

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

鴻喜菇蛋白質對人類肝癌細胞 (HepG2) 生長抑制及

細胞週期停滯之研究

Growth Inhibition and Cell Cycle Arrest in Human Hepatoma

HepG2 Cells by Protein HM-3 from *Hypsizigus marmoreus*

張雅筑

Ya-Chu Chang

指導教授：吳瑞碧 博士

Advisor: James Swi-Bea Wu, Ph. D.

中華民國一百零一年七月

July, 2012

謝誌

本論文承蒙指導教授 吳瑞碧博士兩年來的悉心指導，無論是研究工作上問題之解決及縝密富邏輯性思考能力之訓練，或是生活上待人處世的應對與對學生的關心，各方面皆使學生受益匪淺，在此向老師致上最深的謝意。論文初成，感謝成功大學 鄭瑞棠博士、屏東科技大學 吳明昌博士、中山醫學大學 王進崑博士及嘉義大學 廖慧芬博士於百忙之中撥冗審閱指正，並於口試時給予學生許多寶貴的建議，使論文更加完善流暢，謹此致上誠摯的謝意。

研究期間，感謝所上所有老師的照顧與指導。感謝裕泰學長、阿川學長平日的照顧及提供實驗方向。最要感謝的是嘉續學姊，除了實驗上盡心指導及生活上的關心，您指導的方式讓我對實驗有更多的思考空間，真的很感謝您讓我可以順利完成碩士學位。感謝實驗室成員馨云學姊，在妳的帶領下學到很多、義不容辭為我修筆電的培挺學長、辛苦帶我做實驗的佩芬學姊，和妳一起搞笑的日子非常愉快、在實驗室生活幫助我很多的文昌學長、一起做瑜珈和合購的巧俐學姊、陪我談天說地的鈺蒨學姊。感謝這兩年可以大吐苦水一起瘋癲的弘典、幫忙我超多人很好的基彰、教我實驗的瑞雯，無論酸甜苦辣我們都一起走過。感謝實驗小幫手貴蘭和佳芸、感謝學弟妹斌雁、家銘、甄雯、淑親、彥伶、明勳、柏伶在口試當天的幫忙讓我順利完成口試，祝福你們接下來的實驗順利。

感謝食科所好友及實驗上協助我的育如、一茜、凱琪、雅茹、育正，園藝系好友佳晏、家弘、林樵、千育、潞琳、乃夫、玠廷，外系好友宗翰和允芃，蛋研社好友薈霖、智文、冠儒、家煌，高中好友云馨、瑋孺、怡潔、郁婷、榮瀅及一路走來最支持我的晨瑋，是你們在我情緒低落時一直陪伴鼓勵著我，讓我又有了往前的動力。

最後，要感謝我最愛的家人，感謝爸爸在我做實驗到半夜時來接我回家，感謝媽媽每天為我準備營養的愛心便當，你們的關心總是溢於言辭，尊重且支持任何我想做的事。感謝可愛的弟弟和妹妹為家中帶來不少歡樂，我知道你們其實很貼心，默默的幫我很多。不管實驗上遭逢挫折或在外受了委屈，只要回家就能為我重新灌注溫暖且幸福的能量。

謹此微薄的研究成果獻給身旁的家人、師長及朋友，祝福你們順心愉悅，平安健康。

張雅筑 謹誌於

國立臺灣大學食品科技研究所

中華民國一百零一年七月

摘要

肝癌為近年來國人癌症死因中第二位，目前常用的治療方法有手術切除、肝臟移植、栓塞治療以及化學藥物治療等，但皆有其侷限性或副作用；因此，由天然物開發有效之抗癌藥物已成為重要的課題。鴻喜菇 (*Hypsizigus marmoreus*) 為低熱量、低脂肪且營養價值高的食用菇，目前研究結果顯示其具有抗腫瘤、抗真菌、抗氧化等功能。本研究將鴻喜菇以 40~80% 饱和度之硫酸銨沉澱得蛋白質粗萃物，再以陰離子交換樹脂 DEAE-Sephadex CL-6B 經連續鹽梯度或階梯鹽梯度溶離收集樣品。以 0~1 M 連續鹽梯度所得樣品 HM-3 及階梯梯度 0.2 與 0.4 M 鹽濃度溶離之樣品 (fraction I、II) 對 HepG2 進行生長抑制測試，經 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 HM-3 處理 12 及 24 小時得到的生長抑制率分別為 87.41% 及 88.25%，且生長抑制具有濃度效應。以 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 fraction I 對 HepG2 處理 12 及 24 hr 的抑制率分別為 24.41% 與 19.44%，而 fraction II 則無抑制效果。階梯梯度樣品中以 fraction I 抑制效果為佳，但仍較 HM-3 差，故後續探討生長抑制機制皆以 HM-3 為樣品。由流式細胞儀分析細胞週期結果顯示，以 HM-3 處理 24 小時，會使 HepG2 出現細胞週期停滯 (cell cycle arrest)，當濃度由 0 提升至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ， G_1 phase 比例由 54.35% 提高至 69.08%，但並無細胞凋亡之現象。以瓊脂糖膠體電泳檢測 DNA 完整性，也未觀察到細胞凋亡特徵之一的 DNA 片段化。利用西方墨點法檢測 G_1 細胞週期停滯相關蛋白 p53、p21、p27、cyclin A2、cyclin D1、cyclin E1 及 CDK2 之表現，發現隨處理濃度提高，p53 及 p21 表現量皆有增加的現象，p21 表現量與控制組相比具顯著差異。cyclin E1 表現量與控制組相比有顯著下降的現象，而 p27、cyclin A2、cyclin D1 及 CDK2 表現量則無明顯變化。根據以上結果推測，HM-3 能抑制 HepG2 生長，並可能透過活化 p53 與 p21 而抑制 cyclin E1 之表現，使其細胞週期停留在 G_1 phase。

關鍵字：肝癌、鴻喜菇、細胞週期停滯、細胞凋亡

Abstract

The mortality rate of hepatocellular carcinoma in all cancer mortality ranks second in Taiwan. There are some common treatments against this disease such as surgical resection, liver transplantation, embolization and chemotherapy. Although these treatments have been carried out for many years, they still have limitations and side effects. Therefore, exploration of effective chemotherapeutic agents from natural food is urgently needed. *Hypsizigus marmoreus* is a low-calorie, low-fat and high protein content mushroom. A number of bioactive molecules including antitumor, antifungal and antioxidant substances have been identified from this mushroom. In this research, proteins in *H. marmoreus* were precipitated by 40~80% saturated ammonium sulfate. DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography was used subsequently, and eluted by 0~1 M NaCl continuous or stepwise gradient. Fraction isolated by continuous gradient named HM-3, and eluted by 0.2 or 0.4 M NaCl stepwise gradient named fraction I or II. HM-3 at a concentration of 50 μ g/ml strongly inhibited the growth of HepG2 cells by 87.41% and 88.25% for 12 and 24 hr respectively. HM-3 inhibited the growth of HepG2 cells in a concentration-dependent manner. Cells were incubated with 50 μ g/ml fraction I or II for 12 and 24 hr, and results showed that fraction I inhibited the growth of HepG2 cells by 24.41% and 19.44%. Fraction II had no obvious growth inhibition. Above results indicated that HM-3 had better growth

inhibition than others, so we chose HM-3 to investigate the mechanism of growth inhibition. G₁ phase arrest was observed by flow cytometry when cells were incubated with HM-3 for 24 hr. G₁ phase percentage ranged from 54.35% to 69.08% when concentration increased to 200 μ g/ml from 0 μ g/ml, but no apoptosis was observed. DNA ladder was not observed by agarose gel electrophoresis. Western blotting analysis showed the expression of p53 and p21 increased in HepG2 cells with the increasing concentration of HM-3. Obvious decrease in cyclin E1 was observed and no apparent change in p27, cyclin A2, cyclin D1 and CDK2. According to these results, HM-3 might induce growth inhibition by activating p53 and p21, then inactivating cyclin E1, causing G₁ phase cell cycle arrest in HepG2 cells.

keywords: hepatocellular carcinoma, *Hypsizigus marmoreus*, cell cycle arrest, apoptosis

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
目錄	IV
圖次	VII
第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	2
第一節、癌症	2
(一) 癌症簡介	2
(二) 肝癌	2
(1) 肝臟簡介	2
(2) 肝癌種類	3
(3) 肝癌成因	5
(4) 肝癌可能之治療方法	6
(三) 人類肝癌細胞株 HepG2	9
第二節、食用菇	11
(一) 食用菇簡介	11
(二) 鴻喜菇	15
第三節、細胞週期 (Cell cycle)	17
(一) 細胞週期	17
(二) 細胞週期之調控	19
第四節、細胞凋亡 (Apoptosis)	23
(一) 形態及生理變化	23
(二) 細胞凋亡之機制	25

第三章 研究動機	27
第四章 實驗架構	28
第五章 材料與方法	29
第一節、實驗材料	29
(一) 原料來源	29
(二) 實驗細胞	29
(三) 藥品及試劑	29
(四) 藥品配製	31
(五) 儀器設備	33
第二節、實驗方法	35
(一) 鴻喜菇 40~80%飽和度硫酸銨沉澱粗萃物之製備	35
(二) 鴻喜菇 40~80%飽和度硫酸銨沉澱粗萃物之陰離子交換樹脂區分 ..	35
(三) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之電泳檢定	36
(1) 聚丙烯醯胺電泳 (SDS-PAGE)	36
(2) Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法	37
(四) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之膠體管柱層析	37
(五) 人類肝癌細胞 HepG2 之解凍活化、培養與保存	37
(六) 鴻喜菇萃取物對 HepG2 之生長抑制測試	38
(七) 流式細胞儀分析細胞生長週期之變化	38
(八) 瓊脂糖膠體電泳法檢測 DNA 片段化	39
(1) 細胞收集與染色體 DNA 萃取	39
(2) DNA 濃度定量分析	40
(3) 瓊脂糖膠體電泳法	40
(九) 西方墨點法檢測蛋白質之表現	41
(1) 細胞收集與蛋白質萃取	41

(2) 蛋白質濃度定量分析	42
(3) 聚丙烯醯胺電泳 (SDS-PAGE)	42
(4) 蛋白質轉印	42
(5) 酵素免疫染色法 (Immunoblotting)	43
(十) 統計分析	44
第六章 結果與討論	45
(一) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物之製備	45
(二) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之連續鹽梯度陰離子交換樹脂 區分	45
(三) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之電泳檢定	46
(四) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之膠體管柱層析	46
(五) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之階梯鹽梯度陰離子交換樹脂 區分	47
(六) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物及陰離子交換樹脂區分物對 HepG2 之生長抑制率測試	48
(七) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物對 HepG2 之細胞週期分佈	50
(八) 瓊脂糖電泳檢測 DNA 片段化現象	52
(九) 西方墨點法分析細胞週期相關蛋白表現	53
第七章 結論	79
第八章 參考文獻	80

圖次

圖 2-1、民國 99 及 100 年主要癌症死亡人數佔率.....	4
圖 2-2、細胞週期之調控分子.....	21
圖 2-3、細胞週期中 cyclins 和 p27 ^{Kip1} 的變化.....	22
圖 2-4、細胞壞死與細胞凋亡形態之差異.....	24
圖 2-5、哺乳動物細胞凋亡之兩種主要路徑.....	26
圖 6-1、鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之連續鹽梯度 DEAE-Sepharose 離子交換層析圖.....	57
圖 6-2、鴻喜菇離子交換樹脂區分物之 12.5% SDS-PAGE 以 CBR 染色膠片圖....	58
圖 6-3、鴻喜菇離子交換樹脂區分物之 Sephacryl S-300 膠體管柱層析圖.....	59
圖 6-4、鴻喜菇離子交換樹脂區分物之 Sephacryl S-200 膠體管柱層析圖.....	60
圖 6-5、鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之階梯鹽梯度 DEAE-Sepharose 離子交換層析圖.....	61
圖 6-6、鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物對 HepG2 培養 24 小時之生長 抑制率.....	62
圖 6-7、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 12 及 24 小時之生長抑制率.....	63
圖 6-8、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂階梯梯度樣品 Fraction I 對 HepG2 培養 12 及 24 小時之生長抑制率.....	64
圖 6-9、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續及階梯鹽梯度樣品對 HepG2 培養 12 hr 之生長抑制率綜合比較.....	65
圖 6-10、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續及階梯鹽梯度樣品對 HepG2 培養 24 hr 之生長抑制率綜合比較.....	66

圖 6-11、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 12 小時之細胞週期變化.....	67
圖 6-12、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 24 小時之細胞週期變化.....	68
圖 6-13、以六種不同濃度 DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 24 小時之細胞週期變化.....	69
圖 6-14、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 24 小時之細胞週期變化整理.....	70
圖 6-15、以不同濃度 HM-3 培養 12 及 24 小時 HepG2 之 DNA 瓊脂糖電泳圖.....	71
圖 6-16、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 p53 表現之影響.....	72
圖 6-17、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 p21 表現之影響.....	73
圖 6-18、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 p27 表現之影響.....	74
圖 6-19、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 cyclin A2 表現之影響.....	75
圖 6-20、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 cyclin D1 表現之影響.....	76
圖 6-21、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 cyclin E1 表現之影響.....	77
圖 6-22、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 CDK2 表現之影響.....	78

第一章 前言

由於科技的發展帶來了飲食的西化及生活型態的改變，使台灣近年來盛行之疾病及死亡原因與過去截然不同。現代人普遍攝食蔬果量不足與缺乏運動，再加上壓力大之工作環境，導致各種疾病如癌症、高血壓、糖尿病及心血管疾病等發生率大幅提高。在國人十大死因中，癌症自民國 71 年起即居首位。癌症死亡人數逐年增加，與國人老化速度有關。近年來，國人肝及肝內膽管癌死亡率在惡性腫瘤死亡率中位居第二，僅次於肺癌，可見肝癌對國民健康為一極大威脅。病毒性肝炎、肝硬化、酗酒、肝毒性物質或其他藥物皆可能導致肝癌的發生。肝癌的治療方法不外乎手術切除、肝臟移植、栓塞治療、酒精局部注射以及化學藥物治療等，但皆有其侷限性或副作用；因此，由天然物開發有效之抗癌藥物已成為重要的課題。

食用菇在亞洲地區培育多年，種類相當多元，為極受歡迎的食物之一。菇類的口感特殊且營養價值高，含豐富的蛋白質、維生素與礦物質，且具有低熱量及低脂肪的特性，素有「植物性食物之最」及「蔬菜中的牛排」等美名。目前已有許多文獻指出，食用菇中分離的成分具有許多生理活性，如抗腫瘤、免疫調節、降血糖、抗微生物和抗氧化等功效。鴻喜菇長期以來被視為高級食材，為國內新興栽培的食用菇之一。本研究以鴻喜菇為材料，並由其中分離出具生物活性的蛋白質，探討其對人類肝癌細胞 HepG2 之生長抑制機制。在實際應用上，期望可作為評估鴻喜菇開發為抗癌藥物或保健食品素材之重要參考。

第二章 文獻回顧

第一節、癌症

(一) 癌症簡介

根據行政院衛生署統計資料顯示，惡性腫瘤自民國 71 年起，即位居國人十大死因之首。民國 100 年國人因癌症死亡人數為 42,559 人，占所有死因死亡人數的 28%。惡性腫瘤死亡人數逐年增加，與國人老化速度有關。20 年來，其死亡人數占率從 79 年之 17.8%，逐年上升至 100 年達 28% (行政院衛生署衛生統計，2012)。研究結果顯示，癌症之發生可能與飲食、遺傳、生活習慣及環境汙染等因素有密切的關係。

正常情況下人體內細胞之成長、分化、增殖、自然凋亡的生命週期及其生理、生化功能均受到嚴格的調控，但當細胞受到外在的致癌刺激或內生的基因突變時，細胞中正常調控的機制失衡而使其不受控制地快速增生。不斷增殖的細胞便形成腫瘤，進而壓迫、侵犯或摧毀鄰近的正常組織 (陳，1972)。癌症的種類很多，依其發生的器官部位有肺癌、肝癌、胃癌、皮膚癌及乳癌等。有時在同一器官發生的癌症可再由其組織來源不同加以區分，例如肝癌中由膽管組織演變而來者稱為膽管癌 (Cholangiocarcinoma)，若由肝細胞演變而來者稱為肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma) 或簡稱肝癌 (Hepatoma)，這些差別要經由癌組織的切片檢查才能加以鑑別 (林，1972)。

(二) 肝癌

(1) 肝臟簡介

肝臟位於人體的右上腹腔內，橫隔膜下方，是人體內最大的器官。肝臟分為左葉與右葉，右葉較左葉大，佔全肝的百分之六十以上。肝臟由肝實質細胞和非實質細胞或間質細胞所組成。肝實質細胞指的即是肝細胞 (hepatocyte)，而非實質

細胞則包括竇內皮細胞 (sinusoids endothelial cell)、星狀細胞 (kuffer cell) 和儲脂細胞 (fat-storing cell) 等，其中肝細胞佔 70%~80% (曾，1999)。

肝細胞含豐富的酵素，可執行代謝、儲藏、解毒及排泄等生理作用，重要功能如葡萄糖及脂質的代謝、維生素的儲存、膽汁製造及分解、製造血小板生成素及血漿蛋白、氮與尿素間的轉換、藥物的解毒及代謝作用等。當肝臟受到損傷或發生病變時，會使代謝功能發生障礙，同時也會影響其他臟器的功能，嚴重時甚至會危及生命。

(2) 肝癌種類

民國 100 年國人肝及肝內膽管癌死亡率在惡性腫瘤死亡率中位居第二，僅次於肺癌，可見肝癌對國民健康為一極大威脅。圖 2-1 為民國 99 及 100 年主要癌症死亡人數佔率。一般肝癌可分為兩種，一種源自於肝臟，稱為原發性肝癌 (primary liver cancer)，其中有 60~80% 是由肝硬化轉變而來 (曾，1999)；另一種為身體其他部分擴散到肝臟的則稱為轉移性肝癌，亦稱為續發性肝癌 (secondary liver cancer)。肝癌可依形態學分為三類：塊狀型、結節型與瀰漫型，其中又以結節型最多。若依組織學來分類，則可分為四類：(1) 肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC)，佔肝癌發生率 80%，一般習慣稱呼的肝癌指的即為肝細胞癌；(2) 膽管癌 (Cholangiocarcinoma)，佔肝癌發生率 20%，好發於老人；(3) 肝細胞膽管癌 (Mix hepatocholangiocarcinoma)，較為少見；(4) 肝原細胞癌 (Hepatoblastoma)，較少見，好發於幼兒 (曾，1999)。

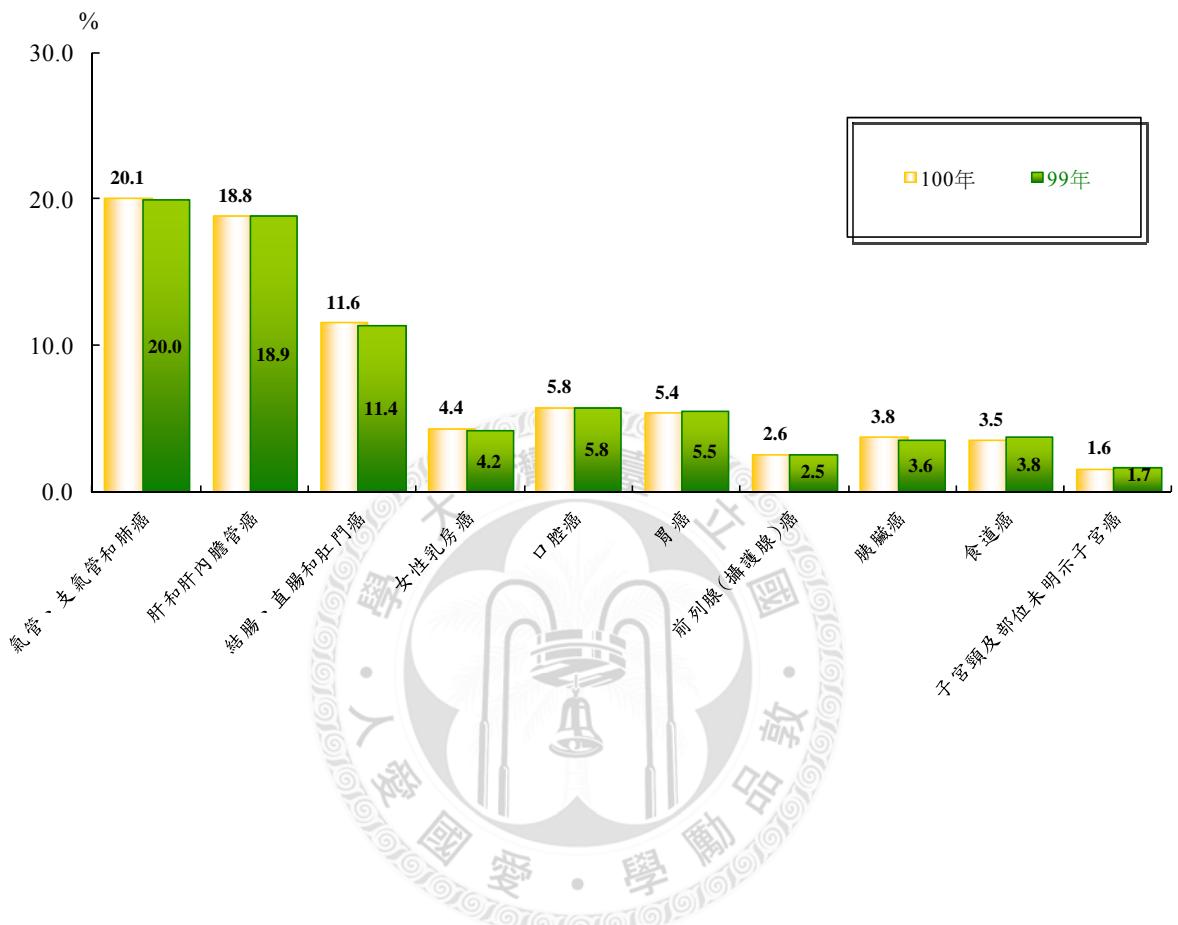


圖 2-1、民國 99 及 100 年主要癌症死亡人數佔率。

(行政院衛生署衛生統計，2012)

(3) 肝癌成因

(a) 病毒性肝炎

據估計，在台灣地區肝癌患者中八成以上曾感染 B 型肝炎。慢性肝炎或 B、C 型肝炎帶原者，每年約有十到二十分之一的機會轉變為肝癌 (Kannangai *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004)。肝炎病毒如 B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 與 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 是引起肝癌的原因之一，肝炎病毒的蛋白會直接干擾與細胞增生或成長所需的基因產物 (Lotz *et al.*, 2001)。B 型肝炎病毒的序列直接嵌入宿主的基因體，會造成宿主基因的不穩定，如細胞的 DNA 缺失、病毒與宿主的 DNA 易位等染色體缺陷。C 型肝炎病毒的核蛋白 (core protein) 能誘導基因轉殖小鼠產生肝癌，且被認為是慢性 C 型肝炎發展成肝癌的關鍵角色，但核蛋白如何透過特別的調控使肝癌發生，其機制目前尚未十分清楚 (Tan *et al.*, 2008)。B 型與 C 型肝炎病毒的感染會透過直接或間接的機制引起細胞上的傷害，不正常的細胞會快速增生，進一步發展成為肝癌 (Lotz *et al.*, 2001)。

(b) 肝硬化

肝硬化多為病毒性肝炎引起，當肝臟嚴重發炎超過其修復能力時，會由纖維組織來加以修補而產生纖維化，並使肝臟循環系統發生改變，最後形成肝硬化。肝臟硬化後，人體免疫力降低，變異的細胞也逐漸失去控制能力而產生癌症，約 80~90% 的肝癌患者在罹患癌症前即有肝硬化的現象 (三軍總醫院血液腫瘤科網站，2012)。通常會因慢性肝炎導致肝硬化而產生肝癌，亦可能不經肝硬化過程而直接導致肝癌 (綠十字健康網，2012)。

(c) 肝毒性物質

能使肝臟受損之毒性物質中，最具代表性的為黴菌所產生的黃麴毒素 (aflatoxin)。台灣因氣候潮濕，貯藏不良的花生、玉米等是黴菌的溫床，其中致癌性最強的即為黃麴毒素 (Lin *et al.*, 2004)。黃麴毒素是由黃麴菌 (*Aspergillus flavus*)

和寄生的麴黴菌代謝後所產生的毒素，此毒素可能造成肝細胞中 p53 抑癌基因突變，再加上其他因素如 B 型肝炎病毒的感染，引起肝癌發生 (周，1991)。

(d) 酗酒

肝癌最大的禍首除了 B 型肝炎帶原外，酗酒也具有加乘作用。流行病學研究顯示，有酗酒習慣者其引發肝臟疾病的危險性比一般人高出 10~20% (Lebrec, 1994)。若肝炎帶原者又同時有酗酒習慣，死於肝癌的危險性比一般人要高出數十倍 (Lin *et al.*, 2004)。

(e) 其他

某些藥物服用過量可能有致肝癌之虞，例如類固醇、男性荷爾蒙及動情素等 (Lebrec, 1994; Lin *et al.*, 2004)。

(4) 肝癌可能之治療方法

肝癌的治療包括根治性 (curative) 及緩解性 (palliative) 兩類療法。根治性治療是以外科手術將肝腫瘤切除或肝臟移植，或經由內科局部燒灼法使肝腫瘤完全壞死，達到治癒的目的。若因肝腫瘤太大、數目較多或病患肝硬化較嚴重，無法接受根治性治療，則使用緩解性治療。緩解性療法無法使肝腫瘤完全壞死，而是以抑制腫瘤生長、延緩惡化或轉移為治療目標。緩解性療法如經肝動脈化學栓塞療法、放射線治療、經肝動脈化學治療或全身性化療等 (林和高，2009)。以下為數種肝癌之治療方式、侷限性或副作用。

(a) 手術切除

手術切除目前仍是肝癌治療之首選，適用於早期肝癌或腫瘤數不超過三顆 (林和高，2009)。一般來說，單獨一顆的肝癌比較適合開刀，多發性的肝癌則須依病況不同而做個別評估。肝癌的大小並非影響可否開刀的主要決定因素，若肝癌已

經侵犯到肝門靜脈主幹，則不適宜開刀。病患須無肝硬化且肝功能及凝血功能正常，若病患本身還有其他疾病，也要加以評估。以手術切除肝腫瘤後，五年內的存活率為 30.6%，其中腫瘤直徑小於 5 公分者存活率為 76%，小於 3 公分者為 83.3% (楊，2003)。

(b) 肝移植 (liver transplantation)

