



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1939532 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 31

(21) 申请号 200610127042. 7

述部分 .

(22) 申请日 2006. 09. 21

审查员 吴立

(30) 优先权数据

11/233, 364 2005. 09. 23 US

(73) 专利权人 益生生技开发股份有限公司

地址 中国台湾台北县汐止市康宁街 169 巷
23-3 号 6 楼

(72) 发明人 陈子智 柯俊良

(74) 专利代理机构 北京连和连知识产权代理有
限公司 11278

代理人 马昭若

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006. 01)

A61K 36/06 (2006. 01)

A61K 36/064 (2006. 01)

A61K 35/74 (2006. 01)

A61P 37/04 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005040375 A1, 2005. 05. 06, 现有技术描

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 7 页

(54) 发明名称

真菌免疫调节蛋白之用途

(57) 摘要

本发明涉及真菌免疫调节蛋白使用于免疫治
疗、活化自然杀手细胞、巨噬细胞或增加细胞激素
及血清抗体治疗及降低血糖的用途。

1. 一种真菌免疫调节蛋白在制备用于减缓癌症所引发的疼痛或副作用、活化自然杀手细胞、活化巨噬细胞、增殖血清抗体以及抑制端粒酶的口服剂型药物中的用途,该蛋白质内含氨基酸序列 SEQ ID No :1 :

MSDTALIFRLAWDVKKLSFDYTPNWGRGNPNFIDTVTFPKVLTDKAYTYRVAVSGRNLGVKPSYAVESDGSQ
KVNFLYNSGYGIADTNTIQVFVVDPTNNDFIIAQWN。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于此蛋白是自灵芝属中所获得。
3. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于此蛋白是自金针菇中所获得。
4. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于此蛋白是由重组的大肠杆菌或酵母菌所提供。

真菌免疫调节蛋白之用途

技术领域

[0001] 本发明涉及真菌免疫调节蛋白使用于免疫治疗及降低血糖的用途。

背景技术

[0002] 灵芝属植物 (Genus *Ganoderma*) 是稀有且珍贵的中药材,在中国泛称为 " 灵芝 " 已经使用 5000 年,目前使用中的灵芝包括 :*G. lucidum* (红色)、*G. applanatum* (棕色)、*G. tsugae* (红褐色)、*G. sinense* (黑色) 及 *G. oregonense* (深棕色)。

[0003] 灵芝有抗过敏 (Chen H.Y et al., *J. Med. Mycol.* 1992 ;33 :505-512)、保肝 (Lin J.M. et al., *Am J Chin Med.* 1993 ;21(1) :59-69)、抗癌 (Wasser SP, *CritRev Immunol* 1999. 19 :65-96) 与增加免疫力等功能 (Kino, *J Biol. Chem.* 1989. 264(1) :472-8)。然而,灵芝在利用上,都以直接萃取 (Homer W.E. et al., *Allergy* 1993 ;48 : 110-116) 或是利用萃取之小分子 (Kawagishi H., et al., *Phytochemistry* 1993 ;32 : 239-241) 的方式为之。

[0004] 由可食菌类 (例如灵芝 *Ganoderma lucidum*, 草菇 *Volvariella volvacea*, 金针菇 *Flammulina velutipes*) 分离出具有免疫调节功能的蛋白质,有相似的氨基酸序列,这些蛋白质被命名为真菌免疫调节蛋白 (FIPs, Fungal Immunomodulatory Proteins, Ko J.L, *Eur. J. Biochem.* 1995 ;228 :224-249)。

[0005] Lin 与其同仁由松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae*) 菌丝中纯化出命名为 FIP-gts 之免疫调节蛋白 (Lin, W.H., et al., *J Biol Chem.* 1997. 272, 20044-20048) ;实验发现,只有从松杉灵芝菌丝体中纯化的 FIP-gts 有免疫调节之功效,松杉灵芝子实体纯化的 FIP-gts 则无 ;选殖 FIP-gts 基因后发现其脱氧核糖核酸序列 (DNA sequence) 与灵芝中发现的 LZ-8 一样,同时因此二分子皆具有免疫调节功效,显示为同一蛋白质。

[0006] 以 Garnier 分析法预测 FIP-gts 之二级结构发现,此蛋白有两个 α -螺旋,七个 β -折片与一个 β -转折,以 SDS-PAGE 分析,此分子之分子量为 13kDa,以 20 μ M 戊二醛 (glutaraldehyde) 进行蛋白质与蛋白质间的结合方式 (protein-protein conjugates) 分析, FIP-gts 为两个相同亚基所组成的双聚体结构 (homo dimer),分子量为 26kDa。

[0007] 此外,以芽细胞形成活性分析 (Blast-formation stimulatory activity assay, BFSA) 发现三个真菌蛋白具有活性,除了由灵芝发现的蛋白外,由金针菇 (*Flammulina velutipes*) 与草菇 (*Volvariella volvacea*) 中发现的凝血蛋白都具有部分免疫调节功能 (Hsu, C.-I., *Study on the Fungal Immunomodulatory Proteins.* 1996. Department of Medical Technology, College of medicine, NTU, Taipei)。这些蛋白之分子量都差不多是 13kDa 而且其凝血功能并不是通过组氨酸、半胱氨酸或甲硫氨酸三种氨基酸所造成,它们属于与碳水化合物 (carbohydrates) 连结的凝集素 (Lectin)。

[0008] 自然杀手细胞是另一种致死淋巴球,就如同细胞毒性 T 细胞,他们皆包含充满有毒化学物质的颗粒,他们之所以被称为 " 自然 " 杀手细胞是因为不像细胞毒性 T 细胞,他们在展开攻击前,不需要去辨识一个特异的抗原。他们以肿瘤细胞作为目标,并保护正常细胞对抗很多种类之具感染力的细菌或微生物,在许多免疫缺失的疾病中,包括艾滋病,自然

杀手细胞的功能是异常的。自然杀手细胞亦可能通过分泌高浓度、具有影响力的淋巴因子,促进免疫调节。

[0009] 细胞毒性 T 细胞及自然杀手细胞都靠接触时进行目标消灭。杀手细胞结合到它的目标,以它的武器瞄准,随后传递将可产生致死爆裂的化学物质使目标细胞膜产生破洞,使得液体流进流出,最后导致细胞爆裂。

[0010] 直到最近,免疫抗癌的治疗方法仍存在着三种形式:手术、化学治疗或放射性治疗。然而,在所有这些形式中,会导致经常性及有害的副作用。因此,这三种治疗方式对癌症病人言,并不是最佳的治疗方式,特别是那些癌症末期的病患。例如,化疗及放射性治疗的剂量过度,常会导致伤害并缩短生命。

[0011] 最近几年,一个第四种抗癌的免疫治疗方法开始流行。这第四种方法可实际加强每个病人体内的天然抗癌免疫力。此第四种方法使用的是自身体内的自然杀手(natural killer,NK)细胞,它是身体内最强、最有效的免疫细胞,比杀手 T 细胞要强约 5 万倍。NK 免疫治疗法无疑地在未来会变得越来越流行。

