩蛋白單元之胺基酸組成相似 (張，2009；Chang and Sheu, 2009)，推測其蛋白組成應為同一蛋白，而由螢光染色法可得知茯苓蛋白 PCP 存在於茯苓菌絲的細胞壁、細胞膜及細胞核部位中 (張，2005)。

在 PCP 的基因選殖上，呂雅婷學姊利用 PCP 的 N 端胺基酸序列合成 PCP 之引子，並利用 rapid amplification cDNA end (RACE) 方法選殖出長約 807 bp、open read frame (ORF) 為 579 bp 之 cDNA，選殖的基因序列轉譯出的胺基酸片段約為 194 個，分子量為 12.765 kDa，且以軟體推測醣化形式與位置預測後，得知其胺基酸序列於第 142 個位置可能具有 N-glycosylation 之修飾作用。將序列轉至大腸桿菌株製成 (His)<sub>6</sub>-PCP 重組蛋白，並以張慧欣學姊所做出的 anti-PCP 單株抗體進行西方轉漬法分析，預估此重組蛋白大小約 17-26 kDa (呂，2011；Lu *et al.*, 2014)。

### 1.2.2 茯苓蛋白 PCP 之生物活性

#### 1.2.2.1 PCP 於 APCs 之影響

在張慧欣學姊過去的研究中，發現茯苓免疫調節蛋白 PCP 可活化 RAW 264.7 巨噬細胞，使其分泌一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及腫瘤壞死因子 TNF- $\alpha$ ，


並提高 RAW 264.7 之 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、IL-18 mRNA 的表現量 (張, 2005)。

PCP 也可活化小鼠腹腔巨噬細胞 (peritoneal macrophages), 使其增加 MHC-II 及 CD86 的表現, 分泌 NO、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$ , 並提高腹腔巨噬細胞 NF- $\kappa$ B、TRAF6、TIRAP 及 MyD88 mRNA 的表現量, 且 PCP 與腹腔巨噬細胞培養 8 小時後可使 Toll-like receptor 4 (TLR4) 之 mRNA 表現量上升, 而去除醣蛋白後的 PCP 雖然無法使 TLR4 mRNA 表現增加, 但其仍會使腹腔巨噬細胞分泌 TNF- $\alpha$ , 且在 TLR4<sup>-/-</sup> C57BL/10ScN 小鼠的腹腔巨噬細胞中, PCP 無法與其腹腔巨噬細胞結合, 故 PCP 是經由 TLR4 受器及 MyD88 傳導路徑以活化腹腔巨噬細胞的免疫刺激物, 且 PCP 之醣蛋白單元有助於其與 TLR4 之鍵結 (張, 2009; Chang and Sheu, 2009)。此外, 在 LAL (*Limulus amoebocyte lysate*) 凝血試驗中則得知 PCP 對細胞無毒性 (張, 2005)。

#### 1.2.2.2 PCP 於 T 細胞之影響

在脾細胞之共培養的研究上, PCP 可活化小鼠脾細胞, 促使其中的 CD4<sup>+</sup> T 細胞及 B 細胞之增生, 誘導 T<sub>H</sub>1 細胞分化並分泌  $\gamma$  干擾素 (interferon gamma, IFN- $\gamma$ ), 並使脾細胞 IL-12 及 IFN- $\gamma$  表現量上升, 且不使脾細胞分泌 IL-4 (張, 2005; Chang and Sheu, 2009)。

PCP 單獨與 T 細胞共培養時, 無法使 T 細胞活化及分泌 IFN- $\gamma$ , 而在有 anti-CD3/CD28 mAbs 存在的情況下, PCP 與小鼠 CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> T 細胞共培養後可使細胞活化及增生, 並增加 CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> T 細胞的 CD44 及 CD69 表面分子表現情形 (張, 2009), 此外, 去醣後的 PCP 仍可使 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞分泌 IFN- $\gamma$  (張, 2009), 推測 PCP 具有能促使處女 T 細胞 (T<sub>H</sub>0) 分化為 T<sub>H</sub>1 細胞之能力。



為了確認 PCP 是否確實誘導  $T_H1$  細胞分化，於免疫沉澱試驗中使用 PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與 anti-CD3/CD28 mAbs 及 T 細胞共培養，發現 PCP 可刺激 T 細胞之  $T_H1$  轉錄因子 (transcription factor) 轉錄訊息傳遞及活化子蛋白 4 (signal transducer and activator of transcription 4, STAT4) 表現，且表現量隨時間增加而上升，並使 T-bet (T-box expressed in T cells) 的 mRNA 表現上升 4.6 倍，且不會增加  $T_H2$  轉錄因子 STAT6 表現，證明 PCP 的確可刺激  $T_H1$  細胞分化 (張，2009；Lu *et al.*, 2014)。

於類異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 小鼠模式試驗中，餵食 PCP 可降低淋巴結細胞之 IL-4 及 IL-5 分泌量、脾細胞之 IL-5 分泌濃度、以及血清中 OVA-specific IgG1、OVA-specific IgE 之 EU 值，並可提升脾細胞 IFN- $\gamma$  分泌量與血清 OVA-specific Ig2a 之含量，故餵食 PCP 可抑制致敏鼠體內之  $T_H2$  免疫反應 (呂，2011；Lu *et al.*, 2014)。

### 1.3 樹突細胞

#### 1.3.1 樹突細胞簡介

樹突細胞 (dendritic cell, DC) 以及自然殺手細胞 (nature killer cell, NK cell) 是先天性免疫系統 (innate immunity system) 及適應性免疫系統 (adaptive immunity system) 中重要的抗原呈現細胞 (antigen presenting cell, APC)，樹突細胞因其成熟時會於細胞周圍伸出樹突樣或偽足樣突起而得名，其約佔全部細胞的 1-2%，可參與、調控免疫反應平衡。樹突細胞有許多種類，包括濾泡樹突細胞 (follicular dendritic cell, FDC)、淋巴樹突細胞 (lymphoid dendritic cell, LDC)、並指狀細胞 (interdigitating cell, IDC) 及郎格罕細胞 (Langerhans cell, LC) (Banchereau and Steinman, 1998; Banchereau *et al.*, 2000)。未成熟之樹突細胞 (immature dendritic cell) 則可由淋巴前驅細胞或是骨髓前驅細胞 (bone marrow precursor cell) 受 GM-CSF 刺激分化而來 (Wei *et al.*, 2011)。



### 1.3.2 樹突細胞之活化

尚未辨認過病原體蛋白的未成熟樹突細胞多存在於上皮細胞及大部分的器官，表面具有主要組織相容複合體 (major histocompatibility complex, MHC) I、II 等受體 (receptor) 可辨識細胞表面的蛋白聚醣 (proteoglycan) 等病原體特徵，也可利用 DCE205 受體吞噬抗原 (Witmer-Pack *et al.*, 1995)，或是使用 Fc 受體 (FcR) 與免疫球蛋白系之抗體 Fc 結構鍵結，例如 Fc $\gamma$ RI (CD64) 及 Fc $\gamma$ RIII (CD16) 及 Fc $\gamma$ RII (CD32) (Fanger *et al.*, 1996)。未成熟之樹突細胞在淋巴組織中一旦辨認了病原體、受感染細胞、死細胞或其他可用於抗原傳遞之物質，便會被活化成具有高效能之抗原呈現細胞，並遊走至血液、鄰近的周圍組織、淋巴系統、培氏斑 (Peyer's patch) 及淋巴結 (lymph node) 呈現病原體的蛋白胜肽，成為可活化淋巴細胞的專一性細胞，達到辨識抗原、調節胞內運輸與降解作用，以及 MHC 分子的訊息傳遞 (Guermónprez *et al.*, 2002)。

### 1.3.3 樹突細胞之表面分子

在 APC 上被描述最為詳細的輔助刺激分子是兩個結構類似的醣蛋白受體 B7.1 (CD80) 及 B7.2 (CD86)，合稱為 B7 分子，可與 T 細胞表面之 CD28 或 CTLA-4 (CD152) 結合，刺激細胞增生或死亡 (Alegre *et al.*, 2001)，而樹突細胞之 CD40 與 CD40 配體 CD154 結合則可傳送活化訊息給 T 細胞 (van Kooten and Banchereau, 2000)，並活化表現 B7 分子的 APC，使 T 細胞更進一步增生 (Bedi and Mead, 2012; Vremec and Shortman, 1997)，CD11c 則是常在樹突細胞上出現的受體，也有少部分出現在單核球上 (Banchereau and Steinman, 1998)。

### 1.3.4 樹突細胞活化路徑

樹突細胞活化路徑 TLR 1-10 可傳遞病原體的訊息並活化樹突細胞分泌多種細胞素 (cytokine)，誘發病原體特異性免疫反應 (Luster, 2006; van Duin *et al.*,

2006)，但在 TLR3/4/9 被活化後，樹突細胞上的 CD11c 分子表現則會下降 (Singh-Jasuja *et al.*, 2013)。

最常見的樹突細胞活化例子是使用革蘭氏陰性菌的脂多醣體 (Lipopolysaccharide, LPS) 之試驗，樹突細胞表面具有辨認 LPS 之受體，此受體與 TLR4 相關，可活化 NF $\kappa$ B 轉錄因子並表現 B7 分子，使樹突細胞能與處女 T 細胞交互作用 (Lu *et al.*, 2008; Michielsen *et al.*, 2012)。而革蘭氏陽性菌的脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 及肽聚糖 (peptidoglycan) Pam3CSK4 (Pam3CysSerLys4) 則可活化 TLR2 並傳遞訊息 (van Duin *et al.*, 2006)。

### 1.3.5 樹突細胞分泌之細胞素及功能


細胞素是由細胞所釋出一種蛋白質，會影響其他具有此細胞素受體的免疫細胞，造成免疫反應或發炎反應 (inflammation) 的發生，例如樹突細胞受活化後，會分泌 IL-6 以活化淋巴細胞，增加抗體產生；IL-12 則可活化自然殺手細胞 (nature killer cell) 及誘使輔助型 T 細胞 (T helper cell, T<sub>H</sub> cell) 分化成 T<sub>H</sub>1 (type 1 T helper cell) 細胞 (Cook *et al.*, 2012)，且輔助型 T 細胞分泌之 IFN- $\gamma$  會使樹突細胞透過過氧化亞硝酸鹽依賴機制 (peroxynitrite-dependent mechanism) 毒殺癌細胞之能力增加 (LaCasse *et al.*, 2011)；IL-10 則會抑制 T<sub>H</sub>1 細胞的分化，並使免疫反應導向 T<sub>H</sub>2 型 (Liew, 2002; Neurath *et al.*, 2002)。

## 1.4 輔助型 T 細胞

### 1.4.1 輔助型 T 細胞之活化

淋巴細胞有兩大類型，第一種是於骨髓中成熟的 B 淋巴細胞 (bone-marrow-derived lymphocytes, B lymphocytes)，第二種則是於胸腺中成熟的 T 淋巴細胞 (thymus-derived lymphocytes, T lymphocytes)。T 細胞又以不同的表面分子而分為 CD4<sup>+</sup> 或 CD8<sup>+</sup> 兩種亞群 T 細胞，前者可幫助抗體之生成，故又被稱為輔助型 T






細胞，後者則可直接將受病原體感染的標靶細胞裂解，因此又被稱為細胞毒殺型 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) (Liew, 2002)。未接觸過抗原的小型 T 細胞稱為處女淋巴細胞 (naïve lymphocytes)，可辨識表現抗原胜肽的 MHC-II。樹突細胞可分泌趨化因子 (chemotactic cytokines, CCK) 使 T 細胞聚集，當 T 細胞認識到樹突細胞等抗原呈現細胞表面上被表現的特定抗原後，便會開始增殖 (proliferate) 並分化 (differentiate) 成抗原專一性 T 細胞 (antigen-specific T cell)，成熟的淋巴細胞會持續在血液及淋巴組織間循環流動，並啟動細胞調節免疫反應 (cell-mediated immune response) (Banchereau and Steinman, 1998)。

#### 1.4.2 T<sub>H1</sub> 型及 T<sub>H2</sub> 型輔助 T 細胞簡介

輔助型 T 細胞表面會表現 CD4 表面分子，此 T<sub>H</sub> 細胞分為兩個亞群，分別為 T<sub>H1</sub> 及 T<sub>H2</sub> 輔助型細胞。當 APC 呈現之抗原胜肽數量多，且與 T 細胞受體結合能力強時，會使免疫反應導向 T<sub>H1</sub>，反之則為 T<sub>H2</sub>，因此 APC 之抗原呈現能力相當重要 (Neurath *et al.*, 2002)。而基因遺傳或環境因素也會透過 T 細胞受體 (T-cell receptor, TCR) 的配體、共刺激分子的活化、其他 T 細胞分化的細胞素或是活化後增益的細胞分裂使得 T<sub>H1</sub> 或 T<sub>H2</sub> 細胞分化 (Romagnani, 2004)。

T<sub>H1</sub> 細胞會受到 IFN- $\gamma$  及 IL-12 所誘發而分化 (Bedi and Mead, 2012; Cook *et al.*, 2012)，並促使轉錄訊息傳遞及活化子蛋白 STAT4 和 T-bet 表現並增加 IFN- $\gamma$  之分泌量 (Romagnani, 2004)，IL-10 則是會抑制其分化，T<sub>H1</sub> 細胞會釋出 IL-2、IFN- $\gamma$  及 TNF- $\beta$  等細胞激素及趨化激素 (chemokine) 吸引巨噬細胞至感染部位，IFN- $\gamma$  更可活化巨噬細胞以吞噬細菌及增強 MHC 抗原呈現能力，並誘使 B 細胞分泌調理性免疫球蛋白 G2a (immunoglobulin G2a, IgG2a) 抗體，使外來病原體更易被細胞吞噬 (Liew, 2002)。

T<sub>H2</sub> 細胞則會受到細胞素 IL-4、IL-13 誘發分化，其啟動反應可在無 TLR 路徑的情況下被執行 (Romagnani, 2004)，使 STAT6 及 GATA-3 磷酸化，使得



IFN- $\gamma$  的生成受到抑制，並上調  $T_H2$  細胞素 IL-4、IL-5、IL-9 及 IL-13 的分泌，其中 IL-4 及 IL-13 會活化 B 細胞分泌體液免疫性之免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 使肥大細胞 (mast cell) 釋放化學物質，造成氣喘等過敏反應，並破壞細胞外之病原體 (Liew, 2002; Neurath *et al.*, 2002)，IL-5 則可使嗜酸性球 (eosinophil) 產生，並與 IgE 結合而增強過敏反應 (Romagnani, 2004)。


## 1.5 過敏性氣喘與 Th 免疫反應之相關性

### 1.5.1 過敏反應簡介

過敏通常是指第一型過敏反應 (type I allergic reaction) 或是由 IgE 引起的即時性過敏反應 (immediate-type hypersensitivity reaction)，常見的疾病則包括氣喘、結膜炎、鼻竇炎、食物過敏、特異性皮膚炎、血管性水腫、蕁麻疹、以及昆蟲和藥物過敏 (Holgate and Polosa, 2008)。過敏反應的發生與表現則是與基因遺傳多型性或是與環境的交互作用有關，過去十幾年在美國及歐洲等西方國家，幾乎有一半以上的人會對環境中常見的抗原產生過敏反應，因此受到環境因子影響而過敏的患病機率相當高，尤其是在季節變化或環境汙染時更容易使患病率升高 (Romagnani, 2004)。

### 1.5.2 過敏反應之免疫發生步驟

當人體接觸到過敏原 (allergen) 時，TLR 路徑的受刺激情形會降低，並激活 GATA-3 使細胞進行  $T_H2$  細胞介導的免疫反應，刺激特異性過敏反應發生， $T_H2$  細胞分泌 IL-4、IL-13 促使 B 細胞合成 IgE，IL-4、IL-9 及 IL-13 並使肥大細胞聚集，IL-3、IL-5 及 GM-CSF 則會使嗜酸性球及嗜鹼性球成熟 (Holgate and Polosa, 2008)，B 細胞分泌之 IgE 可與肥大細胞上的 IgE 高親和力受體 Fc $\epsilon$ RI 受體結合，嗜酸性球及嗜鹼性球也會表現 Fc $\epsilon$ RI，並使嗜酸性球釋出促發炎因子，例如半胱胺酸白三烯 (cysteinyl leukotrienes)、陽離子蛋白、嗜酸性球過氧化酶、



主要鹼性蛋白及嗜酸性粒細胞原神經毒素 (neurotoxin) 等鹼性蛋白質，誘導 IgE 活化肥大細胞釋放組織胺 (histamine)、白三烯、血小板活化物 (platelet-activating factor, PAF) 細胞素等自體有效媒介物質 (autacoid mediators)，使血管內皮細胞表現 P-選擇素 (P-selectin) 及 E-選擇素，讓白血球在在血管壁上滾動，造成細胞間粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM1) 和血管細胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 與整合素 (integrin) 受體進行交互作用，抓住白細胞並協助其通過血管周圍的空間，此為早期過敏反應，通常為 1-30 分鐘，接著隨著細胞素及趨化因子，如 CC-趨化因子配體 2 (CCL2)、CCL3、CCL5 (RANTES)、CCL7、CCL8、CCL13 (單核細胞趨化蛋白 1-4)、CCL24 及 CCL26 (eotaxins1-3) 的釋出，使得巨噬細胞、嗜酸性球及嗜鹼性球聚集，稱為後期過敏反應，時間會持續達 6-72 小時，這一連串的反應稱為過敏反應 (Holgate and Polosa, 2008 ; Humbert et al., 1999)。

### 1.5.3 過敏性氣喘簡介

過敏性氣喘 (asthma) 是常見的過敏反應，氣喘患者的上皮細胞容易受到氧化壓力而造成傷害，過敏原活化下呼吸道黏膜之肥大細胞後，會造成支氣管收縮、慢性發炎，而存在於表皮、神經細胞、血管及纖維母細胞生長因子的 IL-13 也會誘導杯狀細胞 (goblet-cell) 組織特化、黏膜上皮化生 (metaplasia)、分泌黏液、氣管壁重組，造成肺部氣體進出不易、呼吸困難 (Holgate and Polosa, 2008; Larche *et al.*, 2006)。雖然對於人類在兒童時期時減少接觸到致病性或非致病性的過敏原和微生物是否會使體內免疫反應變化仍在研究以及議論階段，但在小鼠的試驗中則發現 6 週大幼年期小鼠的口服耐受性的確比 18 個月大的老年鼠佳，並使抗原特异性 IgE 及 IgG1 下降 (Birmingham *et al.*, 2013)，且樹突細胞及自然殺手細胞的 TLR 受刺激情形與 IL-12、IFN- $\gamma$  及 IFN- $\alpha$  細胞素分泌量也會隨著年齡增長而

下降，使得免疫反應無法被導向至  $T_H1$ ，因此過敏反應的發生也與年齡有相關性 (Romagnani, 2004)。



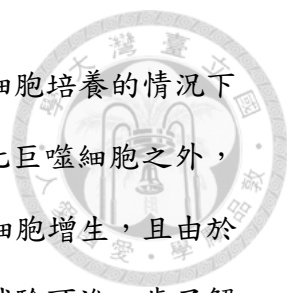
#### 1.5.4 如何透過調控 $T_H$ 免疫反應抑制過敏反應

在減低過敏情形的方法上，除了盡量少接觸過敏原以避免過敏反應發生、吸入腎上腺皮質類固醇 (corticosteroid)、短效性及長效性  $\beta_2$  腎上腺素受體激動藥 (short- and long-acting  $\beta_2$  adrenoceptor agonists, SABAs and LABAs) 來降低  $T_H2$  反應及細胞素生成，並使氣管平滑肌放鬆之外，也可藉由誘導體內的  $T_H1$  反應來減輕過敏反應 (Holgate and Polosa, 2008; Humbert *et al.*, 1999)。由於過敏反應是受到微量的抗原刺激並產生 IgE 而造成的，且  $T_H2$  細胞會分化並分泌 IL-4、IL-13 活化 B 細胞及分泌更多 IgE，但在有 IFN- $\gamma$  存在的情況下可抑制 IL-4 刺激並產生 IgE 的能力，並聚集更多 T 細胞至過敏部位 (Larche *et al.*, 2006)。因此在過敏反應的研究中，過敏反應發生的原因除了調節性 T 細胞 (T-regulatory cells, Treg) 活性降低以外，缺乏使  $T_H2$  轉為  $T_H1$  型的過敏原特異性免疫反應也被認為是其中一個因素，因為 TLR 無法受到刺激並使細胞分泌 IL-12 及 IFN- $\gamma$  (Romagnani, 2004)。故希望樹突細胞接收到促炎因子訊號後產生 IL-12，使  $T_H1$  細胞分化以降低過敏反應 (Holgate and Polosa, 2008)。

#### 1.6 研究動機與目的

自傳統中醫學至現代生技研究中，金針菇、靈芝等真菌類的萃取物對於調節並改善免疫能力之研究相當廣泛，由此可知其萃取物作為健康食品有極大潛力，而在過敏反應的研究中，對於如何透過促進  $T_H1$  細胞分化以抑制  $T_H2$  細胞素產生及減少過敏反應強度，則是一大重要課題。