肝癌合併肝硬化的患者若無法以手術根治，經醫師評估後可考慮肝臟移植 (林和高，2009)。目前國內肝移植準則，患者必須在 65 歲以下，且單一肝癌不超過 5 公分，或多發性肝癌不超過 3 顆且任 1 顆直徑不超過 3 公分，同時未侵犯到血管與遠端轉移。適當選擇的病人 5 年存活率可達 70% 而復發率低於 15%。肝臟移植對於大型肝癌的治療效果不佳，日後復發的機會很高，對於小型肝癌的治療效果較好 (國泰醫院，2012)。目前國內肝臟移植的技術不亞於歐美先進國家，較遺憾的是肝臟移植受限於器官捐贈來源短缺，此法仍較不普遍。

(c) 經皮酒精注射治療 (Percutaneous Ethanol Injection, PEI)

PEI 已在臨床應用近 20 年，療效頗受肯定，適用於肝癌體積小 (腫瘤直徑小於 3 公分且腫瘤數目在 3 個以下) 的病患 (楊，2003)。PEI 是經由超音波定位肝癌的位置，用細針穿刺至腫瘤，再打入純酒精。純酒精能使肝細胞內的蛋白質凝固變質，造成肝細胞壞死。此法的併發症較少，主要為疼痛，缺點為需經多次注射才能使腫瘤壞死 (林和高，2009)。

(d) 經皮無線電頻燒灼療法 (Radiofrequency Ablation, RFA)

經皮無線電頻燒灼療法對小於 3 公分的腫瘤效果與酒精注射一樣。原理也是利用超音波定位，以通電流之細針穿刺至腫瘤，加熱使腫瘤壞死。這種治療的優點是傷口小，治療時間短，可以一次將腫瘤組織完全殺死。治療後若沒有發生併發症，24 小時內即可出院。缺點為併發症較多，主要包括疼痛、暫時性肋膜積水

及腹腔內出血等 (林和高, 2009)。

(e) 經動脈 (化療) 栓塞 [Trans-arterial (chemo) Embolization, TAE/TACE]

TAE 目的在於止血或使腫瘤缺血而壞死，目前常應用在肝臟腫瘤的栓塞治療。肝臟的血液供應是雙軌的，對正常人而言，肝臟血液大約 75% 來自門靜脈，25% 來自肝動脈。肝動脈、門靜脈各供給 50% 氧氣。反之，肝惡性腫瘤所需的血液，幾乎完全由肝動脈供給，若把腫瘤之供應動脈堵塞，不但使腫瘤缺血壞死 (ischemic necrosis)，又不會引起非腫瘤肝組織之完全梗塞 (國泰醫院, 2012)。此法利用血管攝影術，由股動脈穿刺放入導管，將肝腫瘤的肝動脈或主要分支用 gelfoam powder 或 particle 予以阻塞，可使腫瘤產生缺血性壞死，使腫瘤變小或消失。

目前栓塞是除了手術切除療法之外的主要選擇之一，適用於中期肝癌，尤其是在病患具有肝機能不良，肝硬化嚴重或腫瘤位置不佳不適合手術切除等情況。缺點是由於無法使腫瘤完全壞死，病患須接受多次栓塞療法以達抑制腫瘤生長的目的。對於較大腫瘤也可選擇經肝動脈化學栓塞及局部燒灼法合併治療，效果優於僅接受經肝動脈化學栓塞療法者。栓塞不適用於已有血管侵犯、肝外轉移或有出血傾向之病人。若有門靜脈主幹堵塞之狀況則不宜施行肝動脈栓塞，以免造成肝衰竭 (林和高, 2009)。

(f) 經肝動脈化學治療

主要是針對無法經由手術切除之肝臟惡性腫瘤的病人，在肝臟動脈內放置一條可供化療使用的導管，如此可使大部分的化療藥物直接進到肝臟之腫瘤細胞內達到治療效果，進而減少化療藥物之劑量並減少化療藥物所引起之全身性副作用 (國泰醫院, 2012)。適用於晚期肝癌，病患可能有多發性腫瘤，且已侵犯血管或有肝外轉移，唯病患之肝功能需足以承受治療 (林和高, 2009)。

(g) 全身性化療

肝細胞癌為全身性治療最為困難之實質腫瘤之一，化學治療的效果目前學者仍在積極研究中。肝癌患者通常併有肝硬化，對化學治療的耐受性也因器官的受損而變差，變成全身性化療的最大問題。

(h) 放射線治療及質子治療

目前對無法手術切除之肝癌合併有門靜脈栓塞之病患實施放射線治療，對存活率也有部份的改善，但放射線治療有可能增加肝內或肝外的腫瘤轉移。另一種替代的放射線治療是質子治療，放射線能量較集中，且能定位於腫瘤處的施放，因此腫瘤之外的肝組織所受之輻射量較小。放射線治療的優點為不受腫瘤所在部位的限制，為一種有效的治療方法 (楊，2003)。

(i) 標靶治療

標靶治療是透過抑制細胞生長因子及腫瘤血管新生，達到抑制腫瘤生長的目的。此特性提供臨床醫師腫瘤治療的新目標，也啟動了抑制訊息傳遞分子或抑制腫瘤血管新生之標靶藥物的發展。標靶治療為無法接受根治性或緩解性治療的晚期病患帶來希望 (林和高，2009)。標靶治療藥物如 Thalidomide、Bevacizumab、Sorafenib 或 Sunitinib 等，使用時須考量其副作用以及價格，故目前標靶治療的使用及病患選擇仍有其侷限性。

(三) 人類肝癌細胞株 HepG2

常使用的人類肝癌細胞株有 HepG2、Hep3B 及 Huh-7 等，這三種肝癌細胞分別具有不同的特性，例如 HepG2 存在 p53 基因，Hep3B 缺乏 p53 基因，而 Huh-7 則具有突變的 p53 基因等。在本研究中選用 HepG2 為實驗細胞。HepG2 是由一名 15 歲美國男性的肝臟組織分離而得，目前已有穩定的 cell line 可供培養。HepG2 相當適合做為人類肝癌研究的體外模式系統，因其在體外也具有良好

的形態及高度的功能分化。HepG2 並無已知的肝病毒物質，且能表現肝臟特定的代謝功能。與 Hep3B 相比，HepG2 也具有較少的染色體異常與重組。根據電子顯微鏡的觀察結果，HepG2 具有易辨識的胞器，更肯定其為一成熟可用的細胞株 (Javitt, 1990)。



第二節、食用菇

(一) 食用菇簡介

食用菇的營養價值高，且具有獨特的風味及口感，深受國人喜愛。近年來國內食用及藥用菇的消費量有顯著上升的現象，根據調查保守估計，國人每人每年菇類消費量已高達三公斤以上 (王，2009)。國外亦將食用菇視為高級食材，在歐美稱洋菇為「上帝賞賜的食品」，在日本則稱香菇為「植物性食物之最」 (王，1997)。食用菇中蛋白質含量大致介於肉類和蔬果之間，佔乾物重 30~40%，並含有人體所需之 18 種胺基酸，尤其是人體絕對要從外部攝取之離胺酸 (lysine) 含量特別高，因此菇類第一級功能之營養成分能提供人體所需，高營養價值也使食用菇成為素食者除了大豆製品外的另一個選擇。許多菇類因具有特殊香氣成分而提供了很好的嗜好特性，是菇類之所以受到民眾注目的第二級功能，例如松茸因具有松茸醇 (matsutakeol) 和桂皮酸甲酯 (methyl cinnamate) 而頗受日本民眾的喜爱。此外，香菇在烘乾的過程中香菇酸 (lenthinic acid) 轉變成香菇精 (lenthionin)，東南亞國家人民頗鍾愛此一香氣成分，並且也受到部分歐亞人士的青睞，因此香菇市場遍及全世界，並一直佔有舉足輕重的角色 (王，2009)。

近年來研究發現菇類除了第一級營養成分與第二級嗜好特性功能外，尚有許多的生理活性，可視為第三級功能。活性成分如水溶性多醣體、水溶性免疫調節蛋白、三萜類 (triterpenoids)、凝集素 (lectins)、超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等，其生理活性功能如下：

(1) 抗腫瘤

菇類相關抗腫瘤研究中，最早被分離鑑定具有抗癌活性的物質是聚葡萄糖，而已有許多成分被證實具有抗癌活性，例如多醣體、三萜類、蛋白質和類固醇等。有關菇類抗腫瘤活性相關研究如下：

- (a) 靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 中純化之三萜類能藉由抑制 p38 mitogen-activated kinase 之活化，進而抑制人類大腸癌細胞株 HT-29 之生長 (Thyagarajan *et al.*, 2010)。靈芝萃取物在細胞模式下也被發現具有抑制多種腫瘤細胞生長的能力，如白血病、淋巴瘤、骨髓癌、前列腺、乳癌、肝癌、肺癌細胞等 (Mahajna *et al.*, 2009)。
- (b) 高等真菌擔子菌門 (Basidiomycetes) 之菇類的乙酸乙酯萃取物可降低人類卵巢癌細胞的存活能力 (Toubi *et al.*, 2009)。
- (c) 由玉蕈離褶傘 (*Lyophyllum shimeji*) 純化出一種新的 ribonuclease 具有抑制人類肝癌細胞株 HepG2 及乳癌細胞 MCF-7 生長之活性 (Zhang *et al.*, 2010)。
- (d) 由秀珍菇 (*Pleurotus Ostreatus*) 分離出的 lectin 可有效抑制癌細胞 Sarcoma S-180 及 hepatoma H-22 生長 (Wang *et al.*, 2000)。
- (e) 佛羅里達平菇；白玉珍菇 (*Pleurotus florida*) 及 *Calocybe indica* 的乙醇萃取物濃度分別為 35 及 36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，可抑制 T24 膀胱癌細胞的增生及誘發細胞凋亡 (Selvi *et al.*, 2011)。
- (f) 桑黃 (*Phellinus linteus*) 可抑制癌症病患的癌細胞轉移及誘發細胞凋亡，且不影響其他正常部位的功用 (Zhu *et al.*, 2008)。

(2) 免疫調節

許多研究指出，菇類萃取物具有免疫調節之活性，其中多醣體是最為人熟知具有抗腫瘤及免疫調節活性的物質 (Borchers *et al.*, 1999; Ooi and Liu, 2000; Reshetnikov *et al.*, 2001; Tzianabos, 2000; Wasser and Weis, 1999)。菇類活性物質之作用機制並非直接攻擊癌細胞，而是藉由活化寄主體內多種免疫細胞 (Wasser, 2002)，例如刺激巨噬細胞、嗜中性細胞、T 細胞、B 細胞及自然殺手細胞等，進一步刺激免疫細胞分泌多種干擾素與細胞激素，再藉由免疫系統的活化來抑制腫瘤生長，因此菇類萃取物的抗腫瘤能力與其促進免疫力之功能有直接的相關性 (Mizuno, 1995; Wasser and Weis, 1999)。

(3) 降血壓及降血脂

現代人由於飲食習慣改變，往往攝取了過多的高膽固醇食物，而攝取過多此類食物易造成心血管疾病之發生，如高血壓、動脈硬化等。在菇類活性成分或生理活性研究中，也發現部分菇類萃取物具有降低血壓及血脂的作用。有關菇類降血壓及血脂相關研究如下：

- (a) 靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 可使高血壓老鼠的血壓降低及血液中的膽固醇濃度下降 (Kabir *et al.*, 1988)。
- (b) 秀珍菇 (*Pleurotus ostreatus*) 的乙醇萃取物能使高膽固醇老鼠血液中之膽固醇濃度下降 (Bobek *et al.*, 1996)。
- (c) 草菇 (*Volvariella volvacea*) 子實體或菌絲體經動物實驗證實，可降低血液中總膽固醇、肝臟中膽固醇及糞便中固醇之濃度 (Cheung, 1998)。

(4) 降血糖

菇類降血糖相關研究較少，主要在抗癌或免疫調節之研究較多，有關降血糖活性相關研究如下：

- (a) 靈芝子實體萃出之多醣體 (ganoderan B) 可提升血液中胰島素含量，具有降血糖之活性 (Hikino, 1989)。
- (b) 黑木耳 (*Auricularia auricula-judae*) 子實體分離出的水溶性多醣具有降血糖的活性 (Yuan *et al.*, 1998)。
- (c) 蘑菇 (*Agaricus campestris*) 水萃物經細胞及動物實驗，已被證實具有降血糖、釋放胰島素之功用及與胰島素有相似之活性 (Gray and Flatt, 1998)。

(5) 抗氧化

菇類的抗氧化能力與其所含的酚類物質有關 (Velioglu *et al.*, 1998)。菇類含多種抗氧化酵素，如超氧化歧化酶、觸媒 (catalase, CAT)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSHPX) 等，可清除自由基，以減少其對 DNA 傷害、致

癌及因細胞退化所造成之老化現象 (Jayakumar *et al.*, 2006)。有關菇類抗氧化相關研究如下：

- (a) 靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 的甲醇萃取物及水萃物具有良好的自由基清除能力 (Jones and Janardhanan, 2000)。
- (b) 由洋菇 (*Agaricus bisporus*) 中純化出的 tyrosinase 具有避免細胞中 DNA 因氧化而造成損傷之能力 (Shi *et al.*, 2002)。
- (c) Elmastas 等人發現洋菇 (*Agaricus bisporus*)、秀珍菇 (*Pleurotus ostreatus*)、*Polyporus squamosus*、紫丁香蘑 (*Lepista nuda*)、大白菇 (*Russula delica*)、褐絨蓋牛肝菌 (*Boletus badius*)、圓錐鐘菌 (*Verpa conica*) 等菇類的甲醇萃取物具有比 BHA 及 BHT 更佳之抗氧化能力 (Elmastas *et al.*, 2007)。

(6) 抗菌及抗病毒

菇類含許多具有抑制微生物生長能力的活性物質，因此在抗病毒、抗菌、抗真菌方面被廣為研究。早於 1923 年，即有學者提出菇類具有抗真菌的活性 (Brian, 1951)。菇類抗微生物相關研究如下：

- (a) 香菇 (*Lentinus edodes*) 的水萃物具有抑制流行性感冒病毒感染小鼠的能力 (Tsunoda and Ishida, 1970)。
- (b) 洋菇 (*Agaricus bisporus*) 中的醣類與酚類衍生物被認為與洋菇的抗菌性有關 (Vogel *et al.*, 1974)。
- (c) 秀珍菇 (*Pleurotus ostreatus*) 與金針菇 (*Flammulina velutipes*) 純化出的蛋白質對人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 有抑制能力 (Wang and Ng, 2000; Wang and Ng, 2001)。
- (d) 杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 中純化出的蛋白質有抗菸草鑲嵌病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 之能力 (Fu *et al.*, 2003)。
- (e) 松乳菇 (*Lactarius deliciosus*)、翹鱗肉齒菌 (*Sarcodon imbricatus*) 與灰褐紋口蘑 (*Tricholoma portentosum*) 的酚類萃取物具有抑制革蘭氏陽性菌如 *Bacillus*

cereus 和 *B. subtilis* 與真菌 *Candida albicans* 和 *Cryptococcus neoformans* 生長的能力 (Barros *et al.*, 2007)。

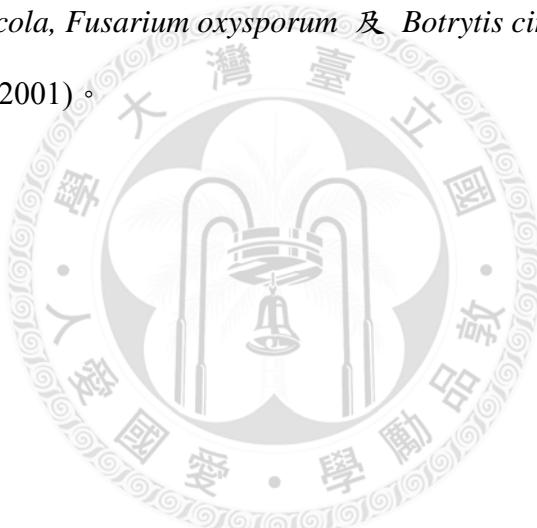
(二) 鴻喜菇

鴻喜菇 (*Hypsizigus marmoreus*)，在日本培育多年，長期以來被視為高級食材，目前是國內新興栽培的食用菇之一。鴻喜菇別名真姬菇、蟹味菇、玉蕈或海鮮菇，廣泛分布於日本、歐洲、北美及西伯利亞等溫帶地區之赤松林或闊葉樹混生林地(今關和本鄉, 1957)。在台灣以瓶栽為主，產區以南投埔里為多，其子實體以 15~50 株不等的數量叢生，形成半球形灰褐色之菌蓋。鴻喜菇為一種低熱量、低脂肪且蛋白質含量高的食用菇，粗蛋白含量約為 24.7%，胺基酸總量約 17.7%，另含硒和葉酸等成分。在分類上鴻喜菇屬於擔子菌綱 (Basidio-mycetes)、傘菌目 (Agaricales)、口磨科 (Tricholomataceae)、離褶傘族 (Lyophyleae)、離褶傘屬 (Lyo-phyllum)，而種名有 shimeji、aggregatum 及 aenau 等 (今關和本鄉, 1957)。鴻喜菇相關生理活性研究如下：

- (a) 由鴻喜菇水萃物分離之多醣類，經細胞實驗證實以 β -(1→3)-glucan 鍵結之多醣，能有效抑制 Sarcoma 180 腫瘤之生長 (Ikekawa *et al.*, 1992)。
- (b) 以鴻喜菇水萃物進行動物實驗，有抑制肺癌細胞 (Lewis lung carcinoma) 轉移之能力並可延長實驗組動物之存活天數 (Saitoh *et al.*, 1997)。
- (c) 以鴻喜菇 4°C 冷萃物餵食皮下已轉殖 CT26 腫瘤細胞之 Balb/c 小鼠，於 200 mg/kg/day 劑量下，具有抑制腫瘤生長之效果，抑制率為 38.7% (徐, 2002)。
- (d) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物 HM-0.2 以濃度 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 對人類白血病細胞 U937 刺激時抑制率為 78.6%。處理 24 小時後可使細胞週期停滯於 G₀/G₁ 期 (許, 2004)。
- (e) 鴻喜菇 40~80% 硫酸銨沉澱物濃度為 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時對小鼠大腸癌細胞 CT26 具有 67.75% 以上的生長抑制率，並可使其細胞週期停滯於 G₂/M 期 (簡，

2005)。

- (f) 鴻喜菇的熱水、冷水以及酒精萃取物，依不同抗氧化力測定方法分析後，均具有良好之抗氧化能力 (Lee *et al.*, 2007)。
- (g) 由鴻喜菇中純化出的蛋白質 marmorin 具有抑制人類肝癌細胞株 HepG2 及乳癌細胞 MCF-7 生長之能力，且能抑制 HIV-1 reverse transcriptase 之活性 (Wong *et al.*, 2008)。
- (h) 鴻喜菇中純化出的 hypsiziprenol A9 具有抑制 HepG2 細胞生長的能力，且使其細胞週期停滯於 G₁ 期 (Chang *et al.*, 2004)。
- (i) 由鴻喜菇子實體純化出的蛋白質 hypsin 具有抑制 *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola*, *Fusarium oxysporum* 及 *Botrytis cinerea* 等菌絲生長的能力 (Lam and Ng, 2001)。



第三節、細胞週期 (Cell cycle)

(一) 細胞週期

細胞在足夠的生長空間及養分下，由一個細胞分裂增殖為兩個細胞，中間受到許多分子調控以進行一個循環的完整過程，稱之為細胞週期。細胞週期大致可分為四期，分別為 G_1 (Gap 1)、S (DNA synthesis)、 G_2 (Gap 2) 及 M (Mitosis)，這四個階段的名稱最早是在 1953 年由 Swift 所定義 (Howard and Pelc, 1953)。隨著生物化學及分子生物的進展，在 1983 年學者發現了 cyclin 蛋白，藉由 cyclin 的合成、磷酸化及降解，可調控整個細胞週期的進行 (Minshull *et al.*, 1989)。1992 年 Nurse 等人發現了 cyclin dependent kinases (CDKs) 的功用 (Norbury and Nurse, 1992)，CDKs 會被 cyclin 活化而磷酸化細胞週期中其他的特定物質。細胞週期各期之交界都有檢驗點 (checkpoints) 或稱 R 點 (restriction point)，決定細胞是否能順利進入下一階段，如同工廠製造過程中之品管。

(1) G_0 phase

此時期又稱 senescence 或 quiescence，為細胞靜止期，細胞可能是永久性休眠或暫時休眠。培養中的細胞需貼附在固體的表面才可繼續生長，否則會停留在 G_0 phase。此時期的細胞需經由某些生長因子刺激後，才能被活化而進入 G_1 期 (Ford and Pardee, 1999)。

(2) G_1 phase

細胞經生長因子刺激後進入 G_1 phase，在 G_1 早期若生長因子被移除，細胞會退回到 G_0 phase (Ford and Pardee, 1999)。此時期細胞開始生長，且開始複製胞器及蛋白質。cyclin D 為此時期最主要的調控蛋白，會進一步活化 CDK4 及 CDK6 (Sherr, 1995)。活化的 cyclin D/CDK 複合體會磷酸化 retinoblastoma protein (pRb)，使其由 Rb/E2F 複合體中釋放，並使轉錄因子 E2F 發揮作用，許多基因

包括 DNA 合成之基因得以轉錄而進入 S 期。cyclin D/CDK 複合體也會活化 cyclin E/CDK2 及促進 DNA 合成 (Geng *et al.*, 1999)。在進入 S 期前會檢查染色體 DNA 是否受到破壞，以進行修補 (repair) 工作，此為細胞週期之第一個 checkpoint。

(3) S phase

S 意指 synthesis 之意，此階段細胞之 DNA 會進行複製合成之動作。在 S phase 的早期，cyclin D 及 cyclin E 會被 ubiquitination 而降解，同時 cyclin A 會增加，並活化 CDK2 使 S phase 持續進行 (Ford and Pardee, 1999)。

(4) G₂ phase

細胞在 S phase 的晚期及整個 G₂ phase 都在為進行分裂而準備，在此階段除了繼續合成蛋白質之外，細胞亦會檢查染色體 DNA 複製是否完整，此為細胞週期之第二個 checkpoint。此時期 cyclin A 及 cyclin B 都會增加，其中 cyclin B 被認為是與細胞分裂最相關的 cyclin，但 cyclin A 也是進入 M 期所不可或缺的蛋白。cyclin B 會和 CDK1 (CDC2) 形成複合體，其活性與在細胞內的位置有關。在 G₂ phase 此複合體位於細胞質中，進行分裂時才由細胞質移動到細胞核 (Jackman and Pines, 1997)。

(5) M phase

M 意指 mitosis，細胞會由一個母細胞變成兩個子細胞，已複製完整的染色體會各自分配至子細胞內。此期細胞形態會有很大的改變，如出現核膜破裂、細胞微管重新排列形成紡錘體、細胞骨架重組及染色體濃縮等現象 (Ford and Pardee, 1999)。M phase 又可細分為 Prophase、Prometaphase、Metaphase、Anaphase、Telophase 及 Cytokinesis 六小期，從 Metaphase 進入到 Anaphase 是細胞週期之第三個 checkpoint，檢測染色體是否在紡錘體上排成一直線。cyclin A 會比 cyclin

B 先被降解，而 cyclin B 的降解會使細胞離開 M phase (Koepp *et al.*, 1999)。

在細胞週期中，當 DNA 受損時，週期便無法通過 checkpoint 而停滯 (Cell cycle arrest)，此時細胞內會進行 DNA 的修復，一旦修補完成才會進入下一時期。若是發現有無法彌補的錯誤時，細胞則選擇走向凋亡 (apoptosis)，以避免錯誤訊息傳至下一代 (Smith and Fornace, 1996)。

(二) 細胞週期之調控

在真核生物中，細胞週期的進行是透過一系列的蛋白質及酵素來調控，稱為細胞週期調控因子 (圖 2-2)。調控細胞週期進行的蛋白稱為 cyclin，目前已知至少有 15 種，細胞週期中 cyclins 的含量變化如圖 2-3。cyclin 會活化 cyclin dependent kinases (CDKs)，目前已知至少有 9 種 CDKs (Adrian and Edward, 2000)。cyclin 會與 CDKs 形成一複合體，此複合體的合成、磷酸化與降解會調控著週期的進行。CDKs 會受到 cyclin kinase inhibitors (CKIs) 的抑制。CKIs 可分為兩類，一類是 INK4 family，由 $p16^{INK4a}$ 、 $p15^{INK4b}$ 、 $p18^{INK4c}$ 及 $p19^{INK4d}$ 組成，此類 CKI 的抑制較具專一性，抑制對象為 cyclin D/CDK4/6 複合體。另一類 CKI 為 Cip/Kip family，成員有 $p21^{Cip1}$ 、 $p27^{Kip1}$ 及 $p57^{Kip2}$ ，抑制對象較無專一性，可抑制多個 cyclin/CDK 複合體 (Ford and Pardee, 1999)。Cip/Kip family 能有效抑制 cyclin E/CDK2 及 cyclin A/CDK2 之作用，雖對 cyclin D/CDK 也有抑制能力，但一方面也可做為其正向的調控因子，cyclin D 與 CDK 需要此類 CKI 的協助才能結合得更佳 (Sherr and Roberts, 1999)。CDK 除了需與 cyclin 結合而被活化之外，部分特定的蛋白基酶複合物之殘基 (residues) 如 CDC2 及 CDK2，則需特定之 cyclin-activation kinase (CAK) 的作用促進其磷酸化，以達到完全活化的效果 (Solomon *et al.*, 1992; Connell-Crowley *et al.*, 1993)。

除了上述的分子之外，在細胞週期中重要的調控分子尚有 Rb。Rb 會與轉錄因子 E2F 結合，此結合會抑制 E2F，使其下游基因無法表現 (Sherr, 1996)。cyclin D/CDK4/6 及 cyclin E/CDK2 會磷酸化 Rb 使其不活化，並由 Rb-E2F 複合體中

釋放。由複合體釋放後的 E2F 可進行 S phase 所需基因之轉錄，使細胞順利進入 S phase，Rb 會維持磷酸化的形式來通過接下來的 S、G₂ 及 M phase。Rb 作用途徑中的 p16^{INK4a}、cyclin D1 和 Rb 在癌細胞的生成扮演了重要且特殊的角色。p16^{INK4a} 的減少會使 cyclin D1 或 CDK4 過度表現，使 Rb 維持高度磷酸化 (hyperphosphorylation) 而進入 DNA 複製階段，不正常的細胞大量複製即導致癌症。目前在許多人類的癌症中都觀察到 cyclin D1 有過度表現的現象 (Ford and Pardee, 1999; Sherr, 1996)。

癌症為不正常的細胞不受控制的大量增生，癌細胞的生成與細胞週期具有極大的關聯，例如 checkpoint 在癌細胞中功能缺失，而許多調控的機制在癌細胞中發生突變。在許多癌症中，細胞缺少抑癌基因 p53 或具有突變的 p53，或在 Rb 作用途徑中有些分子已發生改變 (Ford and Pardee, 1999)，使這些調控分子失去原有的功能而造成細胞週期不斷進行，錯誤的遺傳物質不斷被複製而傳至子細胞，最終導致癌症的發生。

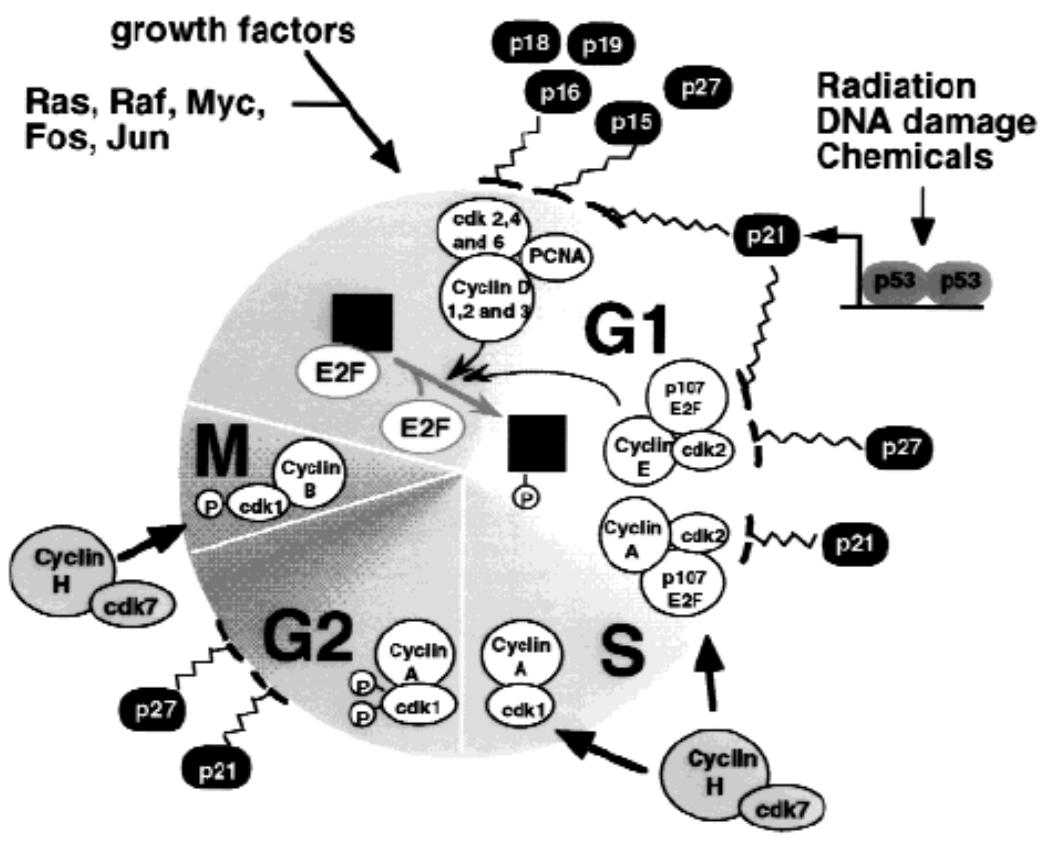


圖 2-2、細胞週期之調控分子。

Figure 2-2. Schematic representation of the cell cycle showing pathways for various cyclin-dependent kinases (cdks).