[0012] 自然杀手细胞是先天免疫系统的重要成份,监视并对抗特定病毒、细胞内细菌及转型细胞(Trinchieri G. Adv Immunol 1989 ;47 : 187-376 ;French AR, Yokoyama WM. Curr Opin Immunol 2003 ;15 :45-51 ;Smyth MJ et al., Nat Immunol 2001 ;2 :293-299)。自然杀手细胞运用细胞媒介的毒性作用通过不同细胞激素(例如 IFN γ 、GM-CSF 及 TNF- α)及化学激素(例如 MIP-1 family 及 RANTES)的释放,而做为先天及后天免疫反应的桥梁(Biron CA. Curr Opin Immunol 1997 ;9 :24-34. ;Biron CA et al., Annu Rev Immunol 1999 ;17 : 189-220)。一来不像 T 细胞,自然杀手细胞杀死病毒感染或恶性转型细胞,不需要事先活化,并且也不受 MHC 的限制。因此自然杀手细胞被认为恶性肿瘤,特别是位于造血起源的恶性肿瘤,实行转移治疗时,最可能的治疗方法(Robertson MJ, Ritz J. Blood 1990 ;76 : 2421-38)。失去或表现变化的第 1 类 MHC 抗原的肿瘤细胞,可以逃离细胞毒性 CD8+T 细胞的检测。但他们很可能轻易的被自然杀手细胞消灭。然而,恶性肿瘤细胞经常会发展对抗宿主免疫监视系统的策略,包括抑制第 1 类 MHC 细胞来避开免疫检测、增加 Fas-L 的表达来杀死反应性淋巴细胞,以及产生抑制性的激素如 TGF- β (Garcia-Lora A et al., J Cell Physiol 2003 ;195 :346-55. ;Kim R et al., Cancer 2004 ;100 :2281-91.)。所以,移动的自然杀手细胞对增加宿主限制恶性肿瘤发展的能力是重要的,尤其当后天免疫系统处于“无反应性”(anergy)及“耐受”(tolerance)的状态时。

[0013] 在肿瘤发展上,巨噬细胞及嗜中性细胞皆能同时视为英雄及恶棍。这些细胞皆能对肿瘤细胞进行吞噬作用及依赖抗体的细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)以及肿瘤生长抑制细胞激素的分泌(Marek Jakóbsiak et al., Immunology Letters December 15, 2003 PP :103-122)。

[0014] 最近,草药治疗已越发被认为是对付恶性肿瘤的另一种可行的疗法(Risberg T et al., J Clin Oncol 1998 ;16(1) :6-12.)。在这些治疗方法中,药用蘑菇在全世界民俗医学中有悠久的历史。在亚洲,灵芝(Ganoderma tsugae, G. tsugae),一种担子菌纲蘑菇,是最受欢迎的化学防癌用的蘑菇之一。很多生物活性的组成部分已经从这个蘑菇的不同的部分鉴定出来,包括子实体,菌丝,孢子和培养基。

[0015] G. lucidum 的两个主要的生物活性成分是多糖体和三萜类(triterpenes)。其

多糖体具有在试管内和在活体内的抗癌效应,这是通过一个免疫调节的机制(Wang SY et al. Int J Cancer 1997 ;70(6) :699-705.)。一些研究人员表示三帖类一般拥有抗氧化作用(Zhu M, Chang Q, et al., Phytother Res 1999 ;13(6) :529-531.)、保肝作用以及抗高血压的生物活性(Kim DH et al., BiolPharm Bull 1999 ;22(2) :162-164.)。最近,有研究报告指出灵芝 *Ganoderma* spp. 具有预防肿瘤的细胞毒性之活性。一种灵芝 *Ganoderma tsugae* 的三帖类,在人类肝癌细胞 Hep3B 中,被发现会引起细胞凋亡和使细胞循环中止,但是分子机制尚未经调查(Gan KH et al., J Nat Prod 1998 ;61(4) :485-487.)。

[0016] 端粒酶是一种反转录酶,在细胞内催化端粒 DNA 的合成及延长(Greider CW, et al., Nature 1989 ;337(6205) :331-337)。这个酶在大多数的恶性肿瘤里会专一的被活化,但是在正常体细胞里经常是不活化的,因此在正常细胞的细胞分裂期间,端粒会逐渐的缩短(Kim NW, et al., Science 1994 ;266(5193) :2011-2015.)。细胞需要一个机制维持端粒稳定性来克服因复制所导致的衰老。端粒酶的活性可能因此成为细胞不朽或致癌生成的速率决定步骤或关键步骤,且超过 90% 活体内的人类癌细胞表达出端粒酶活性(Harley CB, et al., Curr Opin Genet Dev 1995 ;5(2) :249-255.)。做为核糖核蛋白的复合体,端粒酶在人体内由两个主要的亚单位组成。这些是 RNA 的模板及反转录酶亚单位,分别由 hTR 及 hTERT 基因编码。值得注意的是,没有端粒酶活性的肺癌病患,比有端粒酶活性的,活在明显较佳的预后状态(Wu TC, et al., Lung Cancer 2003 ;41(2) :163-169.)。这显示对肺癌患者言,端粒酶的活性是重要的预后因子。

发明内容

[0017] 除非特别定义,所有的技术与科学名词与现有认知与公知技术相同。虽然本发明的材料与方法与公知技术类似或相同,然而以下将详述或测试本发明的较佳方法与材料。以下将定义本发明中使用之专有名词。

[0018] 本发明提供一个真菌免疫调节蛋白用来进行免疫治疗的用途,该蛋白质内含氨基酸序列 SEQ ID No :1 :

[0019] MSDTALFRLAWDVKKLSFDYTPNWGRGNPNFIDTVTFPKVLTDKAYTYRVAVSGRNLGVKPSYAVESD
GSQKVNFLYNSGYGADTNTIQVFVVDPTNNDFIIAQWN

[0020] 或

[0021] SEQ ID No :3

[0022] SATSLTFQLAYLVKKIDFDYTPNWGRGTPSSYIDNLTFPKVLTDDKYSYRVVVGSDLGVESNFAVTPS
GGQTINFLQYNKGYGADTKTIQVFVVIPDTGNSEYIIAEWKKT。

[0023] 本发明之真菌免疫调节蛋白可从 *Ganoderma* species, *Volvariella volvacea* 或重组微生物中获得(例如重组大肠杆菌或酵母菌)。较佳的 *Ganoderma* species 实施例为 *Ganoderma tsugae*。

[0024] 本发明之真菌免疫调节蛋白的用途能用来做为缓和癌症病患的疼痛或副作用的辅佐物。

[0025] 本发明之真菌免疫调节蛋白的用途能用刺激或活化免疫功能。

[0026] 因此,本发明之免疫功能是由挑选自下列群组之机制所造成,此群组是由自然杀手细胞之活化、巨噬细胞之活化以及血清抗体之增殖所组成。而本发明较佳具体化之功能

是通过自然杀手细胞之活化以及端粒酶之抑制所造成。

[0027] 本发明之真菌免疫调节蛋白可以拿来设计成下列剂型,其中包括口服溶液、口服胶囊、口服药片或是口服药丸,是以口服方式服用。

[0028] 本发明发现 FIP-gts 的互补脱氧核糖核酸 (cDNA) 序列与 LZ-8 完全相同 (SEQ ID NO:1),并且有抗癌作用。本发明同时披露以 FIP-gts 处理的癌细胞会降低细胞活性,显示 FIP-gts 可当成抗癌药物。

[0029] 本发明并且发现以 FIP-gts 处理的癌细胞会降低基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2, metalloproteinases-2) 之表达, MMP-2 是肺癌细胞转移 (metastasis) 有关的重要酶。MMP-2 的抑制是抑制肿瘤细胞转移的前兆。

[0030] 名词“免疫调节”不限于刺激或活化免疫功能 (例如活化自然杀手细胞及巨噬细胞或增加血清里 IgG 或 IgM 抗体的生成),或治疗或预防因转移而成的癌症,或通过抑制端粒酶催化亚单位来压抑端粒酶活性的癌症。