在本實驗室之前發表的論文中，已確認茯苓免疫調節蛋白 PCP 可活化小鼠巨噬細胞，且在 anti-CD3/CD28 mAbs 存在的情況下，PCP 可使 T 細胞活化、



增生並增加 IFN- $\gamma$  分泌濃度，但 PCP 在單獨與 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞培養的情況下無法使 T 細胞活化並分泌 IFN- $\gamma$ ，因此假設 PCP 除了可活化巨噬細胞之外，也會利用其他的抗原呈現細胞，如樹突細胞以間接活化 T<sub>H1</sub> 細胞增生，且由於樹突細胞活化後具有調節 T 細胞分化之能力，故希望藉由本試驗可進一步了解 PCP 調節 T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> 之機制。

茯苓蛋白 PCP 在萃取後，除了先以 SDS-PAGE 及醣蛋白染色確認萃取出的茯苓蛋白 PCP 之生化特性外，也藉由 PCP 與骨髓衍生樹突細胞之培養以知曉 PCP 是否能活化樹突細胞。接著利用 DO11.10 小鼠之 OVA 特異性 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞與受 PCP 刺激後的樹突細胞共培養，觀察 T 細胞免疫反應是否可被導向 T<sub>H1</sub> 及分泌 IFN- $\gamma$ ，以及其活化樹突細胞之路徑是否與 TLR2 或 TLR4 相關。最後於動物氣喘模式試驗中探討餵食 PCP 於受 OVA 致敏之氣喘小鼠，是否能使其體內的免疫反應導向 T<sub>H1</sub> 以抑制 T<sub>H2</sub> 免疫反應，減少小鼠的過敏情形。



## 第二章 材料與方法

### 2.1 茯苓蛋白之萃取與分子量檢測

#### 2.1.1 茯苓蛋白粗萃取

[材料]

#### 1. 茯苓樣品來源

購自益壽參藥行。中正區寧波西街 49 號。

#### 2. 化學藥品

- (1) Tris-base、硫酸銨 (ammonium sulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )、冰醋酸 (acetic acid) 購自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- (2) 氯化鈉 (sodium chloride, NaCl)、氯化氫 Hydrogen chloride (HCl)、2-mercaptoethanol 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

#### 3. 試劑

- (1) 蛋白萃取液：取 5 mL 之 2-mercaptoethanol、250 mL 之 acetic acid 及 90 克 NaCl，加入去離子水 (Deionized water, DI) 至 5 L 並混勻。
- (2) 1 M Tris buffer：將 157.6 克 Tris-base 加入 850 mL 去離子水，將 pH 調至 8.2 後，再加 DI 至 1 L。稀釋成 0.01 M 使用。

#### 4. 儀器設備及器材

- (1) 果汁機 Water blender
- (2) 超音波震盪儀 Heatsystem Sonicator XL2020
- (3) 低溫離心機 RC5C plus 購自 Sorvall-kendro (Newton, USA)
- (4) 減壓幫補 DOA-P104-A4 購自 Gast Manufacturiag Inc. (Europe)
- (5) 110 mm 濾紙購自 Whatman International Ltd. (England)
- (6) 透析袋 MW 3000-5000 購自 Spectrum Laboratories Inc. (USA)



## [方法]

將 0.7 公斤之茯苓浸泡於 5 L 蛋白萃取液，放於 4°C 冰箱 overnight，隔天將萃取液分批倒入果汁機，並以破碎 90 秒、置冰 90 秒的頻率進行三循環之破碎步驟，未進行此步驟之萃取液則置於碎冰塊中保持冷藏溫度。其次將破碎後之茯苓倒入燒杯中並置冰，用超音波震盪儀將強度調到 8，以震 10 秒、停 10 秒，各十分鐘的頻率再破碎。使用低溫離心機於 4°C 以 6900 rpm，40 分鐘離心後，收集上清液並以抽氣過濾機及 110 mm 濾紙過濾，加入 90% 之無水  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  於冰箱中攪拌 overnight 使蛋白沉澱，隔天在再以低溫離心機離心 6900 rpm，45 分鐘收集蛋白沉澱。沉澱物加入 0.01 M Tris buffer 回溶後，倒入透析袋 (MW 3000-5000) 浸泡於 0.01 M Tris buffer 中，於冰箱透析四天，期間須換浸泡之 Tris buffer，每日早晚各換一次。透析完後再以低溫離心機離心 9000 rpm，30 分鐘去除不溶物。

### 2.1.2 DE-52 陰離子交換管柱層析

#### [材料]

#### 1. 化學藥品

- (1) DE52 (Diethylaminoethyl cellulose) 購自 Whatman (Maidstone, Kent, UK)
- (2) NaCl、HCl 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
- (3) Tris-base 購自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)

#### 2. 試劑

1 M Tris buffer：將 157.6 克 Tris base 加入 850 mL DI，並用 1M HCl 將 pH 調至 8.2 後，再加 DI 至 1 L。稀釋成 0.5 M 及 0.01 M 使用。

#### 3. 儀器設備及器材

- (1) NanoDrop ND-1000 微量光譜儀購自 NanoDrop Technologies (Wilmington, DE, USA)



- (2) 梯度混合器 Gradient mixer
- (3) 幫浦管柱收集器 Pump column collector
- (4) 15 mL 離心管購自 Corning incorporated (NY, USA)

#### [方法]

##### 1. 管柱製備：

先以 Nano Drop 測  $A_{280}$  吸光值之蛋白濃度，算出總蛋白量，並秤取所需之 DE52 重量（由於 1 g DE52 可容納 0.7 g 蛋白，但會受到其他因素影響而降低收集蛋白的能力，因此以 1 g DE52 可收集 70 mg 蛋白來計算）。將 DE52 加入 300-360 mL 0.5 M Tris buffer（每 1 g DE52 加入 20 mL Tris buffer）輕攪混勻後靜置半小時，溶液分層後將上清液倒掉。加入 300 mL 0.01 M Tris buffer 攪拌混勻，靜置使溶液分層後倒掉上清液，重複此步驟兩次後加入 50 mL 0.01 M Tris buffer，攪拌後快速倒入層析管柱中，並打開下方閥讓多餘的 Tris buffer 流出，使液面高於 DE52 約 1.5 cm。將管柱移至冰箱並接上幫浦流通 0.01 M Tris buffer（流速 = 1.00 mL/min）overnight，隔天測定流下之 buffer pH 值，當 pH 大於 8.2 時即可放入 2 mm 玻璃珠約一公分高，並使液面維持高於玻璃珠 1-2 mm。

##### 2. 蛋白進樣：

蛋白液通入管柱前須先離心濃縮及過濾。讓蛋白液以 1.00 mL/min 之流速通入管柱，下方則以血清瓶收 unbind 液，觀察三分鐘確保管柱不會乾掉後，每 5-15 分鐘觀察流動情形，防止管柱流乾。蛋白液全通入管柱後，用另一血清瓶收 unbind 液，之後以 Nano Drop 測流洗液之  $A_{280}$  吸光值，當濃度約 0.01-0.02 mg/mL 即可進行下一步驟。

##### 3. 蛋白溶出、收集：

以 0.01 M Tris buffer 配置 0.5 M NaCl 約 150 mL，並準備 150 mL 0.01 M Tris buffer。將 gradient mixer、幫浦及 pump column collector 接好，15 mL 離心



管放到收集器中，並將 NaCl 及 Tris buffer 同時倒入 gradient mixer，設定收集器之總收集管數及每管收集體積後，便可將 gradient mixer 兩管之閥、攪拌器、幫浦及收集器開關打開，並使管柱液面高度維持高於 DE52 小於 1 mm。收集完成後，以 Nano Drop 測每一管之  $A_{280}$  吸光值，並收集主要波峰之蛋白液。1 kg 茯苓約可萃得 120 mg PCP。

### 2.1.3 蛋白去醣試驗 (Protein deglycosylation test)

[材料]

#### 1. 化學藥品

酵素性蛋白去醣套組 (Enzymatic protein deglycosylation kit) 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

#### 2. 儀器設備

細胞培養箱 Hera cell

[方法]

將萃取出之 100  $\mu\text{g}$  蛋白溶於 35  $\mu\text{L}$  DI 水中，加入 10  $\mu\text{L}$  5X reaction buffer，再加入酵素 PNGaseF、O-glycosidase、 $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3, 6, 8, 9)-neuraminidase solution、 $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactosidase 各 1  $\mu\text{L}$ ，於 37 $^{\circ}\text{C}$  培養箱中放 3 天後取出，並將 DI 置換成 PBS (phosphate buffered saline) 供後續實驗使用。

### 2.1.4 SDS 電泳 (SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis)

[材料]

#### 1. 化學藥品

(1) APS、N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED)、polyacrylamide 購自 Bio-Rad Laboratories Inc. (USA)



(2) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 購自 Mallinckredt Baker (Kentucky, USA)

(3) Sodium dodecyl sulfate (SDS)、glycine 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

(4) Methonal、Tris-base 購自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)

## 2. 試劑

(1) Tank buffer：取 Tris-base 3 g 及 glycine 14.4 g，加入 10% SDS 後再加 DI 至 1L。

(2) 退染劑：500 mL methanol 加 100 mL acetic acid，再加 DI 至 1 L。

(3) APS：取 0.01 g APS 粉末加入 100 mL DI。

(4) 10% SDS：取 10 g SDS 粉末加入 100 mL DI。

## 3. 儀器設備及器材

(1) 細胞分子照相分析系統 Syngene PXi 購自 J & H Technology Co. Ltd. (Europe)


(2) Mini-protein III 蛋白質電泳系統 protein electrophoresis system 購自 Bio-Rad Laboratories Inc. (USA)

## [方法]

1. 12.5% polyacrylamide gel 製備 (0.75 mm，兩片膠)：

將 3300  $\mu$ L DI、1875  $\mu$ L Tris-base (pH 8.8)、75  $\mu$ L 10% SDS、2250  $\mu$ L 40% acrylamide、50  $\mu$ L APS、5.5  $\mu$ L TEMED 加入錐形瓶搖勻，配製成 running gel (12.5%) 後，將其加入鑄膠片中，並以甲醇加滿鑄膠片以消除氣泡，凝膠 30 分鐘後倒出甲醇，以 DI 洗三次後擦乾，並加入 stacking gel，配方為 2560  $\mu$ L DI、1000  $\mu$ L Tris-base (pH 6.8)、40  $\mu$ L 10% SDS、400  $\mu$ L 40% acrylamide、30  $\mu$ L APS 與 3.4  $\mu$ L TEMED，均勻混合後加至 running gel 上，並插入尺梳 (comb)，凝膠 30 分鐘後小心取出尺梳，以 DI 水洗出氣泡後即完成鑄膠。

2. 電泳跑膠及染色：



架設電泳裝置，並將電泳槽內外都加入 tank buffer。由於一個蛋白槽可加入 20  $\mu\text{L}$  蛋白液，因此須先加入 4  $\mu\text{L}$  染劑、50  $\mu\text{g}$  蛋白，再加 PBS 至 20  $\mu\text{L}$ ，並使用乾式加熱儀加熱 99  $^{\circ}\text{C}$ ，10 分鐘。待蛋白染色完成並冷卻至室溫後，將蛋白液加入槽中，並加入 4  $\mu\text{L}$  標準品 (marker) 後，將電泳系統接上電源並設 80 伏特使蛋白液進入 stacking gel，其後再以 100-120 伏特使蛋白在 running gel 中分層，染劑跑到底部後停止電泳。取出膠片並切下 stacking gel，留著 running gel 並放入 CBR 染劑染 20 分鐘，以 DI 水洗一遍後，再以退染劑退染至蛋白條帶清楚顯現。

### 2.1.5 PAS (periodic acid-Schiff's stain) 醣蛋白染色

[材料]

#### 1. 化學藥品

- (1) Acetic acid、periodic acid、12.5% TCA (trichloroacetic acid) solution 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
- (2) Schiff' reagent 購自 Merck Co. Inc. (Germany)

#### 2. 試劑

過碘酸溶液 Periodic acid solution：含 3% acetic acid 及 1% periodic acid，加水至 100 mL。

[方法]

將跑好之 SDS 膠片放入 TCA solution 中搖晃 1 小時，以 DI 水洗兩次，一次 5 分鐘，再將膠片放入 periodic acid solution 中搖晃 2 小時使多醣之 CHO<sub>H</sub> 鍵打開，一樣以 DI 水洗兩次後，於避光條件下加入 Schiff' reagent 染 20 分鐘，使醣蛋白之醛基還原 Schiff' reagent 並顯現出紫色條帶，最後再以退染劑退染至條帶可明顯分辨。



## 2.2 茯苓蛋白與脾細胞、CD90.2<sup>+</sup> T 細胞之培養與免疫活性試驗

[材料]

### 1. 實驗動物

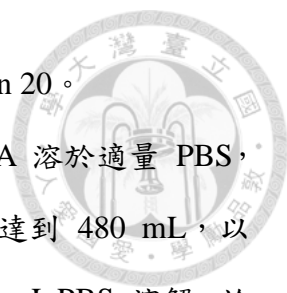
BALB/c 及 DO11.10 小鼠，購自國家實驗動物中心

### 2. 化學藥品

- (1) RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium 購自 Hyclon, Utah (USA)
- (2) Fetal bovine serum (FBS) 購自 GIBCO-BRL Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
- (3) KHCO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 購自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- (4) Potassium chloride (KCl)、NaCl、di-sodium hydrogen phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、sodium dihydrogen phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、NH<sub>4</sub>Cl、Potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、trypan blue、Albumin from bovine serum (BSA)、Concanavalin A (ConA)、MTT (3-4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl) tetrazolium salt 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
- (5) IFN- $\gamma$  ELISA kit 購自 R&D system Inc. (MN, USA)
- (6) Polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate (Tween-20)、dimethyl sulfate (DMSO) 購自 JT Baker Inc. (USA)
- (7) Gentamycin、Kenamycin 購自 Amresco (Solon, OH, USA)
- (8) 95% 酒精 ethanol 購自 友和貿易股份有限公司 (New Taipei City, Taiwan)
- (9) mouse CD90.2 (Thy1.2) microbeads 磁珠抗體 購自 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)

### 3. 試劑

- (1) PBS : 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 以 DI 溶解後，將 pH 質調整至 7.2-7.4 後即可使用。

- 
- (2) ELISA washing buffer：於 PBS 中加入 0.05% (v/v) 之 tween 20。
- (3) MACS (magnetic-activated cell sorting) buffer：稱 0.292 g EDTA 溶於適量 PBS，EDTA 完全溶解後將 pH 值調至 7.2，並加入 PBS 使體積達到 480 mL，以 0.2  $\mu$ m 濾膜過濾後高壓滅菌 (A 液)。另取 2.5 g BSA 以 20 mL PBS 溶解，於無菌操作台 (laminar flow) 內使用 0.22  $\mu$ m Minisart 針頭濾膜過濾 (B 液)，並加入 A 液完成配製。
- (4) Red blood cell (RBC) lysis buffer：秤取 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、100 mM EDTA、10 mM  $\text{KHCO}_3$  於 PBS 中。
- (5) 細胞培養液：將 10% FBS、0.1% 10mg/mL Gentamycin、0.1% 10mg/mL Kenamycin 加入 RPMI-1640 medium。
- (6) MTT solution：MTT 溶於 PBS 中，濃度為 5 mg/mL，並以 0.2  $\mu$ m 膜過濾。

#### 4. 儀器設備及器材

- (1) 細胞培養箱 Hera cell
- (2) 離心機 Labofuge 購自 Heraeus group
- (3) ELISA reader EnSpire 2300 Multilabel Reader 購自 Perkin Elmer Inc. (USA)
- (4) MultiStand 磁板、MidiMACS<sup>TM</sup> Separator 磁鐵、LS 管柱 購自 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
- (5) 多孔細胞培養盤 cell culture plate、50 mL 及 15 mL 離心管 centrifuge tube、6 cm dish 購自 Corning Life Science (Tewksbury, MA, USA)
- (6) 磨砂玻片 76  $\times$  20 mm 購自 KIMBLE, Gerresheimer group (USA)
- (7) 0.1 mm deep 細胞計數器 購自 Reichert, Inc. (NY, USA)
- (8) 5 mL 針筒 購自 Terumo (Tokyo, Japan)
- (9) pH 測量儀 PB-10、0.22  $\mu$ m Minisart 針頭濾器 購自 Sartorius (Goettingen, Germany)
- (10) 三向閥 3 way stopcock 購自 Nipro Medical Industries Ltd. (Tokyo, Japan)



(11) 半體積 96 孔平底盤 購自 Corning Life Science (Tewksbury, MA, USA)

[方法]

### 2.2.1 脾細胞之取得

將小鼠以二氧化碳犧牲後，用酒精噴滿小鼠全身殺菌並放入無菌操作台之鋁箔紙上，將腹部左方毛皮以剪刀剪開，並將脾臟取出泡於裝有 PBS 之 6 cm dish 中。使用兩片磨砂玻片夾住脾臟，並將脾臟細胞磨至 PBS 中，磨到只剩下透明的脾臟外膜後即可將脾細胞吸至 10 mL pipet 中，緩慢小心加入 15 mL 離心管，防止多餘的脾臟碎塊流入離心管。離心 1500 rpm、4 分鐘，倒掉上清液並刮散細胞，加入 1 mL RBC lysis buffer 2 分鐘使紅血球破裂後，加入 9mL PBS 停止反應，離心 1500 rpm、4 分鐘後倒掉上清液，可見到細胞團已變成白色，刮散細胞並加入 5 mL RPMI medium 計數。

### 2.2.2 從脾細胞中分離 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞

將 5 mL MACS buffer 加入脾細胞並計數，離心 1500rpm、4 分鐘後依每  $10^7$  顆細胞的 1/3 加入 10  $\mu$ L CD90.2 磁株抗體，並加入 MACS buffer 將體積補至 1 mL，置於 4°C 冰箱 20-25 分鐘。等待時間可將磁板、磁鐵、5 mL 針筒、廢液桶、LS 管柱、置冰之兩管 50 mL MACS buffer 及 200 mL 燒杯照射紫外光殺菌，10 分鐘後可架設管柱並平衡。將磁鐵放上磁板，順過三向閥及針筒後，將針筒、三向閥及管柱組合至磁鐵上，以針筒吸滿 MACS buffer 並將液體推入管柱中 (針筒內之 buffer 不少於 2 mL)，再調整三向閥至左方使 buffer 流至廢液桶，快流完時由上方加入 3 mL buffer，快流完即平衡完成，注意管柱不可乾掉。

與磁珠抗體反應完之脾細胞先離心 1500 rpm、4 分鐘，倒吊上清、再加入 5 mL MACS buffer 洗兩次，洗完後將 0.5 mL MACS buffer 加入細胞，混勻後再加進管柱中，下方放置裝有冰的 200 mL 燒杯，內放 50 mL 離心管，並以 2 mL MACS buffer 沖洗剛剛裝有細胞的離心管，並加入管柱中。下方 50 mL 離心管

收 2.5 mL unbinding 細胞後，再重新將 unbinding 細胞加入管柱，重複兩次後開始進行流洗步驟，由上方加入 MACS buffer，並收 unbinding 細胞液約 30 mL 後，將內含 3-4 mL buffer 之管柱從磁鐵上拆下，並大力將管柱內含 T 細胞之 MACS buffer 推入 15 mL 離心管，離心 1500 rpm、4 分鐘後計數 T 細胞及 unbinding (none T) 細胞。

### 2.2.3 茯苓蛋白與脾細胞、CD90.2<sup>+</sup> T 細胞之培養

將欲培養之脾細胞、CD90.2<sup>+</sup> T 細胞及 PCP 濃度調至欲培養濃度的兩倍（細胞： $2 \times 10^7$  cells/mL），各取細胞與蛋白液 50  $\mu$ L 加入 96-well plate，於 37°C 細胞培養箱中培養 3 天後，方可取得細胞上清液及進行下一步實驗。若要養於 48-well plate 中，則各取 100  $\mu$ L 細胞與蛋白液加入 well 中，以此類推。正控制組則以 ConA (5  $\mu$ g/mL) 培養細胞。

### 2.2.4 MTT 細胞活性試驗

細胞與蛋白培養 72 小時後，於 96-well plate 中加入 20  $\mu$ L MTT solution，並於 37°C 培養箱中培養 5 小時，plate 離心 1500 rpm、4 分鐘後，將培養液吸出，再加入等量的 DMSO 替代，置於培養箱 5 分鐘後以 ELISA reader 測 540 nm 吸光值。