(Adrian and Edward, 2000)

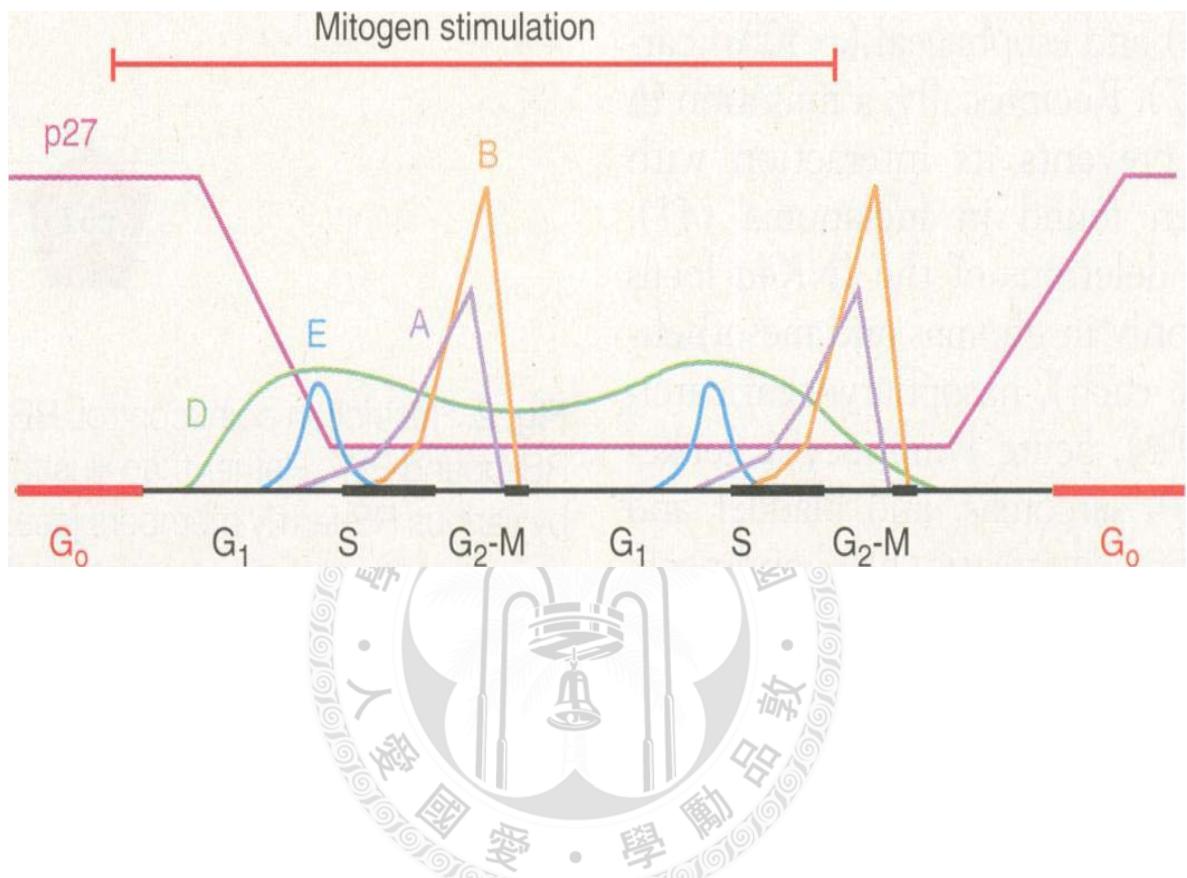


圖 2-3、細胞週期中 cyclins 和 $p27^{Kip1}$ 的變化。

Figure 2-3. Fluctuations of cyclins and $p27^{Kip1}$ during the cell cycle.

(Sherr, 1996)

第四節、細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡是生物細胞一種生理性的自我死亡方式，會使細胞具有特殊的形態且不會引起發炎反應。細胞凋亡的過程受到細胞內多種基因蛋白及細胞外凋亡因子 (apoptotic factors) 複雜的相互作用及調控，因此，細胞凋亡又稱為生理上的細胞死亡 (physiological cell death) 或是程序性細胞死亡 (programmed cell death, PCD)，是由細胞內在有規律的機制所造成，在生理上扮演著相當重要的角色 (Zakeri and Lockshin, 1994)。許多疾病如癌症、自體免疫疾病 (autoimmune disease)、神經退化性疾病 (neurodegenerative diseases)，甚至是局部組織損傷，都與細胞凋亡有著不等程度的直接或間接關係 (Elmore, 2007)。

(一) 形態及生理變化

細胞凋亡有其特殊的形態學上之變化，又可分為早期及晚期。在細胞凋亡早期，細胞會變圓、出現細胞膜小泡 (membrane blebbing) 和細胞皺縮 (cell shrinkage) 等現象，細胞內漸出現染色質濃縮 (chromatin condensation) 和細胞質濃縮 (cytoplasm condensation) 等特徵，但細胞膜仍保持完整；到了晚期，細胞核會開始裂解，細胞膜內陷而將細胞裂解成包有外膜之凋亡小體 (apoptotic bodies)。在細胞凋亡過程並不涉及溶小體 (lysosome) 及細胞膜的破壞，因此不會引起發炎反應或危害到周圍組織，但凋亡小體會被巨噬細胞 (macrophage) 辨識而被吞噬。在生化特性上，細胞凋亡亦有其特徵，例如細胞膜內磷脂醯絲氨酸 (phosphatidylserine, PS) 外翻至細胞膜外、DNA 斷裂、粒線體膜電位去極化 (depolarization)、細胞骨架解離 (cytoskeletal dissociation)，最後 DNA 裂解為 180~200 bp 大小的片段 (DNA fragmentation) (Wyllie, 1980)。細胞在凋亡過程中，由於某些水解酶如蛋白酶與核酸酶的作用，使細胞發生異常變化，並促使細胞走向自我死亡，因此，細胞凋亡與細胞壞死 (necrosis) 所呈現的破壞途徑是不相同的；細胞壞死是一種細胞的被動死亡方式，常因細胞受到嚴重外力傷害所引起，其具有明顯的細胞質腫脹，並

進一步導致細胞膜破裂、釋出其內容物而引起發炎反應（圖 2-4）（譚，2009）。

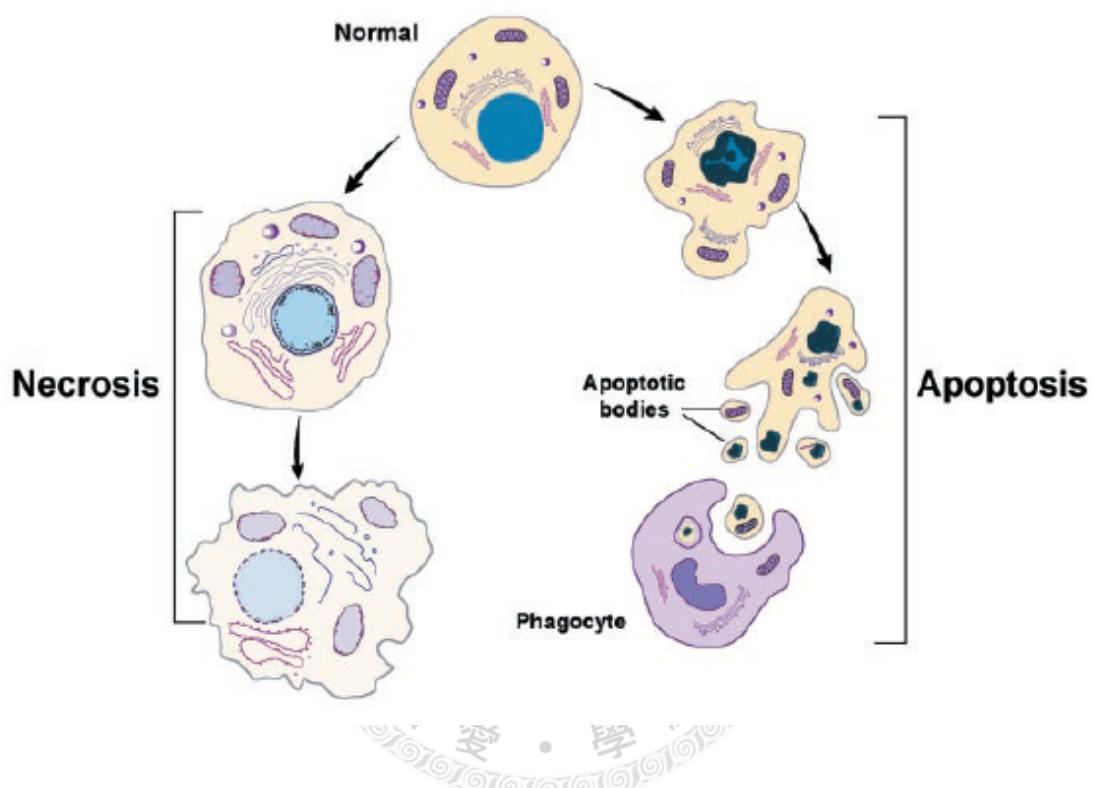


圖 2-4、細胞壞死與細胞凋亡形態之差異。

Figure 2-4. Morphology of necrosis and apoptosis.

(Ramzi *et al.*, 1999)

(二) 細胞凋亡之機制

哺乳動物的細胞凋亡主要有兩種途徑 (圖 2-5)，一種是外源性凋亡途徑，又稱死亡受體途徑 (extrinsic death-receptor pathway)，此途徑的活化始於死亡配體 (death ligands) 和死亡受體 (death receptor) 的結合。最為人熟知的死亡受體如 Fas (CD95) 及腫瘤壞死因子受體-1 (tumour necrosis factor receptor 1, TNF-R1)，其死亡配體分別為 Fas ligand (FasL) 及 TNF。死亡配體與死亡受體結合後會形成一個接位，使接收蛋白如 Fas 相關死亡區域蛋白 (Fas-associated death domain protein) 及 TNF-R1 相關死亡區域蛋白 (TNF-R1 associated death domain protein) 結合上去，形成一個 ligand-receptor-adaptor protein 複合體，稱為死亡誘導訊息複合體 (death-inducing signaling complex, DISC)。DISC 再與 procaspase-8 分子結合，進而使得 caspase-8 的活化。caspase-8 為細胞凋亡中的起始者凋亡蛋白酶，能啟動下游或其他的執行蛋白酶 (Hengartner, 2000)。

當細胞受到以下壓力如基因損傷、缺氧、氧化壓力或細胞內鈣離子濃度過高時可能的另一途徑是粒線體途徑，是透過活化 Bcl-2 家族蛋白如 Bax 和 Bak 來啟動。Bcl-2 family protein 在細胞凋亡的調控過程中扮演相當重要的角色，這一群蛋白質可分為 pro-apoptotic 及 anti-apoptotic 兩大類。Pro-apoptotic 蛋白系列包括有：Bax、Bak、Bad、Bid、Bcl-xs、Bok、Diva、Bik、Bim、Hrk、Nip3、Nix 等蛋白；anti-apoptotic 蛋白系列包括有 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w、Mcl-1、Nr13、A1/Bfl-1 等 (Adams and Cory, 1998)。具抗細胞凋亡能力之 Bcl-2 家族蛋白，則能干擾 pro-apoptotic 蛋白，從而保護細胞免於走上凋亡之路 (Cosulich *et al.*, 1999)。Bcl-2 家族蛋白被啟動後，在粒線體外膜產生聚合作用 (oligomerisation)，而導致粒線體發生功能失調。一旦粒線體功能失調，某些凋亡因子如 cytochrome c (cyt c) 及第二粒線體衍生的凋亡蛋白酶啟動者/低等電點之凋亡抑制蛋白直接結合蛋白 (second mitochondria derived activator of caspases / direct inhibitor of apoptosis binding protein with low PI, SMAC/DIABLO) 會經由粒線體內膜間隙被釋放至細胞質內。cyt c 與凋亡蛋白酶活化因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)

結合，再與 procaspase-9 分子結合，進而使得 caspase-9 的活化，進一步活化其他執行蛋白酶如 caspase-3, -6, -7 而引起細胞凋亡（譚，2009; Hengartner, 2000）。

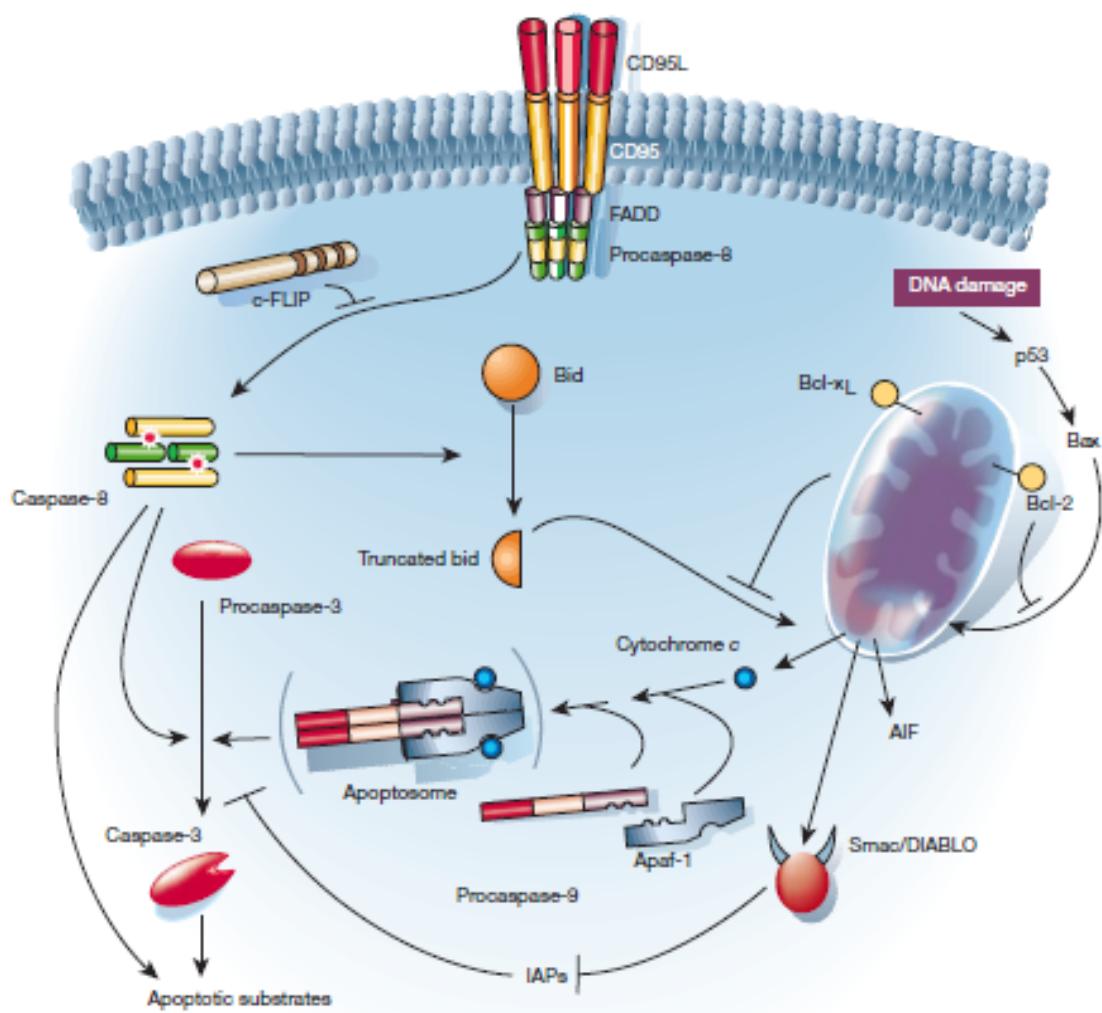


圖 2-5、哺乳動物細胞凋亡之兩種主要路徑。

Figure 2-5. The roads to ruin: two major apoptotic pathways in mammalian cells.

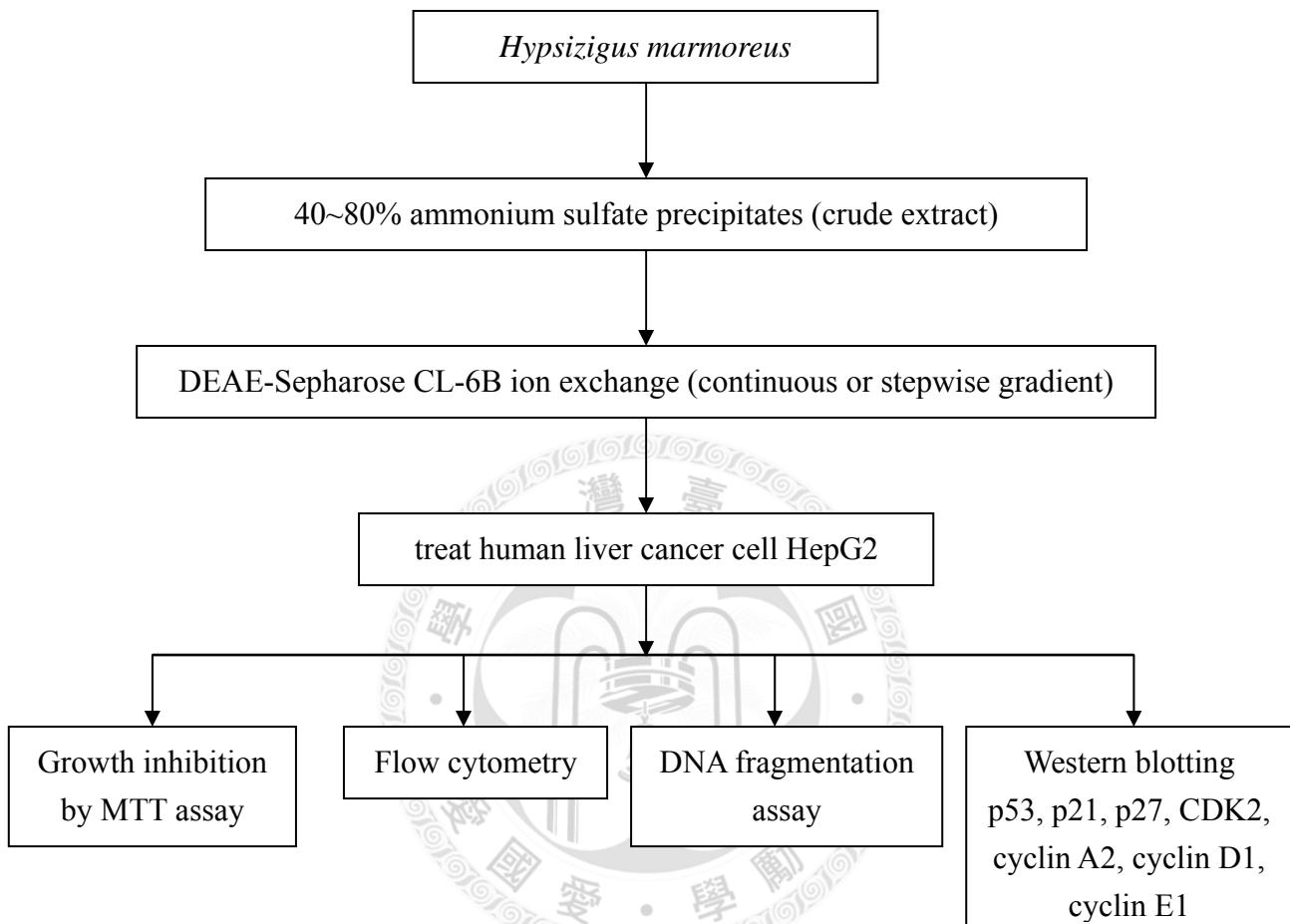
(Hengartner, 2000)

第三章 研究動機

由於肝癌為近年來國人癌症死因之第二位，對國民健康為一極大威脅，加上目前的肝癌治療方法皆有其侷限性或副作用，因此希望由天然物中尋找有效之抗癌成分。鴻喜菇為低熱量、低脂肪且營養價值高的食用菇，目前對於其生理活性之研究多集中於多醣體，蛋白質機能相關研究較少。故本研究以鴻喜菇為材料，希望以硫酸銨沉澱法及 DEAE-Sepharose 陰離子交換樹脂由其中分離出具生物活性的蛋白質，探討其對人類肝癌細胞 HepG2 之生長抑制機制。在實際應用上，期望可作為評估鴻喜菇開發為抗癌藥物或保健食品素材之重要參考。



第四章 實驗架構



第五章 材料與方法

第一節、實驗材料

(一) 原料來源

新鮮之鴻喜菇購自台北大潤發賣場，為好菇道公司在台灣屏東縣所生產。

(二) 實驗細胞

人類肝癌細胞 HepG2，來源為食品工業發展研究所。

(三) 藥品及試劑

95% 食用酒精 (菸酒公司，林口酒廠，台灣)

流式細胞儀鞘液 (FACS Flow, Becton Dickinson, USA)

Acetic acid (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Acrylamide/ Bis 40% solution (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Ammonium sulfate (Merck, Darmstadt, Germany)

Anti-CDK2 antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Anti-cyclin A2 antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Anti-cyclin D1 antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Anti-cyclin E1 antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Anti-GAPDH antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Anti-p53 antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Anti-p21 antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Anti-p27 antibody (Gene Tex, Irvine, CA, USA)

Ammonium persulfate (APS) (Sigma, MO, USA)

Bio-Rad protein assay dye reagent (Richmond, VA, USA)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, MO, USA)

3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, MO, USA)

Diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose CL-6B (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA)

ECL (Millipore, Billerica, MA, USA)

Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) (FLUKA, Switzerland)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, Miami, FL)

Glycine (Sigma, MO, USA)

Hydrochloride (HCl) (Merck, Darmstadt, Germany)

Methanol (景明化工，台灣)

Pen Strep (Gibco, Gaithersburg, MD, USA)

Potassium acetate (CH_3COOK) (林純，日本)

Potassium chloride (KCl) (Sigma, MO, USA)

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Sigma, MO, USA)

Propidium Iodide (PI) (Sigma, MO, USA)

Sodium carbonate (NaHCO_3) (Sigma, MO, USA)

Sodium chloride (NaCl) (Merck, Darmstadt, Germany)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Sodium hydroxide (NaOH) (Sigma, MO, USA)

Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (Sigma, MO, USA)

Sephacryl S-200 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

Sephacryl S-300 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

N, N, N, N'-Tetramethyl-eyhylenediamine (TEMED) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

Tris (Sigma, MO, USA)

Trypsin (Biowest, Miami, FL)

Tween-20 (Merck, Darmstadt, Germany)

(四) 藥品配製

(1) 細胞培養

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) :

DMEM medium 加入 3.7 g NaHCO₃ 後以 6 N HCl 調 pH 至 7.2 後定量至 1000 ml。使用前以 450 ml medium 加入 45 ml FBS 及 5 ml Pen Strep (含 10000 units penicillin/ml 及 10000 µg streptomycin/ml) 即可得 500 ml DMEM/10% FBS 之培養液。

PBS (Phosphate-Buffered Saline) :

8 g NaCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl 溶於 1000 ml 去離子水。

(2) 管柱層析緩衝液

50 mM pH 8.0 Tris-HCl (10x) :