[0031] 真菌免疫调节蛋白所能治疗的癌症是选自下列群组,包含肺癌、骨癌、乳癌、肝癌、非小细胞肺癌、卵巢癌及肠胃道癌。

[0032] 在其它的实施例中,依据本发明的 FIP-gts 能融合至一个抗肿瘤药剂或一个检测标签。如此可允许 FIP-gts 导向药剂或检测卷标到肿瘤细胞,并因此能做到肿瘤的伤害/摧毁或检测。因此, FIP-gts 适合用于利用化疗或外科手术进行的人类或动物身体的治疗方法 (例如,放射免疫引导之外科方法, RIGS),或实施在人类或动物身体的治疗方法。特别的是, FIP-gts 适合用于肿瘤的外科手术或治疗,或肿瘤的诊断等方面的治疗。

[0033] 连结 FIP-gts 的抗肿瘤药剂可以是任何破坏或伤害 FIP-gts 已经结合的肿瘤,或在 FIP-gts 已经结合的细胞环境。例如,抗肿瘤药剂可以是具毒性的化疗药剂或放射性同位素、可以活化前驱药或细胞激素的酶。

[0034] 已为在所属技术领域的技术人员所知之适当的化疗药剂,包括 anthracycline (例如 daunomycin 及 doxorubicin)、vindesine、neocarzinostatin、cis-platinum、chlorambucil、cytosine arabinoside、5-fluorouridine、melphalan、ricin 及 calicheamicin。

[0035] 适当的放射性同位素被用来做为抗病毒药剂已为在所属技术领域的技术人员所知。

[0036] 接上 FIP-gts 的抗肿瘤药剂可能也是活化前驱药的酶。这会使得失活的前驱药活化,在指引的部位形成细胞毒性的形式。在临床的运用上, FIP-gts- 酶的给合体注射入病患体内,可聚积在目标肿瘤的区域。被注射入体内的前驱药因此转变成具细胞毒性的药物,在区域性酶的影响下,聚积在目标肿瘤的区域。

[0037] 因此,本发明也提供一个用于免疫治疗的方法,其成份为注射入病患体内,达有效剂量的本发明之片段或各种多肽。

[0038] 基于本发明之 FIP-gts 含有可用来做 RIGS 以及诊断的检测标签。RIGS 包含注射一个标定的蛋白质进入病患体内,之后以外科手术移除任何该蛋白质所结合之组织。因此,贴上标签之 FIP-gts 可引导外科医师找到组织。

[0039] 此接合 FIP-gts 的检测标签可能是一个成像的药剂,用来做出图像的诸如半衰期短的放射性同位素,例如 ^{111}In 、 ^{125}I 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

[0040] 目前,端粒酶抑制的研究聚焦于(1)直接导向核心端粒酶的组成物(Hahn WC et al., Nat Med 1999 ;5(10) :1164-1170);(2)端粒导向(Zhang RG et al., Cell Res 2002 ;12(1) :55-62);(3)作为端粒酶抑制物的天然组成及小分子(Naasani I et al., Biochem Biophys Res Commun 1998 ;249(2) :391-396)和(4)端粒酶调节机制的干扰(Kawagoe J et al. J Biol Chem 2003 ;278(44) :43363-43372)。

[0041] 所属技术领域的技术人员可以合理推断此医药组合物之施与对象,可以为脊椎动物,适当的对象为患癌症或是有罹癌风险之人类。然而,实施例中之叙述,将含有FIP-gts之医药组合物施用在体外培养的脊椎动物癌症细胞,并以简单的细胞侵蚀分析(cellular invasion assay)与伤害/复原分析(heal wounded assay)证实具体有效;这些结果,可以合理推及治疗脊椎动物。

[0042] 可以将包含FIP-gts之用药组合物以任何公知路径注入脊椎动物体内,包括通过静脉,皮下,肿瘤内,肌肉,穿皮贴片,脊髓内或是颅内等路径进入体内,施行之方法可以快速以注射施行,或是通过浸润或缓释剂长期释放药效。

[0043] 包含FIP-gts之用药组合可预期以公知方法调制成适当的医药组合物,其中之一是将其溶在生理食盐水中,另外也预期可以以适当的载体例如符合生理浓度之无毒盐溶液,百分之五的葡萄糖溶液,灭菌水等,都可以配制适当含FIP-gts的医药组合物。适当的缓冲溶液也可以调置成含FIP-gts的医药组合物,如果需要,可进一步冷冻干缩于注射瓶中,等需要用时再以灭菌水还原,并注射。主要的溶剂为水,或是非水溶剂二者择其一。

[0044] 含FIP-gts的医药组合物的载体可包含医药允许之赋形剂(excipients),以调整适当之酸碱值,含水量,粘稠度,干净度,色泽,灭菌度,稳定度,溶解速度或是配方之味道。相同的,此药学上可接受载体可包含医药允许之赋形剂,以调整药物吸收,与穿过血脑障壁(blood-brainbarrier)之能力;这些赋形剂是以习惯上制备非肠胃用药的方式,以单剂,多重剂量或是以持续或间隔直接浸润之剂型制备。

[0045] 组成含有FIP-gts医药组合物的特定口服配方也是需要深思熟虑的。这些配方最好与适当的物体结合,包括载剂、赋形剂、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、芳香剂、缓释剂及压缩成药锭或包装成固体形式或软件形式的胶囊。或可思量将这些配方设计成下列剂型,如口服液、口服胶囊或口服药丸。或者除了口服方法外,也可考虑将这些配方设计成灌肠剂、栓剂、植入物、贴布、乳液或药膏。一些适当载剂、赋形剂及稀释剂的例子包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇(sorbitol)、甘露蜜醇(mannitol)、淀粉、阿拉伯胶(gum acacia)、磷酸钙(calcium phosphate)、褐藻胶(alginates)、硅酸钙(calcium silicate)、微晶纤维素(Microcrystalline cellulose)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)、纤维素(cellulose)、明胶(gelatin)、糖浆(syrup)、甲基纤维素(methyl cellulose)、羟苯甲酯及羟基安息香酸盐(methyl-andpropyl-hydroxybenzoates)、滑石粉(talc)、镁(magnesium)、硬脂酸(stearate)、水、矿物油与其它适当物质。此配方可以额外加入润滑剂、保湿剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、甜味剂与香料。此医药组合可以依公知技术制备成将活性物质FIP-gts制成施行后可以迅速、持久或是缓释剂型,此配方同时包括可以减少蛋白质分解、核酸或其它分解的物质,或是可以加速吸收的物质,如接口活性剂。此医药组合物也可以包括与聚乙二醇(PolyethyleneGlycol,PEG)、白蛋白(albumin)或是其它可以增进FIP-gts在血液中的稳定

[0046] 包含 FIP-gts 之用药组合可以在脊椎动物中以有效抑制癌细胞生长的剂量施用，专一的剂量以适当的体重、体表面积或是病人体积估算。此剂量同时依施用方法估算。进一步的计算用药剂量可依公知技术者决定，这样的计算可以由公知方法合理推演。例如，以明胶-酶谱法分析 (gelatin-zymography assay) 推算。此剂量同时依熟悉公知之医师估算，依个别病人之特性包括年龄、体重、对药物反应、病人之病况与投药方法决定。投药之剂量可以依据药物动力学数据、剂型与投药路径决定。

[0047] 含有 FIP-gts 的组合物喂食给 BALB/c 老鼠，测试其对自然杀手细胞活性、巨噬细胞活性及血清抗体生成的效应。与不同剂量群组比较，实验结果证实 FIP-gts 可促进自然杀手细胞、巨噬细胞及血清抗体生成的活化。