### 2.2.5 IFN- $\gamma$ 細胞素之 ELISA 酵素免疫分析法測定

所有抗體皆於 IFN- $\gamma$  ELISA kit 中。Capture antibody 以 PBS 稀釋 180 倍後，於半體積 96-well plate 加入 50  $\mu$ L/well，在室溫下放置 overnight，隔天倒掉上清，先以 ELISA washing buffer 150  $\mu$ L/well 清洗 well 5 次，再加入 blocking buffer 100  $\mu$ L/well，於室溫下放 1 小時後，一樣以 ELISA washing buffer 洗 5 次，倒乾並加入 sample 與已稀釋成 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 及 15.625

pg/mL 之標準品 50  $\mu$ L/well，於室溫放 2 小時後清洗 5 次並加入稀釋 180 倍之 detection antibody，50  $\mu$ L/well 放 2 小時，清洗 5 次再加入稀釋 200 倍之 HRP 50  $\mu$ L/well，放 20 分鐘後清洗 8 次、倒乾液體並加入 TMB solution 50  $\mu$ L/well，等 2000 pg/mL 標準品呈明顯天藍色後以 20  $\mu$ L/well 1 M  $H_2SO_4$  停止反應。

### 2.3 茯苓蛋白與樹突細胞之培養與樹突細胞活化 T 細胞能力試驗

[材料]

#### 1. 實驗動物

- (1) 4 週大之 BALB/c 及 8-12 週大之 DO11.10 小鼠 購自國家實驗動物中心 (Taiwan)
- (2) TLR2<sup>-/-</sup> 及 TLR4<sup>-/-</sup> 受器缺陷小鼠 購自 The Jackson Laboratory (Maine, U.S.A)

#### 2. 化學藥品

- (1) KCl、NaCl、 $Na_2HPO_4$ 、 $NaH_2PO_4$ 、 $NH_4Cl$ 、Dipotassium phosphate ( $K_2HPO_4$ )、trypan blue、BSA、Concanavalin A (ConA) 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
- (2)  $KHCO_3$ 、 $H_2SO_4$ 、Tween-20 購自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- (3) IFN- $\gamma$  及 IL-4 ELISA kit 購自 R&D system Inc. (MN, USA)
- (4) IL-6 ELISA kit 購自 eBioscience Inc. (CA, USA)
- (5) RPMI medium 購自 Hyclon (Utah, USA)
- (6) Gentamycin、Kenamycin 購自 Amresco (Solon, OH, USA)
- (7) FBS 購自 GIBCO-BRL Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
- (8) 95% 酒精 ethanol 購自友和貿易股份有限公司 (New Taipei City, Taiwan)
- (9) PE/Cy5-conjugated CD11c、CD4；FITC-conjugated CD40、CD80、CD86；



PerCP/Cy5.5-conjugated CD11c 之小鼠表面分子特異性抗體 購自  
eBioscience (San Diego, CA, USA)

(10) FITC-conjugated CD80 小鼠表面分子特異性抗體 購自 Biolegend Inc. (CA, USA)

(11) LPS-EK Ultrapure、Pam3CSK4 購自 InvivoGen (San Diego, CA, USA)

(12) CellTrace™ CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) kit 購自  
Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

(13) NaN<sub>3</sub> 購自 Riedel-deHaën® (Seelze, Germany)

(14) OVA<sub>323-339</sub> peptide 購自 Anaspec Inc. (CA, USA)

(15) Recombinant murine GM-CSF 購自 PeproTech Inc. (NJ, USA)

### 3. 試劑

(1) PBS：137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 以 DI 溶解後，將 pH 質調整至 7.2 - 7.4 後即可使用。

(2) ELISA washing buffer：於 PBS 中加入 0.05% (v/v) 之 tween 20。

(3) FACS 鞘液：取 75.2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、13.2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、72 g NaCl，以 DI 溶解並加至 1 L，配製 10 倍濃的鞘液。使用前以 DI 稀釋至 1 倍，並以 0.2 μm 濾膜過濾。

(4) FACS buffer：於 1 倍之 FACS 鞘液中加入 2% FBS、0.1% (w/w) NaN<sub>3</sub> 溶解混勻後，以鞘液加至 500 mL，並以 0.22 μm 濾膜過濾，保存於 4 °C 冰箱中。

(5) RBC lysis buffer：秤取 155 mM NH<sub>4</sub>Cl、100 mM EDTA、10 mM KHCO<sub>3</sub> 於 PBS 中。

(6) 細胞培養液：將 10% FBS、0.1% 10mg/mL Gentamycin、0.1% 10mg/mL Kenamycin 加入 RPMI-1640 medium。

### 4. 儀器設備及器材



- (1) 細胞培養箱 Hera cell
- (2) 離心機 Labofuge 購自 Heraeus group
- (3) ELISA reader EnSpire 2300 Multilabel Reader 購自 Perkin Elmer Inc. (USA)
- (4) 流式細胞儀 FACScan、流式細胞儀上樣管 Falcon tube 購自 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
- (5) 多孔細胞培養盤 cell culture plate、50 mL 及 15 mL 離心管 centrifuge tube、6 cm dish、20  $\mu$ m 無菌濾網 cell strainer 購自 Corning Life Science (Tewksbury, MA, USA)
- (6) 0.1 mm deep 細胞計數器 購自 Reichert Inc. (NY, USA)
- (7) 旋渦式震盪器 Vortex-Genie2 購自 Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
- (8) 1 mL 針購自 Terumo (Tokyo, Japan)
- (9) 0.22  $\mu$ m Minisart 濾膜 購自 Sartorius (Goettingen, Germany)
- (10) 96 孔 V 底盤 96-well V plate 購自 Nunc (Rochester, NY, USA)
- (11) 半體積 96 孔平底盤 購自 Corning Life Science (Tewksbury, MA, USA)

## [方法]

### 2.3.1 骨髓衍生樹突細胞之取得方式

將四週大之小鼠以二氧化碳犧牲後，全身噴酒精殺菌消毒並放入無菌操作台之鋁箔紙上，以剪刀及鑷子剪開小鼠腹部中央之毛皮，沿著小鼠腰部撕開外皮後，先將一隻腳的外皮以剪刀及鑷子輔助脫除並連同鼠掌一同剪下，再以另一組乾淨剪刀及鑷子剪下連同腕部下方關節之鼠腿，以確保其骨髓細胞未流失，將鼠腿以棉花清除上面的皮毛後泡於 PBS 中清洗血水。以第三組剪刀及鑷子將腿部之肉剪除，剩下的碎肉則可用紗布磨下，磨乾淨之腿骨浸泡於酒精中 5 分鐘，再以乾淨的 PBS 洗淨腿骨。

將腿骨由關節處扭斷使骨髓露出，把用來去除細胞雜塊的濾膜放到 50 mL

離心管上，並使用 1 mL 針吸滿 medium，插入骨髓洞口，將骨髓細胞沖入離心管中離心 1500 rpm、8 分鐘，去除上清液並刮散細胞後，加入 500  $\mu$ L RBC lysis buffer 反應 30 秒，再加入 4.5 mL PBS 停止反應，離心 1500 rpm、4 分鐘後去除上清液並刮散細胞，加入 3 mL medium 即可計數細胞。

### 2.3.2 茯苓蛋白與樹突細胞之培養

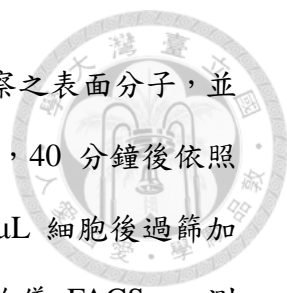
取得樹突細胞後，將其濃度調成  $2 \times 10^6$  cells/mL，並加 1 mL 於 6-well plate 中，再加入以 medium 稀釋之 GM-CSF (500 unit/mL)，1 mL/well，於 37°C 之培養箱中培養 7-14 天，每隔 3 天換一次含 GM-CSF 的 medium，使骨髓細胞能衍生成未成熟之樹突細胞。樹突細胞衍生完成後，將細胞濃度調成  $2 \times 10^6$  cells/mL、LPS 及 PCP 濃度調成兩倍後，加入細胞培養盤中培養 24 小時，隔天即可收集上清液並進行下一步實驗。

### 2.3.3 樹突細胞與 DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞之培養

將已培養 7-14 天之樹突細胞或預先以 OVA 及 LPS、PCP 培養好之樹突細胞與分選好之 DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞分別配成  $1.8 \times 10^6$  cells/mL 及  $1.8 \times 10^7$  cells/mL (DC:T=1:10) 以利 T 細胞增生 (Höpken et al., 2005)，分別取 50  $\mu$ L/well 加入 48-well plate，再將 OVA (10  $\mu$ g/mL) 加入，100  $\mu$ L/well，使最終 OVA 濃度為 5  $\mu$ g/mL。另以 ConA (5  $\mu$ g/mL) 做為活化 T 細胞之正控制組測試。

### 2.3.4 樹突細胞之表面分子檢測

將培養好之細胞收至 eppendorf，離心 2000 rpm、3 分鐘後收取細胞上清液，加入所需體積之 FACS buffer 並混勻細胞後，下細胞至 96-well V 盤 ( $1 \times 10^5$  in 100  $\mu$ L FACS buffer/well)。離心 2000 rpm、3 分鐘後倒乾上清並以 vortex 震散細胞，重複此清洗步驟 2 次。於避光條件下加入 1  $\mu$ L/well PE-conjugated CD11c 抗



體染樹突細胞及 FITC-conjugated C40/CD80/CD86 抗體染欲觀察之表面分子，並加入 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  FACS buffer，包鋁箔紙避光並放入 4°C 冰箱，40 分鐘後依照上面之清洗步驟於避光條件下洗 3 次，用 pipetman 混勻 100  $\mu\text{L}$  細胞後過篩加入 falcon tube，再加入 500  $\mu\text{L}$  FACS buffer，置冰並使用流式細胞儀 FACScan 測平均螢光強度 (mean fluorescent intensity, MFI) 及與對照組之差異百分比。

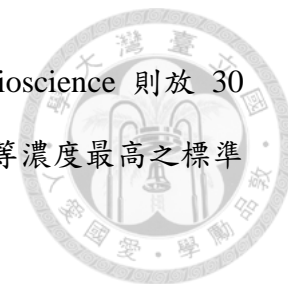
### 2.3.5 CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) 細胞增生試驗

由於細胞染 CFSE 後，於細胞分裂的增生過程中會使每顆細胞所含的螢光量減少，故可藉由螢光減少的程度來判定細胞是否有增生情形。將分好之 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞以 PBS 調成  $5 \times 10^6$  cells/mL，以下步驟全部於避光條件下進行。加入 0.4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  之 FITC-conjugated CFSE 於細胞液後，於 37°C 之細胞培養箱中放 8 分鐘，使 CFSE 與細胞結合，再離心 1500 rpm、4 分鐘，倒去上清液後加入 1 mL FBS 反應 2 分鐘以去除多餘染劑。離心 1500 rpm、4 分鐘後，加入 5 mL RPMI medium 離心洗兩次後，方可計數細胞並與蛋白共培養 72 小時，使用 FACScan 測差異值變化。

### 2.3.6 IL-4、IL-6 及 IFN- $\gamma$ 細胞素之 ELISA 酵素免疫分析法測定

所有抗體皆於 ELISA kit 中，IL-4 及 IFN- $\gamma$  為 R&D 生產，IL-6 則為 eBioscience 生產。於半體積 96-well plate 加入 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  capture antibody。R&D 之抗體以 PBS 稀釋並置於室溫下 overnight，eBioscience 則以 coating buffer 稀釋並放於 4°C 冰箱 overnight。隔天倒掉上清，先以 ELISA washing buffer 150  $\mu\text{L}/\text{well}$  清洗 well 5 次，再加入 blocking buffer 100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，於室溫下放 1 小時，一樣以 ELISA washing buffer 洗 5 次，倒乾並加入 sample 細胞上清液與稀釋之標準品 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，於室溫放 2 小時後清洗 5 次並加入稀釋 180 倍之 detection antibody 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，R&D 放 2 小時，eBioscience 則放 1 小時，清洗

5 次再加入已稀釋之 HRP 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，R&D 放 20 分鐘，eBioscience 則放 30 分鐘，清洗 8 次後倒乾液體並加入 TMB solution 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，等濃度最高之標準品呈明顯天藍色後，以 20  $\mu\text{L}/\text{well}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  停止反應。



## 2.4 動物氣喘模式試驗

[材料]

### 1. 實驗動物

6 週大 BALB/c 小鼠 購自國家實驗動物中心 (Taiwan)

### 2. 化學藥品

(1) OVA (ovalbumin)、BSA、Hanks' balanced salts (HBSS)、NaCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、trypan blue、avertin (2,2,2-tribromoethanol)、tert-amyl alcohol、Carbonate/bicarbonate capsule 購自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

(2) IFN- $\gamma$  及 IL-4 ELISA kit 購自 R&D system Inc. (MN, USA)

(3) IL-5 及 IL-13 ELISA kit 購自 eBioscience Inc. (CA, USA)

(4) IgE 及 IgG2a ELISA kit 購自 BD Pharmingen. (Bioscience, San Diego, USA)

(5) Tween-20、 $\text{KHCO}_3$  購自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)


(6) 福馬林 10% Formaldehyde solution 購自 Mallinckrot Baker Inc. (Phillipsburg, USA)

(7) Liu stain A、Liu stain B 由臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系之莊雅惠副教授之實驗室提供 (Taiwan)

(8) 佐劑 Aluminum hydroxide (Alum.) 購自 Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, USA)

### 3. 試劑

(1) PBS : 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  以 DI 溶解後，將 pH 質調整至 7.2 - 7.4 後即可使用。

- 
- (2) ELISA washing buffer：於 PBS 中加入 0.05% (v/v) 之 tween 20。
  - (3) RBC lysis buffer：秤取 155 mM NH<sub>4</sub>Cl、100 mM EDTA、10 mM KHCO<sub>3</sub> 於 PBS 中。
  - (4) OVA solution：將 OVA 粉末以 PBS 配成 5 mg/mL 後，再以 0.2 μm 膜過濾，分裝並保存於 -20°C 冰箱。
  - (5) Avertin working solution：先將 3.1 mL tert-amyl alcohol + 5 g avertin，於棕色血清瓶在室溫下攪拌 12 小時使其完全溶解後，以 0.2 μm 膜過濾，分裝於棕色 eppendorf 並保存於室溫。取 0.5 mL 並加入 39.5 mL PBS 於棕色血清瓶在室溫下攪拌 12 小時後，以 0.2 μm 膜過濾，並保存於 4°C 冰箱。
  - (6) IgE 及 IgG2a coating buffer：將 carbonate/bicarbonate 回溶於 100 mL DI，過 0.2 μm 膜並保存於 4°C 冰箱。

#### 4. 儀器設備及器材

- (1) 細胞培養箱 Hera cell
- (2) 細胞離心機 Shandon cytospin cytocentrifuge 購自 Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
- (3) ELISA reader EnSpire 2300 Multilabel Reader 購自 Perkin Elmer Inc. (USA)
- (4) 0.1 mm deep 細胞計數器 購自 Reichert Inc. (NY, USA)
- (5) 1 mL 針、軟針 購自 Terumo (Tokyo, Japan)
- (6) 半體積 96 孔平底盤 購自 Corning Life Science (Tewksbury, MA, USA)
- (7) 5 mm 小鼠臉頰採血針 購自 MEDpoint, Inc. (Miami, USA)

#### [方法]

##### 2.4.1 小鼠致敏步驟 (圖十一)

小鼠至少分為未致敏之 PBS 組、致敏之 OVA 組及 sample 組，一組共 5 隻。先將小鼠以打耳洞方式編號成 1-5 號、採血，並於 Day 0、7、14 及 21 以

腹腔注射之方式打入 OVA (OVA 組及 sample 組) 或 PBS (PBS 組)，每隻鼠打 200  $\mu$ L。配藥方面，OVA 及 sample 組 Day 0 的一隻鼠配藥劑量為 50  $\mu$ g OVA (10  $\mu$ L) + 2 mg Alum. (50  $\mu$ L) + PBS 140  $\mu$ L，Day 7、14、21 則為 25  $\mu$ g OVA (5  $\mu$ L) + 2 mg Alum. (50  $\mu$ L) + PBS 145  $\mu$ L；Day 0、7、14、21 之 PBS 組則為 2 mg Alum. (50  $\mu$ L) + PBS 150  $\mu$ L。Day 28 及 29 進行 challenge，先以 avertin working solution 麻醉小鼠 (500  $\mu$ L/隻) 後，用鼻腔注射 (intranasal, i.n.) 之方式將 OVA 滴入每組小鼠，一隻鼠的藥劑配方為 100  $\mu$ g OVA (20  $\mu$ L) + PBS (20  $\mu$ L)，Day 30 犧牲小鼠並進行下一步實驗。

#### 2.4.2 小鼠餵食方式

小鼠於致敏後 Day 14-Day27 進行餵食步驟 (Lee *et al.*, 2013)，每一隻小鼠於早上 10-12 點之間餵食，一次餵 200  $\mu$ L/隻，每隻小鼠約 0.02 kg，本次之茯苓蛋白 PCP 餵食劑量分別為 50  $\mu$ g、100  $\mu$ g 及 200  $\mu$ g/day (每天餵食 2.5、5 及 10 mg/kg)，故 PCP 蛋白液需先調成 250  $\mu$ g/mL、500  $\mu$ g/mL 及 1 mg/mL。

#### 2.4.3 支氣管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 取得方式

小鼠於 Day 30 採血後以斷頸方式犧牲，用針固定前掌及口部後，從喉部以剪刀及鑷子剪開外皮，撥開左右兩邊肉後可見白色氣管，以鑷子將氣管上的膜撥開。先以軟+硬針吸 1 mL HBSS 插入氣管約 2 mm，抽出硬針並來回推拉針筒三次後吸出 0.6 mL BALF 於 eppendorf 得到液 1，之後再以 1 mL HBSS+1%BSA 注入氣管並抽 0.6 mL BALF 兩次，得到液 2、液 3。將液 1 及液 2 離心 6000 rpm、3 分鐘後，吸取液 1 之上清作為 ELISA 測試用 BALF 並存放於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 (因 BSA 會影響 ELISA 結果)，液 2 上清倒掉，液 3 之細胞液則與前兩管混合後，離心 6000 rpm、3 分鐘並加入 200  $\mu$ L RBC lysis buffer，2 分鐘後加入 800  $\mu$ L PBS 停止反應，離心後加入 500  $\mu$ L HBSS+1%BSA 進行細胞計數。



#### 2.4.4 劉氏細胞染色 (Liu stain)

BALF 細胞計數後，調成  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  cells/mL，取 200  $\mu$ L 打 cytopsin 450 rpm、4 分鐘後，以蠟筆圈出玻片上之細胞團塊，於水槽邊先用滴管滴一滴 Lius stain A 於細胞團塊上，30 秒後再滴兩滴 Lius stain B，90 秒後以自來水洗淨背景，並在顯微鏡下觀察、計算巨噬細胞、嗜酸性球及嗜鹼性球之數量，每一片至少共數 200 顆細胞。

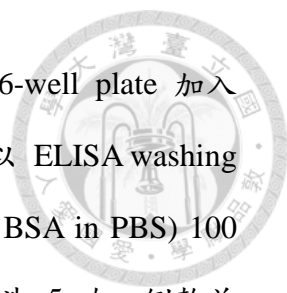
#### 2.4.5 IL-4、IL-5、IL-13 及 IFN- $\gamma$ 細胞素之 ELISA 測定

所有抗體皆於 ELISA kit 中，IL-4 及 IFN- $\gamma$  為 R&D 生產，IL-5 及 IL-13 則為 eBioscience 生產。於半體積 96-well plate 加入 50  $\mu$ L/well capture antibody。R&D 以 PBS 稀釋並置於室溫下 overnight，eBioscience 則以 coating buffer 稀釋並放於 4°C 冰箱 overnight。隔天倒掉上清，先以 ELISA washing buffer 150  $\mu$ L/well 清洗 well 5 次，再加入 blocking buffer 100  $\mu$ L/well，於室溫下放 1 小時，一樣以 ELISA washing buffer 洗 5 次，倒乾並加入 sample 與稀釋之標準品 50  $\mu$ L/well，於室溫放 2 小時後清洗 5 次並加入稀釋 180 倍之 detection antibody 50  $\mu$ L/well，R&D 放 2 小時，eBioscience 則放 1 小時，清洗 5 次再加入已稀釋之 HRP 50  $\mu$ L/well，R&D 放 20 分鐘，eBioscience 則放 30 分鐘，之後清洗 8 次、倒乾液體並加入 TMB solution 50  $\mu$ L/well，等濃度最高之標準品呈明顯天藍色後，以 20  $\mu$ L/well 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 停止反應。

#### 2.4.6 血液之取得及 OVA 特異性 IgE、OVA 特異性 IgG2a 之測定

小鼠於 Day 0 及 Day 30 犧牲前，使用採血針進行臉頰採血，針頭插入處約在臉頰無毛處往後 2 mm，收集血液至 eppendorf。血液於室溫下放置 3 小時，使血液凝結、血清分層後，小心取上層血清至另一管 eppendorf，離心 6000 rpm、3 分鐘後，再將上層之無色血清吸至 eppendorf 中，保存於 -20°C 冰箱。