60.57 g Tris 加大約 800 ml 去離子水，以 6 N HCl 調 pH 至 8.0 後定量至 1000 ml。使用前取 100 ml 加所需克數的 NaCl，並以去離子水定量至 1000 ml。

50 mM pH 7.5 Tris-HCl (10x) :

60.57 g Tris 加大約 800 ml 去離子水，以 6 N HCl 調 pH 至 8.0 後定量至 1000 ml。使用前取 100 ml 加 8.766 g NaCl，並以去離子水定量至 1000 ml，即為含 0.15 M NaCl 的 50 mM pH 7.5 Tris-HCl。

(3) 聚丙烯醯胺電泳 (SDS-PAGE)

A 液 : Acrylamide/ Bis 40% solution

B 液 (分離膠體緩衝液)：

18.2 g Tris/ 0.36 ml TEMED 加去離子水 60 ml 溶解，以 HCl 調 pH 至 8.8 後，加水至 100 ml，儲存於 4°C。

C 液 (焦集膠體緩衝液)：

6.0 g Tris/ 0.4 ml TEMED 加去離子水 40 ml 溶解，以 HCl 調 pH 至 6.8 後，加水至 100 ml，儲存於 4°C。

過硫酸銨溶液 (Ammonium persulfate, APS, 10%)：

取 0.1 g APS 溶於 1 ml 去離子水，需新鮮配置。

10% SDS 溶液：

取 1 g SDS 溶於 10 ml 去離子水。

電泳緩衝液 (running buffer) (10x)：

30.285 g Tris/ 144.13 g Glycine/ 1% 10 ml SDS 加去離子水 800 ml 溶解後調 pH 至 8.3，再定量至 1000 ml。

(4) Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法

染色液：0.75 g CBR-250 溶於 250 ml 蒸餾水後，再加入 250 ml methanol 與 50 ml acetic acid 混合均勻，充分溶解 CBR 後裝瓶密蓋。

脫色液：10% acetic acid/ 20% methanol 之水溶液。

(5) 流式細胞儀分析

PI stain solution (1000 µl)：10 µl PI, 50 µl RNase, 20 µl Triton X-100, 920 µl PBS。

PI：1 mg PI 粉末溶於 1 ml 去離子水。

RNase：2 mg 溶於 1 ml PBS。

5 % Triton X-100：10 µl Triton X-100 溶於 190 µl PBS。

(6) DNA 電泳分析

STE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 M NaCl 。

Cell lysis buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.1% SDS 。

Protein remove buffer : 3 M potassium acetate (pH 5.0)

TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)

TAE 電泳緩衝液 (1x) : 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0

(7) 西方墨點法分析

轉印緩衝液 (transfer buffer) (10x) :

30.3 g Tris/ 14.42 g Glycine，加去離子水 800 ml 溶解後調 pH 至 8.3，再定量至 1000 ml，使用前稀釋 10 倍並加入 20% 甲醇。

PBS (Phosphate-Buffered Saline) (5x) :

38 g NaCl/ 7.8 g NaH₂PO₄，加去離子水 800 ml 溶解後調 pH 至 7.0，再定量至 1000 ml，使用前稀釋 5 倍並加入 0.05% (v/v) Tween 20，即為 PBST。

(五) 儀器設備

迴轉式振盪器 Orbital Shaker (TS-500, 祥泰, 台北, 台灣)

純水製造 system 機 (Milli-Q ultrapure water system) (Millipore, Bedford, MA, USA)

高壓滅菌釜 (Autoclave) (HL-341, 雙鷹, 台北, 台灣)

高速離心機 (Centrifugator) (Sorvall RC 5C, DuPont, CT, USA)

桌上型離心機 (Centrifugator) (KUBOTA 5100, Tokyo, Japan)

培養箱 (CO₂ incubator) (Model TC 2323, SHEL LAB, Tokyo, Japan)

冷凍乾燥機 (Freeze dryer) (VD 400 F, TAITEC, Tokyo, Japan)

無菌操作台 (Laminar flow) (造鑫, 台北, 台灣)

倒立式顯微鏡 (Inverted microscope) (TE 300, Nikon, Tokyo, Japan)

吸管輔助器 (pipetting-aid) (Matrix, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,

USA)

免疫酵素分析儀 (Precision microplate reader) (Bio tek, Epoch, Thermo Fisher Scientific Inc., Vermont, USA)

流式細胞儀 (Flow cytometer) (FACScan, Becton Dickinson, USA)

透析膜 (Dialysis Tubing) (Spectrum, Laguna Hills, USA)

透析夾 (Closures) (Spectrum, Laguna Hills, USA)

梯度混合器 (Amersham Bioscientist, Buckinghamshire, Egland)

分液收集器 (Gilson, Villiers-le-Bel, France)

迷你電泳槽 (gel electrophoresis unit, Bio-rad)

膠片鑄造器 (gel caster, Bio-rad)

免疫轉印槽 (electro-blotting unit, Scie-Plas, UK)

電源供應器 (Hercules 200, Ezlan, Taipei, Taiwan)

PVDF 轉印膜 (Millipore, Billerica, MA, USA)

UVP 冷光照膠系統 (Level, Cambridge, UK)

流式細胞儀專用管 BD Falcon (Becton Dickinson, USA)

第二節、實驗方法

(一) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物之製備

新鮮鴻喜菇尾端接近根部部分切除，與冰冷之 10 % NaCl 溶液以 1:2 的比例，利用均質機攪打約 30 秒，再將均質液置於 4°C 冰箱中攪拌過夜。隔天以 8000 rpm 4°C 之條件離心 30 分鐘，取其上清液，再依硫酸銨飽和沉澱表 (Dawson *et al.*, 1969) 所示的添加量，於 4°C 下緩慢加入 40% 飽和度所需之固態硫酸銨 (226g/1L)，不停攪拌以達 40% 飽和度。攪拌均勻後，再以 8000 rpm 在 4°C 下離心 45 分鐘取其上清液，上清液以篩網過濾掉殘餘沉澱後，於 4°C 下緩慢加入 80% 飽和度所需之固態硫酸銨 (258g/1L)，在 4°C 冰箱中攪拌過夜。隔天以 8000 rpm 4°C 離心 50 分鐘收集沉澱物，以少量蒸餾水溶解沉澱物，置於透析袋 (MW: 3500 kDa) 中，於 4°C 下對蒸餾水透析 2 天 (共換 5~6 次蒸餾水)，於 -20°C 冷凍後再經冷凍乾燥，所得粉末即為硫酸銨沉澱粗萃物，儲存於 -20°C 備用。

(二) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物之陰離子交換樹脂區分

取適量 (約 300 g) 之 DEAE Sepharose CL-6B，填充入管柱 (2.6 × 40 cm)，以 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 緩衝溶液平衡數日後，取 40~80% 硫酸銨沉澱粗萃物 0.15 g 溶於 50 ml Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 緩衝溶液，再以 0.45 μm 膜過濾後通入管柱內，用 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 緩衝溶液以每小時 30 ml 之流速洗約 600 ml 後，再以梯度混合器 (gradient mixer) 進行 0~1 M NaCl (溶於 50 mM, pH 8.0 Tris-HCl) 連續鹽梯度溶離，以分段收集器收集，每管收集 7 ml，依 280 nm 波長吸光圖譜將其區分後，以超過濾濃縮膜 (10000 kDa) 去鹽，將各區分物凍乾，由此取得 HM-3。

階梯梯度則不使用梯度混合器，分別配置 0 M、0.2 M、0.4 M、0.6M、0.8M 及 1M NaCl (溶於 50 mM, pH 8.0 Tris-HCl)，每種濃度各收集一倍管柱體積 (約 180 ml)，以分段收集器收集，每管收集 5 ml，依 280 nm 吸光圖譜將其區分後，以超

過濾濃縮膜 (10000 kDa) 去鹽，將各區分物凍乾，由此取得不同鹽濃度之階梯梯度樣品。

(三) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之電泳檢定

(1) 聚丙烯醯胺電泳 (SDS-PAGE)

先製備 12.5% 之分離膠體 (separation gel)，注入膠片後以 95% 酒精壓泡，待其凝固後以濾紙吸去酒精，再注入 4% 之焦集膠體 (stacking gel)，凝固後將膠片組合架到電泳槽上，倒入電泳緩衝液。分別取 10 μ l 不同濃度之 HM-3 溶液 (5, 10, 20, 40 μ g/ml) 加入 2.5 μ l 之 4 \times sample buffer，混勻後以 100°C 加熱 5 min，以微量吸管將樣品及 5 μ l 蛋白質分子量標定注入樣品槽中。裝上電源蓋，先以 80 V 進行電泳 30 min，再將電壓調整為 120 V，待蛋白質分子量標定之最小分子量 (10 kDa) 跑至膠片的最下方時關掉電源，取出膠片進行 CBR 染色。

SDS-PAGE 膠體溶液 (單位 : ml)

膠體溶液	分離膠體	焦集膠體
	10%	12.5%
A	2.475	3.1125
B	2.5	2.5
C	-	-
		1.24
10% SDS	0.1	0.1
H ₂ O	4.875	4.237
APS	0.05	0.05
總體積	10	10
		5.0

(2) Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法

電泳後之膠片浸入 CBR 染色液，置於震盪器搖盪 30 min 使膠片染色。倒出染色液後先以蒸餾水清洗膠片上殘留的染色液，再浸入脫色液中至背景藍色脫除。

(四) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之膠體管柱層析

取適量 Sephacryl S-300 或 S-200 之膠體，填充於管柱 (1.6 × 100 cm) 中，以 Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 0.15 M NaCl) 緩衝溶液平衡數日。將陰離子交換管柱層析分離所得的 HM-3 經超過濾濃縮去鹽及凍乾後，取 5 mg 溶於 2 ml Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 0.15 M NaCl)，以 0.45 μm 膜過濾後注入 Sephacryl S-300 或 S-200 管柱進行膠體過濾層析，以每小時 30 ml 之流速收集，每管收集 4 ml。依 280 nm 吸光圖譜將其區分，以超過濾濃縮去鹽及凍乾。

(五) 人類肝癌細胞 HepG2 之解凍活化、培養與保存

HepG2 細胞冷凍小管由液態氮取出，解凍約 9 成後取出與 5~9 ml 冰的培養液混合，以 1000 rpm 離心 5 min。離心後倒掉上清液，取 10 ml 溫的培養液均勻混合細胞後加至 10 cm dish，稍微搖晃使其均勻後置入 37°C、5% CO₂ 與充份濕度之培養箱，約 2~3 天進行一次繼代培養。

繼代培養時先將舊的培養液全吸起，加入 3~5 ml PBS 清洗細胞表面，將 PBS 吸起後加入 1 ml 胰蛋白酶 (trypsin)，放入 37°C 培養箱 5 min 使細胞被切下脫離 dish 底部。加入 5~6 ml 培養液將細胞打散沖下後放入 15 ml 離心管，以 1000 rpm 5 min 之條件離心。離心後倒掉上清液，並加入 5 ml 新的培養液均勻混合細胞，取 8.5 ml 培養液及 1.5 ml 細胞液至新的 10 cm dish，稍微搖晃使其均勻後置入 37°C、5% CO₂ 與充份濕度之培養箱，約 2~3 天進行一次繼代培養。

細胞可利用液態氮將其冷凍保存，方法是先將舊的培養液全吸起，加入 3~5 ml PBS (Phosphate-Buffered Saline) 清洗細胞表面，將 PBS 吸起後加入 1 ml 胰蛋白酶 (trypsin)，放入 37°C 培養箱 5 min 使細胞被切下脫離 dish 底部。加入 5~6 ml

培養液將細胞打散沖下後放入 50 ml 離心管，再用約 4 ml 的培養液將每個 dish 沖更乾淨後放入同一支離心管。以 1000 rpm 5 min 之條件離心，離心後倒掉上清液，並加入適量之胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 打散細胞，加入已事先混勻含 7% dimethyl sulfoxide (DMSO) 的適量 FBS，最後體積應為與冷凍小管數目相同的毫升數。分裝至每個無菌冷凍小管中，體積各為 1 ml，標明細胞名稱、數量及冷凍日期。將冷凍小管置於 -80°C 冷凍櫃中緩慢降溫，隔天再將冷凍小管移入 -196°C 液態氮中，如此可保存數年之久。

(六) 鴻喜菇萃取物對 HepG2 之生長抑制測試

生長抑制率是以 3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay 來對細胞進行測試。MTT 為黃色化合物，可作用於活細胞粒線體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環開裂，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比。將肝癌細胞以培養液調整為 1×10^5 cells/mL，在 96 well 無菌培養盤中每個 well 加入 200 μ l 的細胞懸浮液，24 小時後抽走培養液，再加入 180 μ l 未含血清的培養液及 20 μ l 不同濃度之樣品，與肝癌細胞共同培養所需時間。培養時間過後抽走上清液，再加入 100 μ l 未含血清之培養液及 25 μ l 的 MTT 溶液 (2 mg/ mL in PBS) 避光反應 3 小時，再加入 100 μ l 的 DMSO，10~15 分鐘後測量 570 nm 之吸光值。

生長抑制率的計算公式：

$$\text{Growth inhibition (\%)} = (1 - \text{OD}_{\text{day2 treated well}} / \text{OD}_{\text{day2 control well}}) \times 100\%$$

(七) 流式細胞儀分析細胞生長週期之變化

細胞收集：

將肝癌細胞以培養液調整為 1×10^5 cells/mL，在 6 well 無菌培養盤中每個 well 加入 3 ml 的細胞懸浮液，24 小時後抽走培養液，再加入 2.7 ml 未含血清的

培養液及 0.3 ml 不同濃度之樣品，與肝癌細胞共同培養所需時間。培養時間結束後吸除舊培養液至離心管，以 2 ml PBS 清洗兩次，收集至離心管。加入 0.5 ml trypsin，放入 37°C 培養箱 5 min 後輕拍底部，加入 2 ml 5% FBS/PBS，混合後收集至離心管。以 1 ml PBS 清洗兩次，收集至離心管。以 600 g 離心 5 min 後倒掉上清液，盡量吸乾。加入 1 ml PBS 分散細胞，混勻時需緩慢。以 600 g 離心 5 min 後倒掉上清液，盡量吸乾。手持著離心管旋轉，一邊緩慢滴入 3 ml 4°C 70% 酒精，於 -20°C 靜置過夜 (可保存約三周)。

分析前處理：

以 600 g 離心 5 min 後倒掉上清液，加入 2 ml PBS 分散細胞，混勻時需緩慢。以 600 g 離心 5 min 後倒掉上清液，盡量吸乾，加入 1 ml 現配之 PI solution，緩慢混勻，於 37°C 避光反應 30 min。以 40 μ m nylon mesh 過篩移除聚集的細胞，以 FACscan 流式細胞儀進行分析，並以 ModFIT 細胞週期軟體分析數據。

(八) 瓊脂糖膠體電泳法檢測 DNA 片段化

(1) 細胞收集與染色體 DNA 萃取

細胞收集：

將肝癌細胞以培養液調整為 1×10^5 cells/mL，在 10 cm dish 中加入 10 ml 的細胞懸浮液，24 小時後抽走培養液，再加入 9 ml 未含血清的培養液及 1 ml 不同濃度之樣品，與肝癌細胞共同培養所需時間。培養時間結束後吸除舊培養液至離心管，以 2 ml PBS 清洗兩次，收集至離心管。加入 1 ml trypsin，放入 37°C 培養箱 5 min 後輕拍底部，加入 2 ml 5% FBS/PBS，混合後收集至離心管。以 2 ml PBS 清洗兩次，收集至離心管。以 600 g 離心 5 min 後倒掉上清液，盡量吸乾。加入 1 ml PBS 分散細胞，混勻時需緩慢，混勻後將細胞液移至微量離心管。以 600 g 離心 5 min 後盡量吸乾所有的上清液，於 -20°C 保存。

染色體 DNA 萃取：

每管加入 50 μ l STE buffer，上下翻轉均勻懸濁後，加入 300 μ l Cell Lysis Buffer，上下翻轉混合均勻後，置於 60°C 乾浴槽中反應 10 min。反應期間，需每隔 3 min 將離心管翻轉幾次，反應後溶液呈透明狀。每管加入 8 μ l RNaseA，混合均勻後將離心管蓋緊，置於 37°C 乾浴槽 10 min。每管加入 100 μ l Protein Remove Buffer，立即上下翻轉混合 10 sec 後，置冰浴 5 min。以 13000 rpm 離心 5 min 後，小心將上清液吸至乾淨離心管中。在上清液中加入 0.9 mL 95% 酒精，蓋緊管蓋，反覆翻轉離心管使溶液充分混合均勻，置室溫 2-5 min。以 13000 rpm 離心 5 min 後，吸去上清液，保留沉澱。每管加入 0.5 mL 70% 酒精，上下翻轉混合後，以 13000 rpm 離心 3 min。離心後吸去上清液，沉澱再以 70% 酒精重複清洗及離心一次，離心後盡量吸去殘留液體。將離心管管蓋打開置於通風櫥中，待沉澱表面乾燥後，每管加入 50 μ l TE buffer。將離心管置於 60°C 乾浴槽中 30 min，期間每隔 5-10 min 以手指彈拍管底，以助 DNA 溶解。

(2) DNA 濃度定量分析

緩慢吸取 4 μ l DNA 溶液至乾淨微量離心管中，加入 196 μ l TE buffer，充分混合均勻後由每管各取出 100 μ l 稀釋的 DNA 溶液，加入石英盤 96 well 中，測定 DNA 溶液在 260 nm 及 280 nm 之吸光值。利用 Beer-Lambert 定律，可以求得核酸之濃度。

計算公式：

$$A_{260} = \epsilon \times b \times C \quad C \times 50 \text{ 即為核酸濃度 } (\mu\text{g/ml})$$

(ϵ :吸光係數； b :光徑長； C :濃度)

(3) 瓊脂糖膠體電泳法

1.5% agarose gel 製備：

秤取 0.6 g agarose 粉末後，加入 40 ml 的 1x TAE buffer，以微波爐加熱熔

解後，加入 40 μ l DNA safe reagent，搖晃混合均勻後倒入鑄膠器中，並插上 12 well 的齒梳，置室溫至少 20 min 待其凝固。

準備 DNA 樣品：

每管染色體 DNA 各取 8 μ g，在石臘膜上與 1.33 μ l 的 6x 追蹤染劑均勻混合，並視體積補水，將每個樣品槽要加入的體積調整為 8 μ l。

電泳：

小心拔開膠片的齒梳，將膠片置於電泳槽中，倒入 1x TAE buffer，直至溶液蓋過膠片。將各個 DNA 樣品加入樣品槽中，蓋上電泳槽之透明蓋，以 50 V 進行電泳。約 45 min 後待追蹤染劑跑至膠體三分之一處時，關閉電源並取出膠片，以 UV transilluminator box 觀察色帶位置，拍照並做記錄。

(九) 西方墨點法檢測蛋白質之表現

(1) 細胞收集與蛋白質萃取

細胞收集：

將肝癌細胞以培養液調整為 1×10^5 cells/mL，在 10 cm dish 中加入 10 ml 的細胞懸浮液，24 小時後抽走培養液，再加入 9 ml 未含血清的培養液及 1 ml 不同濃度之樣品，與肝癌細胞共同培養 24 hr。24 hr 後吸除舊培養液至離心管，以 3~5 ml PBS 清洗細胞表面，將 PBS 吸起加至離心管。加入 1 ml trypsin，放入 37 °C 培養箱 5 min 使細胞被切下脫離 dish 底部。加入 3~5 ml 培養液將細胞打散沖下後放入離心管，以 1000 g 5 min 之條件離心。離心後倒掉上清液，以 0.75 ml PBS 打散細胞，吸起放入微量離心管，再以 0.75 ml PBS 沖洗一次離心管，加入微量離心管中。以 1000 g 4°C 之條件離心 5 min，離心後吸除上清液，加入 1 ml PBS 混勻細胞後再以 1000 g 4°C 5 min 離心一次。離心後將上清液盡量吸乾。

蛋白質萃取：

將 100~300 μl lysis buffer 加入細胞 pellet 中，震盪數秒後置於冰上冷卻，重複震盪和冷卻步驟持續 30 min。以 16200 g 於 4°C 下離心 30 min，離心後小心吸取上清液進行蛋白質定量，所得到的蛋白質保存於 -20°C。

(2) 蛋白質濃度定量分析

將胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 配置成 0, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$ 等濃度，即為蛋白質標準品，混合均勻後每個濃度取 10 μl 加到 96 well (需做三重複)。將蛋白質染劑 (Bio-rad protein assay dye reagent) 加水稀釋成所需的量 (染劑：水 = 1 : 4)，每個 well 加入 200 μl 。於光譜分析儀測量 595 nm 吸光值，得到蛋白質標準曲線。將樣品稀釋於標準曲線範圍之內的濃度，同樣與蛋白質染劑作用後測量 595 nm 吸光值，相對於蛋白質標準曲線，以內插法計算出此樣品蛋白質濃度。

(3) 聚丙烯醯胺電泳 (SDS-PAGE)

首先製備 10% 之分離膠體 (separation gel)，注入膠片後以 95% 酒精壓泡，待其凝固後以濾紙吸去酒精，再注入 4% 之焦集膠體 (stacking gel)，凝固後將膠片組合架到電泳槽上，倒入電泳緩衝液。取適量蛋白質溶液 (40 $\mu\text{g}/\text{well}$) 加入適量 4 \times sample buffer，以蒸餾水將每個樣品的體積調整為一致，混勻後以 100°C 加熱 5 min，以微量吸管將樣品及 5 μl 蛋白質分子量標定注入樣品槽中。裝上電源蓋，先以 80 V 進行電泳 30 min，再將電壓調整為 120 V，待蛋白質分子量標定之最小分子量 (10 kDa) 跑至膠片的最下方時關掉電源，取出膠片進行蛋白質轉印。分離膠體及焦集膠體之配置溶液比例見本節 (三)。

(4) 蛋白質轉印

先將 PVDF 膜以 100% 甲醇潤濕數秒鐘，浸於轉印緩衝液中備用；轉印所需

之濾紙及海綿也先浸於轉印緩衝液中平衡備用。將完成電泳之 SDS-PAGE 膠片浸在轉印緩衝液中平衡約 5 min，取出轉印卡夾 (Bio-rad)，將多孔性海綿、3 M 濾紙、PVDF membrane、膠片、3 M 濾紙、多孔性海綿依序鋪上，並避免任何氣泡之產生，即完成轉印三明治組合。將卡夾組合放入轉印槽中，使膠片面朝負極，PVDF 面朝正極，並除去卡夾外之氣泡，避免轉印效率降低。倒入轉印緩衝液，於 4°C 下以 400 mA 轉印 75 min。

(5) 酵素免疫染色法 (Immunoblotting)

將轉印完成之 PVDF membrane 浸於 5% 脫脂奶 (溶於 PBST 中)，置室溫 blocking 一小時，以阻斷非專一性抗原反應。將牛奶倒掉後，以 PBST 清洗 15 min 三次後，加入一級抗體 (以 PBST 稀釋至適當倍率) 於 4°C 反應過夜。隔天倒掉一級抗體後 (可回收使用 3~5 次)，以 PBST 清洗 15 min 三次，再加入以 PBST 稀釋鍵結 HRP 之二級抗體，於室溫反應一小時。將二級抗體倒掉後，以 PBST 清洗 15 min 三次，最後以 ECL 方式呈色，利用 UVP 冷光照膠系統照膠，即可知雜合反應結果。

一級與二級抗體使用之濃度

一級抗體	二級抗體	分子量
Anti-p21 (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000)	18
Anti-p27 (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000)	22
Anti-cyclin D1 (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000)	34
Anti-CDK2 (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000)	34
Anti-GAPDH (1:20000)	Anti-rabbit (1:20000)	36
Anti-p53 (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000)	44
Anti-cyclin E1 (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000)	47
Anti-cyclin A2 (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000)	49

(十) 統計分析

實驗結果以 SAS v 9.0 版 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) 軟體執行統計分析，以 one-way ANOVA 判定有無差異性，再以鄧氏新多變預測驗法 (Duncan's New Multiple Range Test) 檢定兩兩之間是否有顯著差異，以 $p < 0.05$ 為具有顯著性差異之標準，並以 a~d 表示。



第六章 結果與討論

(一) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物之製備

Zhao 等人在 2003 年由柳松菇中分離與純化出具有抑制腫瘤生長能力的凝集素 (lectin)，本研究參考其萃取方法以及本實驗室之前人研究 (陳，2010)，以硫酸銨沉澱法收集 40~80% 飽和度的鴻喜菇硫酸銨沉澱粗萃物。每次萃取 1 kg 新鮮鴻喜菇，經 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱，再經透析去鹽及凍乾後，約可得 100 mg 粗萃物，萃取率約 0.01%。每次的回收率略有差異，推測可能原因為植物材料仍具有產季差異，以及每次實驗條件不會完全相同所致。

(二) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之連續鹽梯度陰離子交換樹脂區分

將 0.15 g 的鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物，以 50 ml Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 回溶後，注入 DEAE 陰離子交換層析管柱 (2.6 × 40 cm)。以 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 緩衝溶液每小時 30 ml 之流速洗約 600 ml 後，再以梯度混合器 (gradient mixer) 進行 0~1 M NaCl 連續鹽梯度溶離，以分段收集器收集，每管收集 7 ml。圖 6-1 為鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物以拉連續鹽梯度方式之陰離子交換層析圖，在 280 nm 波長吸光圖譜中，以 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 緩衝溶液流洗的部份，可得到兩個蛋白質波峰，分別出現在第 14~28 管 (流洗體積 98~196 ml) 以及第 29~56 管 (流洗體積 203~392 ml)。以梯度混合器進行 0~1 M NaCl 連續鹽梯度溶離時，隨著鹽濃度增加，帶不同程度負電之蛋白，依序被氯離子沖提而置換下來。在 280 nm 波長吸光圖譜中，可得到兩個蛋白質波峰，分別出現在第 128~188 管 (896~1316 ml) 以及最後將濃度調整為含 1 M NaCl 的 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 後的第 214~219 管 (1498~1533 ml)。將緩衝溶液調整為含 1 M NaCl 後出現的波峰可能因每一批粗萃之鴻喜菇生長情況與產季略有不同，吸光值變化較大，有時亦無觀察到明顯的波峰或 A280 小於 0.1，且與拉連續梯度所得之第 128~188 管相比量也較少，因此選擇拉連續梯度部分之樣品進行

進一步分析。經超過濾濃縮膜去鹽將連續梯度收集之區分物凍乾，由此取得 HM-3。凍乾後可得 5 mg 產物，與進行陰離子管柱層析前的 0.15 g 粗萃物相比，回收率約為 3.33%。若由新鮮鴻喜菇來計算，回收率則為 0.00033%。

