

(一)前言

先天性免疫對宿主防禦系統扮演非常重要角色。許多研究學者提出食用菇類多醣體會促進體內(*in vivo*)及體外(*in vitro*)之不同免疫反應，包括活化吞噬細胞如(嗜中性球、巨噬細胞及單核細胞)、自然殺手(natural killer; NK)細胞、B-及 T-淋巴球細胞等及釋放一些訊息傳遞分子物質如補體及細胞激素(cytokines)等(Christine et al., 2002; Wasser et al., 2002; Lull et al., 2005; Kim et al., 2006b)。有絲分裂活性蛋白質激酶(mitogen-activated protein kinases ; MAPKs)包括活化及磷酸化(JNK、p38 及 ERK)及一些不同的細胞激素如(TNF- α 、IL-1、IL-8)等影響均對活化先天性(*innate*)及適應性(*adaptive*)免疫調節的功能具有決定性。當組織細胞受傷及感染疾病發生時，大量產生一氧化氮(NO)會誘導 iNOS 之表現。NO 及細胞激素會刺激 iNOS 及 Cox-2 之表現(Won and Park, 2005)。

桑黃(*Phellinus linteus*)為一種藥用菇類，是寄生於活桑樹上之真菌，屬於 Hymenochaetaceae family。在亞洲地區如韓國、日本等國家，桑黃被視為是一種珍貴的傳統藥材，也是具有經濟價值之藥食同源物質。有關藥理活性研究顯示，桑黃具有抗癌、抗氧化、抗發炎、保肝及免疫調節等功能 (Song et al., 2003; Kim et al., 2004; Kim et al., 2006a; Kim et al., 2006b; Guo et al., 2007)。自液態培養桑黃中分離之酸性多醣體對以 LPS 處理之小鼠，在體外以 LPS 刺激會促進對巨噬細胞及淋巴細胞之自發性細胞凋亡(Kim et al., 2003)。利用 LPS 刺激巨噬細胞所引起的發炎反應，給予液態桑黃正丁醇萃取物之後具有抑制 ROS 之產生，iNOS、Cox-2 的表現及 NF- κ B 活化，因此液態桑黃的正丁醇萃取物具有抗發炎作用，且劑量增加時效果愈明顯(Kim et al., 2007)。有關桑黃的資料來源大部份來自國外文獻，固態培養桑黃及多醣體之體外(細胞模式)

免疫調節功能評估與其作用機制之研究報告目前尚欠缺。此外，因固態培養桑黃在化學成分上與液態培養桑黃亦有差異，進而影響到桑黃的藥理活性。本研究主要目的是進行固態培養桑黃多醣體對LPS-誘導的THP-1細胞是否活化有絲分裂活性蛋白質激酶(MAPKs)包括(活化及磷酸化JNK、p38及ERK)之免疫調節及抗發炎效應如對一氧化氮(NO)之釋放量、Cox-2系統(Cox-1及Cox-2)與NF- κ B活化的影響等深入研究。上述固態培養桑黃多醣體所獲得之研究成果將來可供作固態培養桑黃開發成為免疫調節用途的保健食品應用於發炎反應之疾病預防的重要參考資料。

(二)材料與方法

1. 實驗材料

1. 固態培養桑黃樣品。

2. 多醣體之製備流程

依 Han et al (1999)所提及方法進行。

3. 細胞株

細胞株：THP-1 細胞 (American Type Culture Collection [ATCC-TIB-202])

4. 細胞培養及相關實驗所需試劑

RPMI-1640 medium、fetal calf serum (FCS)、[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] (MTT) 及 penicillin G-streptomycin-amphotericin B。脂多醣

(lipopolysaccharide; LPS)、NF- κ B ELISA kit 及 Griess reagent 等。

5. 抗體

(1) 一次抗體：Anti-JNK、anti-phospho-JNK (pT183/pY185)、anti-p38、anti-phospho-p38 (pT180/pY182)、anti-ERK、anti-phospho-ERK (pT202/pY204)、anti-iNOS、anti-Cox-1、anti-Cox-2 及 anti- β -actin 抗體。