[0048] 本发明提供一个真菌免疫调节蛋白用来降低病患之血糖之用途，该蛋白质内含氨基酸序列 SEQ ID No :1 :

[0049] MSDTALFRLAWDVKKLSFDYTPNWGRGNPNFIDTVTFPKVLTDKAYTYRVAVSGRNLGVKPSYAVESD
GSQKVNFLYNSGYGADTNTIQVFVDPDTNNDFIQAQWN

[0050] 或

[0051] SEQ ID No :3

[0052] SATSLTFQLAYLVKKIDFDYTPNWGRGTPSSYIDNLTFPKVLTDKKYSYRVVNGSDLGVESNFAVTPS
GGQTINFLQYNKGYGVADTKTIQVFVVPDGTGNSEYIIAEWKKT。

[0053] 本发明中，该病患不限第一或二型糖尿病病患，特指针对遭受第二型糖尿病病患。

[0054] 下列实施例将进一步说明此发明之具体施行，而非限制此发明之范围。

附图说明

[0055] 图 1 是 A549 细胞以 FIP-gts 处理过后的形态改变。A549 细胞以不同浓度 (0、1、2、4 及 10 μ g/ml) 的 FIP-gts 处理并在不同时间 (6、12、24 及 72hrs) 观察之结果。

[0056] 图 2 是人类黑色素瘤细胞株 A375 在以 FIP-gts 处理过后的形态改变。细胞以 0、4 及 16 μ g/ml 的 FIP-gts 处理 0、24 及 48 小时，并在以相位差照相机照相 (x100)。

[0057] 图 3 是 A549 以 FIP-gts 处理后的细胞生长速度。A549 细胞以不同浓度 (0、1、2、4 及 10 μ g/ml) 的 FIP-gts 处理并在 48 小时后以锥虫蓝染色剂染色，估算存活之细胞。数据以中位数加三重复之标准差 (显著性：学生 T 检验，*p<0.05)

[0058] 图 4 是 A549 以 FIP-gts 处理后的细胞群落形成 (Colony forming) 效应 (A) 以细胞群落形成分析不同浓度 (0、0.4、1 及 2 μ g/ml) 的 FIP-gts 处理后，A549 细胞在无法固定的培养基上之生长状况。(B) 细胞群落数量以解剖显微镜观察并计数，每细胞群落最少要有 50 颗细胞。数据以中位数加三重复之标准差 (显著性：学生 T 检验，*p<0.05)

[0059] 图 5 是以 FIP-gts 处理后 A549 在不同时间点的细胞周期进程。以 10% 之 DMEM 使细胞再悬浮 (A) 以流式细胞仪检测细胞并以 Cellquest 软件搜集数据。(B) 资料以 ModFitLT3.0 分析。数据以中位数加三重复之标准差 (显著性：学生 T 检验，*p<0.05)

[0060] 图 6 是 A549 细胞分别以 0、2、4 及 10 μ g/ml 后的 p21 及 procaspase-3 表达。细胞溶解产物在 48 小时后及表达时收集，并以 Western 印迹法做分析。

[0061] 图 7 是以 FIP-gts 处理后 A549 的移行能力分析。以移液器之蓝色尖头在长满的 A549 上刮一道伤痕 (箭头指示原始伤口之大小)，培养 72 或 96 小时后固定细胞并以 Giemsa

染剂染色。

[0062] 图 8 是以 FIP-gts 处理后 A549 中 MMP-2 之活性。(A) A549 细胞以不同浓度 (0、1、2、4 及 10 μ g/ml) 的 FIP-gts 处理 24 小时后, 收集培养液, 以明胶-酶谱法分析 MMP-2 之活性。(B) MMP-2 的活性以密度分析仪量化 (densitometric analysis), 量化之数据以中位数加三重复之标准差 (显著性: 学生 T 检验, * $p < 0.05$)

具体实施方式

[0063] 实施例一: 改变细胞形态

[0064] A549 细胞株属于人类肺癌表皮细胞, 此肺癌细胞株因为具有高度移行能力 (migratory capability) 而相当恶性。本发明以 A549 肺癌细胞株当癌症模型, 研究癌细胞对 FIP-gts 之反应。

[0065] 首先, 本发明以显微镜观察以 FIP-gts 处理过后的细胞形态改变, A549 细胞分别以不同浓度 (0、1、2、4 及 10 μ g/ml) 的 FIP-gts 处理并在不同时间观察并以照相纪录其细胞形态变化 (图一)。

[0066] A549 细胞在 2、4 或 10 μ g/ml 的 FIP-gts 处理之下, 细胞形态在 6 小时后就有显著变化, 细胞形态由触角状的紧贴 (adhering with little tentacles) 状态, 变成圆形且贴附性差 (round and loosely-attached) 的形态, 这些圆形细胞会因为轻微摇动培养皿而漂起。72 小时之后, 没有药物处理或是以低浓度 FIP-gts 处理的 A549 细胞形态摊平扩散并完全覆盖培养皿的表面, 相反的以高浓度 FIP-gts 处理的 A549 细胞无法覆盖培养皿的表面, 而且许多细胞呈现圆形的形态 (图二); 正常肺组织细胞株 BEAS-2B 在 0、2、4 或 10 μ g/ml 的 FIP-gts 处理之下并不会细胞形态的改变, 没有药物处理或是以 FIP-gts 处理的 BEAS-2B 细胞在 24 小时里有相同的生长速度, 而且几乎同时完全覆盖培养皿的表面 (图二)。以正常肺组织细胞株 BEAS-2B 当对照组实验发现, 正常细胞不会被 FIP-gts 影响, 可以在生长 24 小时后完全覆盖培养皿的表面。

[0067] 使用人类黑色素恶性肿瘤细胞株 A357 进行试验, 发现以松杉灵芝蛋白处理之 A357 细胞, 似乎失去细胞与细胞之间的附着力, 细胞不再是紧密地互相接触, 而是杂乱地散布 (图 2)。分别以 0、4 以及 16 μ g/ml 松杉灵芝蛋白处理 A357 细胞, 并观察 24、48 以及 72 小时, 发现所用的松杉灵芝蛋白浓度愈高, 有愈多的细胞变成圆形 (图 2), 图 2 显示 16 μ g/ml 的松杉灵芝蛋白能够大大地抑制细胞附着性以及细胞成长。如前文所述, 证实松杉灵芝蛋白是通过重组细胞架构, 而改变细胞之移动性与附着性。

[0068] 实施例二: 细胞存活能力分析 (Cell viability assay)

[0069] 进一步证实上述之实验结果, 本发明以锥虫蓝 (trypan blue) 染色以检查细胞存活能力。本发明以与前述实验相同的 FIP-gts 浓度 (0、1、2、4 与 10 μ g/ml 的 FIP-gts) 处理细胞 48 小时, 然后加入锥虫蓝, 活细胞不会被锥虫蓝染色, 本发明以计算没被染色的细胞 (活细胞) 数量当成细胞之存活能力。

[0070] 本发明在 6 厘米培养皿中分别接种 (inoculated) 2×10^5 H1355 与 A549 细胞, H1355 细胞株是一般研究新陈代谢之细胞模型, 在 37°C 培养 16 小时后, 更换新的培养液, 同时分别加入不同浓度的 FIP-gts (0、1、2、4 与 10 μ g/ml)。