(三) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之電泳檢定

鴻喜菇硫酸銨沉澱粗萃物以 DEAE 陰離子交換樹脂經連續鹽梯度方式區分後所得之 HM-3 以 12.5% SDS-PAGE 進行電泳檢定，再以 CBR 染色觀察蛋白質分子量分布情形，做為後續選擇膠體管柱層析樹脂分離區間之參考。使用的樣品濃度分別為 5, 10, 20 及 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，每個樣品槽加入 10 μl 之樣品，電泳及染色結果如圖 6-2。HM-3 主要有三個明顯色帶，分子量分別介於 10~15, 15~25, 25~35 kDa，較明顯色帶的分子量皆小於 35 kDa。除了這三個色帶之外，還有許多模糊的色帶，推測是因 HM-3 並非純物質，還有許多雜質存在。HM-3 濃度為 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的色帶較明顯，5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 因濃度低故色帶較不清楚。

前人研究結果顯示，鴻喜菇 100% 飽和度硫酸銨沉澱物以 DEAE 陰離子交換樹脂經階梯鹽梯度方式區分後所得之 HM-0.1 及 HM-0.2，進行電泳檢定後 HM-0.1 在 45~66 kDa 有表現量相當高的兩個色帶，而 HM-0.2 的蛋白質色帶多集中於 20~30 kDa 之間 (許, 2004)。兩相比較下，本實驗與 HM-0.2 的結果較為類似，表現量較高的蛋白質分子量皆小於 30 kDa。

(四) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物之膠體管柱層析

將陰離子交換管柱層析分離所得的 HM-3 經超過濾濃縮去鹽及凍乾後，取 5 mg 溶於 2 ml Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 0.15 M NaCl)，注入 Sephadex G-200 管柱 (1.6 × 100 cm) 進行膠體過濾層析，以每小時 30 ml 之流速收集，每管收集 4 ml。圖 6-3 為陰離子交換樹脂區分物之 S-300 膠體管柱層析圖，在 280 nm 吸光圖譜下，只得到一個波峰，出現在第 21~50 管 (84~200 ml)。以 blue dextran 測得此根管柱之 V_0 為 80 ml, V_t 為 190 ml，波峰應出現在 V_0 及 V_t 之間，即

80~190 ml，實驗結果大致符合此計算值。選用 S-300 是參考 SDS-PAGE 電泳檢定法與 CBR 染色結果及本實驗室之前人研究（陳，2010），希望能以此管柱將陰離子交換層析後取得的 HM-3 再依分子量大小分離出不同的物質。使用此根管柱分離效果不佳，經數次實驗後皆僅得到一個波峰。在 V_0 後快速出現波峰，以膠體過濾分子量較大之物質會先分離出來的原理推測，HM-3 為分子量較大的蛋白質。

S-300 分離蛋白質的範圍為 $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$ Da，後來改選用 S-200，分離範圍為 $5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^5$ Da，希望藉由膠球顆粒大小的不同，以顆粒較小的 S-200 來將 HM-3 中分子量較小的蛋白質分離出來，實驗條件皆與 S-300 相同。圖 6-4 為陰離子交換樹脂區分物之 S-200 膠體管柱層析圖，在 280 nm 吸收光譜下，也僅得到一個波峰，出現在第 17~44 管 (68~176 ml)。在實驗數次後，使用此兩種膠球顆粒大小不同的膠體過濾管柱皆未有良好的分離效果，在已盡量避免實驗操作手法錯誤的前提下，推測可能與蛋白質本身特性有關。因膠體過濾法未得良好之分離效果，於是更改 DEAE-Sepharose 陰離子交換管柱層析拉鹽梯度方式，將連續鹽梯度改變為階梯鹽梯度，觀察是否能得到較純的蛋白質以進行後續機制之探討。

（五）鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之階梯鹽梯度陰離子交換樹脂區分

將 0.15 g 的鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物，以 50 ml Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 回溶後，注入 DEAE 陰離子交換層析管柱 (2.6 × 40 cm)。以 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 緩衝溶液每小時 30 ml 之流速洗約 600 ml 後，不使用梯度混合器進行 0~1 M NaCl 連續鹽梯度溶離，而是分別配置含 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 M NaCl 之 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0)，每一種鹽濃度不同的緩衝液各沖提一倍管柱體積 (約 180 ml)。藉由鹽濃度的增加，以氯離子依序將帶不同程度負電之蛋白質置換下來，並以分段收集器每管收集 5 ml。圖 6-5 為鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物以拉階梯鹽梯度方式之陰離子交換層析圖。在 280 nm 波長吸光圖譜中，以 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 緩衝溶液流洗的部份進行細胞實驗後，

發現對 HepG2 並無明顯的生長抑制現象，故流洗的部分沒有繼續收集與作圖，僅測定拉階梯鹽梯度部分之吸光。由圖 6-5 可觀察到以五種含不同鹽濃度之緩衝液沖提管柱，可得到明顯的四個波峰，分別為第 15~53 管 (75~265 ml)、第 54~90 管 (270~450 ml)、第 91~126 管 (455~630 ml) 以及第 127~166 管 (635~830 ml)，命名為區分物 I、II、III 及 IV。區分物 I、II、III 及 IV 分別為使用含 0.2、0.4、0.6 及 0.8 M NaCl 的 Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 所溶離，含 1 M NaCl 的 Tris-HCl 所溶離的波峰則不明顯。區分物 IV 吸光值較低，且不同次實驗結果的差異較大，有時並無觀察到明顯的波峰。推測可能因每一批粗萃之鴻喜菇生長情況與產季略有不同而導致此現象，因此未選擇此區分物進行細胞實驗。將區分物 I、II、III 經超過濾濃縮並凍乾後，發現以同樣的實驗方式，區分物 III 凍乾後所得的量比區分物 I、II 少很多，因此選擇區分物 I、II 進行後續細胞實驗。

(六) 鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物及陰離子交換樹脂區分物對 HepG2 之生長抑制率測試

(1) 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物對 HepG2 之生長抑制率

以不同濃度之鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物與人類肝癌細胞 HepG2 培養 24 hr 後進行生長抑制率測試，結果如圖 6-6。以 0、100、200、400 及 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的粗萃物濃度對 HepG2 處理 24 hr，濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時的抑制率為 4.14%，200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抑制率為 8.02%。當處理濃度再提高至 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，生長抑制率也提升至 43.65%，而以 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理 24 hr 後生長抑制率上升至 85.96%。經線性內插法計算得鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物對 HepG2 的半致死濃度 (IC_{50}) 為 460.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。由圖 6-6 可觀察到隨著處理濃度提高，細胞的生長抑制率也有增加的現象，粗萃物對 HepG2 的抑制具有濃度依賴效應 (concentration-dependent manner)。先前文獻指出，鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 與小鼠大腸癌細胞 (CT26) 共同培養 24 hr 後，其生長抑制率為 67.75%，而培養 48 及 72 hr 後，其生長抑制率分別可達 90.3% 及

92.81% (簡, 2005)。因本實驗未進行濃度為 600 $\mu\text{g/ml}$ 的生長抑制率測試，故以線性內插法計算當濃度為 600 $\mu\text{g/ml}$ 時，抑制率約為 64.8%，與前人的結果相近。

(2) 陰離子交換樹脂連續梯度區分物 HM-3 對 HepG2 之生長抑制率

將 DEAE-Sepharose 陰離子交換層析管柱拉連續鹽梯度所得之區分物 HM-3，以不同濃度與 HepG2 培養 12 及 24 hr 後之生長抑制率如圖 6-7。當濃度為 25 $\mu\text{g/ml}$ 時，處理 12 hr 的生長抑制率為 7.02%，24 hr 則為 9.25%。濃度為 37.5 $\mu\text{g/ml}$ 時，處理 12 hr 反而比 24 hr 有較高之生長抑制率，前者抑制率為 34.37%，後者為 11.67%。將濃度提高後，兩者的差距縮小。以 50 $\mu\text{g/ml}$ 處理 12 及 24 hr 後得到的生長抑制率分別為 87.41% 及 88.25%。以 100 $\mu\text{g/ml}$ 處理 12 及 24 hr 的生長抑制率則分別為 92.42% 及 91.08%。由線性內插法計算可得到以 HM-3 對 HepG2 處理 12 及 24 hr 後的 IC_{50} 分別為 41.2 $\mu\text{g/ml}$ 及 43.76 $\mu\text{g/ml}$ 。隨著 HM-3 處理的濃度提升，細胞的生長抑制率也有增加的現象，HM-3 對 HepG2 的抑制具有濃度依賴效應。若與 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物之結果相比，HM-3 對 HepG2 抑制之 IC_{50} 約降為十分之一，顯示經進一步的純化後，樣品的有效濃度提高。

(3) 陰離子交換樹脂階梯梯度區分物 I、II 對 HepG2 之生長抑制率

DEAE-Sepharose 陰離子交換層析管柱拉階梯鹽梯度所得之區分物 I 對 HepG2 的生長抑制率如圖 6-8。以 25 $\mu\text{g/ml}$ 對 HepG2 處理 12 hr 時並無明顯的抑制能力，生長抑制率僅有 1.26%，處理 24 hr 後抑制率提高至 13.3%。濃度為 37.5 $\mu\text{g/ml}$ 時培養 12 及 24 hr 的結果相近，抑制率分別為 17.63% 及 17.69%。當濃度提高至 50 $\mu\text{g/ml}$ 時以處理 12 hr 的效果較佳，抑制率為 24.41%；處理 24 hr 的抑制率則為 19.44%。較低濃度 (25 $\mu\text{g/ml}$) 時以處理 24 hr 的效果較佳，濃度較高時 (50 $\mu\text{g/ml}$) 則處理 12 hr 的效果較好，但隨濃度提高，生長抑制率均有增加的現象。區分物 II 與其他樣品一同進行實驗時得到的生長抑制率為負值，

且不具濃度效應，對 HepG2 並無明顯的抑制能力。區分物 II 單獨處理人類肝癌細胞 HepG2 時雖無抑制能力，但為了探討其與區分物 I 的結合對抑制 HepG2 生長是否具有協同作用 (synergistic effect)，將其與區分物 I 以相同比例混合後進行生長抑制率的測試。

(4) 綜合比較

將 HM-3、區分物 I 及區分物 I 和 II 之混合物分別以不同濃度對 HepG2 處理 12 及 24 hr，得到之生長抑制率如圖 6-9 與圖 6-10。由圖 6-9 可觀察到，以不同樣品對 HepG2 進行 12 hr 之培養，當濃度分別為 25、37.5 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 時，此三種樣品皆以 HM-3 的抑制率最佳，其次為區分物 I，區分物 I 和 II 之混合物對 HepG2 並沒有抑制能力，生長抑制率為負值。濃度為 37.5 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 時此三種樣品具有顯著性差異。當處理時間為 24 hr 時，由圖 6-10 可觀察到濃度為 25 及 37.5 $\mu\text{g/ml}$ 時，區分物 I 的抑制能力比其他兩者佳。濃度提高至 50 $\mu\text{g/ml}$ 後，HM-3 的抑制率遠高於其他兩種樣品，具有顯著性差異。綜合以上結果顯示區分物 I 和區分物 II 混合之效果並沒有比單獨使用區分物 I 佳，兩者間並無協同作用。以此三種樣品對 HepG2 進行 12 及 24 hr 之培養得到的生長抑制率皆以 HM-3 較佳，推測由於陰離子交換樹脂只能依據蛋白質所帶之負電量進行區分，並無法將活性成分集中至同一區分物，因此可能在進行拉階梯鹽梯度過程中影響了樣品本身的離子結構，造成活性成分的分散或協同作用的破壞而使得樣品的抑制能力較差 (許, 2004)，因此在後續探討生長抑制機制的部份皆以 HM-3 為樣品。

(七) 鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物對 HepG2 之細胞週期分佈

先前文獻指出，鴻喜菇 40~80% 硫酸銨沉澱物會使小鼠大腸癌細胞 (CT26) 生長停滯於 G₂/M phase 以及增加 sub G₁ 之比例 (簡, 2005)。玉皇菇活性蛋白 PCP-3A 可誘導人類白血病細胞 (U937) 細胞週期停滯於 S phase 及細胞凋亡 (陳, 2010)。由此推測鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物 HM-3 對 HepG2 的生長抑

制可能會藉由誘導細胞週期停滯或細胞凋亡而進行，故在本實驗中以流式細胞儀來分析經樣品處理後 HepG2 的細胞週期變化。首先參照生長抑制率的結果，以 0、25、37.5 及 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HM-3 與 HepG2 培養 12 及 24 hr，觀察其細胞週期變化，結果如圖 6-11 與圖 6-12。在處理 12 及 24 hr 後，均未觀察到有明顯之 sub G_1 ，推測細胞並未發生凋亡。經 HM-3 不同濃度的處理，在培養 12 及 24 hr 後都觀察到了 S phase 有下降的現象。當 HM-3 的濃度由 0 上升至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，處理 12 hr 的細胞其 S phase 比例由 29.19% 下降至 21.87%；處理 24 hr 的細胞則由 32.41% 下降至 27.18%。 G_2 phase 比例的變化較無一定的趨勢。在 G_1 phase 的部份，處理 12 hr 後，其比例有先下降後上升的趨勢，但上升的幅度較小，僅增加了 2.9%。當濃度由 0 上升至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，以 HM-3 處理 24 hr 的 HepG2 細胞其 G_1 phase 比例由 53.53% 上升至 61.12%，增加了 7.59%。由於以 HM-3 處理 24 hr 的 HepG2 比起僅處理 12 hr 有較為明顯 G_1 phase 增加的現象，因此選擇 24 hr 此時間點，並將處理濃度的範圍增加，來探討其是否有 G_1 phase 細胞週期停滯的現象。

將 HM-3 的濃度調整為 0、25、50、75、100 及 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，並與 HepG2 培養 24 hr 後觀察其細胞週期變化，結果如圖 6-13。由圖 6-13 可觀察到濃度提高至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 後並無觀察到明顯的 sub G_1 上升，HM-3 並未誘導細胞凋亡的發生。隨著濃度由 0 提高至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ， G_1 phase 的比例由 52.67% 增加為 69.37%，S 及 G_2 phase 比例的變化則較無一定的趨勢。重複三次實驗後將結果整理為圖 6-14，當濃度由 0 提高至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ， G_1 phase 比例由 54.35% 增加為 69.08%，推測細胞出現了生長停滯在 G_1 phase 的現象 (G_1 cell cycle arrest)。S phase 的比例在濃度提高至 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 後，即與控制組具有顯著差異，大致上有隨濃度提高而下降的趨勢， G_2 phase 比例隨濃度的變化並不顯著。

人體中細胞週期和細胞凋亡主要調節體內細胞分化及細胞死亡之平衡。早於 1972 年，就有學者提出細胞凋亡的發生與體內惡性細胞的減少與腫瘤發生機率的降低有所關聯 (Kerr *et al.*, 1972)。誘導癌細胞走向細胞生長週期的停滯和細胞凋亡

是目前癌症治療的藥理之一 (Hengartner, 2000)。先前文獻指出，鴻喜菇的甲醇萃取物 hypsiziprenol A9 具有抑制 HepG2 細胞生長的能力，且會引發其細胞週期停滯在 G₁ phase。經 24 hr 處理後，當 hypsiziprenol A9 濃度由控制組提高至 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，G₁ phase 比例由 65% 提高至 81% (Chang *et al.*, 2004)，增加了 16%。以 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鴻喜菇 100% 硫酸銨沉澱物之離子交換樹脂餾分物 HM-0.2 刺激人類白血病細胞株 (U937) 24 hr 後，G₁ phase 比例由 47.96% 提高至 80.07%，增加了 32.11% (許，2004)。本實驗中 HepG2 細胞經 HM-3 處理 24 hr 後，當濃度由 0 提高至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，G₁ phase 比例由 54.35% 上升為 69.08%，增加了 14.73%。實驗結果與前人的比起來較低，推測可能原因為樣品特性及處理方式或細胞株不同所致。

(八) 瓊脂糖電泳檢測 DNA 片段化現象

DNA 片段化為細胞凋亡的特徵之一，細胞中的 DNA 會裂解為 180~200 bp 大小的片段 (Wyllie, 1980)。本實驗將 HepG2 以 0、25、37.5 及 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HM-3 培養 12 及 24 hr 後，抽取細胞中之 DNA 並以 1.5% 瓊脂糖膠體 (agarose gel) 進行電泳，觀察經處理後細胞中 DNA 的表現。圖 6-15 為以 1.5% 瓊脂糖膠體進行電泳檢測 DNA 片段化的結果，M 為 100 bp 的 DNA 分子量標準。由圖中可觀察到處理 12 hr 時，當 HM-3 濃度提高，DNA 拖尾 (smear) 的情形增加，但並無出現 DNA 片段化的現象。以 0 及 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HM-3 處理 24 hr 後無明顯的 DNA 條帶，推測可能是電泳前加入樣品時有所疏失，導致無明顯條帶的出現；而以 37.5 及 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理 24 hr 後 HepG2 之 DNA 也出現 smear 的現象，同樣也並未觀察到 DNA 的片段化。綜合上述結果，推測 HM-3 並不能使 HepG2 發生細胞凋亡。DNA smear 出現的可能原因有抽取之 DNA 細胞凋亡已進行至最後的階段或發生了細胞壞死 (necrosis) (Kerr and Harmon, 1991)。文獻指出，細胞發生凋亡時並不一定會出現 DNA 片段化且可不透過 caspase 來進行 (Galluzzi *et al.*, 2007)，因此需同時配合其他檢測方式以確認細胞是否走向凋亡。

(九) 西方墨點法分析細胞週期相關蛋白表現

由目前所得的結果顯示，鴻喜菇陰離子交換樹脂區分物 HM-3 能使人類肝癌細胞 HepG2 的細胞週期停滯於 G₁ phase，但並無觀察到細胞凋亡的現象。為探討 HM-3 是透過何種機制使 HepG2 出現生長抑制及細胞週期停滯於 G₁ phase，本實驗以西方墨點法來檢測細胞週期中 G₁ phase 相關蛋白 p53、p21、p27、cyclin A2、cyclin D1、cyclin E1 及 CDK2 之表現。

(1) p53

將人類肝癌細胞 HepG2 以 0、25、50、100 及 200 μg/ml 的 HM-3 培養 24 hr 後，抽取細胞中之蛋白質進行聚丙烯醯胺電泳 (40 μg/well)，再以西方墨點法分析細胞週期相關蛋白表現。圖 6-16 為 HM-3 處理 24 hr 對 HepG2 中 p53 表現量之影響。實驗結果顯示，p53 表現量隨處理濃度提高有增加的趨勢。與 HM-3 濃度為 0 μg/ml 的控制組相比，以 200 μg/ml 處理時可使 p53 表現量上升 86.13%，以統計軟體分析後未達顯著差異，推測可能是標準差太大所致。由此結果推測 HM-3 可能會造成 HepG2 中 DNA 受損，並且進一步活化 p53，希望能在進入 S phase 前進行細胞自身 DNA 修補的工作。

當細胞中 DNA 受損時，會使細胞週期停在 checkpoint 以進行修補，避免錯誤的訊息傳至子細胞。當修補未完成時，細胞會保留突變或是走向凋亡。G₁ phase checkpoint 基因包括 p53，與細胞凋亡途徑也有所關聯 (Reed, 1999)，正常未經突變的 p53 會活化促進細胞凋亡發生的 Bax 基因 (O' Connor, 1997)。p53 為腫瘤抑制基因 (tumor suppressor genes)，在 DNA 受損時會增加，並活化 p21。p21 會抑制 cyclin/CDK 複合體的作用，使細胞週期發生 G₁ phase 停滯的現象，以進行 DNA 的修補。除了 p21 外，p53 亦會活化 Gadd 45，也是與 DNA 修補相關之蛋白 (Ford and Pardee, 1999)。

(2) p21

p21 為 p53 的下游基因，當 p21 被活化時可觀察到 G₁/S 細胞週期停滯的現象 (Eastham *et al.*, 1995)。圖 6-17 為 HM-3 處理 24 hr 對 HepG2 中 p21 表現量之影響，結果顯示 p21 表現量會隨處理濃度提高而增加，以 200 μg/ml 處理時 p21 表現量與控制組相比具有顯著性差異 ($p < 0.05$)。由此結果推測 HM-3 的處理可能會活化 HepG2 中的 p53 而進一步活化 p21，進而使細胞週期停滯在 G₁ phase。

(3) p27

圖 6-18 為 HM-3 處理 24 hr 對 HepG2 中 p27 表現量之影響，經處理後細胞中 p27 的表現與控制組相比並無顯著差異，推測 HM-3 造成之細胞週期停滯非透過活化 p27 而造成。p27 與 p21 同屬 CKI 中的 Cip/Kip family，能抑制多個 cyclin/CDK 複合體，如 cyclin D/CDK 與 cyclin E/CDK2 等，而 p27 對 cyclin E/CDK2 的抑制效果較 cyclin D/CDK 佳。不活化態的 cyclin D/CDK 仍可能有高比例的 p21 或 p27，因細胞可能處於特殊的生理情況下或是被 CAK (cyclin-activation kinase) 所抑制 (Koff *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1994)。當細胞生長處於靜止狀態時，p27 的含量很高，但進入細胞週期後 p27 的量會下降 (Kato *et al.*, 1994)。本實驗 p27 三重複的結果中，有兩次的表現量較低，推測可能是因細胞皆已進入細胞週期，並非處在靜止的 G₀ phase 所致。

(4) cyclin A2

在細胞週期 G₁ phase 晚期，cyclin A 的生合成對於 G₁-S phase 之間的轉換相當重要，當 cyclin A 被抑制時會使細胞無法順利進入 S phase (Girard *et al.*, 1991)。本實驗中選擇了 cyclin A2 抗體來偵測其表現量，不同於 cyclin A1 只有出現在生殖細胞 (germ cell)，cyclin A2 在所有組織中均會表現。圖 6-19 為 HM-3 處理 24 hr 對 HepG2 中 cyclin A2 表現量之影響，經處理後細胞中 cyclin A2 的

表現與控制組相比並無顯著差異，顯示 HM-3 濃度的提升並不會影響細胞中 cyclin A2 的表現量。當細胞進入 S-phase 後，cyclin E 會降解，而 cyclin A 的含量會有大幅增加的情形 (Sherr, 1996)。本研究中觀察到了以 HM-3 處理後之 HepG2 出現了 G₁ phase 停滯的現象，推測細胞尚未進入 S phase，故 cyclin A 的表現量並無增加。p21 是 cyclin A/CDK2 的負向調控因子之一，但隨著 HM-3 處理濃度增加而表現量提高的 p21，並未對 cyclin A2 發揮其抑制效果。

(5) cyclin D1

圖6-20 為 HM-3 處理 24 hr 對 HepG2 中 cyclin D1 表現量之影響，經處理後細胞中 cyclin D1 的表現與控制組相比並無顯著差異，推測 HM-3 造成的 G₁ phase 停滯並非透過抑制 cyclin D1 而造成。D-type cyclin 有 D1、D2 及 D3 等三種，是細胞週期中 G₁ phase 早期的調控因子。D-type cyclin 在細胞週期中的主要功能是扮演生長因子的感應者，接收環境中的訊號而進一步轉換為細胞週期所需的物質 (Sherr and Roberts, 1999)。在許多人類的癌症中，cyclin D1 有過度表現 (overexpression) 的現象 (Sherr, 1996)。D2 與 D3 較具有組織專一性 (tissue specificity)，較常在 T 細胞型態的白血球出現，其他組織例如乳癌組織則較少或沒有表現 (Courjal *et al.*, 1996)。cyclin D 會活化 CDK4 和 CDK6，並與其形成複合物，來調控 cyclin E/CDK2 的進行，使細胞得以順利由 G₁ phase 進入 S phase (Ford and Pardee, 1999; Adrian and Edward, 2000)。

(6) cyclin E1

目前已知的 cyclin E 有兩種，分別為 cyclin E1 與 E2。此兩者有非常相似的調控作用，而 cyclin E2 的相關研究較少 (Hwang and Clurman, 2005)，一般常以 cyclin E 來代指 cyclin E1。圖6-21 為 HM-3 處理 24 hr 對 HepG2 中 cyclin E1 表現量之影響，以樣品處理後 cyclin E1 表現量雖未隨濃度變化有逐漸下降的趨勢，但與控制組相比有顯著下降的現象 ($p < 0.05$)。此結果顯示 HM-3 可透過抑制

cyclin E1 來使細胞無法通過 checkpoint，進而發生 G_1 phase 停滯之現象。

(7) CDK2

CDK2 會與 cyclin E 及 cyclin A 結合，形成的複合體分別負責調控 G_1 及 S phase，到了 S phase 晚期 cyclin A 改與 CDK1 (CDC2) 結合，負責 S 及 G_2 phase 之間的轉換 (Sherr, 1996; Adrian and Edward, 2000)。圖 6-22 為 HM-3 處理 24 hr 對 HepG2 中 CDK2 表現量之影響，經處理後 CDK2 表現量與控制組相比並無顯著差異。雖然 CDK2 並未隨處理濃度有顯著變化，但由於以樣品處理後 cyclin E1 的表現量有下降的現象，推測細胞中減少的 cyclin E1 可能使 cyclin E1/CDK2 複合體的數量也減少而引起 G_1 phase 停滯。CDK2 在 G_1 phase 的活性增加需同時具有 Cip/Kip 蛋白被抑制及 Rb 活性被抑制這兩個條件 (Sherr and Roberts, 1999)。本研究中觀察到 p21 之表現量有隨處理濃度增加而上升的趨勢，但因未檢測 Rb 活性，兩條件有可能只符合一個，故未觀察到 CDK2 表現量下降的現象。

綜合西方墨點法蛋白質表現之結果，以 HM-3 處理後 HepG2 細胞中與控制組相比具顯著性差異的蛋白為 p21 與 cyclin E1，p53 表現量大幅增加但可能因標準差過大而無顯著差異，p27、cyclin A2、cyclin D1、CDK2 則不具顯著性差異。由以上結果推測 HM-3 造成的細胞週期停滯可能是透過活化 p53 及其下游基因 p21。p21 進一步抑制 cyclin E1，可能使 cyclin E1/CDK2 複合體的數量減少，使細胞停滯在 G_1 phase 無法順利進入 S phase 以進行 DNA 複製，因而對 HepG2 的生長造成抑制。

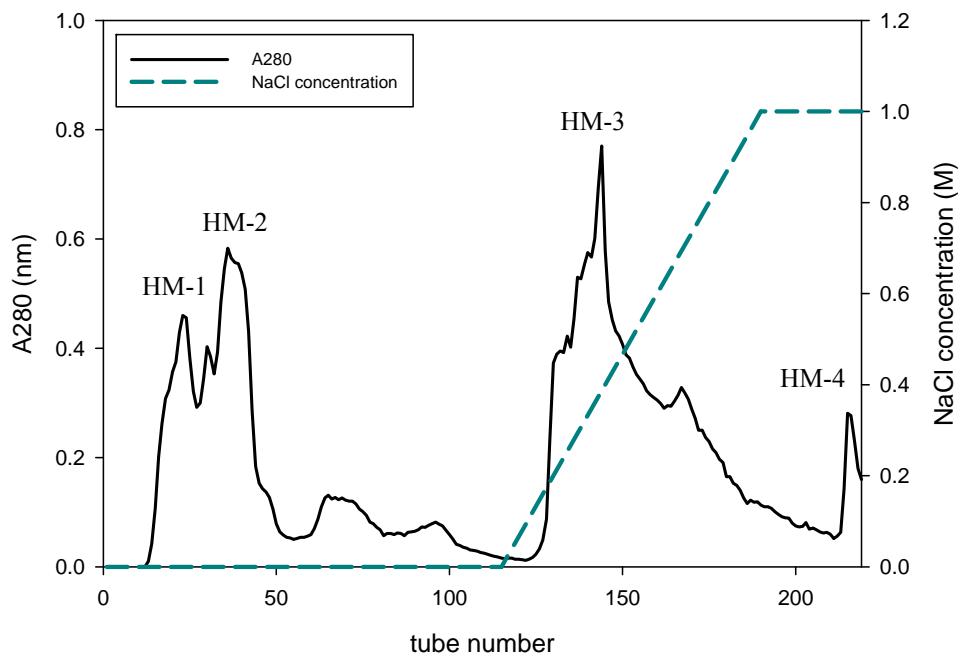


圖 6-1、鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之連續鹽梯度 DEAE-Sephadex 離子交換層析圖。

Figure 6-1. DEAE-Sephadex ion-exchange chromatogram of 40~80% ammonium sulfate precipitate from *H. marmoreus* by NaCl continuous gradient.