(2) 二次抗體：Anti-rabbit 及 anti-mouse 抗體。

2. 實驗及執行進度

1. 細胞培養

各將 THP-1 細胞培養於 RPMI medium 中 [pH 7.4, 含 10 % 胎牛血清 (Fetal calf serum) 及含 100 units/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin 和 0.25 μ g/ml amphotericin B] 與 5 % CO₂ 的培養箱內。每兩天更換一次培養基溶液，當長至培養瓶單層長滿(confluent)，便做繼代培養(subculture)。實驗時，以血球計數器計算細胞數，再取適當細胞數目進行實驗。

2. 細胞存活率分析

首先從 THP-1 細胞取 100 μ l (1.0×10^6 個/ml)，種至 96 孔盤，培養 24 小時後，分為控制組(0.1% DMSO)、只有 LPS (1 μ g/ml) 誘導及分別以 LPS 誘導後，再加入各種不同濃度的藥物處理，各做三重覆，另以 DMSO (濃度 1.0 %) 及去離子水 (18.2 M Ω /cm, 20 $^{\circ}$ C) 為控制組，於 CO₂ 培養箱連續作用後，於每 well 分別加入 PBS 沖洗一至二次，以免藥物的顏色影響吸光值，再於每 well 分別加

入100 μ l 調配好的MTT試劑，經4小時的反應後，即以ELISA reader測試吸光值，並依此算出細胞存活率(cell viability; %)。

3.一氧化氮(NO)定量分析法

控制組(0.1% DMSO)、LPS (1 μ g/ml) 誘導及分別以 LPS 誘導後，再加入各種不同濃度的藥物作用培養 24 小時後，離心取上清液，在 96-well 逐一添加 50 μ l/well 的藥物或各標準濃度 NaNO_2 ，再添加 100 μ l/well Griess reagent，進行 Griess 反應，反應 5 分鐘呈色均勻後，以酵素免疫分析儀 (ELISA)讀取 540 nm，讀得之吸光值代入 NaNO_2 濃度標準曲線，可算求得 NO_2^- 濃度。

4.西方墨點轉漬法 (Western blotting method)

細胞收集並以 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 20 mM sodium chloride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin 及 10 μ g/ml aprotinin)懸浮細胞沉澱物，以注射針筒抽吸細胞液，以 10,000 \times g 於 4°C 離心 10 分鐘。取 50 μ g/ml 之蛋白質跑 SDS-PAGE gel，整個裝置放入 4°C 冷房，進行電泳分析後，使用轉印槽，再轉印到 PVDF membrane，以 0.5 % BSA (in 0.1 % PBST)進行空白處抑制 (blocking)，在室溫下搖晃 1 小時，再放入一次抗體溶液中，於室溫下搖晃 1 小時，以 washing buffer (10 mM Tris-base, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1 % Tween 20)洗滌 PVDF membrane 3 次，每次 15 分鐘。再將二次抗體溶液稀釋到合適之濃度，加入 PVDF membrane 在室溫下反應 1 小時，而後以 washing buffer 洗 3 次，每次 15 分鐘。將 PVDF membrane 以 chemiluminescent-based detection system 與 X-ray film 來表現所測定之蛋白質 band。

5.統計學分析

所有資料將以 mean±SD 的方式表示。採用 SAS 電腦統計套裝軟體 (SAS Institute, Cary, NC) 進行變異數分析(Analysis of Variance, ANOVA)，並以 Duncan's Multiple Range Test 來測試不同處理間顯著差異效果。當 $P < 0.05$ 時才視為在統計學上有意義。