[0071] 在 48 小时后收集 FIP-gts 药物处理的细胞, 把旧的培养液移除并将细胞收

集在 15ml 离心管中,细胞以 1×PBS 清洗两次,于室温下离心 1 分钟后,将细胞再悬浮(resuspended)于 0.5ml 的 TE 缓冲溶液中,以原来之培养液中和此溶液,将细胞移到 15ml 离心管,以 800rpm 离心 5 分钟,上清液去除并丢弃,细胞以 0.5ml 之 1×PBS 打散,取出 20 μ l 细胞,并加入 5 μ l 锥虫蓝溶液染色,再以细胞计数器算出细胞数量。

[0072] 细胞之存活率以 48 小时后没有处理 FIP-gts (0 μ g/ml FIP-gts) 之细胞数为基准 (100%),而 48 小时后,不同浓度的 FIP-gts (1、2、4 与 10 μ g/ml) 处理的细胞存活率分别为:98.2%、94.8%、80.0%与 60.3% (图三),此结果与下述之 MTS 细胞活性分析法分析结果一致,这两个实施例证实 FIP-gts 对 A549 肺癌细胞株有毒杀作用,并且会抑制细胞生长与降低细胞存活率。

[0073] 实施例三:计算细胞数量—细胞群落形成 (Colony forming)

[0074] 本实验将以细胞群落形成 (Colony forming) 法分析 FIP-gts 对癌细胞之毒杀作用,A549 细胞以不同浓度的 FIP-gts (0、0.4、2 与 10 μ g/ml),FIP-gts 药物处理 24 小时后,再将处理后之细胞以每 6cm 培养皿植入 400 颗细胞培养 12 天。

[0075] 首先,本发明在 6 厘米培养皿中分别接种 (inoculated) 2×10^5 A549 细胞,在 37°C 培养 16 小时后,更换新的培养液,同时分别加入不同浓度的 FIP-gts (0、0.4、1、2 与 10 μ g/ml) (图四)。处理 24 小时后细胞以 1×PBS 清洗两次,药物处理的细胞再重新置入,1ml 的 TE 缓冲溶液加入并在 37°C 静置 1 分钟,以打散细胞。序列稀释以精准估算细胞数,在以每 6cm 培养皿植入 400 颗细胞,在 37°C 培养 12 天后,细胞以 1×PBS 清洗两次,再以 0°C,2ml 95% 乙醇加入个别培养皿中,在室温静置 20min,再将乙醇倒掉,个别培养皿中再加入 2ml 10% Giemsa 染色,室温静置 30min,将 10% Giemsa 染剂倒掉并收集,以清水冲洗染色的细胞,晾干并观察。

[0076] A549 细胞之存活率以没有处理 FIP-gts (0 μ g/ml FIP-gts) 之细胞数为基准 (100%),不同浓度的 FIP-gts (0.4、1、2 与 10 μ g/ml) 处理的 A549 细胞存活率分别为 97.3%、91.5%、69.6%及 39.0% (图四 A、图四 B),除了以 1 μ g/ml FIP-gts 处理的细胞外,其它实验组的存活率皆显著下降 (标准 T 检验, $p < 0.05$),与本发明的细胞计数结果相似,因此本发明认为,FIP-gts 对 A549 癌细胞有毒杀作用,并抑制其细胞群落形成。

[0077] 实施例四:流式细胞仪

[0078] 本发明发现以 FIP-gts 处理的细胞会降低存活率,而其可能机制也许是 FIP-gts 抑制细胞生长或是 FIP-gts 诱导细胞凋亡 (apoptosis);为了进一步了解 FIP-gts 之抑癌机制,本发明以流式细胞仪分析 FIP-gts 对细胞之影响。

[0079] 首先,本发明在 6 厘米培养皿中分别接种 (inoculated) 5×10^5 细胞,加入 5ml 培养液,在 37°C 培养 16 小时后,以 1×PBS 清洗两次,更换新的培养液,同时分别加入不同浓度的 FIP-gts (0、2、4 与 10 μ g/ml),处理 24 与 48 小时后以下列程序收集细胞:

[0080] a. 将旧的培养液移入 15ml 离心管。

[0081] b. 以冷的 1×PBS 清洗两次。

[0082] c. 将细胞以 1×Trypsin-EDTA 处理,由培养皿分离下来。

[0083] d. 将旧的培养液加入,停止 1×胰蛋白酶-EDTA 反应,将细胞冲下并

[0084] 移入 15ml 离心管。

[0085] e. 以 800rpm 离心 5min,倒掉上清液,以 1×PBS 清洗两次。

- [0086] f. 加入冷的 1ml 70%乙醇,一面加一面摇晃,置入 4℃冰箱隔夜处理,以安定细胞。
- [0087] 理,以安定细胞。
- [0088] g. 以 800rpm 离心 5min,倒掉上清液。
- [0089] h. 以冷的 1×PBS 清洗两次,倒掉上清液,并尽可能干燥。
- [0090] i. 在避光状态下在每离心管加入 1ml 碘化丙啶 (propidium iodide)
- [0091] 混合物:
- | | | |
|--------|---------------------|-------------|
| [0092] | 1×pBS | 550 μ l |
| [0093] | 5% Triton X-100 | 200 μ l |
| [0094] | 250 μ g/ml 碘化丙啶 | 200 μ l |
| [0095] | 10mg/ml RNaseA | 50 μ l |
- [0096] 最终浓度为:1% Triton X-100,0.5mg/ml RNase A and 4 μ g/ml PI
- [0097] j. 室温静置 30min。
- [0098] k. 将过大的细胞块以 40 μ m 尼龙网过滤,将单细胞悬浮液置入流式细胞仪分析管中。

[0099] 为了分析细胞中的 DNA 含量,本发明以 FACSCalibur (BECTONDICKINSON) 细胞流速仪检测被 PI 染到的 DNA 释放出波长 617nm 的红色荧光,再将检测之数据以 CELL Quest 程序收集,并以 Mod Fit 3.0 程序分析细胞周期。

[0100] 以流式细胞仪分析,本发明发现以 FIP-gts 处理的细胞,最少有 30% 会停在细胞周期的 G1 期。停在细胞周期的 G1 期细胞数量增加,会让分布于细胞周期的 S 期细胞数量减少,换句话说,FIP-gts 抑制细胞生长。少数细胞停在次 G1 期,以 FIP-gts 处理的细胞第二天,有最大量的细胞比例 (大约 1.6%) 停在次 G1 期,此现象显示, FIP-gts 降低细胞存活率主因为使细胞停在细胞周期的 G1 期,然而同时有部分细胞会进入细胞凋亡。

[0101] 实验结果显示,细胞 G1 期现象随着 FIP-gts 处理浓度提高而增加,所有分布于各细胞周期之细胞数为 100%,24 小时后,不同浓度的 FIP-gts (0、1、2、4 与 10 μ g/ml) 处理的 A549 细胞产生 G1 期之比率分别为:58.2%、59.1%、62.0%、64.0%及 75.5%,停在细胞周期的 G1 期细胞数量增加,会让分布于细胞周期的 S 期细胞数量减少,相同 FIP-gts 处理条件下,A549 细胞分布于细胞周期的 S 期之比率分别为:32.8%、30.9%、30.1%、27.2%及 18.2% (图五 A,图五 B)。实验结果同时显示,细胞 G1 期现象随着 FIP-gts 处理时间增加而增加,48 小时后,相同 FIP-gts 处理条件下的 A549 细胞产生 G1 中止之比率分别为:60.2%、68.8%、72.6%、76.1%及 82.1%,停在细胞周期的 G1 期细胞数量增加,会让分布于细胞周期的 S 期细胞数量减少,相同 FIP-gts 处理条件下,A549 细胞分布于细胞周期的 S 期之比率分别为:31.8%、25.1%、23.0%、20.0%及 13.8%,此实验结果证明, FIP-gts 会使 A549 细胞停在细胞周期的 G1 期 (图五 A,图五 B)。