OVA 以 coating buffer 稀釋成 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  後，於半體積 96-well plate 加入 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，放置在 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中 overnight。隔天倒掉上清，先以 ELISA washing buffer 150  $\mu\text{L}/\text{well}$  清洗 well 5 次，再加入 blocking buffer (1% BSA in PBS) 100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，於室溫下放 1 小時後，一樣以 ELISA washing buffer 洗 5 次，倒乾並加入已稀釋 100 倍之血清 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，於室溫放 2 小時後清洗 5 次並加入稀釋後之 Biotin anti-mouse IgE 及 IgG2a 作為 detection antibody，50  $\mu\text{L}/\text{well}$  放 2 小時，清洗 5 次再加入稀釋 200 倍之 HRP 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，放 30 分鐘並清洗 8 次，倒乾液體並加入 TMB solution 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  使液體反應至深藍色後，以 20  $\mu\text{L}/\text{well}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  停止反應。

#### 2.4.7 肺部切片之取得及染色

小鼠於犧牲後並抽取 BALF 後，以彎頭剪刀及鑷子剪開小鼠胸、腰部中間的外皮，剪開膜後看見小鼠肋骨，用鑷子夾入小鼠肋骨下方之劍突，往上提並用剪刀剪開肋骨與肺部之間的皮膜，拉出小鼠肺葉並剪離鼠體，以 PBS 清洗後放於組織切片保存盒中，並泡於棕色血清瓶內之福馬林中。其後委託台灣大學實驗動物中心 (Laboratory Animal Center of National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan) 進行小鼠肺部之蠟包埋、切片及 H & E 染色 (hematoxylin and eosin stain)。

#### 2.5 統計方式

試驗之數據結果皆至少三重複，並以 SAS 統計軟體分析數據，分析方式則以 Duncan 鄧氏新多變域測驗法做成對數據的平均值比較，以 \* 號表示顯著差異情形。\* 為  $p < 0.05$ ，\*\* 為  $p < 0.01$ ，N.S. 表示無顯著差異 (no significance)。



## 第三章 結果

### 3.1 PCP 無法直接活化 T 細胞

#### 3.1.1 PCP 之製備

自中藥行購買乾燥的茯苓切片，將其磨成粉狀後浸泡於萃取液中，經過破碎、離心、硫酸銨沉澱、透析、DE-52 管柱層析及 NaCl 鹽析步驟後，由 chromatography elution profile (圖一 A) 可知 elution volume 為 135-180 mL 處有一蛋白波峰，此蛋白波峰即為欲萃取的 PCP 蛋白，收集此範圍之蛋白後，再將 Tris buffer 置換成 PBS，即完成試驗用之 PCP 樣品。

將萃取好的 PCP 使用 SDS 電泳法跑膠以觀察其分子量，可知於 10-17 kDa 及 17-24 kDa 處有兩條明顯蛋白條帶 (圖一 B)，因茯苓蛋白為雙元體蛋白 (張，2005)，故此兩條不同分子量之條帶為此雙元體蛋白的兩蛋白單元。由 marker 位置可推估 PCP 之兩條單元蛋白分子量約為 14 kDa 及 21 kDa，與前人萃取出之茯苓蛋白跑 SDS 電泳之位置 14.3 kDa 及 21.3 kDa 一致，故可知本次萃得之 PCP 蛋白分子量與前人相同。經過醣蛋白染色後 (圖一 C)，則可見 21.3 kDa 處蛋白單元之條帶呈紫紅色，且以蛋白去醣套組處理 PCP 使其醣基被酵素去除後，原本於 21.3 kDa 之蛋白條帶已消失，只留下非醣蛋白的 14.3 kDa 蛋白單元，表示 PCP 之 21.3 kDa 蛋白單元確實含醣基、且 14.3 kDa PCP 蛋白單元不含醣基，因此確認本次萃取之茯苓免疫調節蛋白 PCP 為含有 21.3 kDa 及 14.3 kDa 此兩單元蛋白之雙元體醣蛋白。

#### 3.1.2 PCP 無法直接活化 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞

為確認萃取出之茯苓蛋白 PCP 生物活性是否與前人相同，並找出 PCP 之最佳培養濃度，於是使用不同濃度之 PCP (0、25、50、100、150 及 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與 BALB/c 小鼠脾細胞培養 72 小時進行 MTT 細胞活性試驗，以觀察 PCP 活化

脾細胞之能力，並收集細胞上清液測試 PCP 使脾細胞免疫反應導向  $T_H1$  及分泌 IFN- $\gamma$  細胞素的效果。

由脾細胞之 MTT 試驗結果中，可明顯看出於體外試驗中 PCP 活化脾細胞有濃度效應，且使用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  茯苓蛋白 PCP 有最佳的脾細胞活化能力，使 540 nm 之吸光值由 0.685 上升至 1.116，增加 63% 之 540 nm 吸光值 (圖二 A)。

而在  $T_H1$  細胞素 IFN- $\gamma$  之濃度變化上，PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與脾細胞於 37°C 培養 72 小時後，以 ELISA 測其細胞上清液之 IFN- $\gamma$  細胞素濃度，與 medium (M) 對照組相比之下可明顯觀察到 IFN- $\gamma$  濃度由 1.7 ng/mL 上升至 4.8 ng/mL，共增加 182% (圖三)，故可證明 PCP 可使脾細胞中的輔助型 T 細胞往  $T_H1$  分化並分泌 IFN- $\gamma$  細胞素，因此在後續實驗中，會使用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCP 作為試驗濃度來進行 PCP 活化細胞、產生  $T_H1$  免疫反應之試驗。

但在 PCP 單獨與脾細胞中之  $CD90.2^+$  T 細胞的培養結果上，由 MTT 試驗可看出  $CD90.2^+$  T 細胞不管與何種濃度的 PCP 共同培養 72 小時，皆無法使 540 nm 吸光值有明顯提升的情形，540 nm 吸光值皆只有約 0.24 (圖二 B)，且 IFN- $\gamma$  分泌量 (2.0 ng/mL) 也與 medium 對照組 (1.7 ng/mL) 無差異 (圖三)。因此 PCP 無法直接活化  $CD90.2^+$  T 細胞，以及使  $T_H1$  分化並分泌 IFN- $\gamma$  細胞素 (圖三)。

### 3.2 PCP 可活化樹突細胞

在 PCP 與樹突細胞共培養之試驗中，從 4-6 週小鼠腿部骨髓中取出單核球細胞，加入 GM-CSF 培養 7-14 天，使單核球細胞衍生成樹突細胞後，再與 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或 PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培養 24 小時，將樹突細胞 CD40、CD80 及 CD86 染色後觀察表面分子表現量變化情形，並收集細胞上清液測樹突細胞分泌之 IL-6 及 IL-12p70 細胞素，以觀察 PCP 是否增加樹突細胞的呈現能力及促使  $T_H1$  細胞分化之能力。



### 3.2.1 PCP 可促進 DC 表面分子之表現

原始樹突細胞受活化後，當樹突細胞上的表面分子 CD40、CD80 及 CD86 有表現增加之情形，則樹突細胞將抗原呈現給 T 細胞的效果會增加，因此可透過細胞染色及 FACSscan 儀器，先找出並圈選樹突細胞之 CD11c 表面分子後，再偵測螢光強度來測定樹突細胞表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現量。將 PCP 或正控制組 LPS 與樹突細胞培養 24 小時後跑 FACSscan 測 FITC 螢光強度，結果顯示與 medium 對照組相比之下，PCP 組的樹突細胞表面分子 CD40、CD80 及 CD86 之 FITC 平均螢光強度 MFI 分別上升 87.2%、57.0% 及 69.6%，FITC 百分比增加 39.9%、31.8% 及 24.81%，histogram 的波紋高峰也有明顯往右移之情形 (圖四)，表示樹突細胞受到 PCP 刺激後可活化，使其表面分子表現情形增加，並增強對 T 細胞抗原呈現之能力。

### 3.2.2 PCP 提高樹突細胞分泌 IL-6 及 IL-12p70

取不同濃度之 PCP (0、25、50、100、150 及 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與樹突細胞培養 24 小時後之細胞上清液，以 ELISA 酵素免疫分析法測定樹突細胞活化時會分泌的發炎細胞素 IL-6 濃度，以及可促使先天輔助型 T 細胞 ( $T_{H0}$ ) 往  $T_{H1}$  細胞方向分化的細胞素 IL-12p70 之濃度。結果顯示，使用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度之 PCP 與樹突細胞培養後有最佳的 IL-6 細胞素分泌濃度 (271  $\text{ng}/\text{mL}$ )，於 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCP 濃度下培養的樹突細胞則有最高的 IL-12p70 細胞素分泌濃度 (280  $\text{ng}/\text{mL}$ )，100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCP 之 IL-12p70 濃度則無顯著差異 (219  $\text{pg}/\text{mL}$  and 212  $\text{pg}/\text{mL}$ , respectively) (圖五)。

根據以上兩實驗結果可知 PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 確實能使樹突細胞活化，使其表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現情形增加，並分泌細胞素 IL-6 及 IL-12，使樹突細胞抗原呈現能力上升並推論其可調節  $T_{H1}/T_{H2}$  免疫反應，使免疫反應導向  $T_{H1}$  方向發展。



### 3.3 PCP-DC 抑制 DO11.10 T 細胞之 $T_H2$ 免疫反應

#### 3.3.1 T 細胞之 CFSE 細胞增生試驗結果

為了確認受 PCP 刺激後的樹突細胞是否可促使 T 細胞增生，使  $T_H1$  細胞分化並抑制  $T_H2$  免疫反應，因此先使用 PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及 OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與樹突細胞培養，刺激樹突細胞及辨認 OVA 蛋白 24 小時後，再將此樹突細胞與對 OVA 具有特異性免疫反應之 DO11.10  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞及 OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培養 72 小時，於第三天取細胞上清液測 T 細胞分泌之 IFN- $\gamma$  及 IL-4 細胞素濃度，並使用 FACScan 測 DO11.10  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞之 CFSE 染劑螢光變化，以確認  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞是否因為樹突細胞的刺激而增生。

在 CFSE 細胞增生試驗之結果中，正控制組 ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 會使 DO11.10  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞增生率由 9.35% 增加至 60.8%，增生率上升 51.45% (圖六上，ConA)，證明細胞健康狀態無問題。與 PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培養的脾細胞會使增生情形由 9.35% 增加至 39.5%，共上升 30.15% (圖六上，Splenocyte)，單獨與 T 細胞培養的增生情形則只上升 2.75% (由 9.35% 增至 12.1%) (圖六上，PCP)，因此由 CFSE 試驗之結果可以確認 PCP 在單獨與 OVA 及  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞培養的情況下，無法使  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞增生情形上升。

而預先使用 PCP 刺激及辨認過 OVA 的樹突細胞，在 DC:T=1:10 的比例下與 DO11.10  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞培養 72 小時後，與用 medium 及 OVA 培養的組別相比之下，則可使 DO11.10 的  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞增生情形增加 6.4% (62.5% 增加至 68.9%) (圖六下，PCP-DC)，因此預先以 PCP 刺激 24 小時的樹突細胞具有使 DO11.10 小鼠 T 細胞增生之能力。

#### 3.3.2 細胞上清液 IFN- $\gamma$ 及 IL-4 濃度測定結果

樹突細胞預先辨認 OVA 24 小時，再將其與 DO11.10  $\text{CD}90.2^+$  T 細胞培養 72 小時後，收集其細胞上清液，並以 ELISA kit 測定 T 細胞分泌的  $T_H1$  細胞

素 IFN- $\gamma$  及 T<sub>H</sub>2 細胞素 IL-4 濃度。

在 DCs + T 細胞上清液的 IFN- $\gamma$  濃度之結果中，於有預先以 OVA 刺激之樹突細胞存在的情況下，會使 DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞的 IFN- $\gamma$  濃度由 75.0 pg/mL (Medium 組) 增加至 633.34 pg/mL (M-DC 組) (圖七)。而在有預先使用 PCP (100  $\mu$ g/mL) 培養、讓樹突細胞認識 OVA 的 PCP-DC 組中，則是會因為受到樹突細胞分泌 IL-12p70 的刺激 (圖五) 而使 DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T<sub>H</sub>0 細胞衍生成 T<sub>H</sub>1 細胞，T<sub>H</sub>1 細胞的 IFN- $\gamma$  分泌濃度也由 633.34 pg/mL (M-DC 組) 升高至 2560 pg/mL (PCP-DC 組) (圖七 A)。

而在 T<sub>H</sub>2 細胞素 IL-4 的分泌結果上，預先以 LPS (1  $\mu$ g/mL) 培養並辨認 OVA 的樹突細胞雖然也會使 IFN- $\gamma$  分泌濃度增加。但同時也會使 T 細胞之 IL-4 分泌量由 137.6 pg/mL (M-DC 組) 上升至 236.1 pg/mL (LPS-DC 組) (圖七 B)，故 LPS 無法抑制 T<sub>H</sub>2 細胞之分化。而 PCP-DC 組的 DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞 IL-4 分泌量則是與 M-DCs 組相似 (PCP-DCs 154.5 pg/mL vs. M-DCs 137.59 pg/mL) (圖十 B)，且 IFN- $\gamma$  濃度有升高，故預先以 PCP 培養並辨認 OVA 之樹突細胞可使 DO11.10 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞增生，並使 T<sub>H</sub>0 分化成較多的 T<sub>H</sub>1 細胞，使 IFN- $\gamma$  細胞素分泌濃度提升，並減少 T<sub>H</sub>2 細胞之分化及 IL-4 細胞素的分泌濃度，讓免疫反應趨向 T<sub>H</sub>1 發展。

### 3.4 PCP 活化 DC 之路徑研究

為了得知 PCP 活化樹突細胞的路徑是否屬於 TLR2 或 TLR4，故使用 TLR2<sup>-/-</sup> 及 TLR4<sup>-/-</sup> 兩種基因剔除鼠之樹突細胞與 PCP (100  $\mu$ g/mL) 培養 24 小時，並以透過 TLR4 路徑活化樹突細胞的脂多醣體 LPS (1  $\mu$ g/mL) 或透過 TLR2 路徑活化樹突細胞的肽聚糖 Pam3CSK4 (1  $\mu$ g/mL) 蛋白做為控制組，培養後使用 FACScan 測樹突細胞表面分子 CD40、CD80 及 CD86 之 FITC 百分比、MFI 及活化後產生的 IL-6 細胞激素濃度，以此來判定 PCP 活化樹突細胞的路徑。



### 3.4.1 PCP 刺激 TLR2<sup>-/-</sup> 小鼠樹突細胞

在 TLR2<sup>-/-</sup> 樹突細胞 FACSscan 結果中，Pam3CSK4 (1 µg/mL) 組之表面分子表現與 medium 對照組相似 (FITC 百分比差異值分別為 -0.1%、-4.5% 及 -4.9%)，表示此 TLR2<sup>-/-</sup> 基因剔除鼠正常，無法受 PamCSK4 刺激活化樹突細胞，正控制組 LPS (1 µg/mL) 之 FITC 百分比則有明顯增加 (上升 5.4%、8.8% 及 14.5%)。使用 PCP (100 µg/mL) 培養 24 小時後能使樹突細胞之 CD40、CD80 及 CD86 平均螢光強度 MFI 分別上升 7.8%、14.4% 及 17.2% (圖八)，代表 TLR2<sup>-/-</sup> 樹突細胞表面分子仍會受到 PCP 刺激而增加其表現量。而在測定細胞上清液 IL-6 濃度的 ELISA 試驗結果中，PCP 組的 TLR2<sup>-/-</sup> 樹突細胞 IL-6 分泌濃度 (2.25 ng/mL) 也有明顯上升之情形，且分泌量與 LPS 組相似 (圖十)。因此 PCP 仍可活化 TLR2<sup>-/-</sup> 樹突細胞，增加樹突細胞表面分子之表現量及 IL-6 分泌濃度，故樹突細胞受 PCP 刺激而活化的路徑不屬於 TLR2。

### 3.4.2 PCP 刺激 TLR4<sup>-/-</sup> 小鼠樹突細胞

在 TLR4<sup>-/-</sup> 樹突細胞受 PCP 刺激 24 小時後的表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現結果中，LPS (1 µg/mL) 組之表面分子螢光強度與對照組相似 (FITC 百分比分別為 4.2%、4.1% 及 8%)，證明此 TLR4<sup>-/-</sup> 基因剔除鼠功能正常，正控制組 Pam3CSK4 (1 µg/mL) 的螢光百分比有明顯增加 (28.2%、15.5% 及 20.1%)。PCP (100 µg/mL) 組之 FITC 百分比與 medium 對照組相比之下，CD40、CD80 及 CD86 的差異值百分比分別上升 28.3%、11.2% 及 30.0% (圖九)，而在 MFI 的表現上，雖然 LPS 組及 PCP 組之樹突細胞表面分子 MFI 值皆有些許上升，但與 Pam3CSK4 組的 MFI 值相較之下仍較少。而在樹突細胞上清液 IL-6 濃度的測定中，PCP 組的樹突細胞 IL-6 分泌濃度與對照組相比有上升至 5.2 ng/mL (圖十)，但與 Pam3CSK4 組的 IL-6 分泌量 (17.5 ng/mL) 相較之下仍低了許多。由以上結果得知 PCP 可提升 TLR4<sup>-/-</sup> 樹突細胞之表面分子表現量及 IL-6 分泌



濃度，故 PCP 活化樹突細胞之路徑不為 TLR4。

### 3.5 餵食 PCP 於動物氣喘模式試驗

本動物氣喘模式試驗分兩次，第一次於小鼠致敏後測試餵食 PCP 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  及 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  之免疫反應結果，第二次則測試餵食 PCP 50  $\mu\text{g}/\text{day}$  及 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  之結果，每組試驗之 BALB/c 鼠皆有五隻，於氣喘動物模式（圖十一）第 30 天採血及犧牲後抽取小鼠的支氣管肺泡灌洗液 (BALF)，以測定 BALF 中嗜酸性球數、IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  濃度及血清之 OVA 特異性 IgE 與 IgG2a 含量，並取小鼠肺部做蠟切片及 H & E 染色，以觀察其細胞浸潤、增厚的情形。

#### 3.5.1 BALF 嗜酸性球及 $T_H2$ 細胞素

在 BALF 每毫升嗜酸性球數測定結果中，OVA 控制組的嗜酸性球數皆為最高，表示本次致敏結果正常。而在餵食不同 PCP 濃度的每毫升嗜酸性球數結果中，由低到高分別為餵食 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP ( $1.44 \times 10^5$  cells/mL)、100  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP (第一次試驗  $1.46 \times 10^5$  cells/mL 及第二次試驗  $1.4 \times 10^5$  cells/mL)、50  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP ( $2.1 \times 10^5$  cells/mL)，但餵食 PCP 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  組與 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  組的嗜酸性球數無顯著差異（圖十二），因此餵食 PCP 皆可降低嗜酸性球之衍生情形，而每日餵食至少 100  $\mu\text{g}$  之 PCP 可減少較多的嗜酸性球數量。

在 BALF 之  $T_H2$  細胞素 IL-4 分泌濃度結果測定中，餵食 50 及 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 的 IL-4 濃度無差異 (PCP 50  $\mu\text{g}/\text{day}$  : 30.7 pg/mL ; PCP 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  : 23.2 pg/mL)，但 PCP 餵食濃度提高至 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  後，會使其 BALF 中分泌之 IL-4 濃度抑制情形減少（圖十三，上），不過在餵食不同濃度之 PCP 處理組中，與 OVA 對照組相比皆可減少其 IL-4 的分泌濃度。

於 IL-5 細胞素的 ELISA 結果中，以餵食 PCP 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  之組別抑制 IL-5 細胞素分泌效果為佳，餵食 50  $\mu\text{g}/\text{day}$  及 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 的 BALF 中 IL-5 分



泌濃度則與 OVA 組小鼠無顯著差異 (圖十三, 中), 由於  $T_H2$  細胞分泌之 IL-5 細胞素與嗜酸性球衍生有相關, 但 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  之嗜酸性球數卻不像 50  $\mu\text{g}/\text{day}$  那樣高, 此結果會於第四章中討論。

而在 IL-13 分泌量上, 也是以餵食 PCP 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  的抑制效果最好 (圖十三, 下), 餵食 PCP 50  $\mu\text{g}/\text{day}$  也有抑制 IL-13 分泌的結果, 但仍以餵食 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 之抑制能力為佳, 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 之 IL-13 濃度則與 OVA 組無顯著差異。由於  $T_H2$  細胞分泌之 IL-4 及 IL-13 會促使 B 細胞分泌 IgE (Humbert *et al.*, 1999), 故推測餵食 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 之 OVA 特異性 IgE 分泌量受到抑制, 其次則為餵食 50 及 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 之組別。

### 3.5.2 BALF $T_H1$ 細胞素

在 BALF 中之  $T_H1$  細胞素 IFN- $\gamma$  分泌量上, 以每日餵食 100  $\mu\text{g}$  PCP 之小鼠組別有最高的 IFN- $\gamma$  分泌濃度 (約 290  $\text{pg}/\text{mL}$ ), 而餵食 50  $\mu\text{g}/\text{day}$  及 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 之 IFN- $\gamma$  濃度 (250  $\text{pg}/\text{mL}$  and 177  $\text{pg}/\text{mL}$ , respectively) 則與 OVA 對照組的濃度無顯著差異 (圖十四)。由於 IFN- $\gamma$  是由  $T_H1$  細胞分化後分泌而來, 故由 BALF 之  $T_H1$  細胞素 IFN- $\gamma$  及  $T_H2$  細胞素 IL-4 濃度結果, 可知餵食 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  PCP 的 BALB/c 小鼠  $T_H1$  細胞分化情形較明顯, 使體內的免疫反應被導向  $T_H1$ , 也較能抑制  $T_H2$  免疫反應發生。