(三)結果與討論

1.固態培養桑黃不同萃取物及桑黃多醣對 THP-1 細胞增殖分析

第一年研究計畫成果報告發現，自固態培養桑黃分離之多醣(PSCPL)以脂多醣(LPS)誘導對 THP-1細胞之細胞存活率表現比固態培養桑黃子實體95%酒精(EESCPL)及水萃取物(WESCPL)為佳。所以固態培養桑黃多醣(PSCPL)在濃度1.0-5.0 $\mu\text{g/ml}$ 下具有抗LPS-誘導細胞死亡，且呈劑量型保護效應(Fig. 1)。尤其以5.0 $\mu\text{g/ml}$ PSCPL對THP-1細胞保護效力最顯著 ($P < 0.05$)，因此本研究以此劑量之PSCPL進行免疫調節分子機制討論。

2.固態培養桑黃多醣(PSCPL)對 THP-1 細胞的一氧化氮(NO)釋放能力之影響

固態培養桑黃多醣(PSCPL)以脂多醣(LPS)誘導對人類單核細胞(THP-1)產生的一氧化氮(NO)所造成之影響，進行探討。結果發現，PSCPL在5.0 $\mu\text{g/ml}$ 可顯著地抑制LPS所誘導之NO釋放量(Fig. 2)，具有抵抗LPS誘導所引起之發炎反應。

3.固態培養桑黃多醣(PSCPL)對 THP-1 細胞的 MAPK 路徑之影響

固態培養桑黃多醣(PSCPL)以脂多醣(LPS)誘導對人類單核細胞(THP-1)造成 MAPK 路徑之影響，深入討論。結果發現，單獨以 LPS 誘導對 THP-1 細胞會造成活化及磷酸化(JNK、p38 及 ERK)

激酶均有明顯表現，而 PSCPL 在 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 均可以抑制 LPS 所誘導之活化及磷酸化(JNK 及 p38) 的表現，但是對 LPS 誘導後加入 5.0 $\mu\text{g/ml}$ PSCPL 處理之活化及磷酸化的 ERK 蛋白質表現，並無任何影響 (Fig. 3)。

4.固態培養桑黃多醣(PSCPL)對 THP-1 細胞之 iNOS、Cox-1 及 Cox-2 之表現影響

固態培養桑黃多醣(PSCPL)以脂多醣(LPS)誘導對人類單核細胞(THP-1)造成 iNOS、Cox-(1 及-2) 系統之影響，進行研究。結果發現，單獨以 LPS 誘導對 THP-1 細胞會造成 iNOS、Cox-1 及 Cox-2 均有明顯表現，而 PSCPL 在 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 均可以抑制 LPS 所誘導之 iNOS 及 Cox-2 的表現，但是對 LPS 誘導後加入 5.0 $\mu\text{g/ml}$ PSCPL 處理之 Cox-1 之表現，並沒有抑制影響 (Fig. 4)。

5.固態培養桑黃多醣(PSCPL)對 THP-1 細胞之 NF- κ B 活化效應影響

固態培養桑黃多醣(PSCPL)以脂多醣(LPS)誘導對人類單核細胞(THP-1)會造成細胞核之 NF- κ B 活化的影響，進行深入研討。結果發現，單獨以 LPS 誘導對 THP-1 細胞會造成 NF- κ B 活化的比例明顯增高，而 PSCPL 在 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 可以明顯抑制 LPS 所誘導之 NF- κ B 活化的比例 (Fig. 5)。

(四)計畫成果自評

綜合所有研究成果發現，固態培養桑黃未來可開發成為具有免疫調節功能之保健食品，運用於預防發炎疾病。

(五)參考文獻

Christine JG, Duncan CJ, Pugh N, Pasco DS, Ross SA. (2002) *J Agric Food Chem.*

50:5683-5685.

Guo J, Zhu T, Collins L, Xiao ZX, Kim SH, Chen CY. (2007) *Mol. Carcinog.* 46:144-154.

Han SB, Lee CW, Jeon YJ, et al. (1999) *Immunopharmacology* 41:157-164.