Column: 2.6 × 40 cm

Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, followed by the same buffer containing 0~1 M NaCl continuous gradient.

Flow rate: 30 ml/hr

Collection volume: 7 ml/tube

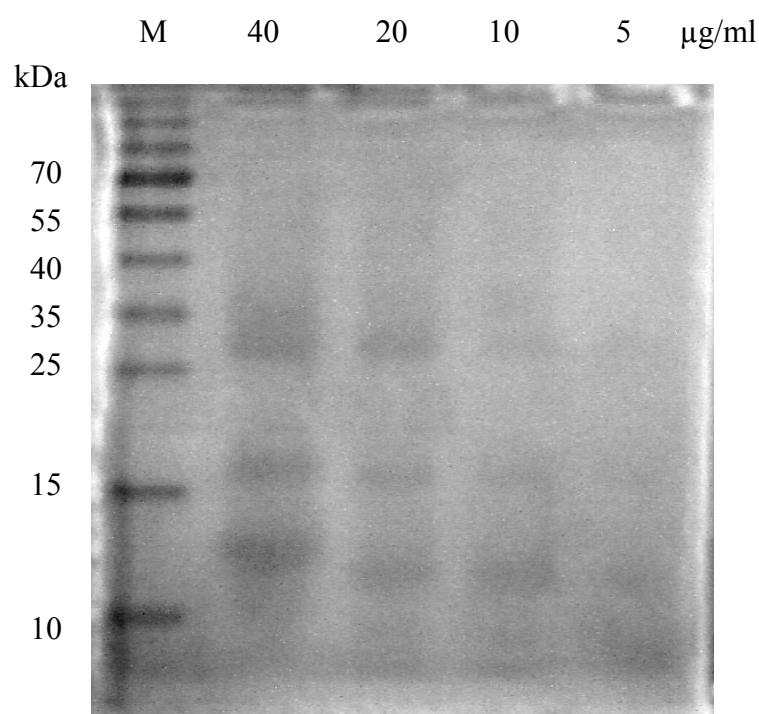


圖 6-2、鴻喜菇離子交換樹脂區分物之 12.5% SDS-PAGE 以 CBR 染色膠片圖。

Figure 6-2. The 12.5% SDS-PAGE gel electrophoregrams of HM-3 from

DEAE-Sepharose ion exchange as visualized by CBR staining.

M: protein molecular weight marker

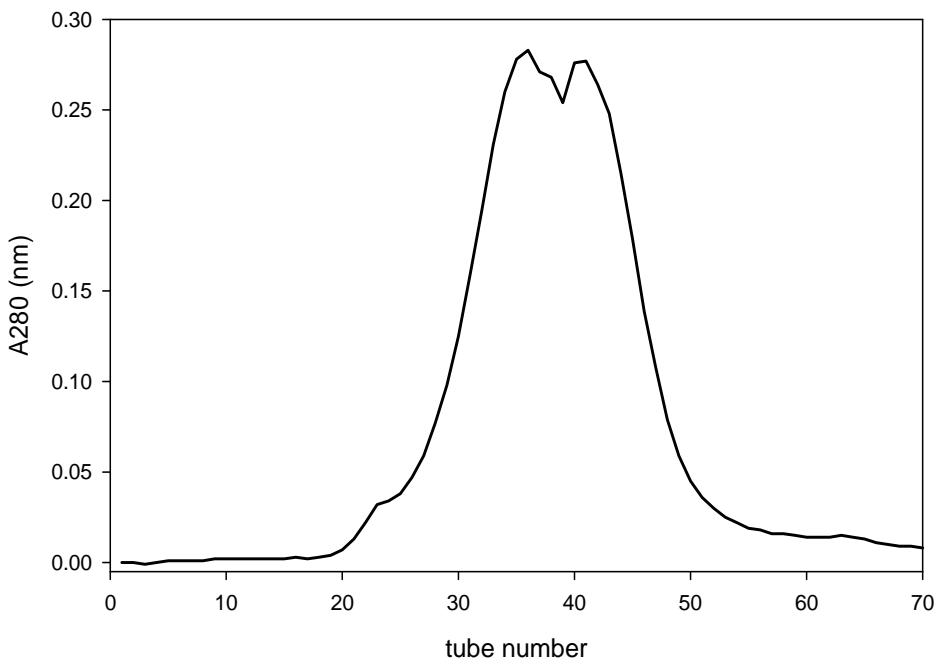


圖 6-3、鴻喜菇離子交換樹脂區分物之 Sephadryl S-300 膠體管柱層析圖。

Figure 6-3. Sephadryl S-300 gel filtration chromatogram of HM-3 from DEAE-Sephadex ion exchange.

Column: 1.6 × 100 cm

Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl.

Flow rate: 30 ml/hr

Collection volume: 4 ml/tube

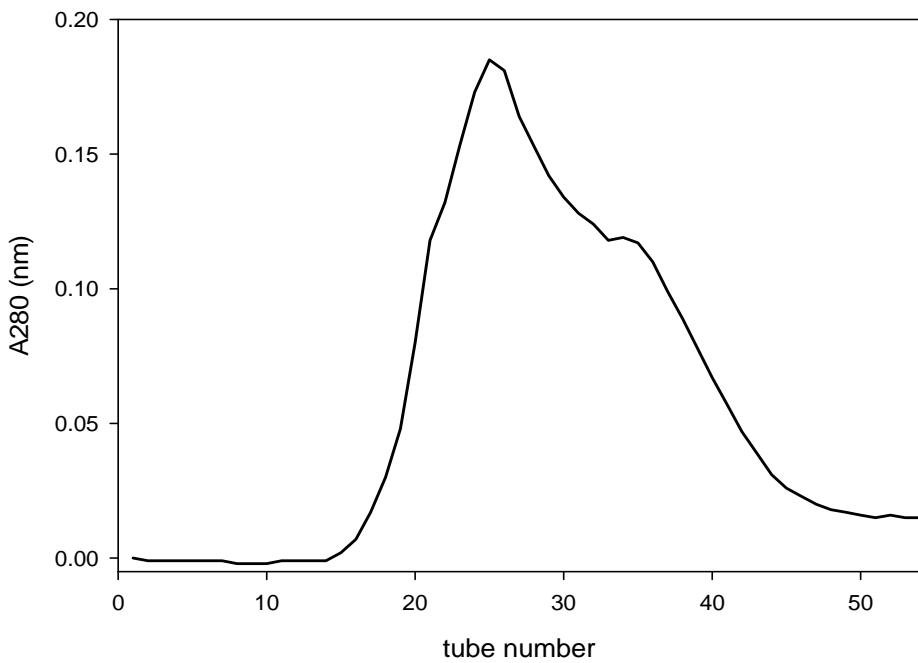


圖 6-4、鴻喜菇離子交換樹脂區分物之 Sephadryl S-200 膠體管柱層析圖。

Figure 6-4. Sephadryl S-200 gel filtration chromatogram of HM-3 from DEAE-Sephadex ion exchange.

Column: 1.6 × 100 cm

Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl.

Flow rate: 30 ml/hr

Collection volume: 4 ml/tube

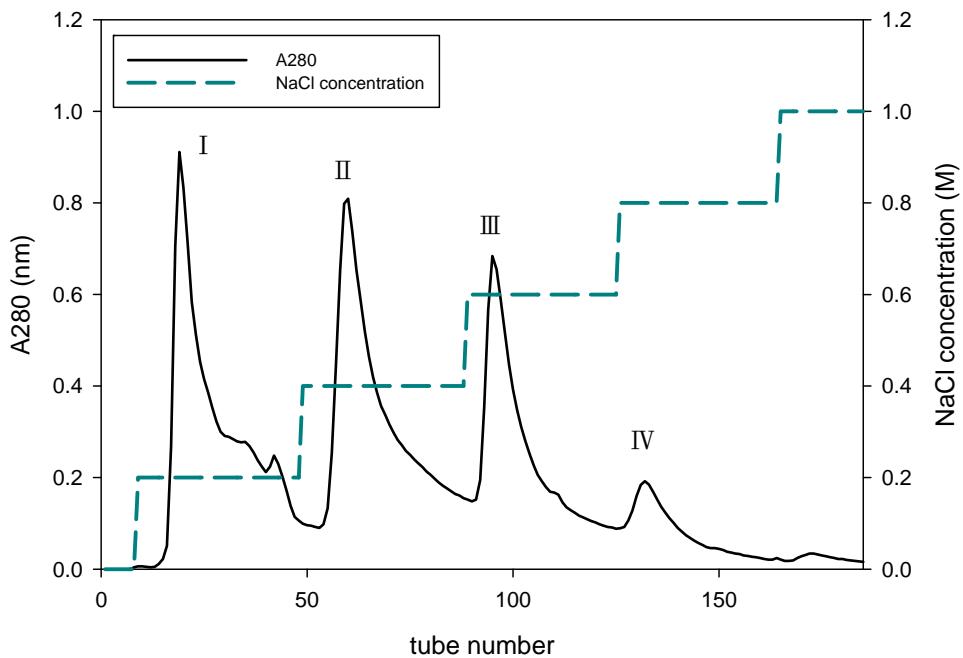


圖 6-5、鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱物之階梯鹽梯度 DEAE-Sephadex 級子交換層析圖。

Figure 6-5. DEAE Sephadex ion-exchange chromatogram of 40~80% ammonium sulfate precipitate from *H. marmoreus* by NaCl stepwise gradient.

Column: 2.6 × 40 cm

Elution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, followed by the same buffer containing 0~1 M NaCl stepwise gradient.

Flow rate: 30 ml/hr

Collection volume: 5 ml/tube

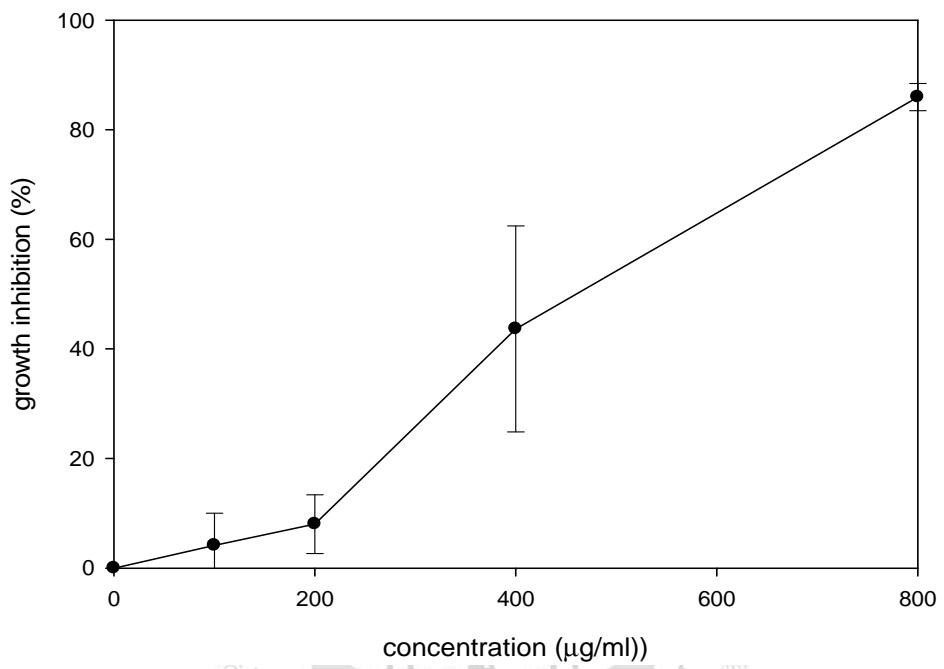


圖 6-6、鴻喜菇 40~80% 飽和度硫酸銨沉澱粗萃物對 HepG2 培養 24 小時之生長抑制率。

Figure 6-6. Effect of 40~80% ammonium sulfate precipitate crude extract from *H. marmoreus* on the growth of HepG2 cells. Cells were incubated for 24 hr. Cell growth inhibition was determined by MTT assay.

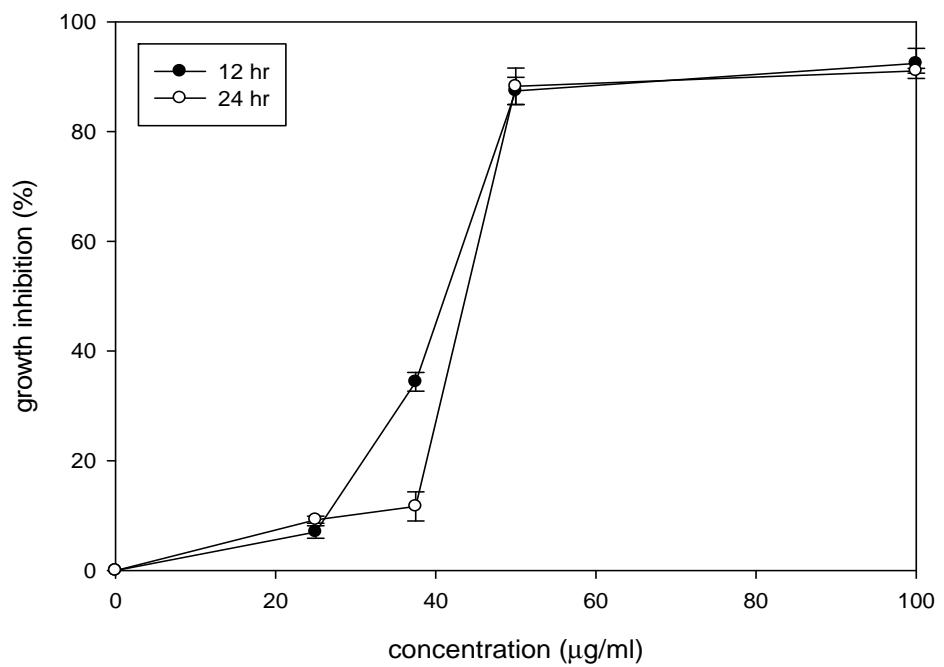


圖 6-7、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 12 及 24 小時之生長抑制率。

Figure 6-7. Growth inhibition of DEAE-Sepharose continuous gradient fraction HM-3 in HepG2 cells. Cells were incubated with HM-3 for 12 and 24 hr. Cell growth inhibition was determined by MTT assay.

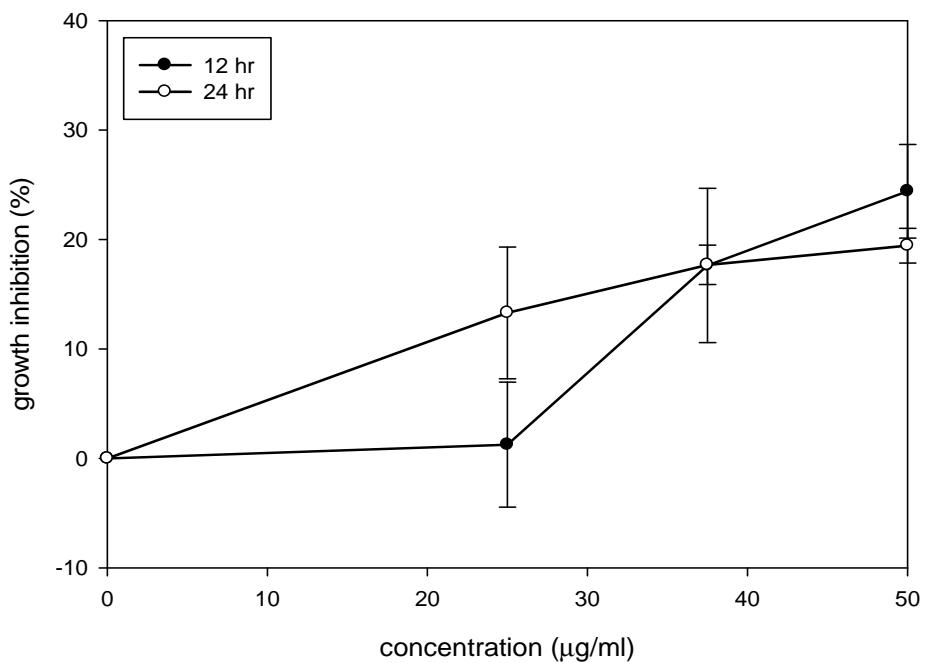


圖 6-8、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂階梯梯度樣品 Fraction I 對 HepG2 培養 12 及 24 小時之生長抑制率。

Figure 6-8. Growth inhibition of DEAE-Sepharose stepwise gradient fraction I in HepG2 cells. Cells were incubated with fraction I for 12 and 24 hr. Cell growth inhibition was determined by MTT assay.

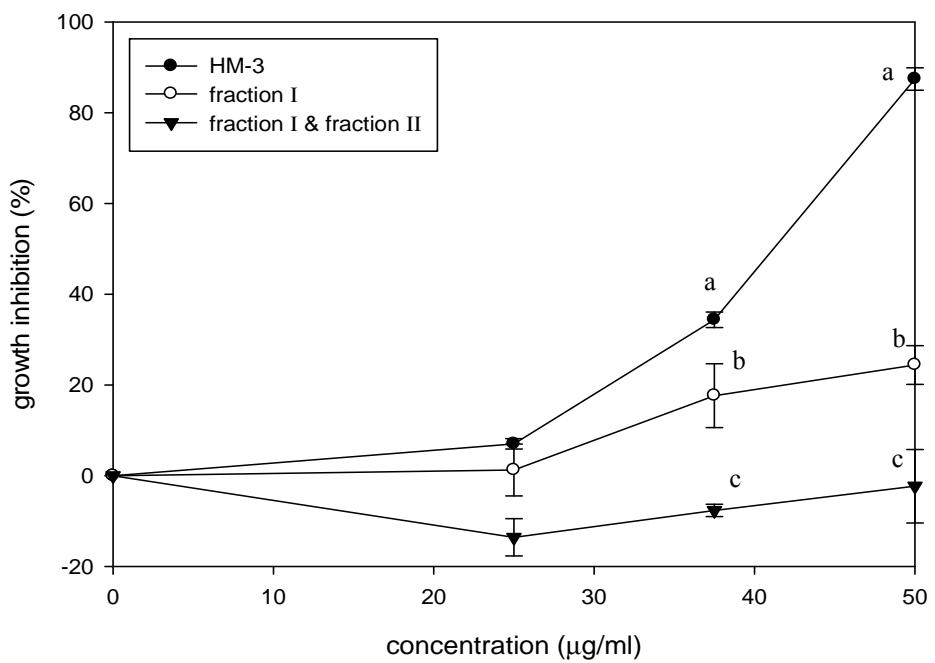


圖 6-9、DEAE-Sephadex 離子交換樹脂連續及階梯鹽梯度樣品對 HepG2 培養
12 hr 之生長抑制率綜合比較。

Figure 6-9. Effect of HM-3, fraction I and fraction I & II on the growth of HepG2 cells. Cells were incubated with various concentrations of these samples for 12 hr. Cell growth inhibition was determined by MTT assay.

a~c different letters in the same concentration indicate significant difference at 5% confidence level.

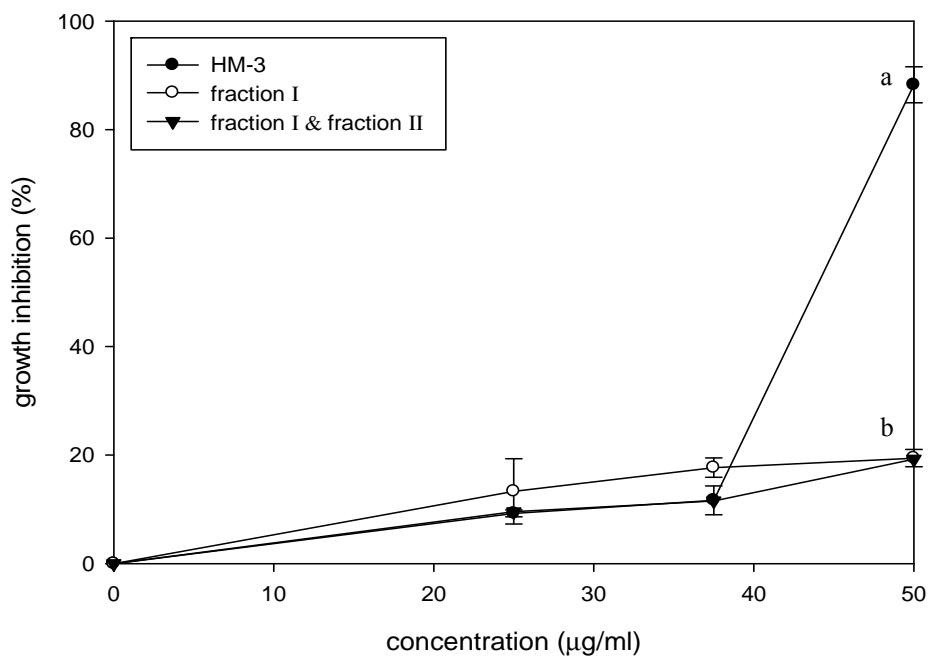


圖 6-10、DEAE-Sephadex 純化樹脂連續及階梯鹽梯度樣品對 HepG2 培養 24 hr 之生長抑制率綜合比較。

Figure 6-10. Effect of HM-3, fraction I and fraction I & II on the growth of HepG2 cells. Cells were incubated with various concentrations of these samples for 24 hr. Cell growth inhibition was determined by MTT assay.

a and b different letters in the same concentration indicate significant difference at 5% confidence level.

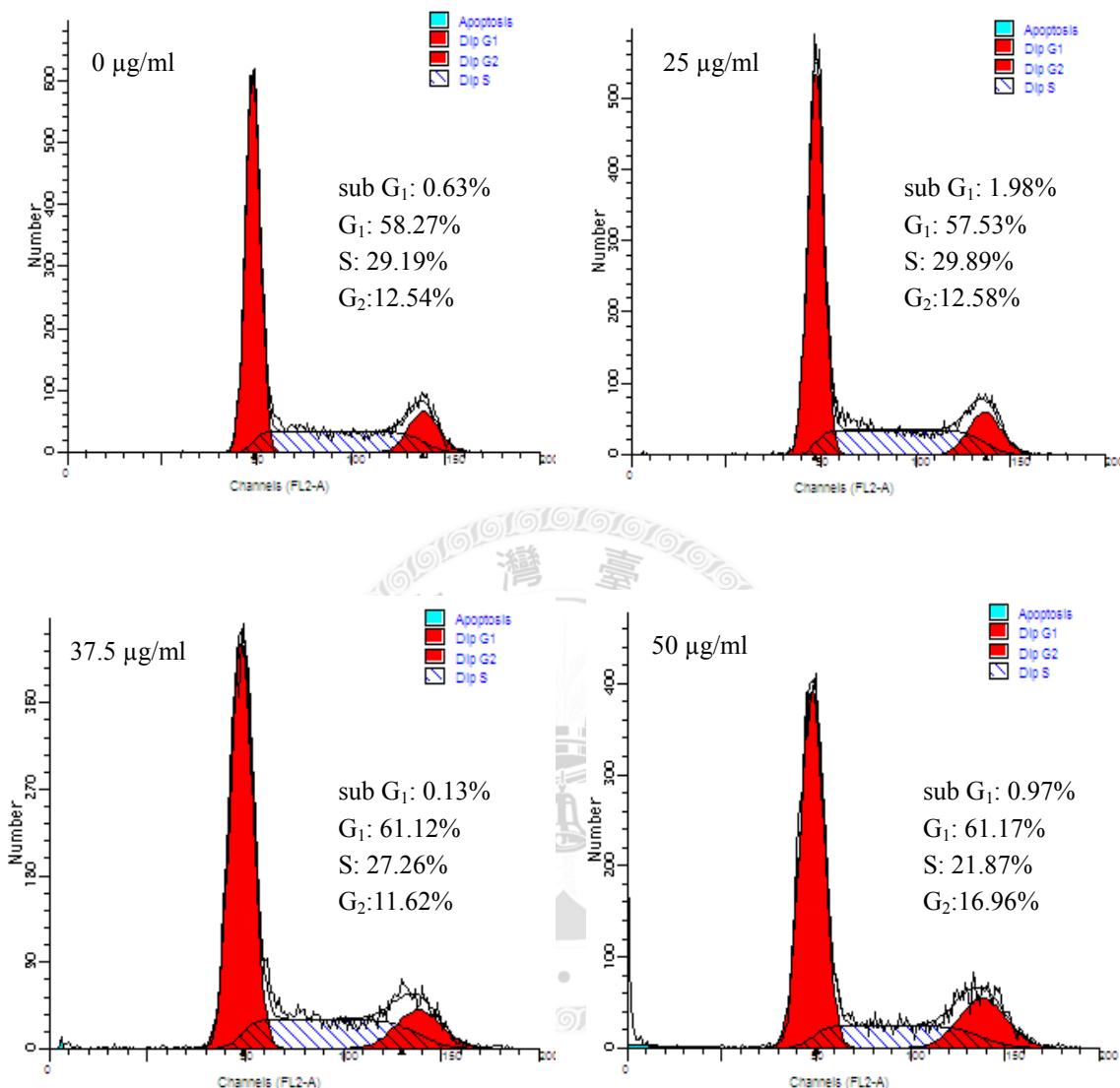


圖 6-11、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 12 小時之細胞週期變化。

Figure 6-11. The cell cycle distribution of HepG2 cells after incubation with various concentration of HM-3 for 12 hr.