### 3.5.3 血清 OVA-specific-IgE 及 OVA-specific-IgG2a

BALB/c 小鼠血清皆於使用 blocking buffer 稀釋 100 倍後, 使用 ELISA 之方式 coating OVA 蛋白, 測其血清中的 OVA 特異性 IgE (OVA-specific-IgE) 及 IgG2a (OVA-specific-IgG2a) 含量。

小鼠血清 OVA-specific IgE 之 ELISA 結果中, 餵食各濃度 PCP 之處理組的 OVA-specific-IgE 吸光值由低到高為 100  $\mu\text{g}/\text{day}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{day}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{day}$  ( $\text{OD}_{450}$

分別為 0.52、0.71、1.19)，且餵食 PCP 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  之處理組 OVA-IgE 吸光值與 OVA 對照組吸光值 ( $\text{OD}_{450}=1.0$ ) 無顯著差異 (圖十五 A)。由於 IgE 是 B 細胞受到  $\text{T}_{\text{H}2}$  細胞素刺激後所產生的，因此於三組處理組中，以每日餵食 100  $\mu\text{g}$  PCP 有較好的 IgE 抑制效果。

而在 OVA-specific IgG2a 之結果中，以餵食 PCP 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  之吸光值 ( $\text{OD}_{450}=0.83$ ) 最高，餵食 PCP 50  $\mu\text{g}/\text{day}$  ( $\text{OD}_{450}=0.53$ ) 及 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  ( $\text{OD}_{450}=0.46$ ) 處理組吸光值則與 OVA 對照組吸光值 ( $\text{OD}_{450}=0.6$ ) 無顯著差異 (圖十五 B)。因為 IgG2a 是由 B 細胞受到  $\text{IFN-}\gamma$  刺激而釋出的免疫球蛋白，故由此可知餵食 PCP 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  較能促使  $\text{T}_{\text{H}1}$  細胞分化並分泌  $\text{IFN-}\gamma$ ，使 B 細胞產生 OVA 特异性 IgG2a，並抑制了  $\text{T}_{\text{H}2}$  細胞之分化及 IL-4 與 IL-13 的分泌，抑制 B 細胞分泌 IgE 之能力也為最好的，因此證明餵食 PCP 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  可藉由提升  $\text{T}_{\text{H}1}$  細胞分化來抑制  $\text{T}_{\text{H}2}$  相關的過敏反應。

#### 3.5.4 肺部切片 H&E 染色結果

將小鼠肺部以蠟包膜、切片並進行 H&E 染色，再於顯微鏡下觀察放大 40 倍及 200 倍的肺部組織。與 PBS 對照組的肺部切片染色結果 (圖十六 A) 相比之下，OVA 正對照組的肺部組織周圍有發炎性細胞聚集，且組織增厚情形相當明顯 (圖十六 B)，代表發炎性細胞有在呼吸道平滑肌組織周圍增殖，並有細胞浸潤現象，而在 PCP (100  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) 餵食組則可減少細胞增厚及發炎細胞浸潤情形 (圖十六 C)，故每日餵食 100  $\mu\text{g}$  PCP 可抑制發炎細胞聚集於致敏小鼠之肺部組織。




## 第四章 討論

### 4.1 PCP 活化樹突細胞之討論及其與 TLR 路徑之相關性

樹突細胞上的表面分子具有輔助刺激免疫反應並傳達抗原給 T 細胞之功能，樹突細胞分泌之細胞素則可誘導處女淋巴細胞分化成  $T_{H1}$ 、 $T_{H2}$  或  $T_{H17}$  等不同類型的細胞，造成不同類型免疫反應發生。本次利用 FACScan 所觀察的樹突細胞表面分子包含 CD40、CD80 及 CD86，CD40 在活化後除了可進一步活化 CD80 及 CD86 這兩個 B7 分子之外，也會分泌 IL-12 使免疫反應導向  $T_{H1}$  (van Kooten and Banchereau, 2000)，CD80 和 CD86 表達情形增加之後則會與 T 細胞之 CD28 結合，使 T 細胞增生並分泌 IL-2 等細胞素 (Alegre *et al.*, 2001)，而 PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與 BALB/c 小鼠之樹突細胞共同培養 24 小時後，與對照組相比之下可使 CD40、CD80 及 CD86 螢光表現情形皆明顯增加，因此 PCP 可使樹突細胞對 T 細胞之呈現能力上升，並推測受 PCP 活化的樹突細胞具有分泌 IL-12 使 T 細胞增生、導向  $T_{H1}$  免疫反應的能力，而在樹突細胞分泌的細胞素濃度測定上，也驗證了 PCP 刺激活化樹突細胞確實具有使 IL-12 分泌濃度增加的能力，與前面 CD40 表面分子表現增加的結果相符。此外，樹突細胞受 PCP 刺激後也會分泌大量 IL-6，推測樹突細胞可能也會影響  $T_{H17}$  細胞之分化，未來若要往  $T_{H17}$  免疫反應之方向研究，除了 IL-6 以外也可測樹突細胞分泌 TGF- $\beta$  及 IL-23 之濃度。

TLR 之激活機制對於疾病進入體內的檢測、活化樹突細胞並引發一連串免疫反應佔有重要地位，與 TLR6 為異源二聚體的 TLR2 可受到肽聚糖 Pam3CSK4 等細菌成分刺激而活化，使 IL-8 和 IL-23 被表達，而 TLR4 則可偵測革蘭氏陰性菌釋出的 LPS、呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 的融合蛋白或小鼠乳腺腫瘤病毒 (mouse mammary tumor virus, MMTV) 的膜蛋白及其他內源性分子 (例如熱休克蛋白、透明質酸和  $\beta$ -防禦素 2) 等，辨識感染性病原體上



的相關分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)、介導細胞素的生成並活化免疫系統，活化後的 TLR4 可透過非 MyD88 的 TRIF 路徑活化 I 型干擾素 (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ ) 基因，使巨噬細胞分泌 I 型干擾素，達到抗病毒之作用，也可透過 MyD88 路徑活化促發炎細胞素之生成，使血清中的 IL-6、TNF- $\alpha$  及 IL-12p70 濃度上升，進而調節 T<sub>H</sub> 免疫反應的平衡 (Lu *et al.*, 2008)。前人將 PCP 與腹腔巨噬細胞共同培養，發現 PCP 可上調與 TLR2 及 TLR4 相關性及高的 NF- $\kappa$ B、MyD88、TIRAP 及 TRAF6 之基因表現情形，以及 TNA- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 及 IL-18 的 mRNA 表現 (張, 2005; Chang and Sheu, 2009)，由 TLR4 之 mRNA 表現量及 TLR4<sup>-/-</sup> 小鼠分泌 NO 和 TNF- $\alpha$  之分析結果則指出 PCP 具有透過 TLR4 來活化巨噬細胞的能力 (Chang and Sheu, 2009)，本實驗則欲從 TLR2<sup>-/-</sup> 及 TLR4<sup>-/-</sup> 鼠的樹突細胞與 PCP 培養後的表面分子表現及 IL-6 細胞素分泌狀況來初步瞭解 PCP 透過何種路徑去活化樹突細胞，發現 TLR4<sup>-/-</sup> 小鼠的樹突細胞受到 PCP 刺激活化後的 CD40、CD80、CD86 表面分子表現量及 IL-6 分泌濃度與對照組相比之下皆有下降情形，但由於 PCP 對於 TLR4<sup>-/-</sup> 小鼠樹突細胞的活化抑制情形並非完全抑制，因此仍須透過使用 anti-TLR2 及 anti-TLR4 抗體分析 PCP 活化樹突細胞之路徑是否同時受到或完全不受到 TLR2 及 TLR4 之影響。

#### 4.2 PCP 透過活化樹突細胞誘導 T<sub>H</sub>1 反應

PCP 不能直接刺激 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞活化並分泌 IFN- $\gamma$  (圖二、圖三)，只能在有 anti-CD3/CD28 抗體的情況下才可刺激 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞增生，且增生結果與 PCP 及脾細胞共培養時相似，並使 T 細胞 CD44、CD69 表現量、IFN- $\gamma$  及 TNF- $\alpha$  分泌濃度上升 (Lu *et al.*, 2008)。而本實驗則是先證明 PCP 可活化樹突細胞後，再使用預先與 PCP 培養 24 小時並辨認 OVA 抗原的樹突細胞與對 OVA 具有特異性的 DO11.10 小鼠之 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞培養，發現 PCP 能增加樹突細

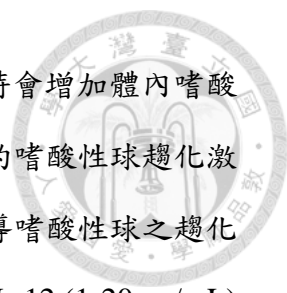
胞將抗原呈現給 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞，使 T 細胞增生並分泌 IFN- $\gamma$ 、減少 T<sub>H2</sub> 細胞之 IL-4 分泌量，讓免疫反應導向 T<sub>H1</sub> 型細胞的能力，因此 PCP 確實可藉由活化樹突細胞，使樹突細胞之 CD40 及 B7 表面分子表現量與介導 T<sub>H1</sub> 細胞增生的 IL-12p70 細胞素分泌量增加，並間接使 T 細胞增生以及使免疫反應導向 T<sub>H1</sub> 方向，因而抑制了 T<sub>H2</sub> 免疫反應的發生。

#### 4.3 餵食 PCP 於小鼠氣喘動物模式之討論

為了確認 PCP 是否能藉由調節 T<sub>H</sub> 免疫反應使 T<sub>H1</sub> 細胞增生、T<sub>H2</sub> 細胞分化受到抑制，因此使用了 T<sub>H2</sub> 相關的呼吸道過敏動物模式，並以餵食的方式在小鼠開始對 OVA 過敏後每日服用不同濃度的 PCP 茯苓蛋白萃取物，最後再由 BALF 中的 T<sub>H1</sub>、T<sub>H2</sub> 相關細胞素、血清免疫球蛋白及肺部切片探討 PCP 藉由誘導 T<sub>H1</sub> 細胞分化而抑制 T<sub>H2</sub> 過敏反應的能力。


當巨噬細胞或樹突細胞等抗原呈現細胞接收到抗原後，便會將抗原呈現給 T 細胞而引發 T<sub>H2</sub> 反應，其中 T<sub>H2</sub> 細胞分泌的 IL-4 及 IL-13 會使 B 細胞分泌 IgE 並活化肥大細胞，IL-5 則會使嗜酸性球分化並造成細胞浸潤情形 (Holgate and Polosa, 2008; Humbert *et al.*, 1999)。比較 IL-4、IL-13 及 OVA 特異性 IgE 的結果後，可明顯看出 PCP (100  $\mu$ g/d) 組的細胞素及免疫球蛋白分泌量皆有被抑制，而每日餵食 50  $\mu$ g/d PCP 組之 IL-4 及 IL-13 抑制成果則略比餵食 200  $\mu$ g/d PCP 組佳，在 OVA 特異性 IgE 的分泌抑制上也可明顯看出每日餵食 50  $\mu$ g PCP 的效果較每日餵食 200  $\mu$ g PCP 之組別佳。

而在會促使嗜酸性球分化的 IL-5 分泌結果中，雖然餵食 PCP 50  $\mu$ g/d 及 200  $\mu$ g/d 的 IL-5 分泌濃度與 positive control 的 OVA 組相比之下無顯著差異，但在 BALF 中的嗜酸性球數目上，只要有服用 PCP 的組別，與對照組相比之下嗜酸性球數目皆有被抑制下來，餵食 200  $\mu$ g/d PCP 之嗜酸性球分化抑制效果也與餵食 100  $\mu$ g/d PCP 組無差異。IL-5 在小鼠及人類中被認為是使嗜酸性球分



化及成熟最重要的因子，當 IL-5 過度表達 (over-expression) 時會增加體內嗜酸性球及抗體含量 (Kouro and Takatsu. 2009)，此外，肺上皮細胞的嗜酸性球趨化激素受體 CCR3 (Eotaxin receptor) 則可與其餘趨化激素結合，誘導嗜酸性球之趨化作用並上調  $T_H2$  免疫反應 (Lamkhioued *et al.*, 2003)，但是當 IL-12 (1-20 ng/mL) 及 IFN- $\gamma$  的濃度增加時，CCR3 的表達能力則會明顯減少，因而抑制了骨髓始祖細胞 (myeloid progenitor) 的嗜酸性球分化情形 (Lamkhioued *et al.*, 2003; Rais *et al.*, 2002)。由於本次未有足夠之 BALF 測 IL-12 濃度，故無法確認 IL-12 是否影響到嗜酸性球的分化，而在 50  $\mu\text{g/d}$  及 200  $\mu\text{g/d}$  PCP 組 BALF 中之 IL-5 及 IFN- $\gamma$  也與 OVA 組無顯著差異，其他可能則為支氣管細胞受到 IL-12、IFN- $\gamma$  及 CCR 受體表達影響，使得嗜酸性球分化、聚集情形減少。此外，嗜酸性球也會造成過敏反應發生處的細胞浸潤及增厚，在肺部組織切片的 H & E 染色結果中即可明顯觀察到 OVA 致敏對照組的肺部組織切片有較多的細胞增厚情形，而在餵食 100  $\mu\text{g/d}$  PCP 的組別中，由於其 BALF 中的  $T_H2$  細胞素 IL-5 分泌濃度減少，加上有  $T_H1$  細胞分泌 IFN- $\gamma$ ，使得嗜酸性球分化情形受到抑制，故細胞浸潤情形不會像沒有餵食 PCP 的 OVA 組一樣嚴重。

而在誘導  $T_H1$  免疫反應的能力上，IL-12 會誘發  $T_H1$  細胞分化，並活化 STAT4 及 T-bet 之表達，使 IFN- $\gamma$  分泌並影響 B 細胞分泌抗原特異性之 IgG2a (Liew, 2002; Romagnani, 2004)，前人研究中也指出 PCP 可使 STAT4 磷酸化、增加 T-bet 之 mRNA 表現量，且於口服 PCP 的異位性皮膚炎動物試驗中也發現口服 PCP 可增加  $T_H1$  相關之細胞素 IFN- $\gamma$  及免疫球蛋白 IgG2a 濃度，並抑制  $T_H2$  細胞素的生成 (Lu *et al.*, 2014)，而在本次餵食 PCP 的氣喘動物模式試驗中，以腹腔注射 OVA 之方式使小鼠致敏而對 OVA 產生特異性過敏反應後，餵食 100  $\mu\text{g/d}$  PCP 可明顯增加 BALF 內的  $T_H1$  細胞素 IFN- $\gamma$  濃度，且會使 B 細胞受刺激並分泌 IgG2a，因此可在血清中觀察到 OVA 特異性 IgG2a 含量增加的情形，代表小鼠致敏後餵食 100  $\mu\text{g/d}$  PCP 確實可誘導呼吸道之  $T_H1$  細胞分化，



使得免疫反應導向  $T_{H1}$ ，並抑制  $T_{H2}$  誘導的過敏反應。而餵食 PCP 50  $\mu\text{g}/\text{d}$  或 200  $\mu\text{g}/\text{d}$  之小鼠 BALF 中  $T_{H1}$  細胞素 IFN- $\gamma$  分泌量與 OVA 組相似，因此在這兩組小鼠血清中，B 細胞分泌的 OVA 特異性 IgG2a 含量與 OVA 組沒有顯著差異，推測每日餵食 50  $\mu\text{g}$  或 200  $\mu\text{g}$  PCP 無法顯著抑制  $T_{H2}$  過敏，若要再更進一步確認最佳的 PCP 餵食濃度，則可選擇介於 50  $\mu\text{g}/\text{d}$  及 200  $\mu\text{g}/\text{d}$  之間的 PCP 餵食濃度進行試驗。

#### 4.4 結論

由以上實驗結果可知 PCP 可透過包含 TLR4 之路徑活化樹突細胞的 CD40、CD80 及 CD86 表面分子，並讓樹突細胞分泌 IL-12p70、刺激處女 T 細胞分化成  $T_{H1}$ ，使免疫反應導向  $T_{H1}$  及分泌 IFN- $\gamma$ 。而在小鼠氣喘動物模式試驗中，每日餵食 100  $\mu\text{g}$  PCP 可增加 BALF 中的  $T_{H1}$  細胞素 IFN- $\gamma$  及血清中的 OVA 特異性 IgG2a 含量，使  $T_{H1}$  免疫反應上升，並抑制 BALF 中的嗜酸性球數、 $T_{H2}$  細胞素 IL-4、IL-5 及 IL-13 濃度，以及血清之 OVA 特異性 IgE 含量，且可減少肺部組織的細胞增厚、浸潤情形。根據以上實驗結果茯苓免疫調節蛋白 PCP 可透過具有抗原呈現效果之樹突細胞調節淋巴細胞的  $T_{H1}$  免疫反應，並抑制  $T_{H2}$  氣喘反應造成的細胞素及免疫球蛋白增加。



## 第五章 參考文獻

- 王紅利. 2011. 茯苓的松菟栽培技術. 中國林副特產. 4:52-55.
- 呂雅婷. 2011. 茯苓免疫調節蛋白之基因選殖及其對類異位性皮膚炎老鼠模式之效應. 國立臺灣大學園藝所碩士論文. 台北.
- 張敏、高曉紅、孫曉萌、徐嘉瞳、李香豔、史衍杰、范新田. 2008. 茯苓的藥理作用及研究進展. 北華大學學報 1:63-68.
- 張慧欣. 2005. 茯苓免疫調節蛋白的純化與生理活性之探討. 國立臺灣大學園藝所碩士論文. 台北.
- 張慧欣. 2009. 茯苓免疫調節蛋白活化小鼠腹腔巨噬細胞之訊息路徑及促進 T 細胞活化與第一型 T 輔助細胞免疫反應. 國立臺灣大學園藝所博士論文. 台北.
- 傅傑、王克勤、方紅、蘇瑋、鄧芬. 2002. 茯苓藥原及生產栽培現狀. 中藥研究與資訊 2:24-25.
- 黃千育. 2012. 鴻喜菇免疫調節蛋白 HMP 於活化小鼠樹突細胞及呼吸道過敏模式之研究. 國立臺灣大學園藝所碩士論文. 台北.
- 楊小文. 2013. 茯苓生產在栽培技術的有益探索. 農民致富之友. 9:143.
- 趙文婉, 林璧鳳. 2004. 茯苓和靈芝的保健功效. 科學發展 383:62-67.
- Akihisa, T., E. Uchiyama, T. Kikuchi, H. Tokuda, T. Suzuki, and Y. Kimura. 2009. Anti-tumor-promoting effects of 25-methoxyporicoic acid A and other triterpene acids from *Poria cocos*. J. Nat. Prod. 72:1786-1792.
- Akihisa, T., Y. Nakamura, H. Tokuda, E. Uchiyama, T. Suzuki, Y. Kimura, K. Uchikura, and H. Nishi. 2007. Triterpene acids from *Poria cocos* and their anti-tumor-promoting effects. J. Nat. Prod. 70:948-953.
- Alegre, M.L., K.A. Frauwirth, and C.B. Thompson. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat. Rev. Immunol. 1:220-8.



Banchereau J. and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392:245-252.

Banchereau<sup>1</sup>, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 18:767-811.

Bedi B. and J.R. Mead. 2012. Cryptosporidium parvum antigens induce mouse and human dendritic cells to generate T<sub>H</sub>1-enhancing cytokines. Parasite Immunol. 34(10):473-85.

Birmingham, J.M., S. Patil, X.M. Li, and P.J. Busse. 2013. The effect of oral tolerance on the allergic airway response in younger and aged mice. J. Asthma 50(2):122-32.

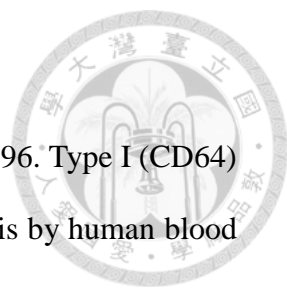
Chang, H.H. and F. Sheu. 2009. A novel fungal immunomodulatory protein (PCP) isolated from *Poria cocos* activates mouse peritoneal macrophage involved in toll-like receptor 4. J. Agric. Food Chem. 57(14):6129-6139.

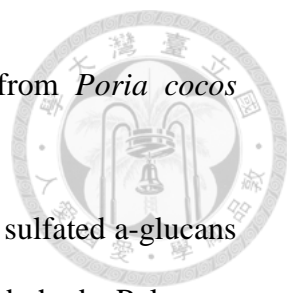
Chang, T.T., C.C. Huang, and C.H. Hsu. 2006. Clinical evaluation of the Chinese herbal medicine formula STA-1 in the treatment of allergic asthma. Phytother. Res. 20:342-347.