Kim BC, Choi JW, Hong HY, et al. (2006a) *J Ethnopharmacol.* 106:364-371.

Kim GY, Lee JY, Lee JO, et al. (2006b) *Biosci Biotechnol Biochem.* 70:1218-1226.

Kim HG, Yoon DH, Lee WH, et al. (2007) *J Ethnopharmacol.* 114:307-315.

Kim SH, Lee HS, Lee S, et al. (2004) *J Ethnopharmacol.* 95:367-372.

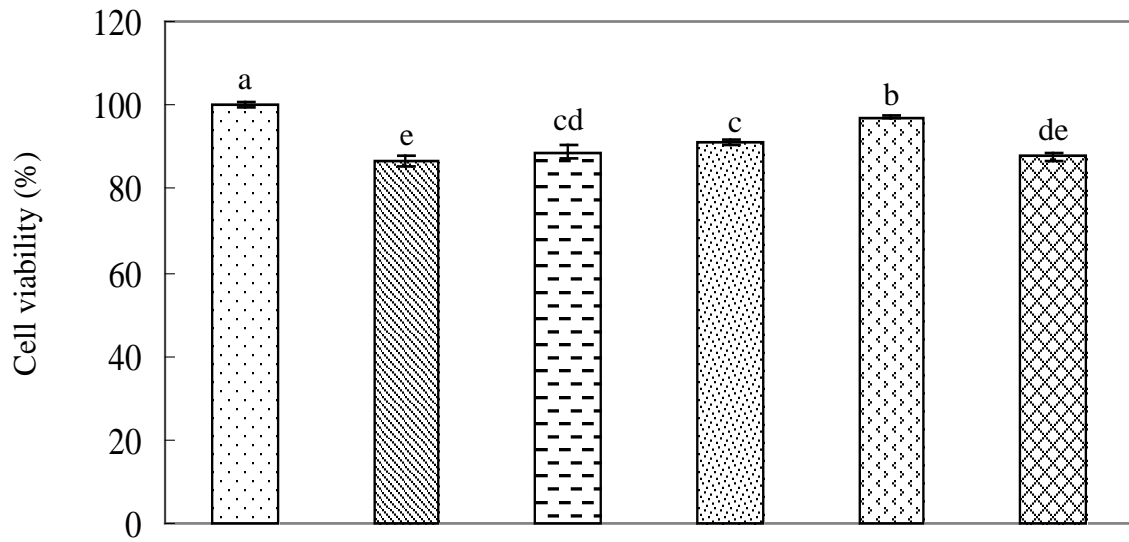
Kim GY, Roh SI, Park SK, et al. (2003) *Biol Pharm Bull.* 26:1418-1423.

Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF.(2005) *Mediators Inflamm.* 2005:63-80.

Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. (2003) *J Ethnopharmacol.* 88:113-116.

Wasser SP. (2002) *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:258-274.

Won SY, Park EH (2005) *J Ethnopharmacol* 96:555-561.



LPS	-	+	+	+	+	+
PSCPL (µg/ml)	-	-	1	3	5	10

Fig. 1. Effect of PSCPL on LPS-induced cell viability. THP-1 cells were treated with control (0.1% DMSO), 1, 3, 5 and 10 µg/ml of PSCPL in the presence of LPS for 24 h. Cell viability was analyzed by MTT assay. Each data represents the mean±SD of three independent experiments. The bar having the same letter was not significantly different at $P < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range tests.