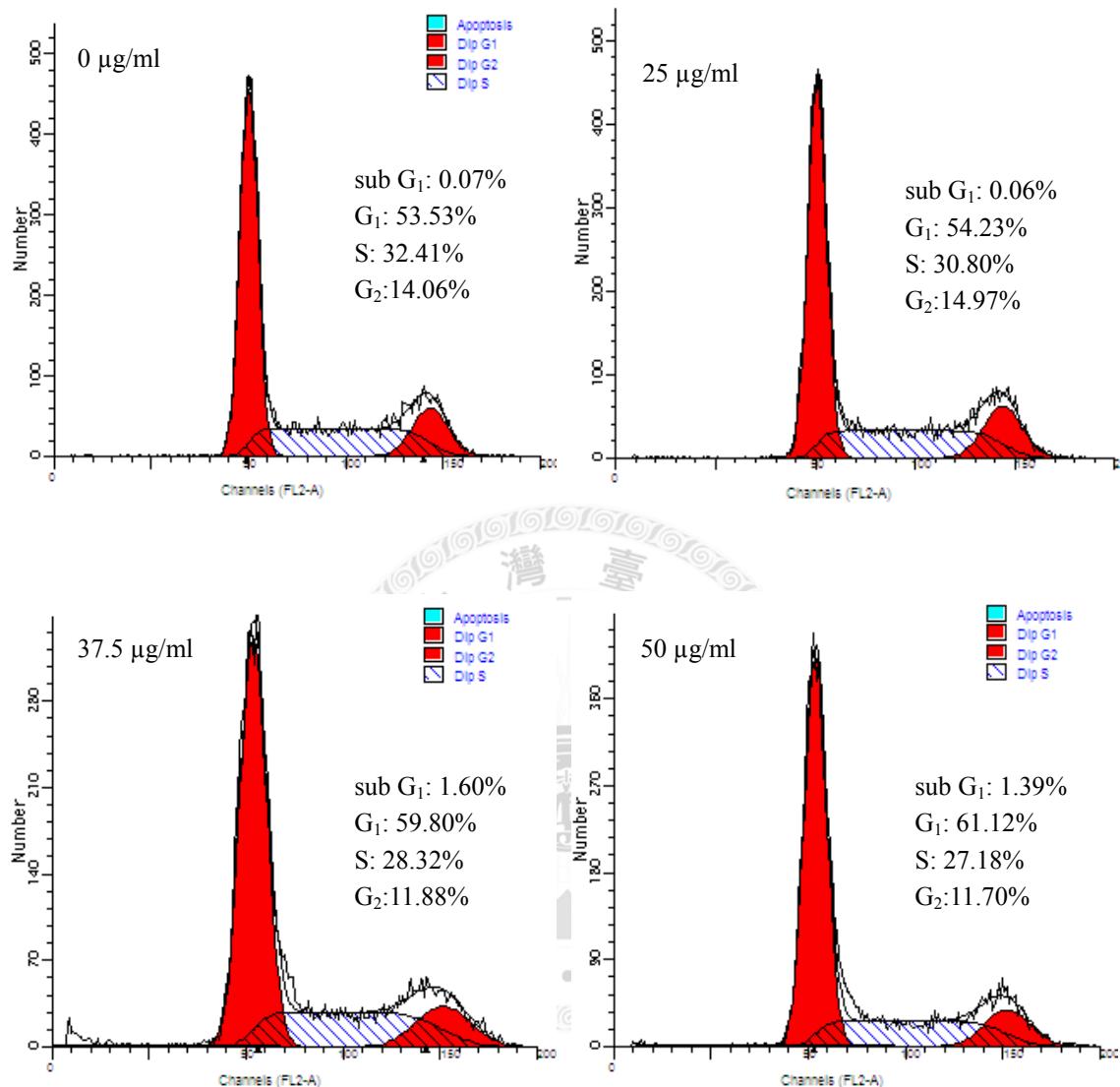


圖 6-12、DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 24 小時之細胞週期變化。

Figure 6-12. The cell cycle distribution of HepG2 cells after incubation with various concentration of HM-3 for 24 hr.

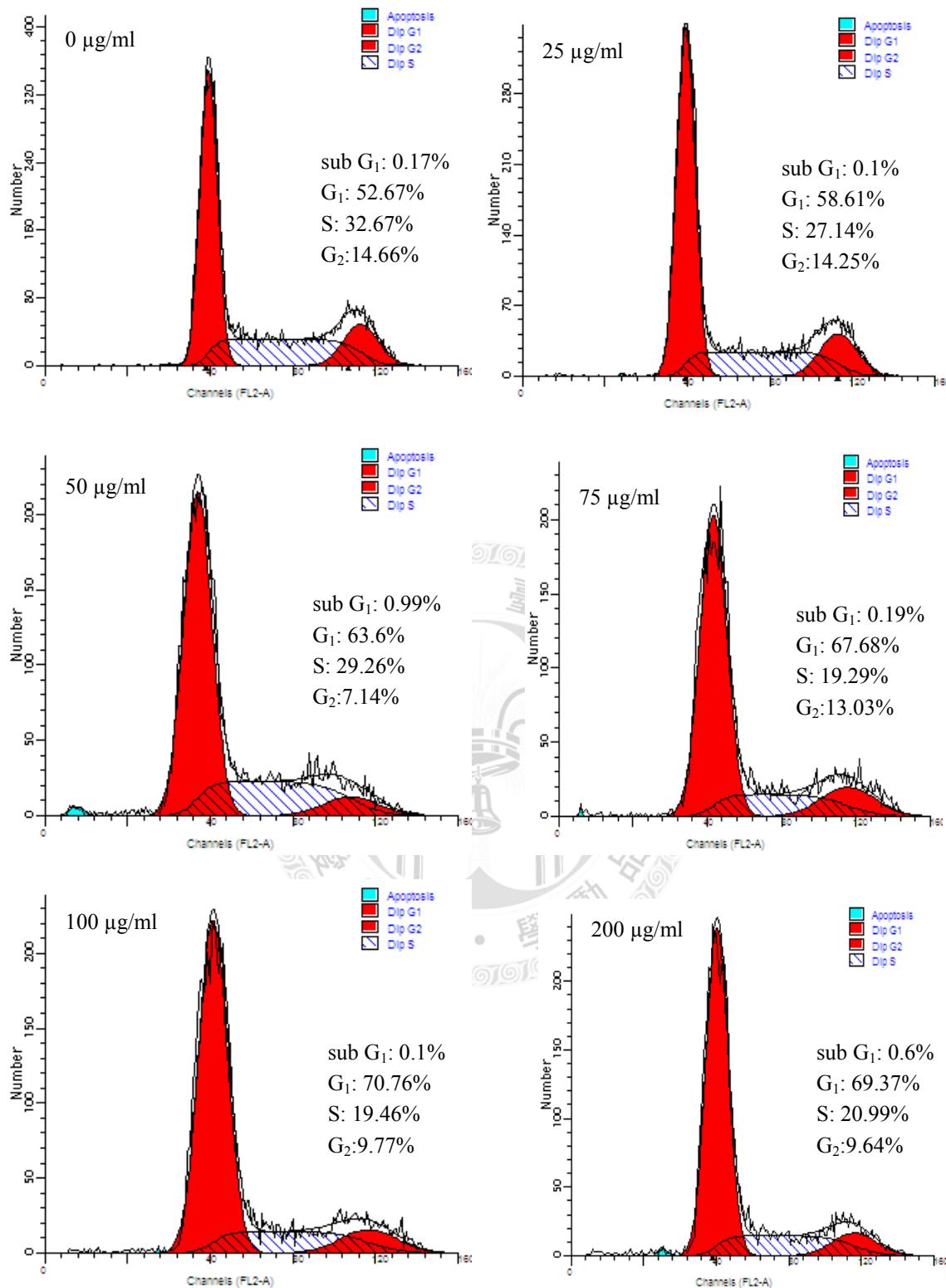


圖 6-13、以六種不同濃度 DEAE-Sepharose 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 24 小時之細胞週期變化。

Figure 6-13. The cell cycle distribution of HepG2 cells after incubation with six different concentration of HM-3 for 24 hr.

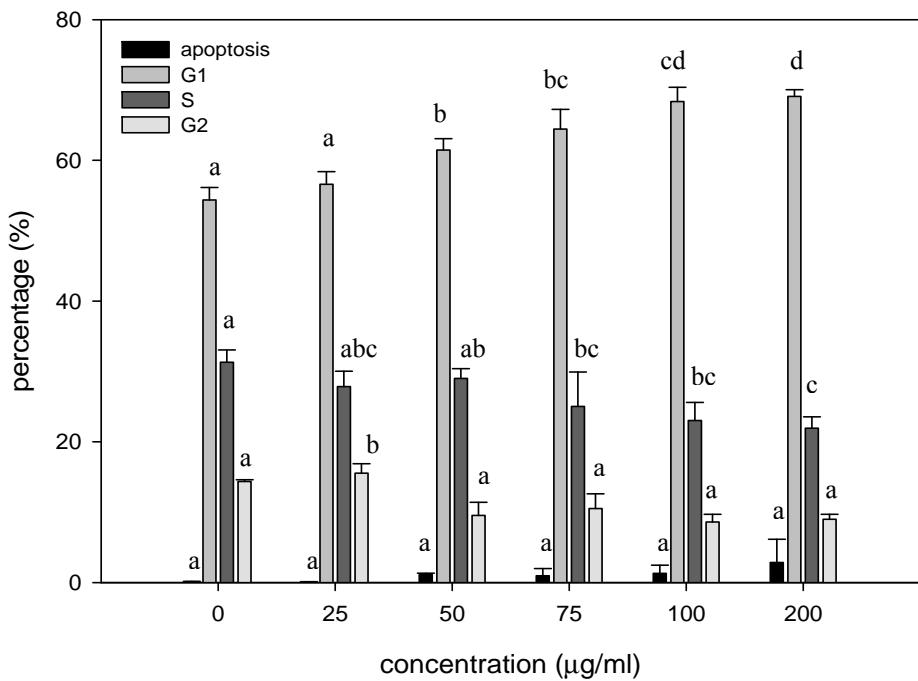


圖 6-14、DEAE-Sephadex 離子交換樹脂連續梯度樣品 HM-3 對 HepG2 培養 24 小時之細胞週期變化整理。

Figure 6-14. The cell cycle distribution of HepG2 cells after incubation with various concentration of HM-3 for 24 hr.

a~d different letters in the same cell cycle phase indicate significant difference at 5% confidence level.

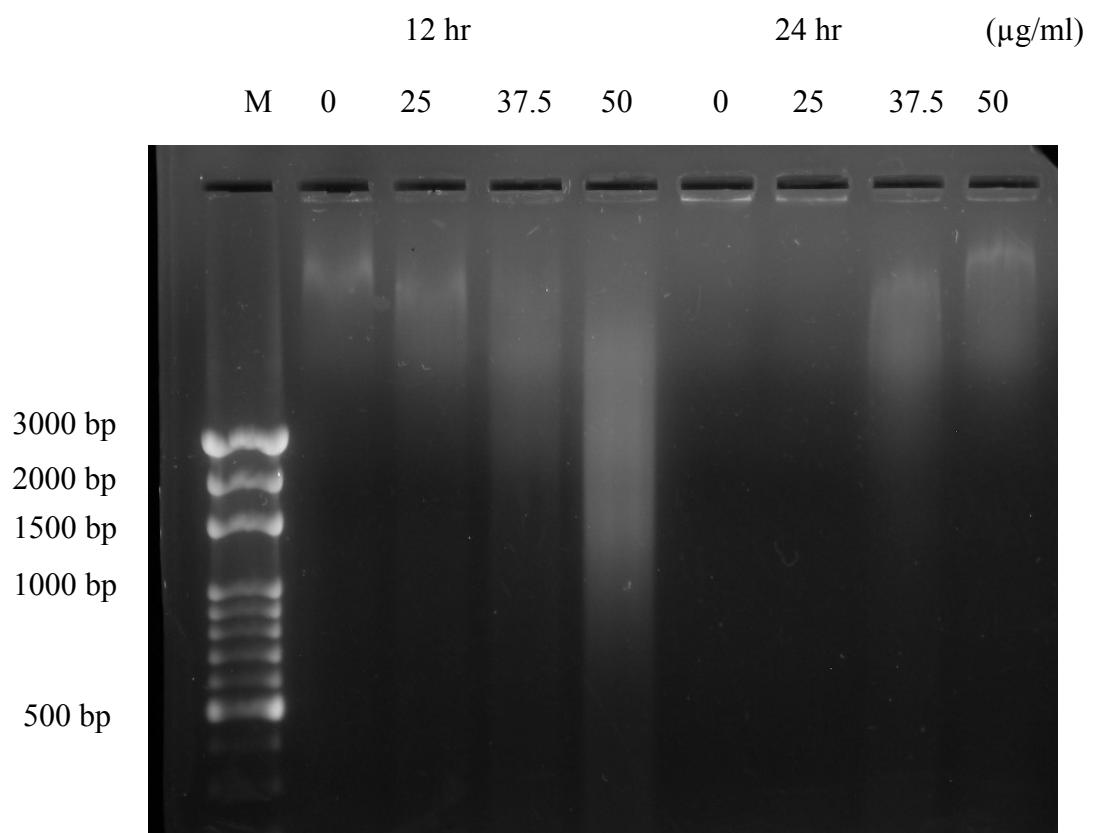


圖 6-15、以不同濃度 HM-3 培養 12 及 24 小時 HepG2 之 DNA 瓊脂糖電泳圖。

Figure 6-15. DNA fragmentation assay of HepG2 cells incubated with various concentrations of HM-3 for 12 and 24 hr. DNA was extracted and analyzed by agarose gel electrophoresis.

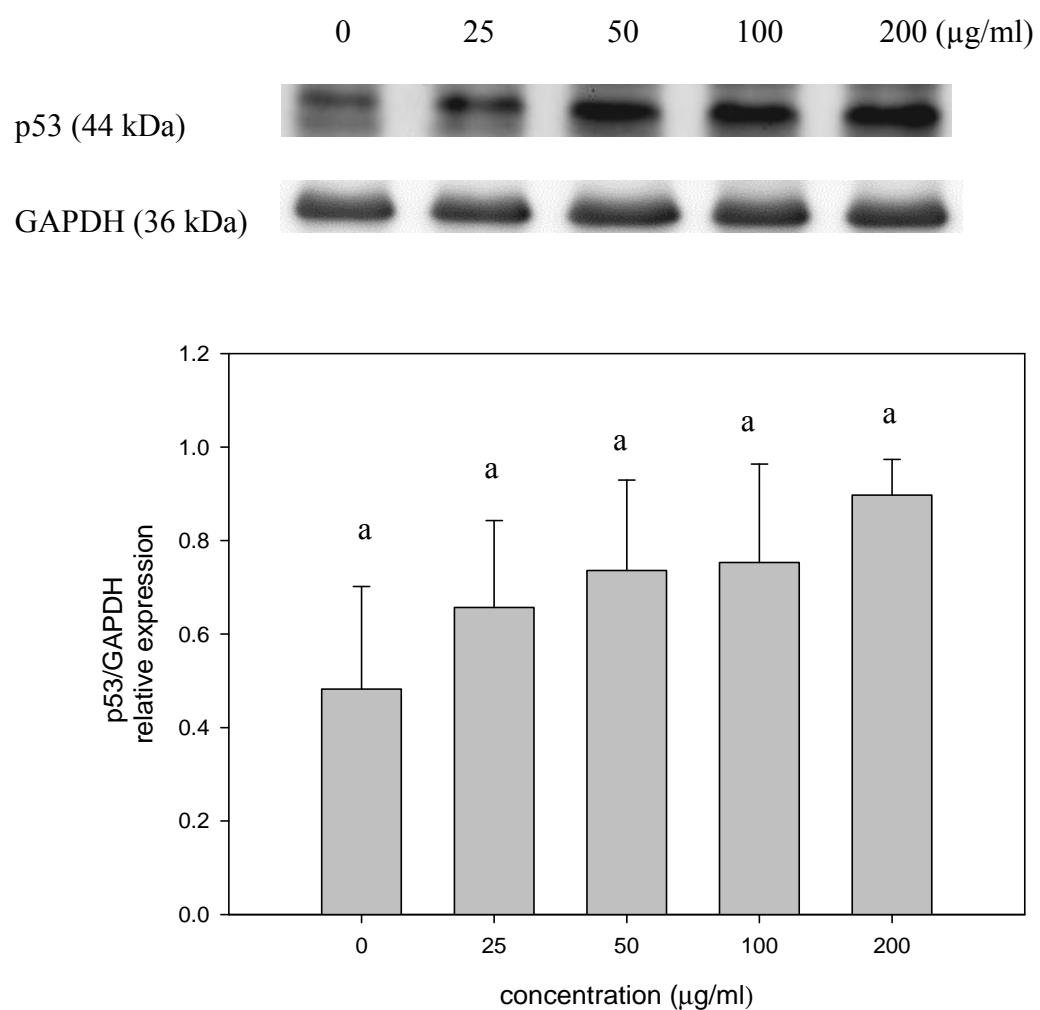


圖 6-16、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 p53 表現之影響。

Figure 6-16. Effect of HM-3 on the protein expression of p53 in HepG2 cells.

a indicates no significant difference at 5% confidence level with 0 μg/ml.

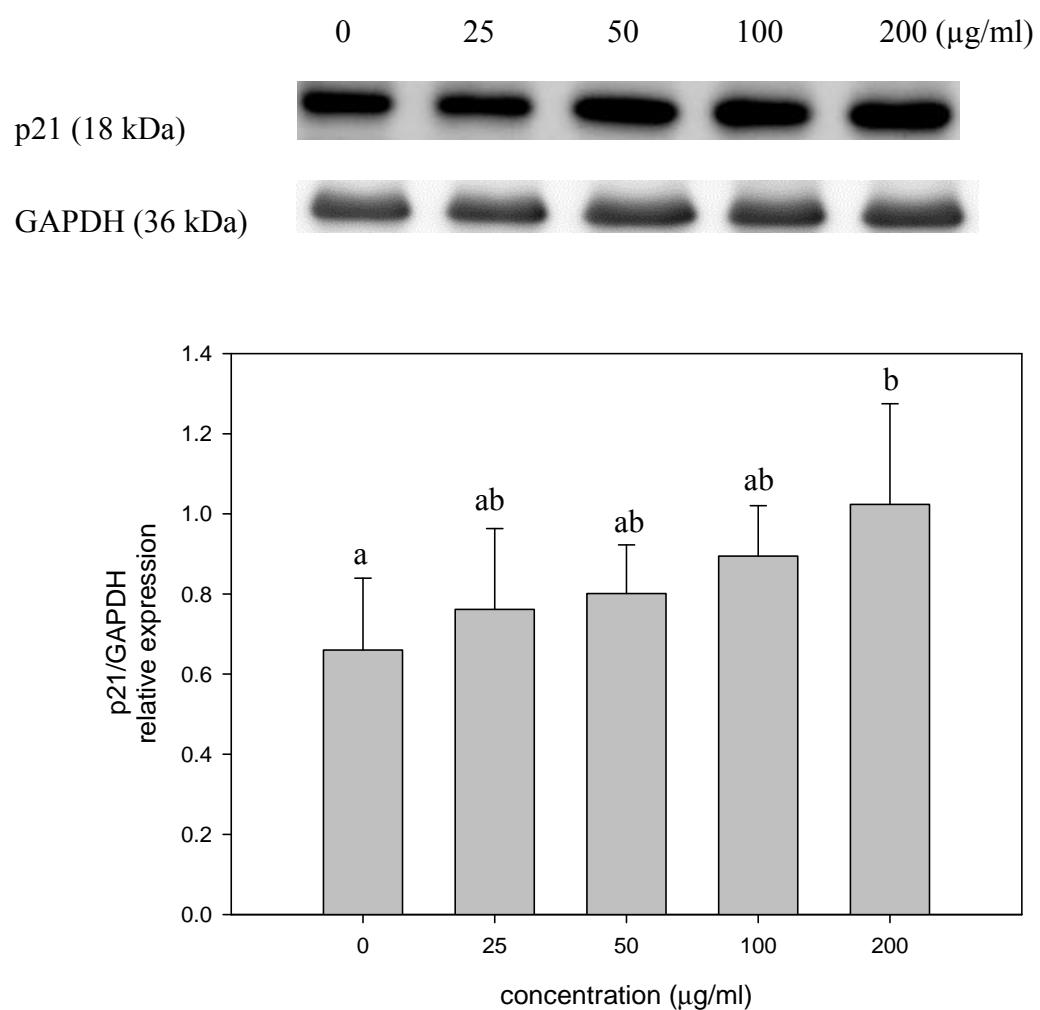


圖 6-17、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 p21 表現之影響。

Figure 6-17. Effect of HM-3 on the protein expression of p21 in HepG2 cells.

a and b indicates significant difference at 5% confidence level.

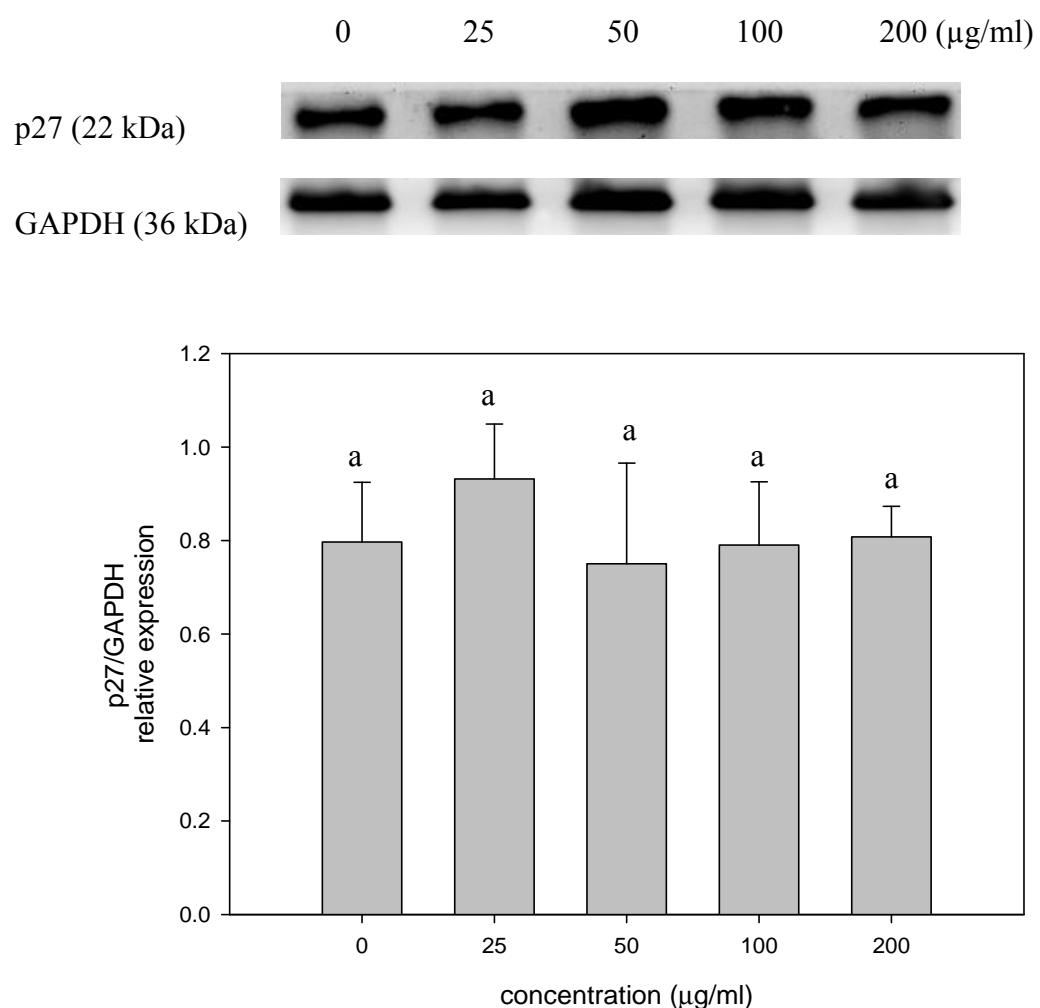


圖 6-18、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 p27 表現之影響。

Figure 6-18. Effect of HM-3 on the protein expression of p27 in HepG2 cells.

a indicates no significant difference at 5% confidence level with 0 μg/ml.

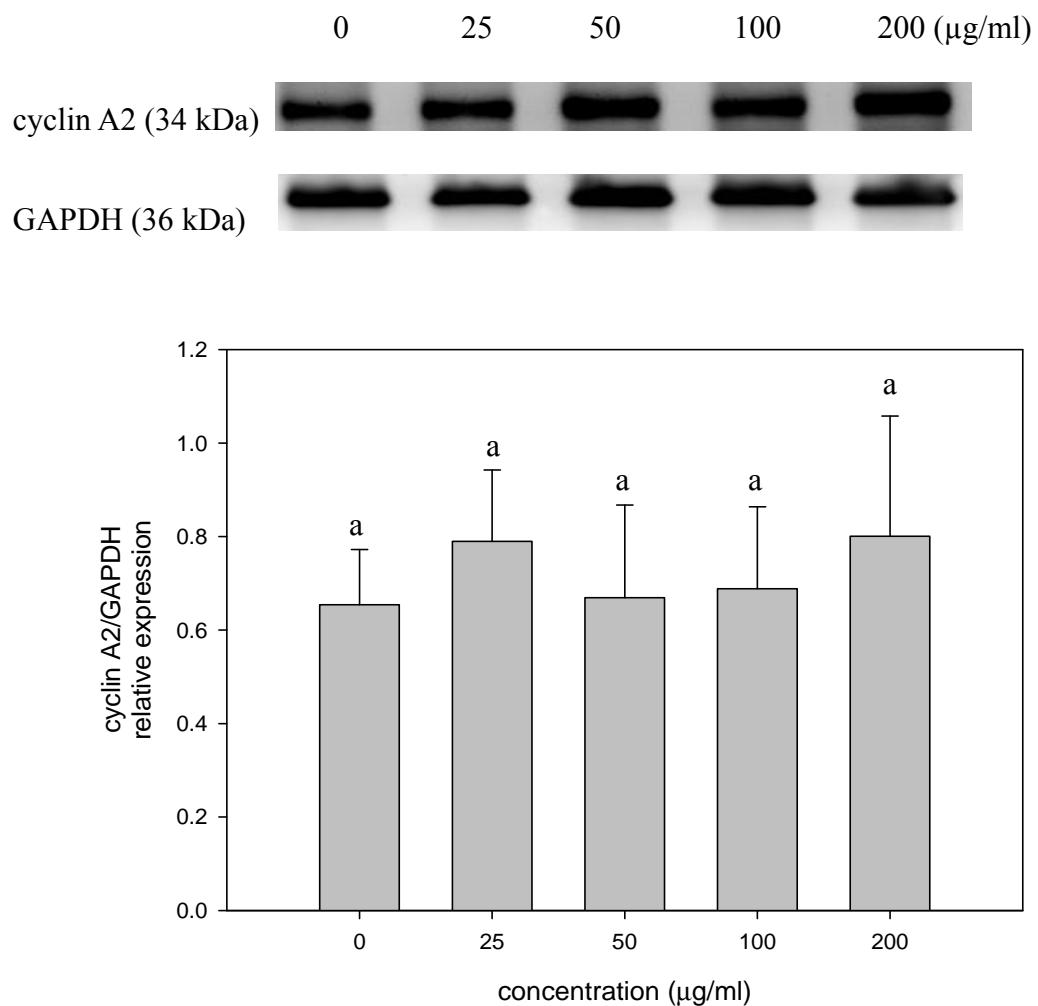


圖 6-19、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 cyclin A2 表現之影響。

Figure 6-19. Effect of HM-3 on the protein expression of cyclin A2 in HepG2 cells.

a indicates no significant difference at 5% confidence level with 0 μg/ml.