Cheng, S., I. Eliaz, J. Lin, and D. Sliva. 2013. Triterpenes from *Poria cocos* suppress growth and invasiveness of pancreatic cancer cells through the downregulation of MMP-7. Int. J. Oncol. 42:1869-1874.

Chihara, G., J. Hamuro, Y. Maeda, Y. Arai, and F. Fukuoka. 1970. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). Nature 225: 943-944.

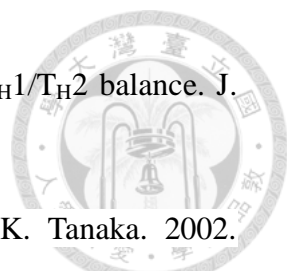
Cook, P.C., L.H. Jones, S.J. Jenkins, T.A. Wynn, J.E. Allen, and A.S. MacDonald. 2012. Alternatively activated dendritic cells regulate CD4<sup>+</sup> T-cell polarization

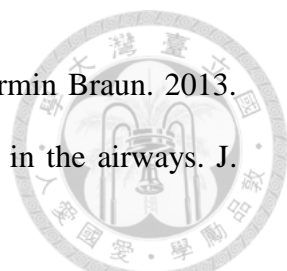
- 
- in vitro and in vivo. PNAS 109(25):9977-9982.
- Fanger, N.A., K. Wardwell, L. Shen, T.F. Tedder, and P.M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. J. Immunol. 157(2):541-548.
- Fuchs, S.M., C. Heinemann, S. Schliemann-Willers, H. Härtl, J.W. Fluhr, and P. Elsner. 2006. Assessment of anti-inflammatory activity of *Poria cocos* in sodium lauryl sulphate-induced irritant contact dermatitis. Skin Res. Technol. 12:223-227.
- Gapter, L., Z. Wang, J. Glinski, and K.Y. Ng. 2005. Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332(4):1153-1161.
- Grogan, J.L., and R.M. Locksley. 2002. T helper cell differentiation: on again, off again. Curr. Opin. Immunol. 14:366-372.
- Guermontprez, P., J. Valladeau, L. Zitvoige, C. Théry, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 20:621-667.
- Hattori, T., K. Hayashi, T. Nagao, K. Furuta, M. Ito, and Y. Suzuki. 1992. Studies on antinephritic effects of plant components (3): Effect of pachyman, a main component of *Poria cocos* Wolf on original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms. Jpn. J. Pharmacol. 59(1):89-96.
- Holgate, S.T. and R. Polosa. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat. Rev. Immunol. 8:218-30.
- Höpken, U.E., I. Lehmann, J. Droese, M. Lipp, T. Schler, and A. Rehm. 2005. The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: proliferation versus deletion. Eur. J. Immunol. 35:2851-2863.
- Huang, Q. and L. Zhang. 2011. Preparation, chain conformation and anti-tumor

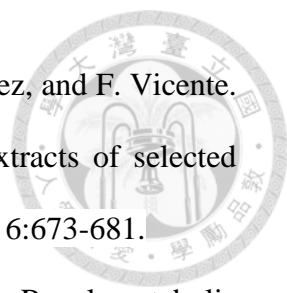
- 
- activities of water-soluble phosphated (1→3)- $\alpha$ -D-glucan from *Poria cocos* mycelia. Carbohydr. Polymers 83:1363-1369.
- Huang, Q., L. Zhang, P.C. Cheung, and X. Tan. 2006. Evaluation of sulfated  $\alpha$ -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. Carbohydr. Polymers 64:337-344.
- Humbert, M., G. Menz, S. Ying, C.J. Corrigan, D.S. Robinson, S.R. Durham, and A.B. Kay. 1999. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. Immunol. Today 20(11):528-33.
- Jeong, J.W., H.H. Lee, M.H. Han, G.Y. Kim, S.H. Hong, C. Park, and Y.H. Choi. 2014. Ethanol extract of *Poria cocos* reduces the production of inflammatory mediators by suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. BMC Complement Altern. Med. 14:101.
- Jin, Y., L. Zhang, M. Zhang, L. Chen, P.C. Cheung, V.E. Oi, and Y. Lin. 2003. Antitumor activities of heteropolysaccharides of *Poria cocos* mycelia from different strains and culture media. Carbohydr. Res. 338:1517-1521.
- Kouro, T. and K. Takatsu. 2009. IL-5 and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. Int. Immunol. 21:1303-1309.
- LaCasse, C.J., N. Janikashvili, C.B. Larmonier, D. Alizadeh, N. Hanke, J. Kartchner, E. Situ, S. Centuori, M. Har-Noy, B. Bonnotte, E. Katsanis, and N. Larmonier. 2011. T helper-1 lymphocytes induce dendritic cell tumor killing activity by an interferon- $\gamma$ -dependent mechanism. J. Immunol. 187(12): 6310–6317.
- Lamkhioued, B., S.G. Abdelilah, Q. Hamid, N. Mansour, G. Delespesse, and P.M. Renzi. 2003. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by T<sub>H</sub>2 cytokines in CD34<sup>+</sup> progenitor cells. J. Immunol.

- 170:537-547.
- Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 761-771.
- Lee, K.S. and M.W. Lee. 1982. Studies on the antibacterial activity of *Poria cocos*. *Korean J. Mycol.* 10:27-31.
- Lee, S.M., Y.J. Lee, J.J. Yoon, D.G. Kanga, and H.S. Lee. 2012. Effect of *Poria cocos* on hypertonic stress-induced water channel expression and apoptosis in renal collecting duct cells. *J. Ethnopharmacol.* 141(1):368–376.
- Lee, S.G., W.D. Park, H.J. Jeong, E.J. Lee, J.B. Kim, and H.J. Kim. 2010. Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbal extracts according to extraction methods. *Korean J. Food Sci. Tech.* 42(5):571-577.
- Lee, Y.T., S.S. Lee, H.L. Sun, K.H. Lu, M.S. Ku, J.N. Sheu, J.L. Ko, and K.H. Lue. 2013. Effect of the fungal immunomodulatory protein FIP-fve on airway inflammation and cytokine production in mouse asthma model. *Cytokine* 61(1):237-44.
- Li, T.H., C.C. Hou, C.L. Chang, and W.C. Yang. 2011. Anti-Hyperglycemic properties of crude extract and triterpenes from *Poria cocos*. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2011:128402.
- Liew, F.Y. 2002. T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.* 2:55-60.
- Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151.
- Lu, M.M., J.J. Cheng, C.Y. Lin, and C.C. Chang. 2010. Purification, structural elucidation, and anti-inflammatory effect of a water-soluble 1,6-branched 1,3- $\alpha$ -D-galactan from cultured mycelia of *Poria cocos*. *Food Chem.*

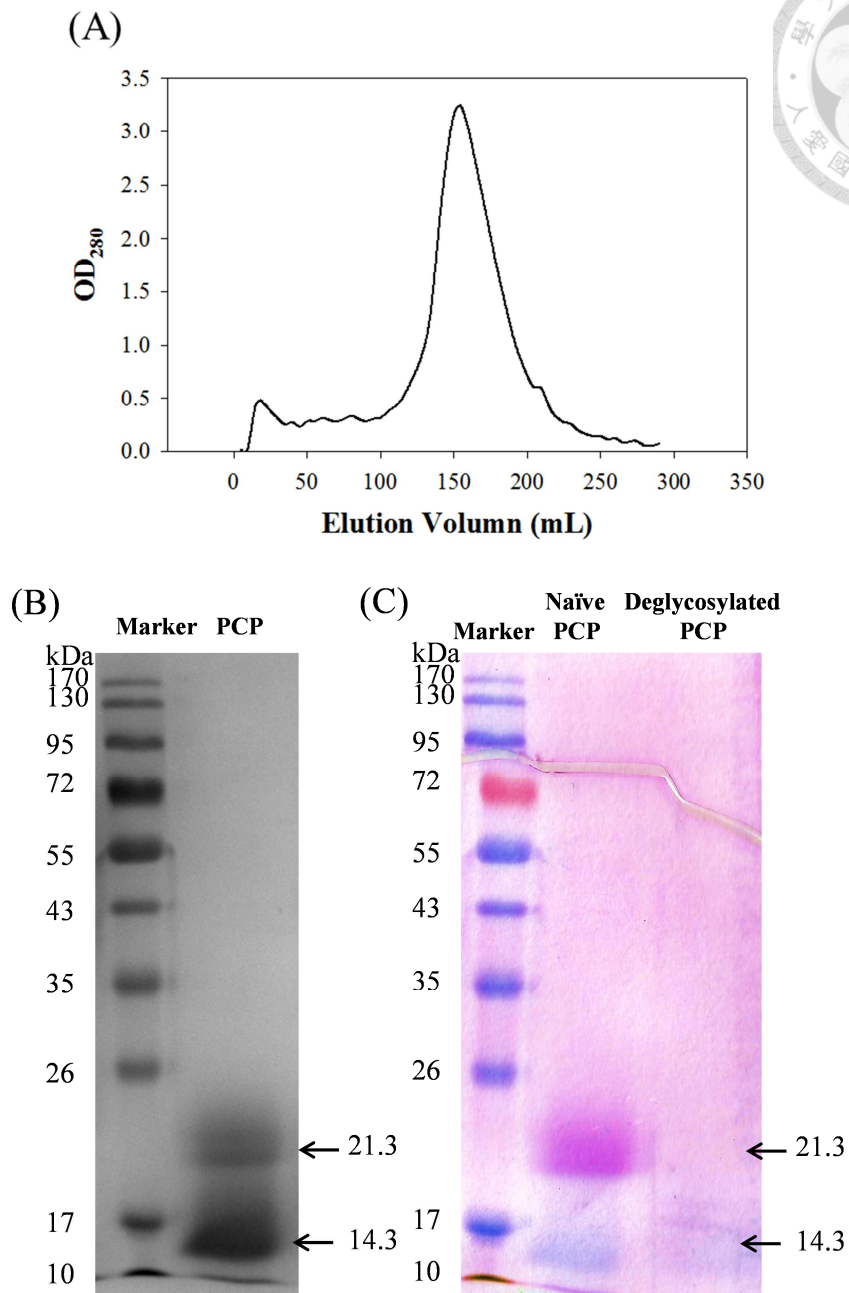
- 118:349-356.
- Lu, Y.T., Y.C. Kuan, H.H. Chang, and F. Sheu. 2014 Molecular cloning of a *Poria cocos* protein that activates T<sub>H</sub>1 immune response and allays T<sub>H</sub>2 cytokine and IgE production in a murine atopic dermatitis model. *J. Agri. Food Chem.* 62(13):2861-2871.
- Luster A.D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14(1):129-35.
- Michielsen, A.J., J.N.O' Sullivan, and E.J. Ryan. 2012. Tumor conditioned media from colorectal cancer patients inhibits dendritic cell maturation. *Onco. Immunol.* 1(5):751-753.
- Nakano, H., K.L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D.N. Cook, T. Kakiuchi, and M.D. Gunn. 2009. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T<sub>H</sub>1 immune responses. *Nat. Immunol.* 10(4):394-402.
- Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher. 2002. The role of T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.* 8(6):567-73.
- Park, Y.H., I.H Son, B. Kim, Y.S. Lyu, H.I. Moon, and H.W. Kang. 2009. *Poria cocos* water extract (PCW) protects PC1 2 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death through antioxidant and antiapoptotic functions. *Die Pharm.* 64:760-764.
- Rais, M., J.S. Wild, B.K. Choudhury, R. Alam, S. Stafford, N. Dharajiya, and S. Sur. 2002. Interleukin-12 inhibits eosinophil differentiation from bone marrow stem cells in an interferon- $\gamma$ -dependent manner in a mouse model of asthma. *Clin. Exp. Allergy* 32:627-632.
- Ríos, José-Luis. 2011. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos*. *Planta. Med.* 77:681-691.

- 
- Romagnani S. 2004. Immunologic influences on allergy and the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 balance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113(3):395-400.
- Sato., M., T. Tai, Y. Nunoura, Y. Yajima, S. Kawashima, and K. Tanaka. 2002. Dehydrotrametenolic acid induces preadipocyte differentiation and sensitizes animal models of noninsulin-dependent diabetes mellitus to insulin. *Biol. Pharm. Bull.* 25(1):81-86.
- Singh-Jasuja, H., A. Thiolat, M. Ribon, M.C. Boissier, N. Bessis, H.G. Rammensee, and P. Decker. 2013. The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiol.* 218:28-39.
- Sun, Y. 2014. Biological activities and potential health benefits of polysaccharides from *Poria cocos* and their derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* 68C:131-134.
- Tai, T., A. Akahori, and T. Shingu. 1993. Triterpenoids from *Poria cocos*. *Phytochemistry* 32:1239-1244.
- Tai, T., T. Shingu, T. Kikuchi, Y. Tezuka, A. Akahori. 1995a. Triterpenes from the surface layer of *Poria cocos*. *Phytochemistry* 39:1165-1169.
- Tai, T., Y. Akita, K. Konoshita, K. Koyama, K. Takahashi, and K. Watanabe. 1995b. Antiemetic principles of *Poria cocos*. *Planta. Med.* 61:527-530.
- Tang, J., J. Nie, D. Li, W. Zhu, S. Zhang, F. Ma, Q. Sun, J. Song, Y. Zheng, and P. Chen. 2014. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Poria cocos* sclerotium. *Carbohydr. Polymers* 105:121-126.
- van Duin, D., M. Ruslan, and C.S. Albert. 2006. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol.* 27(1):49-55.
- van Kooten, C. and Banchereau J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17.

- 
- Veres, T.Z., S. Voedisch, E. Spies, J. Valtonen, F. Prenzler, and Armin Braun. 2013. Aeroallergen challenge promotes dendritic cell proliferation in the airways. *J. Immunol.* 190:897-903.
- Vremec, D. and K. Shortman. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.* 159(2):565-573.
- Wang, S., Y. Wen, and C. Hu. 1995. Immunoactivities of the polysaccharides from *Morus alba*, *Chlamydomonas mexicana* and *Poria cocos*. *Phyther. Res.* 9:448-451.
- Wang, Y., M. Zhang, D. Ruan, A.S. Shashkov, M. Kilcoyne, A.V. Savage, and L. Zhang. 2004. Chemical components and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos*. *Carbohydr. Res.* 339:327-334.
- Wang, Y., S. Liu, Z. Yang, Y. Zhu, Y. Wu, J. Huang, and J. Mao. 2010. Oxidation of  $\beta$ -glucan extracted from *Poria cocos* and its physiological activities. *Carbohydr. Polymers* 85:798-802.
- Wei, W.C., Y.H. Su, S.S. Chen, J.H. Sheu, and N.S. Yang. 2011. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 cells. *Cytokine* 55(1):79-89.
- Witmer-Pack, M.D., W.J. Swiggard, A. Mirza, K. Inaba, and R.M. Steinman. 1995. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol.* 163(1):157-162.
- Xu., R., G.C. Fazio, and S.P. Matsuda. 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *65(3):261-291.*
- Zhang, L., A.S. Ravipati, S.R. Koyyalamudi, S.C. Jeong, N. Reddy, J. Bartlett, P.T.

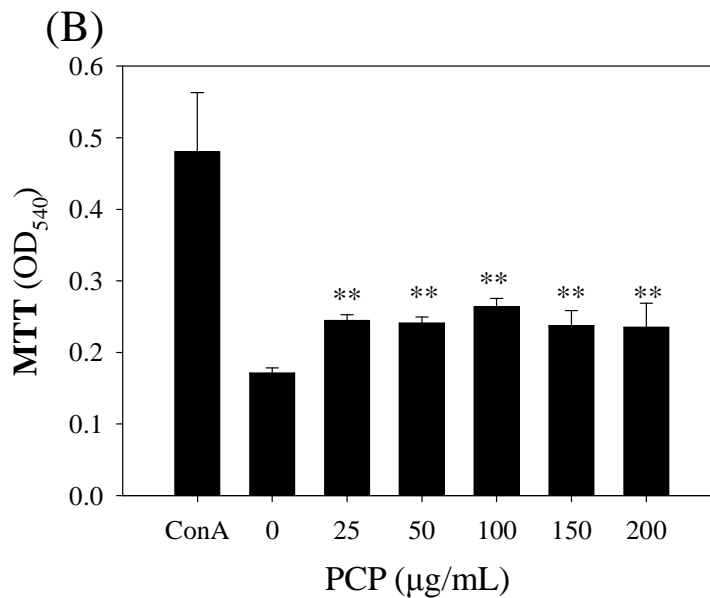
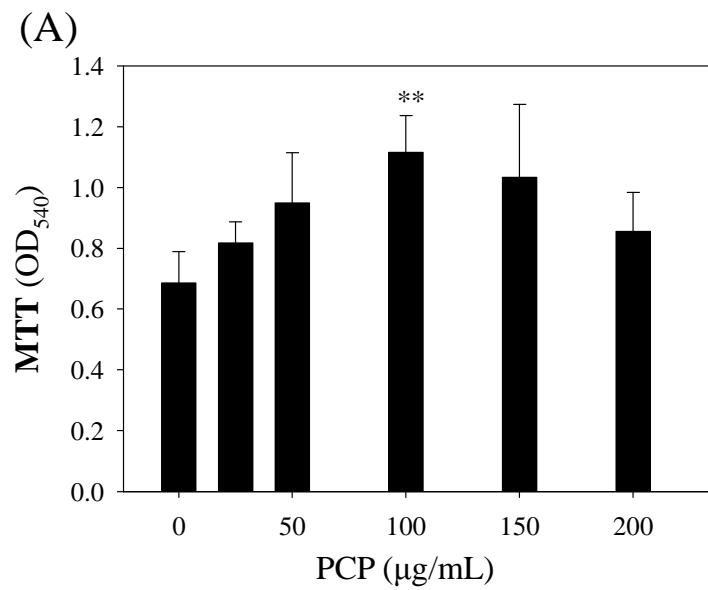
- 
- Smith, M. de la Cruz, M.C. Monteiro, Á. Melguizo, E. Jiménez, and F. Vicente. 2013. Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6:673-681.
- Zhao, Y.Y., P. Lei , D.Q. Chen, Y.L. Feng, and X. Bai. 2013a. Renal metabolic profiling of early renal injury and renoprotective effects of *Poria cocos* epidermis using UPLC Q-TOF/HSMS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 81-82:201-209.
- Zhao, Y.Y., Y.L. Feng., X. Bai, X.J. Tan, R.C. Lin, and Q. Mei. 2013b. Ultra performance liquid chromatography-based metabonomic study of therapeutic effect of the surface layer of *Poria cocos* on adenine-induced chronic Kidney disease provides new insight into anti-fibrosis mechanism. *PLoS One* 8(3): e59617.
- Zhou, L., Y. Zhang, L.A. Gapter, H. Ling, R. Agarwal, and K.Y. Ng. 2008. Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos*. *Chem. Pharm. Bull.* 56(10):1459-1462.





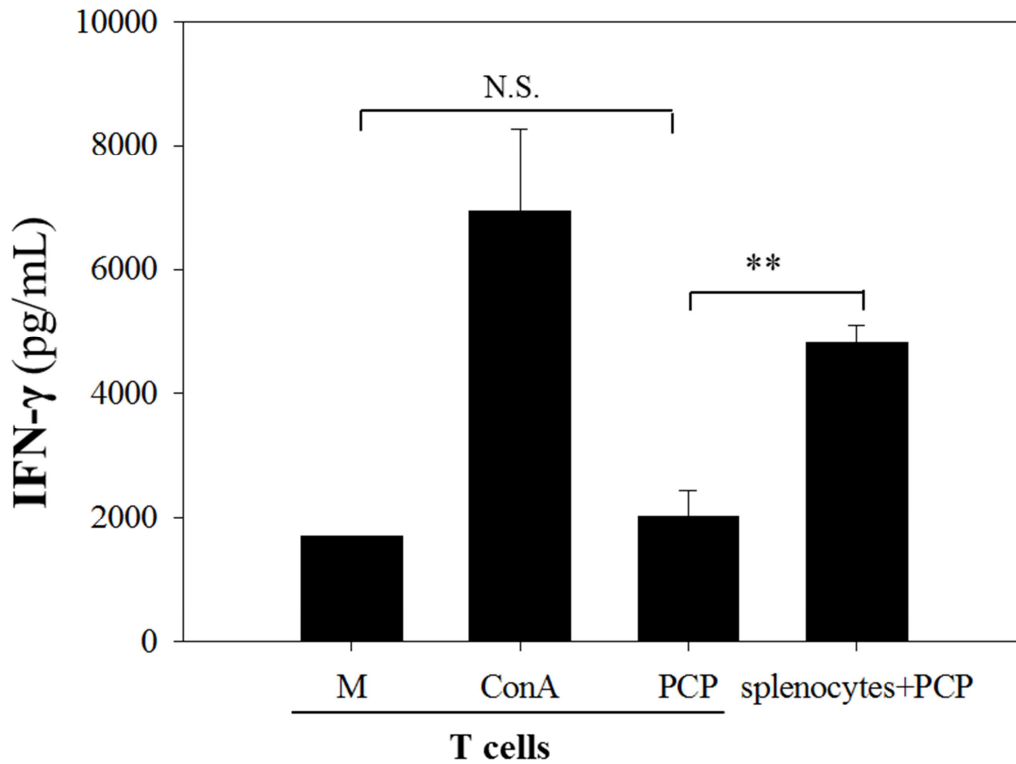
圖一、PCP 之 DE-52 層析、SDS-PAGE 及 PAS 醣染分析結果。

**Fig. 1. DE-52 chromatography elution profile, SDS-PAGE, and PAS staining analysis results of PCP.** (A) DE-52 column was eluted with a linear gradient of 0-0.5 M NaCl in 0.01 M Tris buffer. The polyacrylamide gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 for (B) SDS-PAGE and Schiff' reagent for (C) PAS staining analysis results.