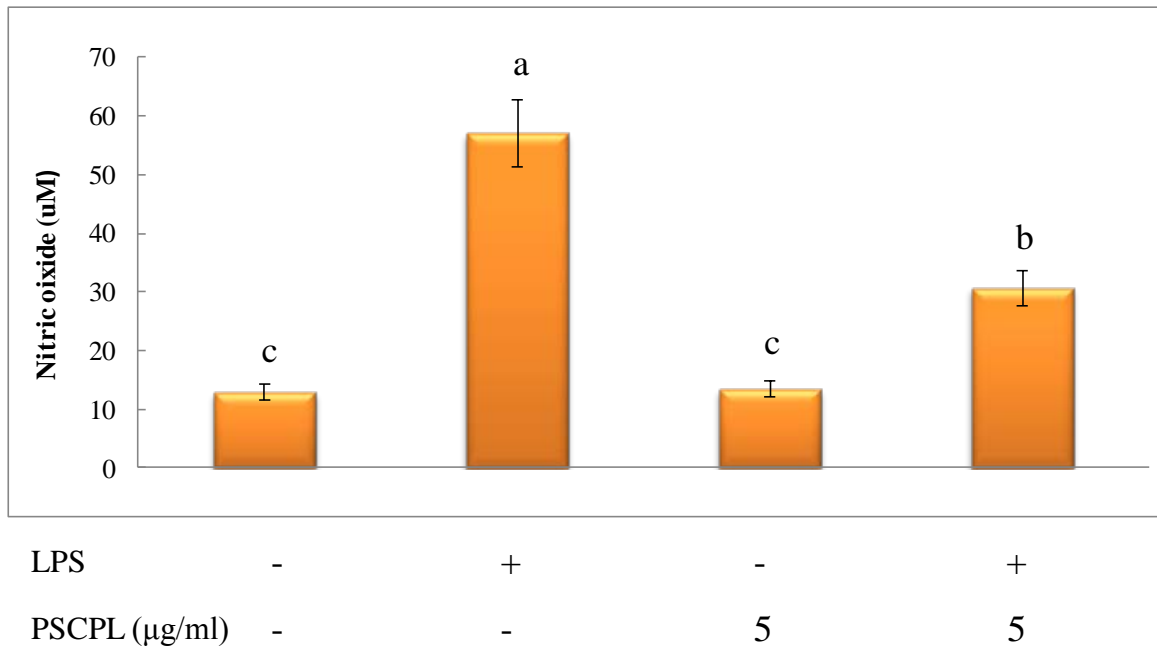


Fig. 2. Effect of PSCPL on NO production in LPS-induced THP-1 cells. NO was analyzed by the Griess reagent. Each data represents the mean±SD of three independent experiments. The bar having the same letter was not significantly different at $P < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range tests.