[0102] 我们同时发现,当 A549 细胞以 10 μ g/ml 的 FIP-gts 处理后,少数细胞会停在次 G1 期,意指部分细胞会进行细胞凋亡,10 μ g/ml 的 FIP-gts 处理 24 与 48 小时后,分别有 0.9% 与 1.6% A549 细胞会停在次 G1 期 (图五 B)。

[0103] 实施例五:Western 印迹法

[0104] 细胞中的 p53 蛋白会受到胞外刺激 (如 UV 照射,化疗药物顺铂 (cisplatin) 处理) 活化而稳定, p53 会进一步活化其下游基因,包括 p21 与 Bax。p21 基因主要抑制细胞

周期进入 G1 期 (Zhong, X et. al., 2004. Int. J. Cancer), 本发明以 Western 印迹法发现, 以 FIP-gts 处理细胞 48 小时后, p53 基因蛋白会被诱导表达, 同时也会诱导 p21 基因之蛋白质。此结果显示 FIP-gts 会使 A549 细胞中的 p21 活化而停在细胞周期的 G1 期。

[0105] 目前已知有三个与细胞凋亡相关的途径, 分别是经过内质网 (Endoplasmic Reticulum, ER), 死亡受体 (death receptor) 与线粒体 (mitochondria), 这三个途径都会造成半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶 -3 (procaspase-3, 32kDa) 被切割, 产生活化型 caspase-3 (17kDa)。Caspase-3 是 caspase 序列反应的最终执行者, 它会造成细胞凋亡, DNA 断裂, 细胞核聚集与形成核涵体 (nuclear inclusions) (Di Pietro, R., et al. (2004) Int J Immunopathol Pharmacol 17(2) 181-190)。本发明发现当细胞以高浓度 FIP-gts 处理时, 会让 procaspase-3 量减少, 而产生活化的 caspase-3。

[0106] 本发明从流式细胞仪结果发现 FIP-gts 会让培养的细胞停在细胞周期 G1 期, 同时会造成一部分的细胞凋亡, 因此本发明将进一步检验细胞以 FIP-gts 处理后相关蛋白质表达量的改变。

[0107] a. 检体制备:

[0108] 本发明在 6 厘米培养皿中分别以 5×10^5 细胞密度接种 (inoculated) A549 细胞, 加入 5ml 培养液, 在 37℃ 培养 16 小时后, 分别加入不同浓度的 FIP-gts (0, 2, 4 与 10 μ g/ml) 处理 48 小时后将细胞由培养皿移至离心管, 以 1×PBS 清洗两次, 到去上清液, 再加入细胞缓冲液 (10mM EDTA, 10mM EGTA, 5mM NaF, 10% 甘油 (glycerol), 1mM DTT, 400mM KCl, 0.4% Triton X-100, 20mM 钠 β -甘油磷酸, 0.1mM Na_3VO_4 , 1mM PMSF/DMSO, 3 μ g/ml 蛋白酶抑制剂 (aprotinin), 2 μ g/ml 胃蛋白酶抑制剂 (pepstatin A), 2 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽 (Leupeptin), 1X 磷酸水解酶抑制者组成物 I (phosphatase inhibitor cocktail I) (Sigma, P2850); 1X 磷酸水解抑制者组成物 II (Sigma, P5726)) 以溶解细胞。将细胞溶解反应混合物至于冰上, 并以超音波均质机 (ultrasonic homogenizer) 在 4℃ 将细胞均质化, 重复此动作两次, 每次间隔超过 10 分钟; 以 12000rpm, 4℃ 进行 20min 条件离心后, 将上清液移至已灭菌 1.5ml 离心管, 并检测蛋白质含量。将检体加入 2X SDS 样本缓冲液 (200mM Tris pH6.8, 8% SDS, 40% 甘油, 2.86M 2-mercaptoethanol 及适量的溴酚蓝 (bromophenol blue)), 并以 95℃ 加热。上述步骤须再两小时完成。

[0109] b. 蛋白质定量

[0110] 本发明以 Bio-Rad 溶液定量蛋白质, Bio-Rad 试剂首先以 H_2O 以 4 : 1 稀释, 此为 Bio-Rad 蛋白质检测试剂, 将 2 μ l 检体加入 498 μ l Bio-Rad 蛋白质检测试剂, 37℃ 反应 20min, 以光度计 (spectrophotometer) 检测 595

[0111] nm 波长之吸收, 检测值与以牛血清白蛋白 (BSA, bovine serum albumin) 当标准样品绘出之曲线比较, 算出蛋白质含量 (μ g/ μ l); BSA 标准曲线绘制: 取 2、4、6、8、10 μ g BSA 分别置入 498、496、494、492 与 490 μ l 之 Bio-Rad 蛋白质检测试剂, 以光度计 (spectrophotometer) 检测 595nm 波长之吸收, 绘制出光吸收与蛋白质含量的相关曲线。由此方法, 可以计算检体蛋白质之含量。

[0112] c. SDS-PAGE (十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳)

[0113] 表 1 以下列配方制备分离胶体 (Running/separating gel)

[0114]

	15 %	12.5 %	10 %
dd H₂O	6.3 ml	7.6 ml	8.8 ml
1.5M Tris pH 8.8	5 ml	5 ml	5 ml
(38.67:1.33)Acrymide:Bis	7.5 ml	6.2 ml	5 ml
10% SDS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
APS(10 mg/ml)	1 ml	1 ml	1 ml
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l
总量	20 ml	20 ml	20 ml

[0115] 表 2 制备 3%堆积胶体 (Stacking gel)

[0116] dd H₂O 3.54ml

[0117] 0.5MTris pH 8.8 1.5ml

[0118] (38.67 :1.33)Acrymide :Bis 0.45ml

[0119] 10% SDS 0.06ml

[0120] APS(10mg/ml) 0.3ml

[0121] TEMED 15 μ l

[0122] 总量 6ml

[0123] 将检体以 SDS-PAGE 电泳分析时准备转渍膜 Hybond-P membrane (Pharmacia), 将膜以甲醇浸泡 15 秒, 以 ddH₂O 清洗 10min, 再将膜以转渍溶液中浸泡 (transfer buffer : 20% 甲醇、192mM 甘氨酸、25mMTris-HCl, pH 9.2) 10min。SDS-PAGE 电泳后将电泳胶小心移出, 置于 Hoefer Semiphor Transfer 以标准程序将蛋白质转渍至转渍膜上, 转渍后, 将转渍膜浸入封闭缓冲液 (Blocking buffer) (5% 脱脂奶粉在 TTBS 缓冲液中 : 50mM Tris, 0.2% Tween 20, 150mM NaCl, pH 7.5) 37℃ 反应一小时。

[0124] 抗体检测

[0125] 将具专一性的抗体加入在上述封闭过的转渍膜上 (blocked Hybond-Pmembrane), 以含 3% BSA 的 1X TTBS 缓冲液稀释下列一级多株抗体 (primary polyclonal antibody) : anti-caspase-3 (1 : 500, Cayman)、anti-COX-2 (1 : 1000, Cayman#160106), 以含 5% 脱脂速溶奶粉的 1X TTBS 缓冲液稀释下列一级多株抗体 anti-BAX (1 : 8000, R&D)、p53 (1 : 500, DAKO)、p21 (1 : 500, Zymed), 将转渍膜置入含稀释抗体之缓冲溶液, 4℃ 摇晃反应 16 小时, 将转渍膜以 100ml 含 3% 脱脂速溶奶粉 1X TTBS 缓冲液洗两次, 以含 3% 脱脂速溶奶粉的 1X TTBS 缓冲液稀释的二级抗体 (anti-rabbit IgG-HRP (1 : 5000, Cell Signaling#7074), 抗-老鼠 IgG-HRP (1 : 10000, Chemicon AP124P)), 再将转渍膜分别置入含稀释二级抗体之缓冲溶液, 室温摇晃反应一小时, 重复清洗步骤。准备冷光呈色剂 (NEN、NEL105、1 : 1 与强化发光剂 (Enhanced luminol reagent) 及氧化剂 (Oxidizing reagent), 混合 5min) 将转渍膜呈色, 并以 X-ray 底片显像。