圖二、PCP 與 BALB/c 小鼠脾細胞及 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞培養後之細胞活性。

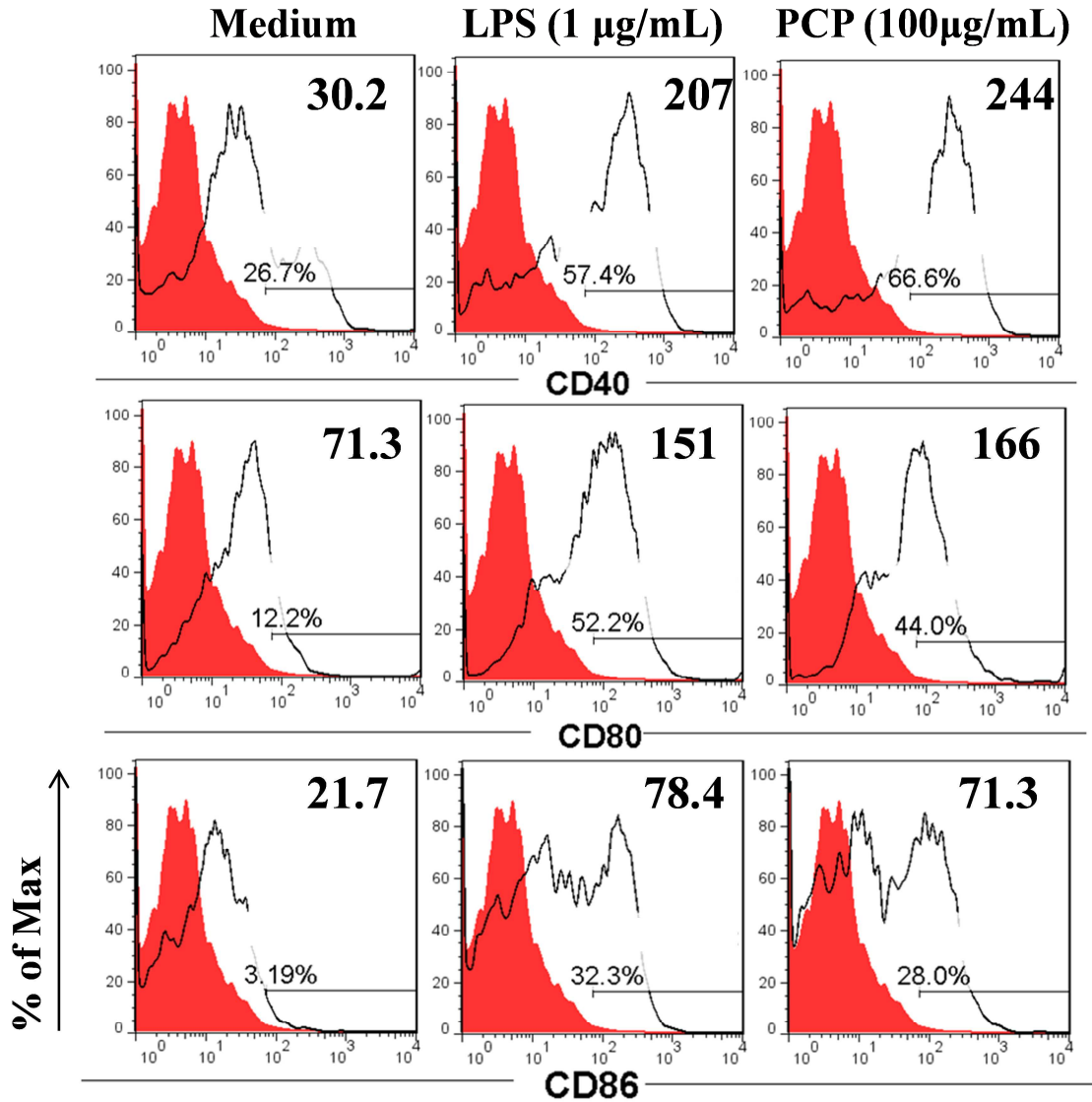
**Fig. 2. Cell viability of BALB/c splenocytes and CD90.2<sup>+</sup> T cells induced with different concentrations of PCP.** We used anti-CD90.2 microbeads to separate CD90.2<sup>+</sup> T cells from BALB/c mice's splenocytes, and then CD90.2<sup>+</sup> T cells was treated with different concentrations of PCP. Cell viability of splenocytes (A) and CD90.2<sup>+</sup> T cells (B) were measured by MTT test. \*\* $p < 0.01$  (Duncan test).



圖三、PCP 刺激 BALB/c 脾細胞及 CD90.2<sup>+</sup> T 細胞 IFN- $\gamma$  分泌之活性。

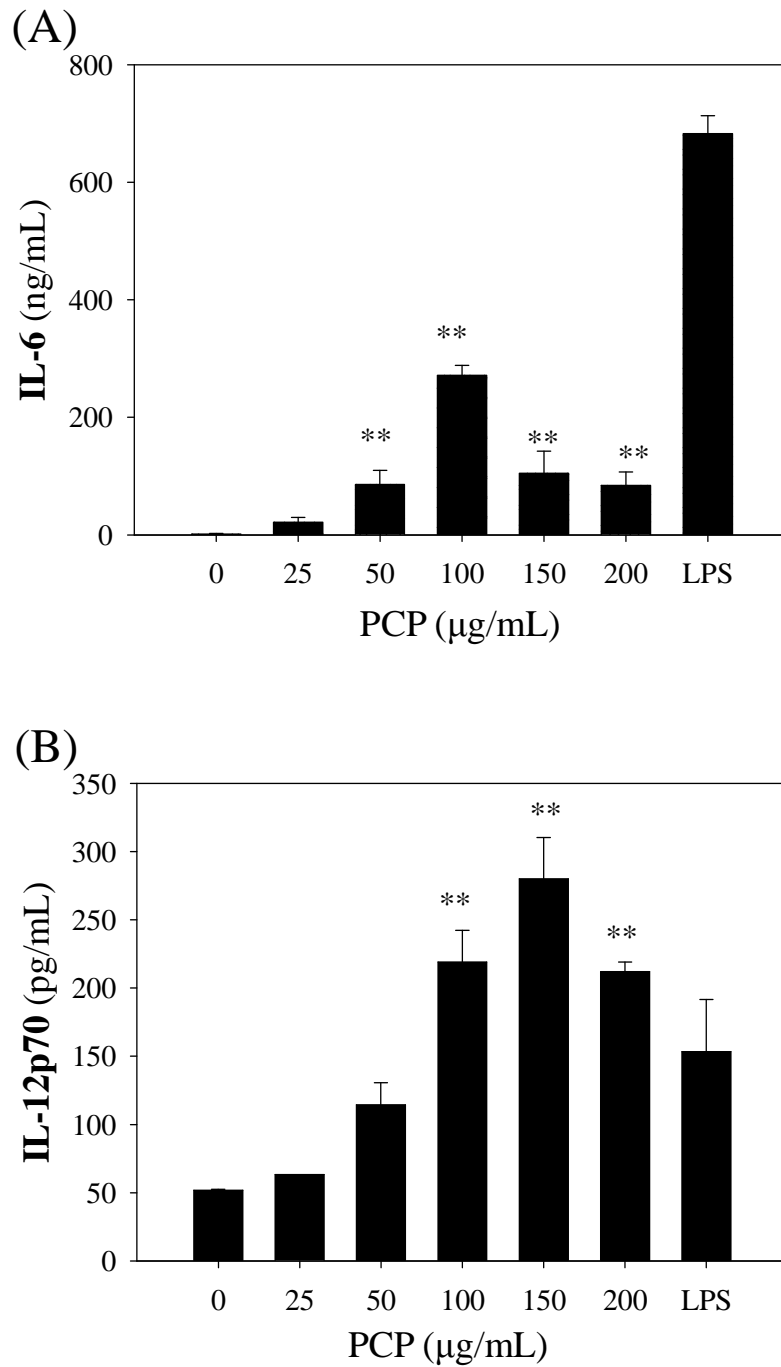
**Fig. 3. Activity of PCP on BALB/c splenocytes and CD90.2 T cells IFN- $\gamma$  secretion.**

IFN- $\gamma$  concentration was measured by ELISA. The supernatant of splenocytes and CD90.2<sup>+</sup> T cells were harvested after incubated with PCP (100  $\mu$ g/mL) or ConA (5  $\mu$ g/mL) for 72 hr. \*\* $p$ <0.01. N.S.=No significance (Duncan test).



圖四、PCP 可增加 BALB/c BMDCs 表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現量。

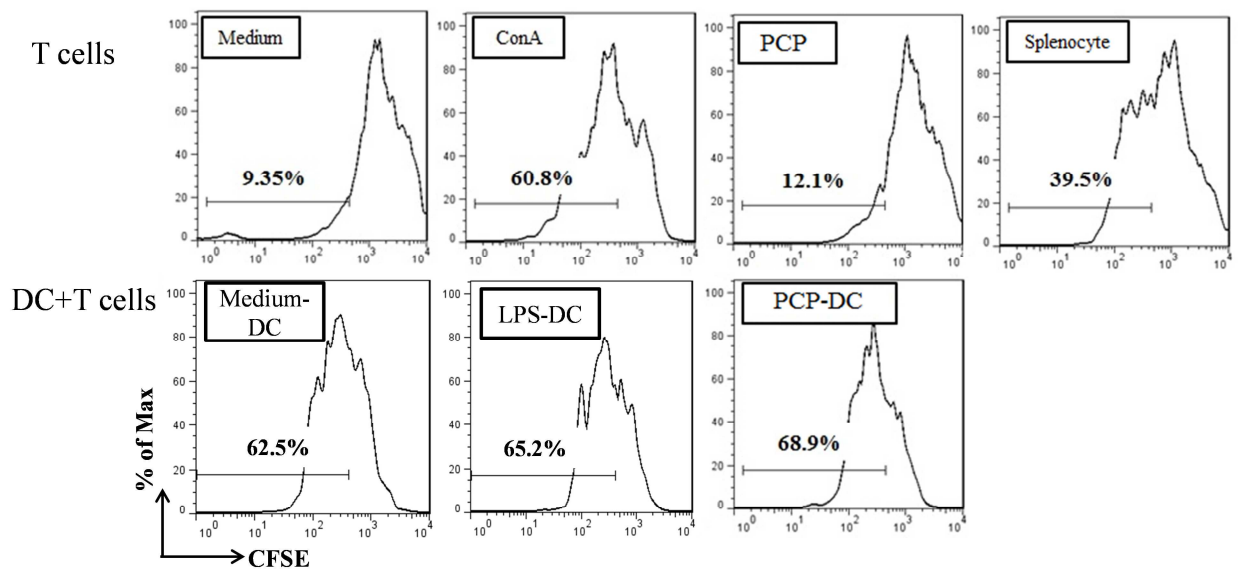
**Fig. 4.** PCP could promote the expression of CD40, CD80, and CD86 on BALB/c BMDCs. BMDCs were incubated with PCP (100 µg/mL) for 24 hr. The expression of BMDC surface markers and mean fluorescent intensity (MFI) were analyzed by flow cytometry.



圖五、PCP 活化之 BMDCs 可提升 IL-6 及 IL-12p70 分泌結果。

**Fig. 5. PCP could promote IL-6 and IL-12p70 production on BMDCs.** BMDCs were incubated with different concentrations of PCP for 24 hr. The cell supernatants were harvested and analyzed for IL-6 (A) and IL-12 p70 (B) secretion by ELISA.

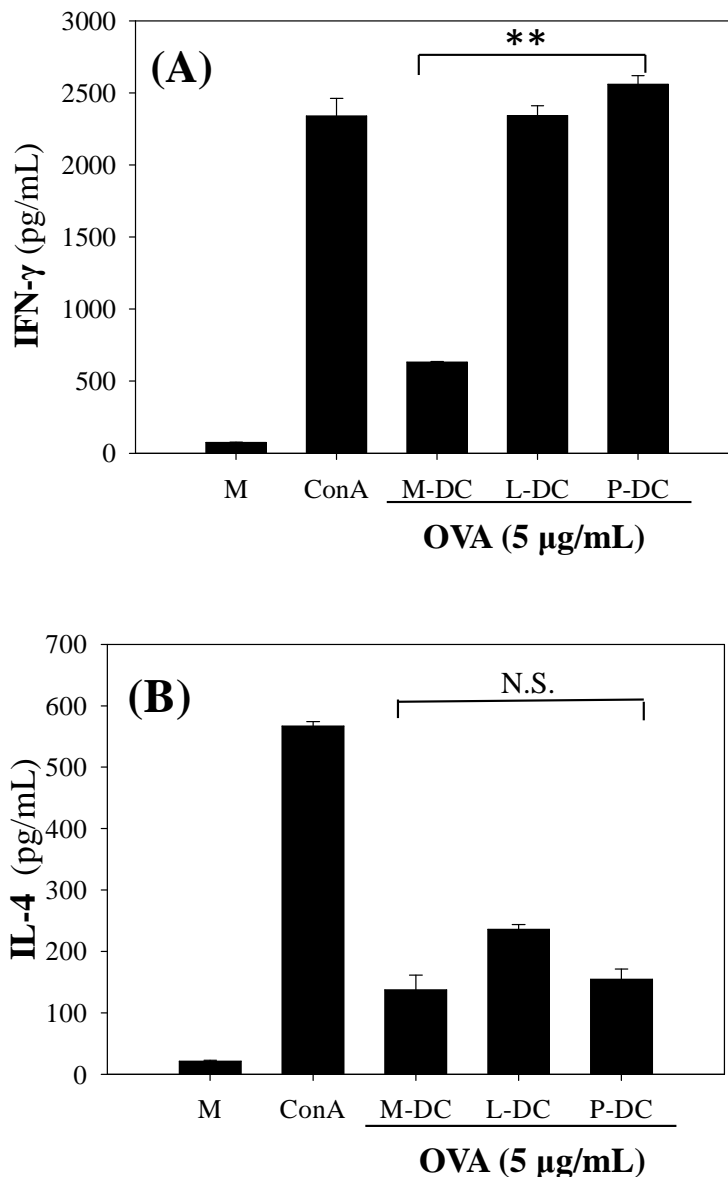
\*\* $p < 0.01$  (Duncan test).



圖六、PCP 預培養之 BMDCs 可促 DO11.10 T 細胞增生。

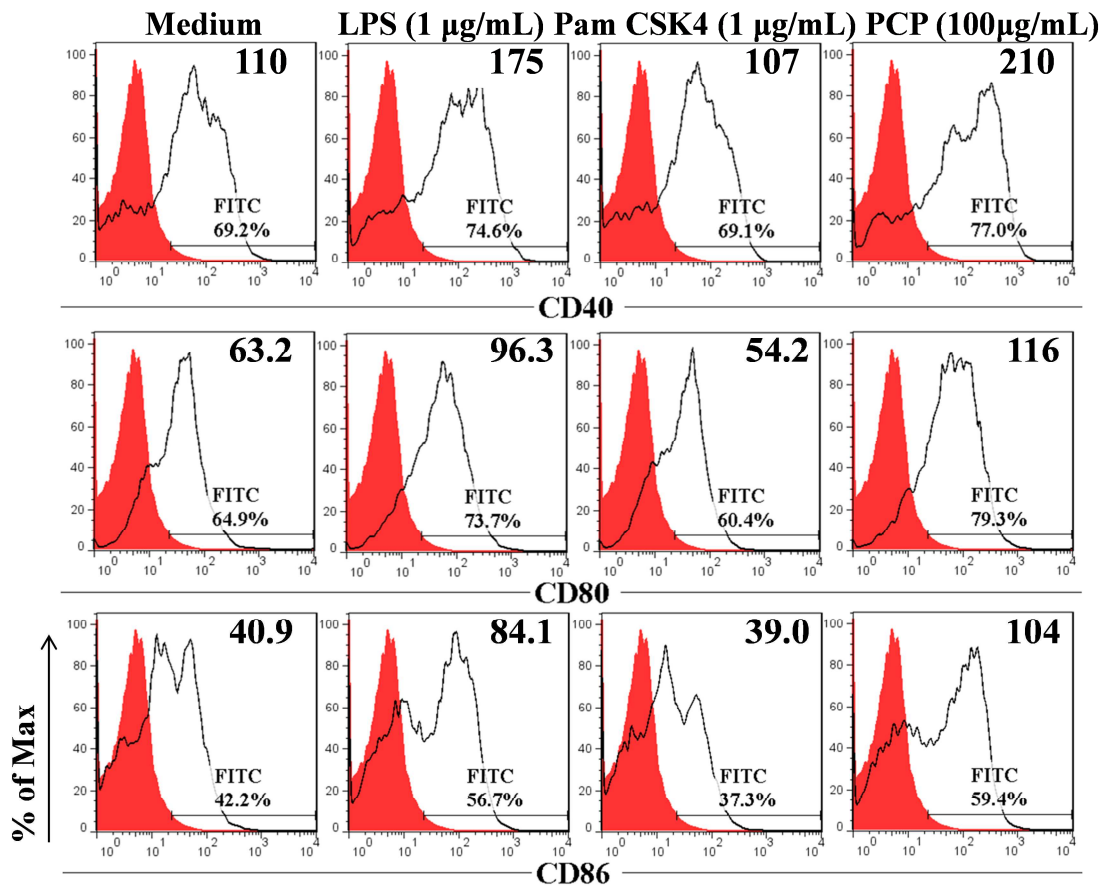
**Fig. 6. PCP-preincubated BMDCs could promote DO11.10 T cell proliferation.**

After the incubation of BMDCs with PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 hr, BMDCs were incubated with DO11.10 OVA-specific T cells which were labeled with CFSE and OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 72 hr. DO11.10 T cells and splenocytes were also incubated with ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 72 hr. DO11.10 T cell proliferation was performed by using flow cytometry and the percentage of proliferated T cells is stated.



圖七、DO11.10 T 細胞與 PCP 預培養之 BMDCs 培養後 IFN- $\gamma$  及 IL-4 分泌。

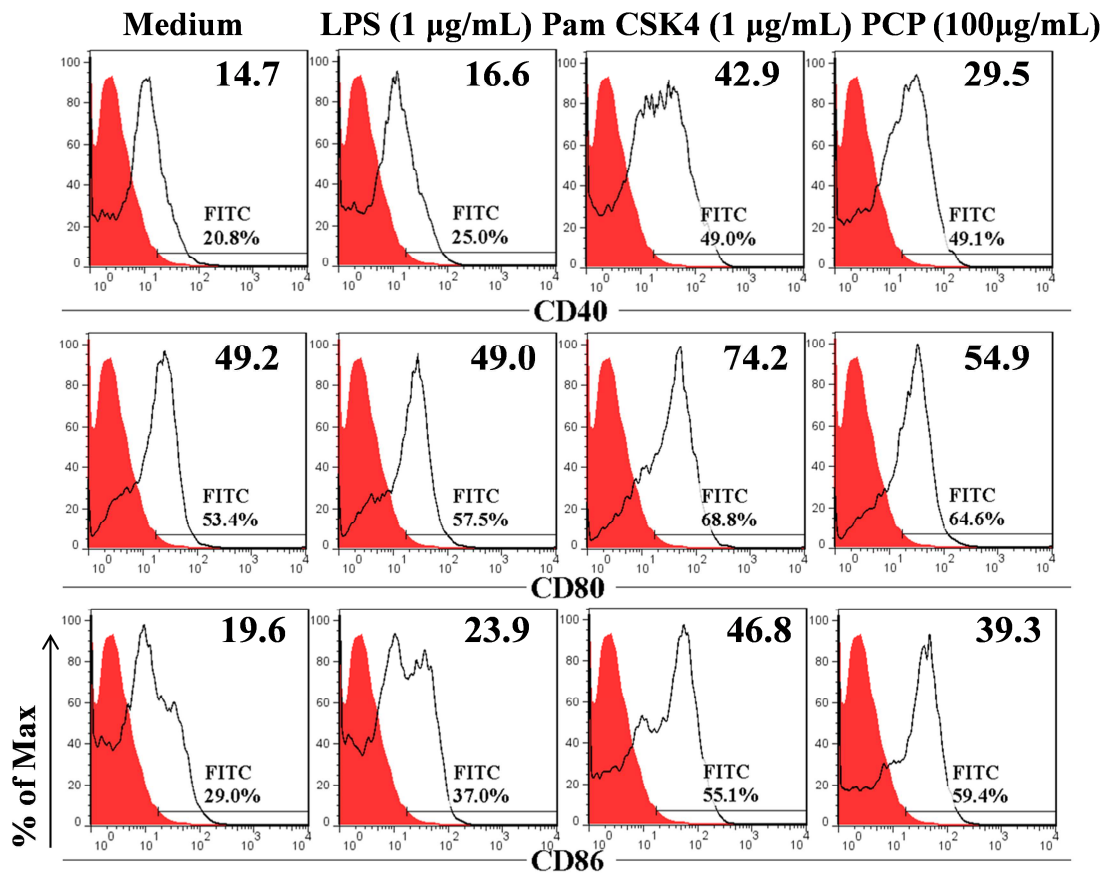
**Fig. 7.** IFN- $\gamma$  and IL-4 production in DO11.10 T cells incubated with BMDCs preincubated with PCP. After the incubation of PCP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and BMDCs for 24 hr, the BMDCs were incubated with DO11.10 OVA-specific T cells labeled with CFSE and OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 72 hr. The cell supernatants were analyzed for IFN- $\gamma$  (A) and IL-4 (B) secretion by ELISA.  $**p < 0.01$ . N.S.=No significance (Duncan test).