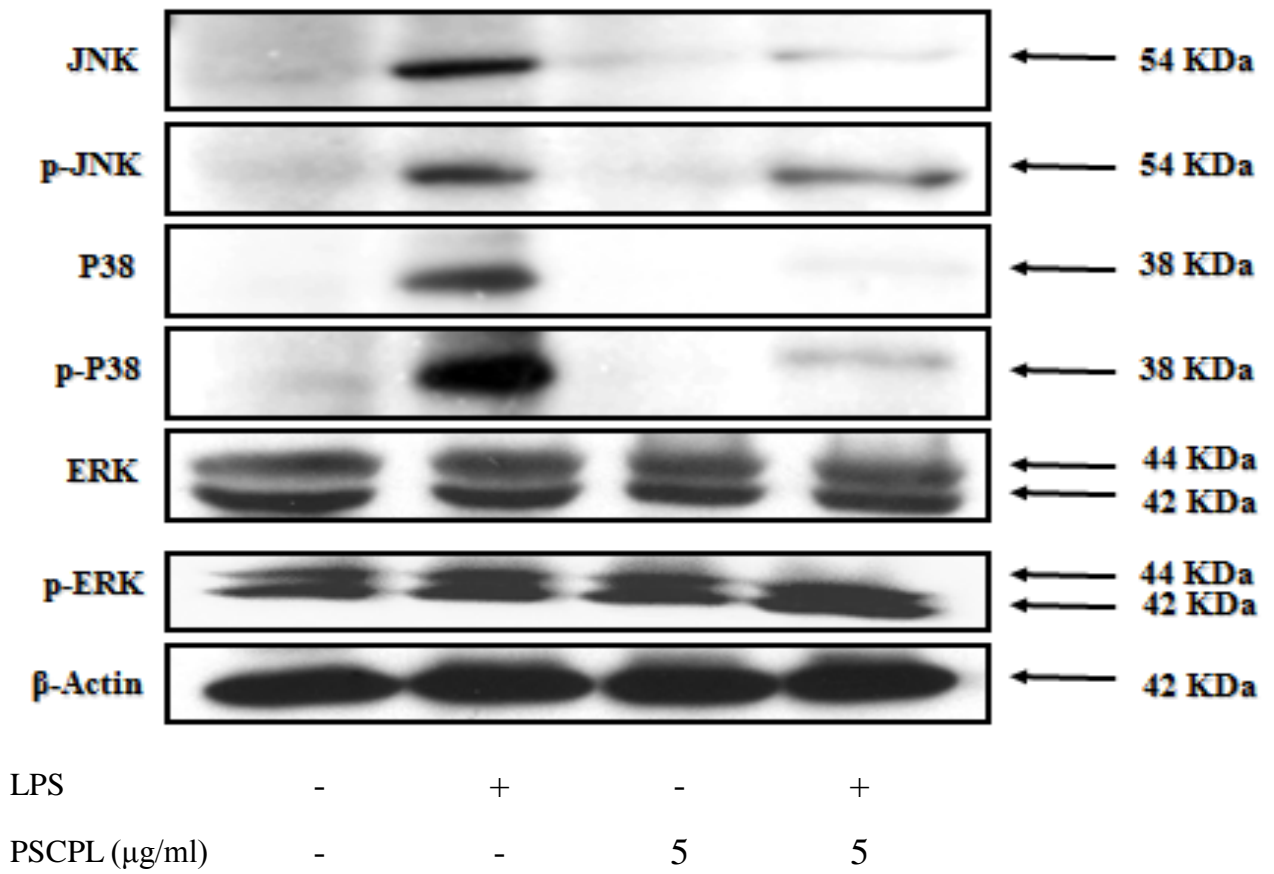


Fig. 3. Effects of PSCPL on activation and phosphorylation of MAPKs (JNK, p38, and ERK) in LPS-induced THP-1 cells. β -Actin was used a positive control.