[0126] G1 期中最重要的检查者是 p21 蛋白, 本发明发现 : 以不同浓度的 FIP-gts (0、2、4 与 10 μ g/ml) 处理 48 小时后 p21 表达量显著增加 (图六), 已知 p21 会被 p53 活化, Western 印迹法结果显示 p53 表达量会被 FIP-gts 诱导 (图六), 因此本发明认为的细胞存活率分别为 FIP-gts 会诱导 p53 表达, 进一步增加 p21 的量与造成 G1 期。

[0127] 进一步分析 FIP-gts 是否会抑制细胞分化或是对细胞有毒杀作用, 本发明以 Western 印迹法检验 caspase-3 表达量。本发明发现以 10 μ g/ml 浓度的 FIP-gts 处理 48

小时后 procaspase-3 减少 (图六), 而 FIP-gts 处理后 procaspase-3 会活化成 caspase-3, 让细胞进行细胞凋亡, 意指细胞数的降低不是因为细胞凋亡的增加, 而是细胞分化被抑制。

[0128] 实施例六: 伤害 / 复原分析 (Wound healing assay)

[0129] 利用伤害 / 复原分析, 本发明发现 FIP-gts 可以有效抑制肺癌细胞的移行能力。

[0130] 本发明在 24 孔培养皿中分别以 2×10^5 细胞密度接种 (inoculated) A549 细胞, 让细胞生长致几乎完全覆盖培养皿, 更换含 0.5% FBS 培养液培养 24 小时, 以抑制细胞生长; 用移液器之蓝色尖头在长满的 A549 上刮一道伤痕, 以 $1 \times \text{PBS}$ 清洗, 更换新的培养液, 同时分别加入不同浓度的 FIP-gts (0、1、2、4 与 $10 \mu\text{g/ml}$) 处理, 每 24 小时照一次相纪录细胞生长。

[0131] 一般而言, 癌症细胞在其转移之前, 他会有移行能力 (正常细胞不太会移动), 本发明以伤害 / 复原分析检验细胞以不同浓度的 FIP-gts (0、1、2、4 与 $10 \mu\text{g/ml}$) 处理后, 其移行能力是否增加。实验发现, 当细胞以 FIP-gts 处理 48 小时后, 移行能力并没有显著的变化; 当分别以 0、1、2 $\mu\text{g/ml}$ 的 FIP-gts 处理 72 小时后, 细胞可以往被划开的区域生长, 而分别以 4、10 $\mu\text{g/ml}$ 的 FIP-gts 处理 72 小时后, 细胞移行能力几乎没有显著的变化; 96 小时后, 没有 FIP-gts 药物处理的细胞可以覆盖大约 1/3 的划开区域, 以低浓度 FIP-gts 药物处理的细胞有些微移行能力, 然而高浓度 FIP-gts 药物处理的细胞不会移行 (图七)。

[0132] 利用伤害 / 复原分析, 本发明发现 FIP-gts 可以有效抑制肺癌细胞的移行能力; 当 FIP-gts 药物处理浓度达 4、10 $\mu\text{g/ml}$ 时细胞不会移行。实施例七: 明胶 - 酶谱法 (Gelatin Zymography) 分析

[0133] 当细胞转移 (metastasis) 时, 基质金属蛋白酶 (metalloproteinase, MMP) 将细胞间质 (extracellular matrix) 消化, 将细胞与细胞间质分开, 并提供其移行能力, 目前已知 MMP-2 与 MMP-9 大量表达于恶性癌症 (Johnsen, M., et al., Curr Opin Cell Biol, 1998. 10, pp. 667-671)。MMP-2 与 MMP-9 之表达量与癌症细胞转移 (metastasis) 有密切之关联 (Curran, S. and Murray, G. I. (2000) Eur J Cancer, Vol. 36, pp. 1621-1630., Liabakk, N. B., et al., Cancer Res, 1996. 56, pp. 190-196)。

[0134] 为了避免培养液血清 (Serum) 中的 MMP-2 与 MMP-9 干扰, 本发明已无血清培养液将 A549 细胞饥饿处理后, 再加 FIP-gts 药物处理, 以分析其 MMP 蛋白质之活性; 为了进一步确认明胶 - 酶谱法分析的细胞密度结果, 本发明以 Bio-Rad 试剂检测蛋白质浓度。

[0135] 本发明发现以高浓度的 FIP-gts 药物处理可以抑制 MMP-2 表达量, 而此 FIP-gts 药物处理抑制效应随剂量增加而显著。

[0136] 本发明在 24 孔培养皿中分别以 1×10^5 细胞密度接种 (inoculated) A549 细胞, 隔天更换无血清培养液, 并以不同浓度的 FIP-gts (0、2、4 与 $10 \mu\text{g/ml}$) 处理, 培养 24 小时, 移除培养液培养并以 $1 \times \text{PBS}$ 清洗两次。以 CE 缓冲溶液收集细胞并以 Bio-Rad 试剂检测蛋白质浓度。在 55°C 下, 以 2g 明胶溶于 100m 二次水中来制备 2% 明胶。

[0137] 表 3 以 0.1% 明胶来制备 8% SDS-PAGE gel。

[0138]

	8 %
dd H₂O	3.0 ml
1.5M Tris pH 8.8	2.0 ml
(38.67:1.33) Acrymide:Bis	2.2 ml
10 % SDS	0.08 ml
APS (10 mg/ml)	0.4 ml
2 % Gelatin	0.4 ml
TEMED	10 μ l
总量	8ml

[0139] 将凝胶以 Western 印迹法制备,置于电泳槽中,将培养液与 5X 染剂 (0.1% SDS、 10^4 mM Tris-HCl pH 6.8、50%甘油 (或 25g 蔗糖),0.125%溴酚蓝)混合,加在电泳胶上并开始进行电泳;电泳结束后以清洗液 (40mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM CaCl₂、2.5% Triton X-100) 于室温清洗电泳胶 30 分钟两次,再与反应缓冲溶液 (40mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM CaCl₂、0.01% NaN₃) 37℃反应 12 小时,以考马斯蓝 (0.2% Coomassie blue R-250、50%甲醇、10%醋酸) 染色 30 分钟,再以 10%醋酸及 20%甲醇退染。退染后,以 50% ddH₂O、50%甲醇及 0.33%甘油干燥,并将电泳胶以年糕纸封在 Plexiglas 板并风干。

[0140] 细胞的移行能力与 MMP 蛋白质分泌有关,在此,本发明以明胶-酶谱法分析细胞以 FIP-gts 药物处理后 MMP-2 的活性是否被改变;本发明发现 FIP-gts 浓度升高,MMP-2 表达量显著的下降 (学生 T 检验, $p < 0.05$),以没有处理 FIP-gts (0 μ g/ml FIP-gts) 之 MMP 表达量为基准 (100%),不同浓度的 FIP-gts (1、2、4 与 10 μ g/ml) 处理的 MMP 表达量分别为: 95.7%、90.3%、73.6% 与 29.8% (图八),因此本发明认为 FIP-gts 可以通过调控 MMP-2 蛋白而抑制癌细胞的移行能力。