圖八、與 PCP 共培養之  $TLR2^{-/-}$  BMDCs 表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現。

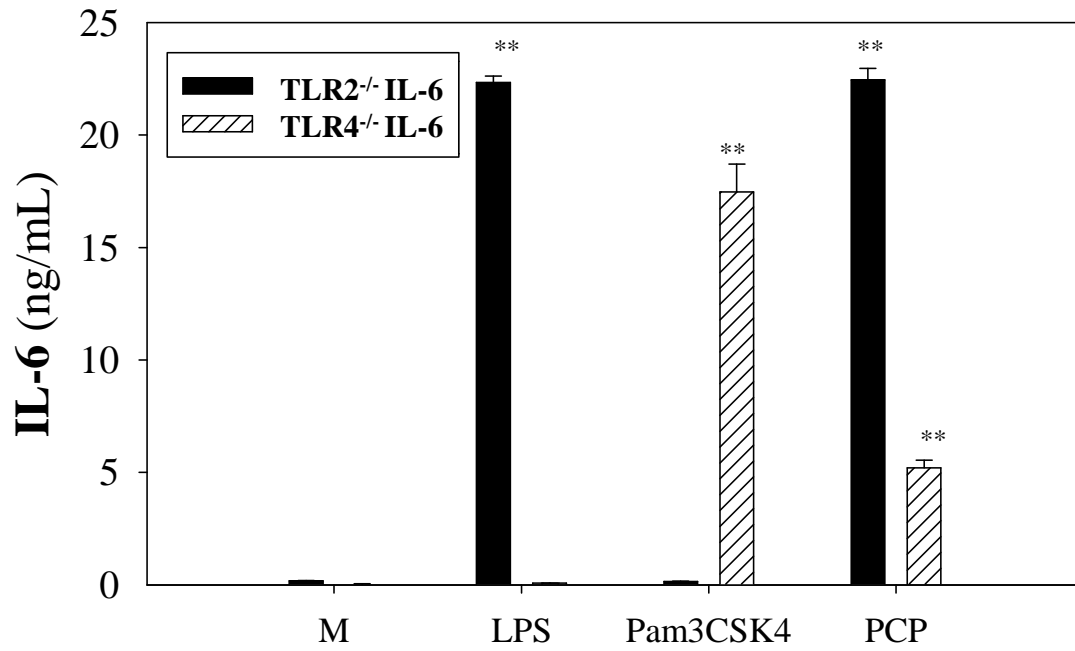
**Fig. 8.** CD40, CD80, and CD86 expression on  $TLR2^{-/-}$  BMDCs induced by PCP.  $TLR2^{-/-}$  BMDCs were incubated with PCP (100 µg/mL) for 24 hr. The expression of BMDC surface markers and mean fluorescent intensity (MFI) were analyzed by flow cytometry.





圖九、與 PCP 共培養之  $TLR4^{-/-}$  BMDCs 表面分子 CD40、CD80 及 CD86 表現。

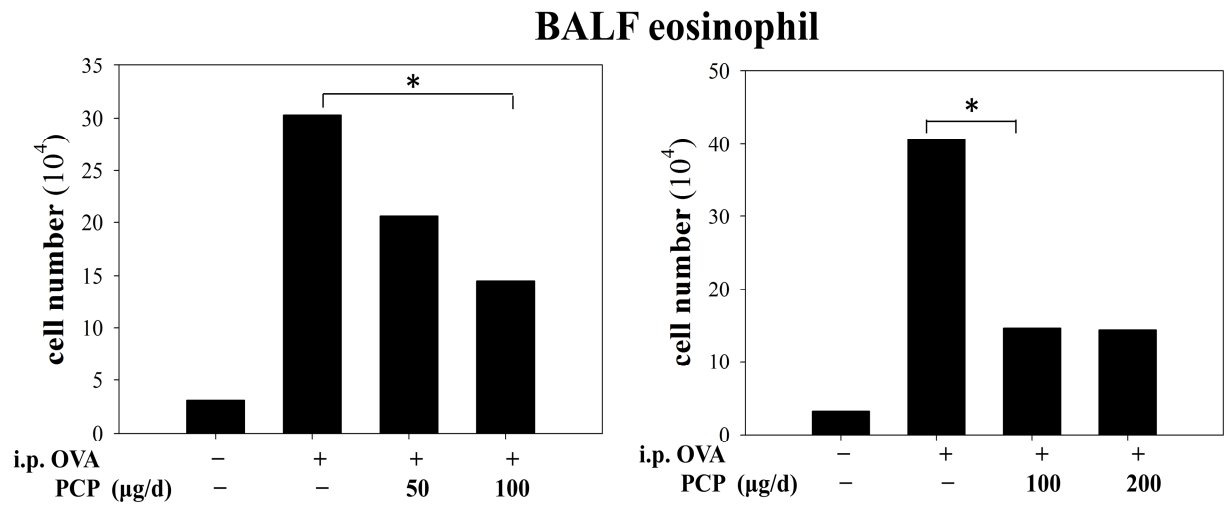
**Fig. 9.** CD40, CD80, and CD86 expression on  $TLR4^{-/-}$  BMDCs induced by PCP.  $TLR4^{-/-}$  BMDCs were incubated with PCP (100 µg/mL) for 24 hr. The expression of BMDC surface markers and mean fluorescent intensity (MFI) were analyzed by flow cytometry.



圖十、與 PCP 共培養之 TLR2<sup>-/-</sup> 及 TLR4<sup>-/-</sup> 樹突細胞 IL-6 分泌量。

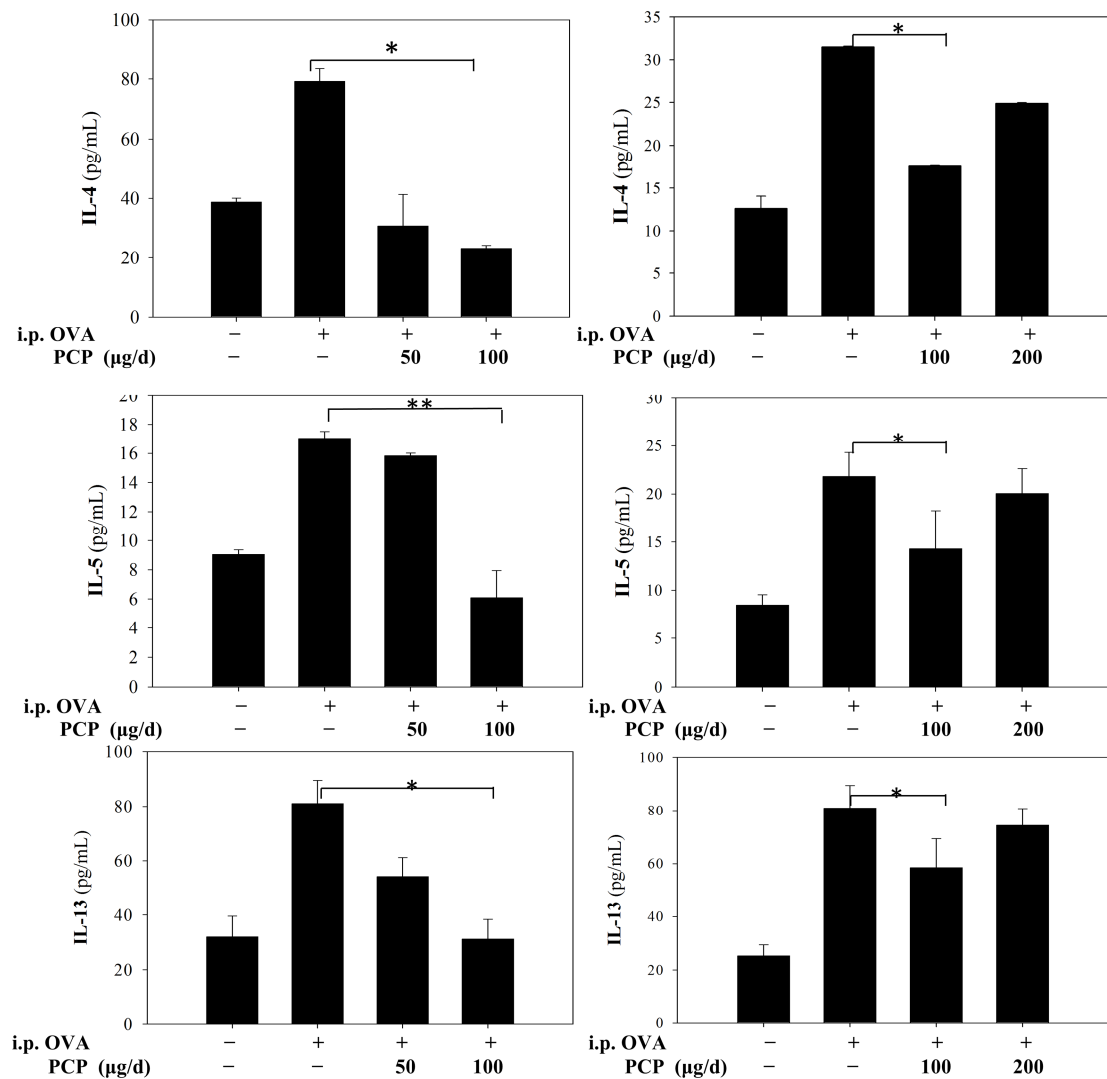
**Fig. 10. IL-6 production in PCP-activated TLR2<sup>-/-</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> BMDCs.** TLR2<sup>-/-</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> BMDCs were incubated with PCP (100 µg/mL) for 24 hr. The cell supernatants were analyzed for IL-6 secretion by ELISA. \*\**p*<0.01 (Duncan test).





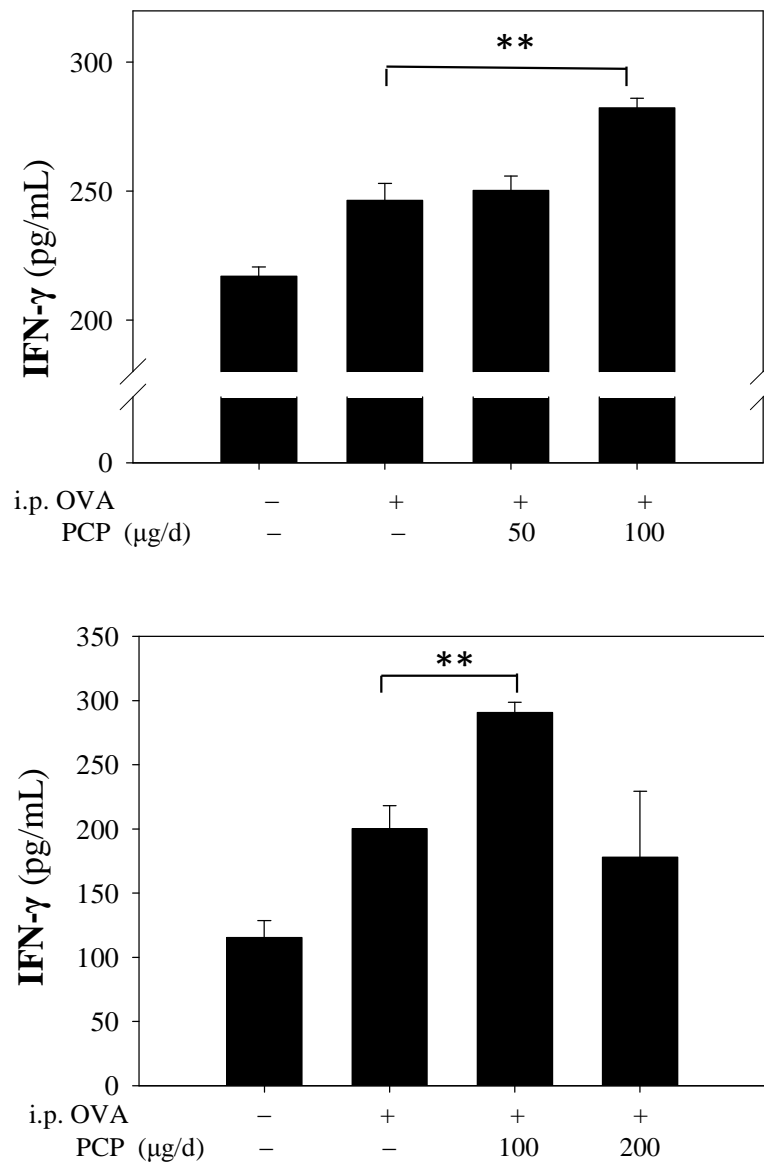
圖十二、餵食 PCP 可降低 BALB/c 小鼠 BALF 之嗜酸性球數。

**Fig. 12.** Oral administration of PCP could decrease the number of eosinophils in OVA-treated BALB/c mice BALF. After the final OVA challenge, BALF was collected to calculate eosinophil number (per milliliter).  $n=5/\text{group}$ .  $*p<0.05$  (Duncan test).



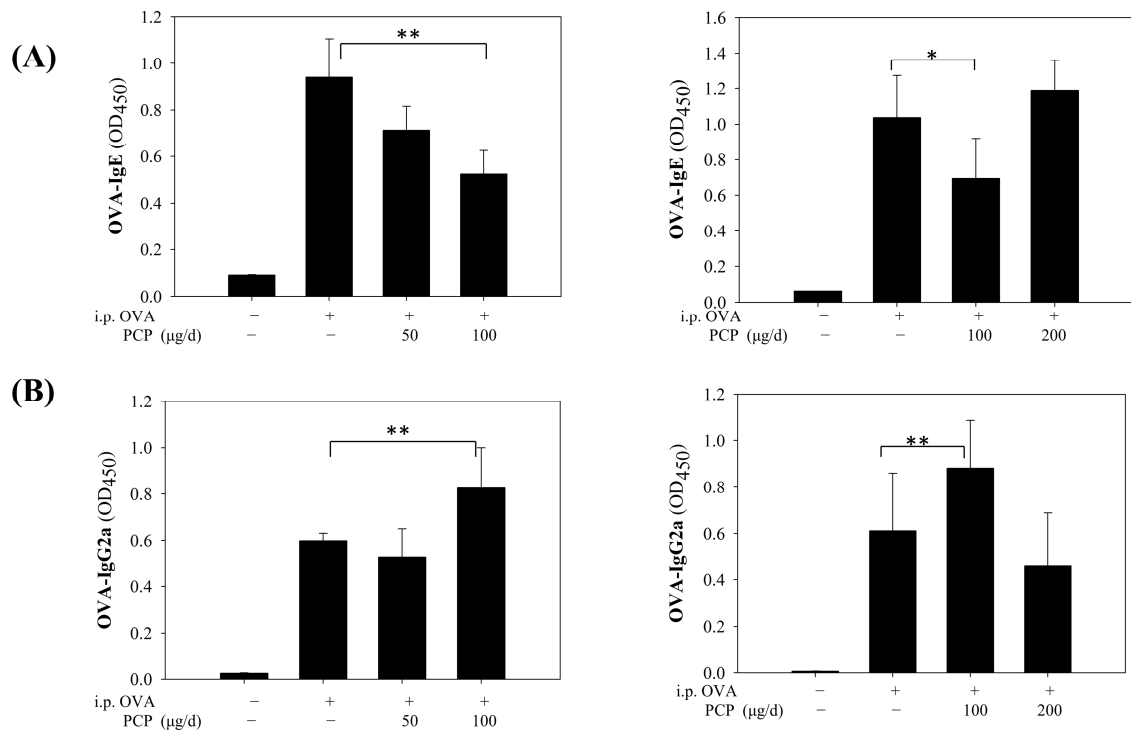
圖十三、口服 PCP 之氣喘小鼠 BALF  $T_H2$  細胞素 IL-4、IL-5 及 IL-13 分泌。

**Fig. 13. IL-4, IL-5, and IL-13 levels of  $T_H2$  cytokine in BALF of OVA-treated mice with oral administration of PCP.** After the final OVA challenge, BALF was collected, centrifuged, and measured the cytokine expression in supernatant for  $T_H2$  (IL-4, IL-5, and IL-13) cytokine levels by ELISA.  $n=5/\text{group}$ .  $*p<0.05$ .  $**p<0.01$  (Duncan test).



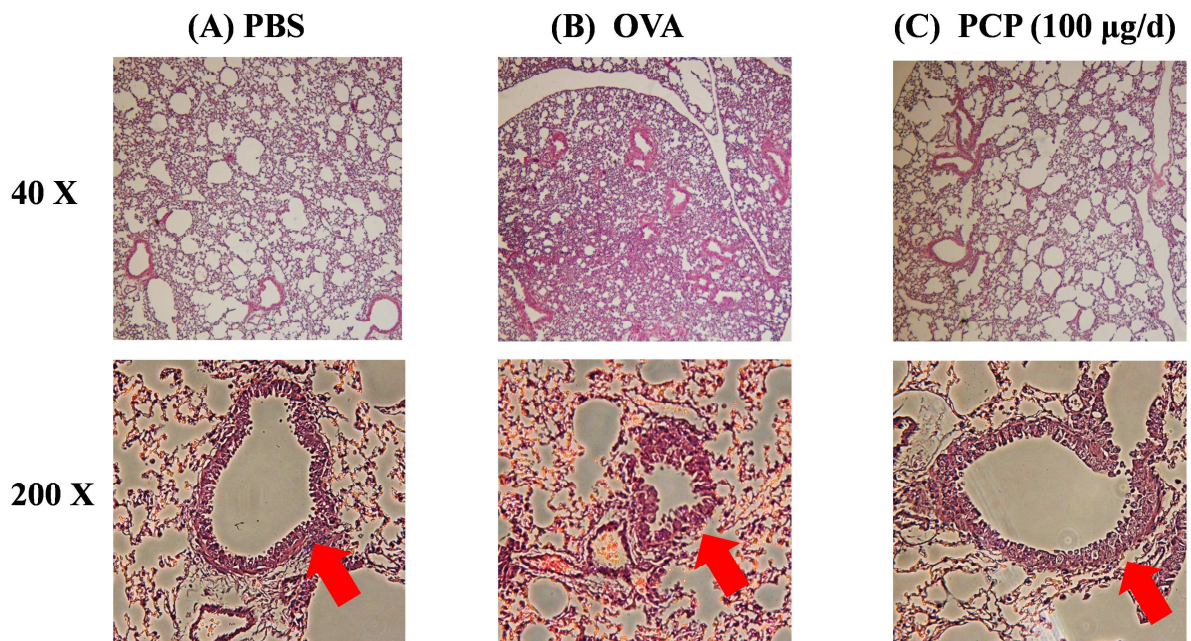
圖十四、口服 PCP 氣喘小鼠 BALF 之  $T_H1$  細胞素 IFN- $\gamma$  分泌。

**Fig. 14.** IFN- $\gamma$  cytokine levels in BALF of OVA-treated mice with oral administration of PCP. After the final OVA challenge, BALF was collected, centrifuged, and cytokine expression in supernatant measured for  $T_H1$  cytokine (IFN- $\gamma$ ) level by ELISA.  $n=5/\text{group}$ .  $**p<0.01$  (Duncan test).



圖十五、口服 PCP 氣喘小鼠血清之 OVA 特異性 IgE 及 IgG2a 分泌。

**Fig. 15. OVA-specific IgE and OVA-specific IgG2a level in the serum of the OVA-treated mice with oral administration of PCP.** Serums were collected from different groups of mice on day 0 and day 30, then OVA-specific IgE (A) and OVA-specific IgG2a (B) were determined by ELISA.  $n=5/\text{group}$ .  $*p<0.05$ .  $**p<0.01$  (Duncan test).



圖十六、H&E 染色之小鼠肺部切片。

**Fig. 16. Lung sections assessing cellular inflammation with H&E staining.** Lung tissues were obtained on day 30 and were soaked in 10% formalin. Paraffin-embedding and H&E staining were prepared by the Laboratory Animal Center of National Taiwan University College of Medicine. The arrows identify infiltrating immune cells.