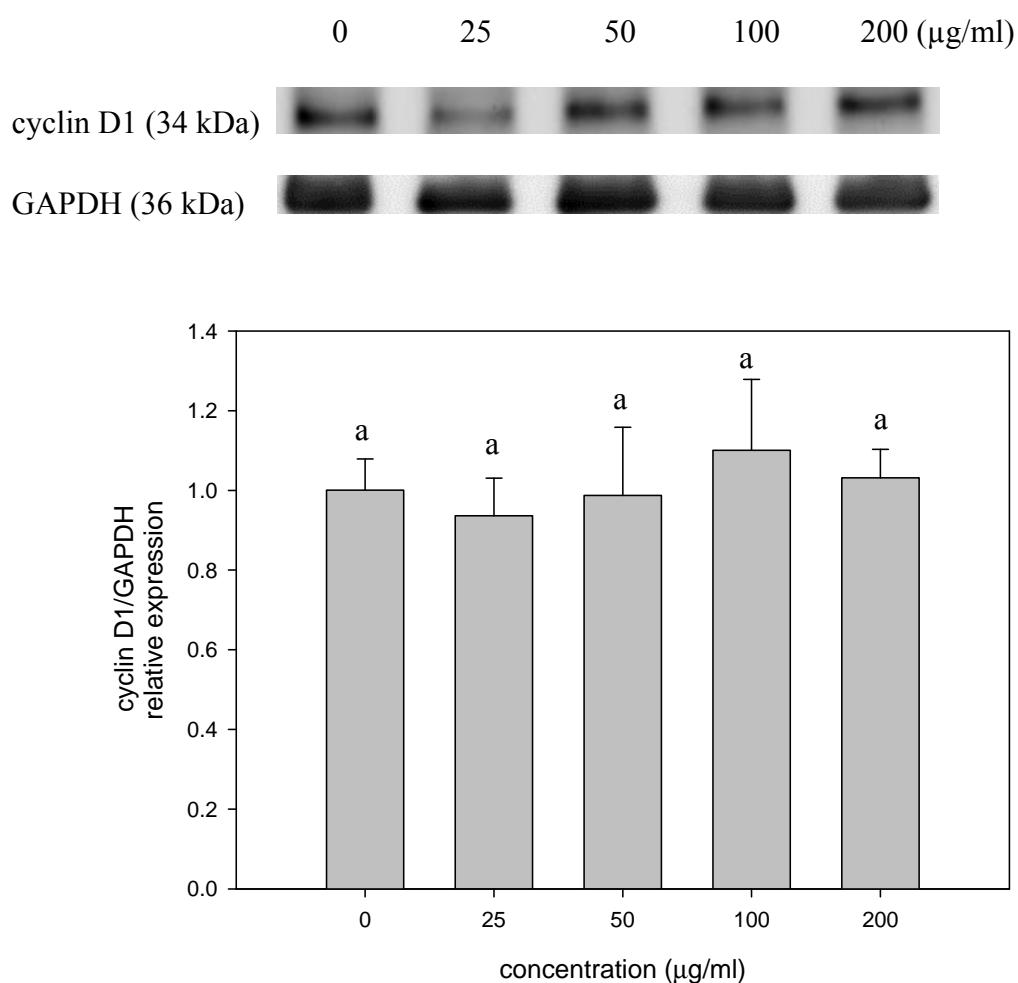


圖 6-20、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 cyclin D1 表現之影響。

Figure 6-20. Effect of HM-3 on the protein expression of cyclin D1 in HepG2 cells.

a indicates no significant difference at 5% confidence level with 0 μg/ml.

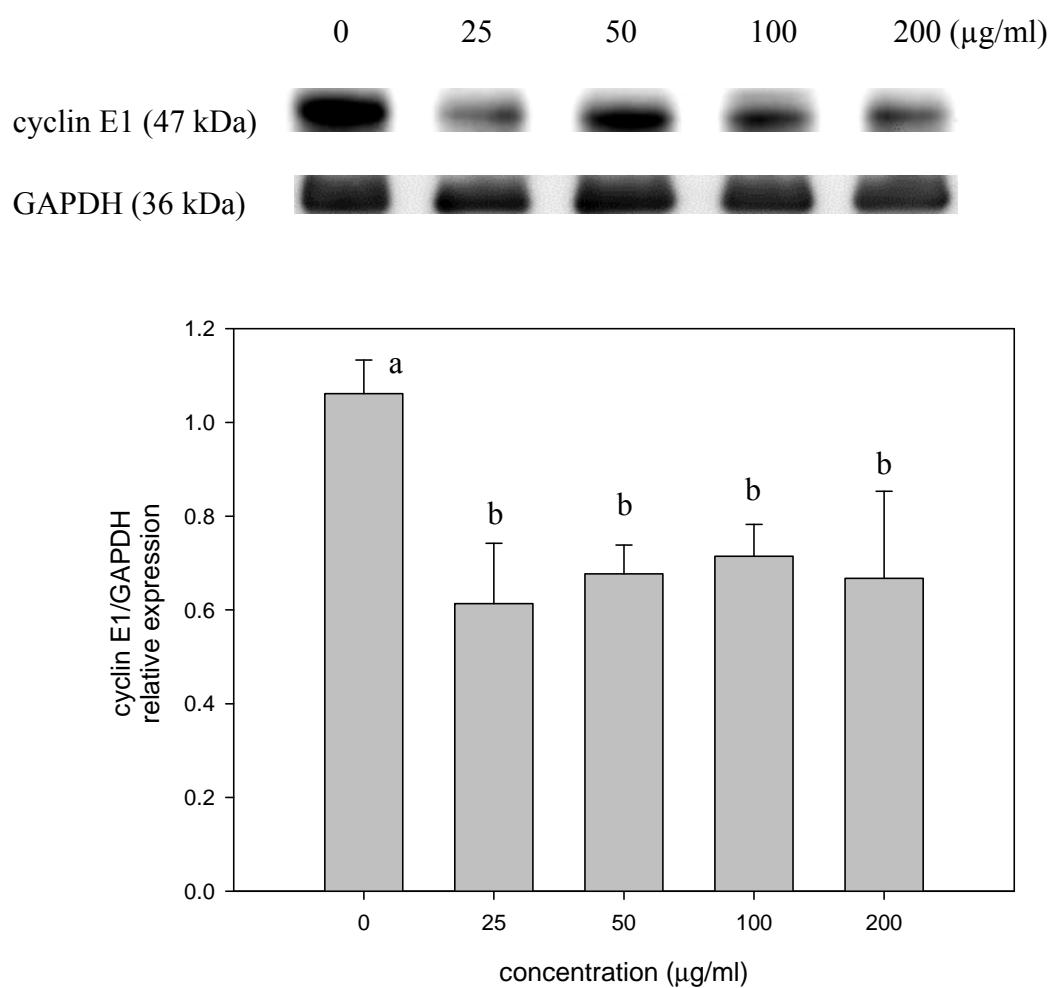


圖 6-21、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 cyclin E1 表現之影響。

Figure 6-21. Effect of HM-3 on the protein expression of cyclin E1 in HepG2 cells.

a and b indicates significant difference at 5% confidence level.

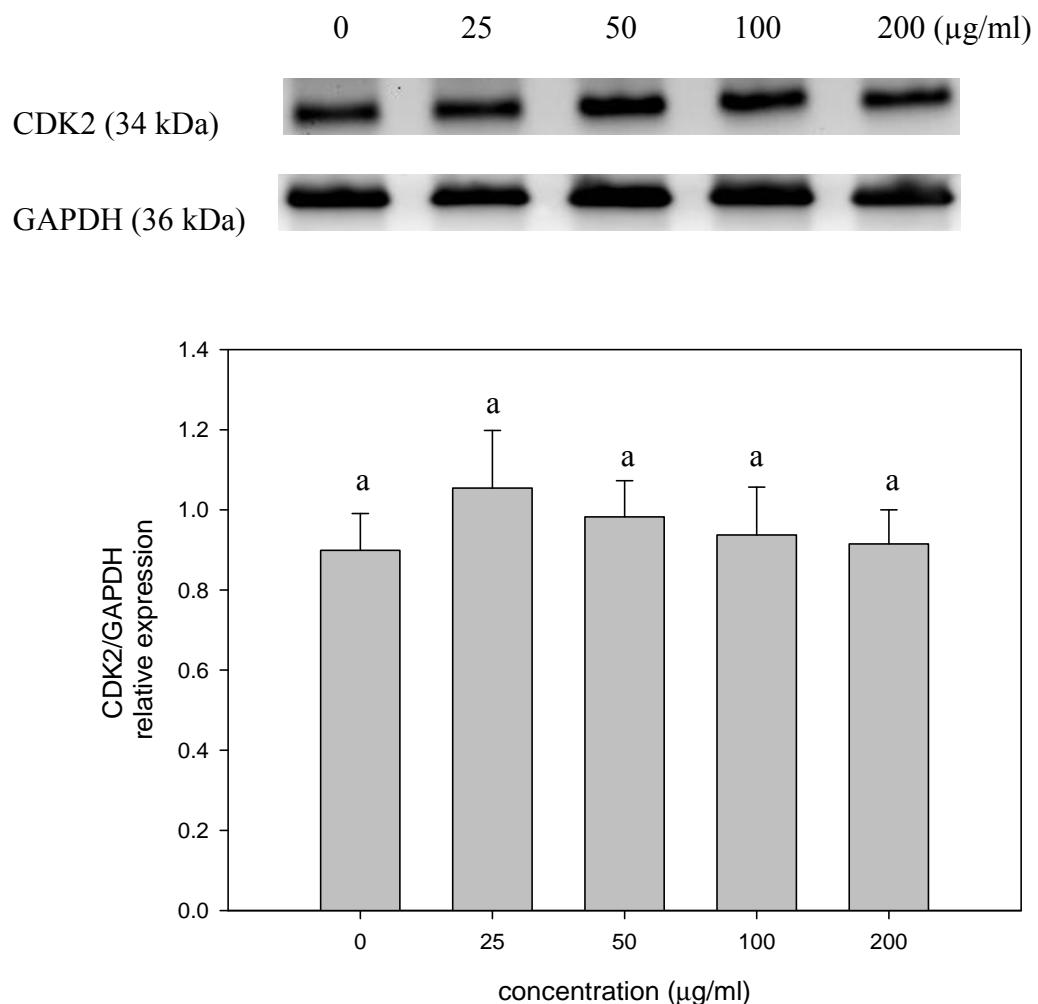


圖 6-22、HM-3 對 HepG2 細胞中細胞週期調控蛋白 CDK2 表現之影響。

Figure 6-22. Effect of HM-3 on the protein expression of CDK2 in HepG2 cells.

a indicates no significant difference at 5% confidence level with 0 μg/ml.

第七章 結論

本研究由鴻喜菇中分離出具有生物活性之蛋白質，並探討其對人類肝癌細胞 HepG2 的生長抑制機制。實驗結果如下：

1. DEAE-Sepharose 陰離子交換層析管柱以連續鹽梯度得區分物 HM-3 與階梯鹽梯度所得 fraction I 能抑制 HepG2 的生長且具有濃度效應，兩者中以 HM-3 效果為佳。
2. 由流式細胞儀分析細胞週期結果顯示，HM-3 能使 HepG2 的細胞週期停滯在 G₁ phase，但並無觀察到細胞凋亡。以瓊脂糖膠體電泳檢測 DNA 完整性，也未觀察到細胞凋亡特徵之一的 DNA 片段化，推測細胞並未發生凋亡。
3. 以西方墨點法進一步分析細胞週期相關蛋白之表現，p53 及 p21 之表現量隨 HM-3 濃度提高有增加之趨勢，以樣品處理後 p21 表現量與控制組相比具顯著差異。cyclin E1 表現量與控制組相比顯著下降，而 p27、cyclin A2、cyclin D1 及 CDK2 則無明顯變化。

歸納以上實驗結果，HM-3 能抑制 HepG2 之生長，且使其發生 G₁ phase 細胞週期停滯之現象。推測此現象可能是透過活化 p53 及其下游基因 p21，並抑制 cyclin E1 之作用，因而使細胞週期停滯於 G₁ phase。

第八章 參考文獻

三軍總醫院血液腫瘤科網站。2012。

http://wwwu.tsgh.ndmctsgh.edu.tw/hem/hema_oncology/cancer_gi.htm

今關六也、本鄉次雄。1957。原色日本菌類圖鑑。保育社，東京。

王次男。1997。食用菇類的營養價值與藥用價值。蔗報月刊，65，26-27。

王伯徹。2009。菇類之食藥用價值及其多樣化市場產品開發。農業生技產業期刊，18，34-40。

行政院衛生署。2012。行政院衛生署衛生統計資訊網。

林仁混。1972。癌是怎樣產生的。科學月刊，3，23-26。科學月刊社，台北。

林志陵、高嘉宏。2009。肝癌治療的新進展—標靶治療。健康世界，281，67-72。

周成功。1991。細胞生長的「煞車」—邁向克服癌症的一小步。科學月刊，22，460-462。科學月刊社，台北。

徐麗嵐。2002。以柳松菇與鴻喜菇誘導人類白血病細胞 (U937) 分化及對 Balb/c 鼠皮下移植 CT26 腫瘤之抑制效果。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。

陳光耀。1972。癌病淺說。科學月刊，3，13-14。科學月刊社，台北。

陳建男。2010。玉皇菇中一種新免疫調節蛋白之純化與其生理活性之研究。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

許珮暄。2004。柳松菇及鴻喜菇萃取物對人類白血病細胞株 (U937) 生長抑制於 G₀/G₁ 期之機制。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。

國泰醫院網站肝癌的治療。2012。

<http://www.cgh.org.tw/tw/content/depart/AB00/DL/B0000000052.pdf>

曾岐原。1999。最新病理學，第二版，pp337-339。匯華圖書出版有限公司，台北。

楊秉輝。2003。肝癌治療方法的選擇。中國臨床醫生雜誌，31，21-22。

綠十字健康網。2012。<http://www.greencross.org.tw>

簡佳怡。2005。鴻喜菇蛋白質對小鼠大腸癌 CT26 細胞生長抑制機制及對 Balb/c 鼠之該腫瘤轉移效果。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。

譚健民。2009。粒線體與細胞凋亡。生物醫學，2，250-268。

Adams, J. M.; Cory, S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **1998**, 281, 1322-1326.

Adrian, M. S.; Edward, A. S. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, 92, 376-387.

Barros, L.; Calhelha, R. C.; Vaz, J. A.; Ferreira, I. C. F. R.; Baptista, P.; Estevinho, L. M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, 225, 151-156.

Bobek, P.; Ozdin, L.; Kuniak, L. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and its ethanolic extract in diet on absorption and turnover of cholesterol in hypercholesterolemic rat. *Nahrung*. **1996**, 40, 222-224.

Borchers, A. T.; Stern, J. S.; Hackman, R. M. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, 221, 281-293.

Brian, P. W. Antibiotics produced by fungi. *Bot. Rev.* **1951**, 17, 357-430.

Chang, J. S.; Son, J. K.; Li, G.; Oh, E. J.; Kim, J. Y.; Park, S. H.; Bae, J. T.; Kim, H. J.; Lee, I. S.; Kim, O. M.; Kozukue, N.; Han, J. S.; Hirose, M.; Lee, K. R. Inhibition of cell cycle progression on HepG2 cells by hypsiziprenol A9, isolated from *Hypsizigus marmoreus*. *Cancer Lett.* **2004**, 212, 7-14.

Cheung, P. C. Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. *J. Nutr.* **1998**, 222, 687-688.

Connell-Crowley, L.; Solomon, M. J.; Wei, N.; Harper, J. W. Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Mol. Biol. Cell* **1993**, 4, 79-92.

Cosulich, S. C.; Savory, P. J.; Clarke, P. R. Bcl-2 regulates amplification of caspase

activation by cytochrome c. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 147-150.

Courjal, F.; Louason, G.; Speiser, P.; Katsaros, D.; Zeillinger, R.; Theillet, C. Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: Evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int. J. cancer* **1996**, *69*, 247-253.

Dawson, R. M. C.; Elliot, D. C.; Elliot, W. H.; Jones, K. M. Preparation and composition of biochemical reagents. In Data for Biochemical Research, 2nd edition; Oxford University Press. U. K. **1969**, p. 615.

Eastham, J. A.; Hall, S. J.; Sehgal, I.; Wang, J.; Timme, T. L.; Yang, G. *In vivo* gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 5151-5155.

Elmastas, M.; Isildaka, O.; Turkekulb, I.; Temura, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, *20*, 337-345.

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495-516.

Ford, H. L.; Pardee, A. B. Cancer and the cell cycle. *J. Cell Biochem. Suppls.* **1999**, *32/33*, 166-172.

Fu, M.; Lin, J.; Wu, Z.; Lin, Q.; Xie, L. Screening of proteins anti-tobacco mosaic virus in *Pleurotus eryngii*. *Wei sheng wu xue bao.* **2003**, *43*, 29-34.

Galluzzi, L.; Maiuri, M. C.; Vitale, I.; Zischka, H.; Castedo, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1237-1266.

Geng, Y.; Whoriskey, W.; Park, M.; Bronson, R.; Medema, R.; Li, T.; Weinberg, R.; Sicinski, P. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* **1999**, *97*, 767-777.

- Girard, F.; Strausfeld, U.; Fernandez, A.; Lamb, N. J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **1991**, *67*, 1169-1179.
- Gray, A.; Flatt, P. R. Insulin-releasing and insulin-like activity of *Agaricus campestris* (mushroom). *J. Endocrinol.* **1998**, *157*, 259-266.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**, *407*, 770-776.
- Hikino, H.; Ishiyama, M.; Suzuki, Y.; Konno, C. Mechanisms of hypoglycemic activity of Ganderan B: a glycan of *Gandoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* **1989**, *55*, 423-428.
- Howard, A.; Pelc, S. R.; Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity 6 suppl.* **1953**, *261*.
- Hwang, H. C.; Clurman, B. E. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **2005**, *24*, 2776-2786.
- Ikekawa, T.; Saitoh, H.; Feng, W.; Zhang, H.; Li, L.; Matsuzawa, T. Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*. I. Antitumor activity of extracts and polysaccharides. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1954-1957.
- Jackman, M. R.; Pines, J. N. Cyclins and the G₂/M transition. *Cancer Surv.* **1997**, *29*, 47-73.
- Javitt, N. B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J.* **1990**, *4*, 161-168.
- Jayakumar, T.; Ramesh, E; Geraldine, P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 1989-1996.
- Jones, S.; Janardhanan, K. K. Antioxidant and antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.-Reishi (Aphyllophoromycetideae) from south India. *Int. J. Med. Mush.* **2000**, *2*, 195-200.
- Kabir, Y.; Kimura, S.; Tamura, T. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on

blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1988**, *34*, 433-438.

Kannangai, R.; Molmenti, E.; Arrazola, L.; Klein, A.; Choti, M.; Thomas, D. L.; Torbenson, M. Occult hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *J. Viral Hepat.* **2004**, *11*, 297-301.

Kato, J. Y.; Matsuoka, M.; Polyak, K.; Massagué, J.; Sherr, C. J. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **1994**, *79*, 487-496.

Kerr, J. F. R.; Harmon, B. V. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Tomei, L. D.; Cope, F. O., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, U. S. A. **1991**, 5.

Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239-257.

Koepf, D. M.; Harper, J. W.; Elledge, S. J. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* **1999**, *97*, 431-434.

Koff, A.; Ohtsuki, M.; Polyak, K.; Roberts, J. M.; Massagué, J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF- β . *Science* **1993**, *260*, 536-539.

Lam, S. K.; Ng, T. B. Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 1071-1075.

Lebrec, D. Pharmacological treatment of portal hypertension: Hemodynamic effects and prevention of bleeding. *Pharmacol. Ther.* **1994**, *61*, 65-107.

Lee, Y. L.; Yen, M. T.; Mau, J. L. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1-9.

Lin, M. H.; Wu, P. Y.; Tsai, S. T.; Lin, C. L.; Chen, T. W.; Hwang, S. J. Hospice

palliative care for patients with hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Palliat. Med.* **2004**, *18*, 93-99.

Lotz, G.; Kiss, A.; Novák, P. K.; Sobel, G.; Schaff, Z. Hepatitis virus and hepatocarcinogenesis. *J. Physiol. Paris.* **2001**, *95*, 417-422.

Mahajna, J.; Dotan, N.; Zaidman, B. Z.; Petrova, R. D.; Wasser, S. P. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: The case of *Ganoderma lucidum*. *Nutr. Cancer* **2009**, *61*, 16-26.

Minshull, J.; Pines, J.; Golsteyn, R.; Standart, N.; Mackie, S.; Colman, A.; Blow, J.; Ruderman, J. V.; Hunt, T. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J. Cell Sci.* **1989**, *12*, 77-97.

Mizuno, T. Bioactivity biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Rev. Int.* **1995**, *11*, 7-21.

Norbury, C.; Nurse, P. A. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 441-470.

O'Connor, P. M. Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv.* **1997**, *29*, 151-182.

Ooi, V. E.; Liu, F. Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharideprotein complexes. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 715-729.

Ramzi, S.; Cotran, M. D. *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6th edition; Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. Eds.; Saunders Press. U. S. A. 1999, p. 18.

Reed, C. J. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1999**, *11*, 68-75.

Reshetnikov, S. V.; Waseer, S. P.; Tan, K. K. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int. J. Med. Mushr.* **2001**, *3*, 361-394.

Saitoh, H.; Feng, W. J.; Matsuzawa, T.; Ikekawa, T. Antitumor activity of *Hypsizigus*

marmoreus. II. Preventive effect against lung metastasis of Lewis lung carcinoma.

Yakugaku Zasshi. **1997**, 117, 1006-1010.

Selvi, S.; Umadevi, P.; Murugan, S.; Giftson, S. J. Anticancer potential evoked by *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* using T24 urinary bladder cancer cell line. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, 10, 7279-7285.

Sherr, C. J. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 187-190.

Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* **1996**, 274, 1672-1677.

Sherr, C. J.; Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev.* **1999**, 13, 1501-1512.

Shi, Y. L.; James, A. E.; Benzie, I. F. F.; Buswell, J. A. Mushroom derived-preparation in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2002**, 22, 103-111.

Smith, M. L.; Fornace, A. J. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutat. Res. Rev.* **1996**, 340, 109-124.

Solomon, M. J.; Lee, T.; Kirschner, M. W. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol. Biol. Cell* **1992**, 3, 13-27.

Tan, A.; Yeh, S. H.; Liu, C. J.; Cheung, C.; Chen, P. J. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer. *Liver Intl.* **2008**, 28, 175-188.

Thyagarajan, A.; Jedinak, A.; Nguyen, H.; Terry, C.; Baldridge, L. A.; Jiang, J.; Sliva, D. Triterpenes from *Ganoderma Lucidum* induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). *Nutr. Cancer* **2010**, 62, 630-640.

Toubi, A.R.; Waseer, S. P.; Fares, F. Ethyl acetate extract of submerged cultured mycelium of higher Basidiomycete mushrooms inhibit human ovarian cancer cell growth. *Int. J. Med. Mush.* **2009**, 11, 29-37.

Tsunoda, A.; Ishida, N. A mushroom extract as an interferon inducer. *Ann. N. Y. Acad.*

Sci. **1970**, 173, 719-726.

Tzianabos, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, 13, 523-533.

Velioglu, Y. S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4113-4117.

Vogel, F. S. McGarry, S. J.; Kemper, L. A. K.; Graham, D. G. Bacteriocidal properties of a class of quinoid compounds related to sporulation in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Am. J. Pathol.* **1974**, 76, 165-174.

Wang, H.; Gao, J.; Ng, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus Ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 275, 810-816.

Wang, H.; Ng, T. B. Isolation of a novel Ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translationinhibitory, and ribonuclease activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 276, 587-593.

Wang, H.; Ng, T. B. Isolation and characterization of velutin, a novel lowmolecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Sci.* **2001**, 68, 2151-2158.

Wasser, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 60, 258-274.

Wasser, S. P.; Weis, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higherbasidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.* **1999**, 19, 65-96.

Wong, J. H.; Wang, H. X.; Ng, T. B. Marmorin, a new ribosome inactivating protein with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 81, 669-674.

- Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **1980**, *284*, 555-556.
- Yuan, Z.; He, P.; Cui, J.; Takeuchi, H. Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. on genetically diabetic KKAY mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1898-1903.
- Zakeri, Z.; Lockshin, R. A. Programmed cell death: early changes in metamorphosing cells. *Biochem. Cell Biol.* **1994**, *72*, 589-596.
- Zhang, R. Y.; Zhang, G. Q.; Wang, H. X.; Ng, T. B. A novel ribonuclease with antiproliferative activity from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Lyophyllum shimeji*. *Biochem. Genet.* **2010**, *48*, 658-668.
- Zhao, C.; Sun, H.; Tong, X.; Qi, Y. An antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 321-327.
- Zhu, T.; Kim, S. H.; Chen, C. Y. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1330-1335.