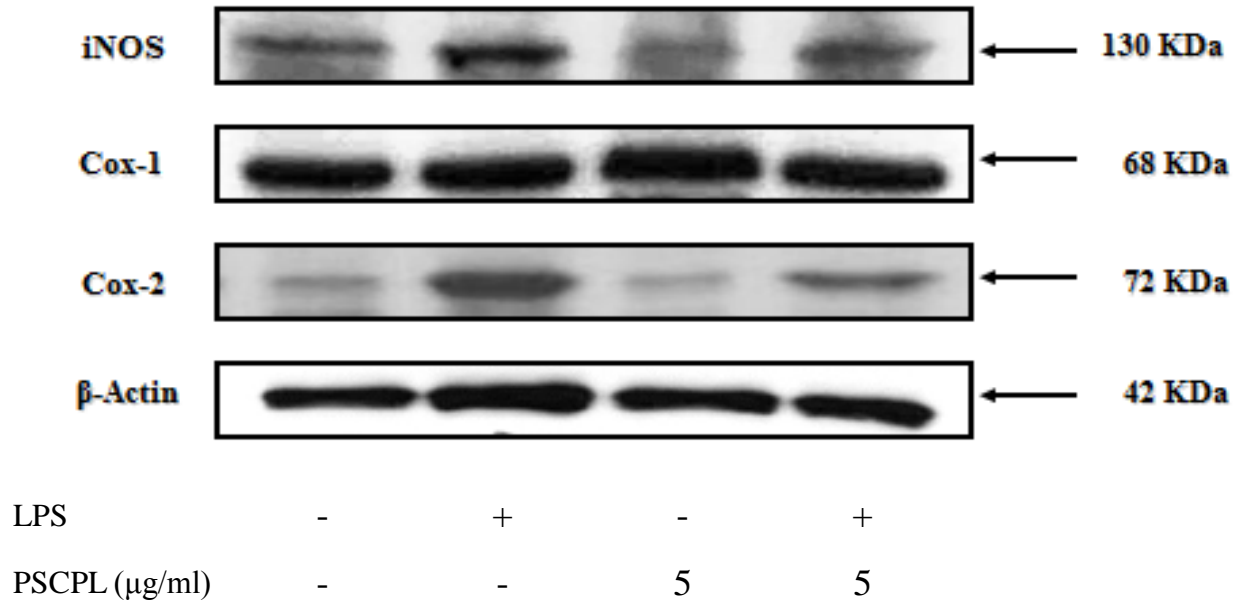


Fig. 4. Effects of PSCPL on iNOS, Cox-1, and Cox-2 expression in LPS-induced THP-1 cells. β -Actin was used a positive control.

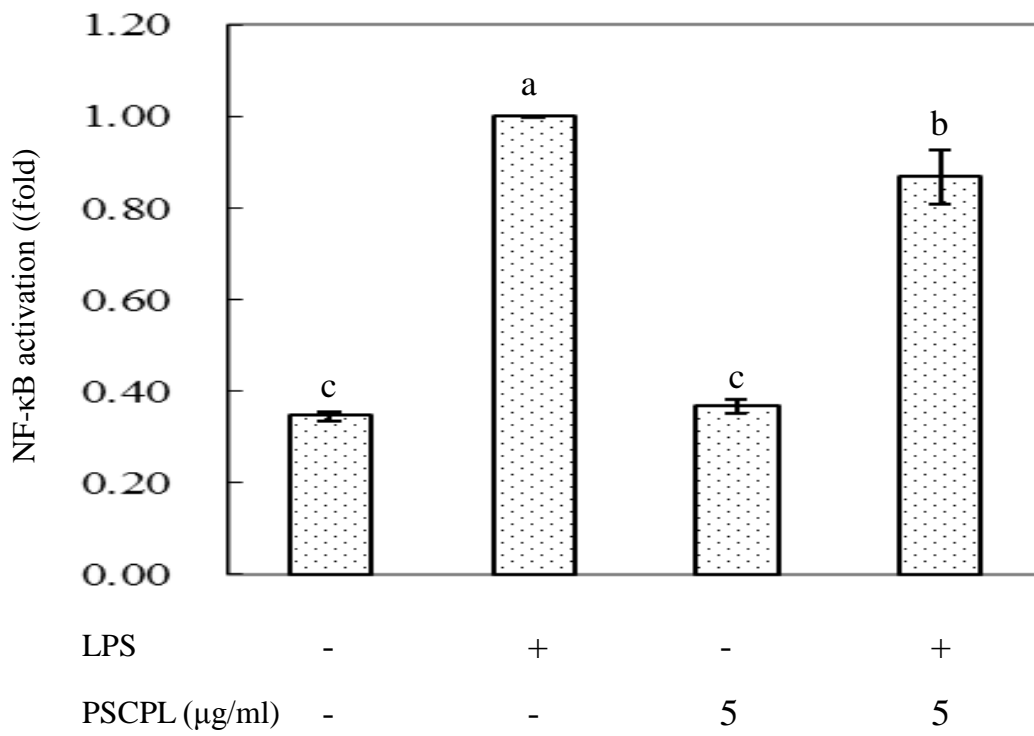


Fig. 5. Effects of PSCPL on nucleus NF-κB activation in LPS-induced THP-1 cells. Each data represents the mean±SD of three independent experiments. The bar having the same letter was not significantly different at $P < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range tests.