[0141] 实施例八: 反转录聚合酶连锁反应分析 ((Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reactions. RT-PCR))

[0142] 以高浓度 FIP-gts 处理细胞会造成 MMP 蛋白表达量减少,本发明以 RT-PCR 以检测金属蛋白酶的组织抑制因子-1 (TIMP-1, Tissue Inhibitor of MetalloProteinase) 与血纤维蛋白溶原活化抑制剂-1 (PAI-1, Plasminogen Activator Inhibitor-1) 的基因转录,本发明发现,当细胞以不同浓度的 FIP-gts (0、2、4 与 10 μ g/ml) 处理 24 小时后, TIMP-1 (图十) 与 PAI-1 (图十三) 之信使核糖核酸 (mRNA) 下降,而 TIMP-2 不被影响 (图十二),因此本发明认为, FIP-gts 可以通过调控 MMP-2 mRNA 减少 (图十一) 而通过增加 TIMP-1 抑制其它的 MMP 蛋白 (例如 MMP-9),进而抑制癌细胞的转移能力。

[0143] 以 Promega RT-PCR kit 进行 RT-PCR:

[0144] 1 μ g 全部 RNA 以 70℃加热 10min.,再置于冰上冷却。然后以下列配方进行反应: 25mM MgCl₂ 24 μ l、5 $\times$ MMLV 缓冲液 4 μ l、10mM dNTP 混合物 2 μ l 核糖核酸酶抑制剂 (Recombinant Rnasin Ribonuclease inhibitor) 0.5 μ l、MMLV 反转录酶 1 μ l、寡 (dT) 15 引物 1 μ l 及加入不含核酸酶的水,直到总量达到 20 μ l。

[0145] 表 4 RT-PCR 所需之核酸引物 (Primer)

[0146]

酶	序列 5' → 3'	位置 (bp)	温度 (°C)
MMP-2	5' -GGCCCTGTCACTCCTGAGAT-3' 5' -GGCATCCAGGTTATCGGGGA-3'	1337-1356 2026-2007	62°C
TIMP-2	5' -TTTATCTACACGGCCCCCTCCTCAG-3' 5' -ACGGGTCCTCGATGTCAAGAACTC-3'	480-504 739-717	63°C
PAI-1	5' -GGATCCAGCCACTGGAAAGGCAACATG-3' 5' -GGATCCGTGCCGGACCACAAAGAGGAA-3'	1470-1490 1236-1216	55°C
TIMP-1	5' -TGGAGAGACACTGCCAACTTG-3' 5' -AGGCTGTGCCTTCCTACAGA-3'	1700-1720 2224-2204	58°C

[0147] 实施例九：增加细胞激素的表达

[0148] 人类周边血液单核球细胞 (PBMCs) 以 0、1.25、2.5、5 及 10 $\mu\text{g/ml}$ FIP-gts 处理。在 48 小时后以 ELISA 测量人类 PBMCs 的细胞激素表达。发现到当增加 FIP-gts 处理的浓度后,细胞激素 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 及 IL-4 的表达会跟着增加 (表 5)。

[0149] 表 5：人类 PBMCs 以 FIP-gts 处理的细胞激素表达的增加

[0150]

	FIP-gts ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	1.25	2.5	5	10
IL-2 (pg/ml)	116	316	272	425	1218
IFN- γ (pg/ml)	70	4135	4578	4378	4372
TNF- α (pg/ml)	89	1174	2076	3525	2219
IL-4 (pg/ml)	5	3	7	13	39

[0151] 实施例十：比较在三种不同细胞株上的 FIP 效应

[0152] 用来看 FIP 效应的三种癌细胞株：人类前列腺癌细胞株 PC3、人类乳癌细胞株 MDA231 及人类黑色素瘤细胞株 A375 (表 6)。FIP-gts 效应的评估,遵循着实施例 1 所披露的实验步骤,是以观察受 FIP-gts 处理后的细胞形态改变进行；遵循着实施例 3 所披露的实验步骤,是以测量细胞增殖的抑制进行；及遵循着实施例 4 所披露的实验步骤,是以测量菌落形成的抑制进行。

[0153] 表 6 在不同癌细胞株上 FIP-gts 的效应

[0154]

细胞株	细胞株起源	形态变化	细胞生长抑制	菌落生长抑制
PC3	人类前列腺癌	n. d.	+	+

MDA231	人类乳癌	n. d.	+	+
A375	人类黑色素瘤	+	+	+

[0155] 实施例十一

[0156] 材料与方法

[0157] 动物品系

[0158] 由中国台湾实验动物中心 (National Laboratory Animal Center in Taiwan) 所购买之 4 ~ 5 周大的 BALB/c 小鼠。

[0159] FIP-gts 剂量

[0160] 低剂量 : 200 微克 / 公斤重 / 天, 高剂量 : 600 微克 / 公斤重 / 天 ; 阳性对照组剂量 (以台湾市售之灵芝粉为对照组) : 300 毫克 / 公斤重 / 天 喂食周期, 喂食途径与喂食期间 :

[0161] 初期, 以高剂量 FIP-gts 为喂食配方, 接着以中剂量与低剂量稀释高剂量的配方 ; 从测试第一天起, 每一试验组每天由口部喂食持续 6 星期。分析方法

[0162] 1. 自然杀手细胞 (natural killer cells) 活性分析 (非专一性免疫调节功能测试)

[0163] 小鼠喂食 FIP-gts 六周后, 取出其胰脏, 以流式细胞仪分析喂食 FIP-gts 不同剂量实验组与阴性对照组间自然杀手细胞 (natural killer cells) 活性的差异。

[0164] 2. 巨噬细胞 (Macrophages) 活性分析 (非专一性免疫调节功能测试)

[0165] 小鼠喂食 FIP-gts 六周后, 由其腹部取出巨噬细胞 (Macrophages), 以巨噬细胞吞噬以荧光标定的大肠杆菌 (E. coli.), 再以流式细胞仪分析喂食 FIP-gts 不同剂量实验组与阴性对照组间巨噬细胞 (Macrophages) 活性的差异。

[0166] 3. 血清抗体的制造 (非专一性免疫调节功能测试)

[0167] 小鼠喂食 FIP-gts 前与被宰杀后, 采取其血液以分析血液中免疫球蛋白浓度变异, 以分析喂食 FIP-gts 不同剂量实验组与阴性对照组间的差异。

[0168] 4. 细胞激素之分泌量分析 (专一性免疫调节功能测试)

[0169] 在经过 10 星期之服用松杉灵芝蛋白以及两次之注射卵蛋白素 (OVA, ovalbumin) 之后, 宰杀该实验动物, 以洋刀豆血球凝集素 (Con A, Concanavalin A)、脂多糖 (LPS, Lipopolysaccharide) 或是卵蛋白素刺激其脾脏细胞, 在经过 48 ~ 72 小时培养后, 以 " 酶联免疫吸附实验 (ELISA) " 测量细胞激素之含量, 把每一组剂量所测得的数值与阴性对照组作比较, 若 p 值小于 0.05, 即代表有显著差异。

[0170] 5. 血清中抗卵蛋白素之免疫球蛋白分析 (专一性免疫调节功能测试)

[0171] 在研究松杉灵芝蛋白之前, 先将该实验动物进行免疫、再激活, 并在宰杀该实验动物前, 自后眼窝采取血液样本。以酶联免疫吸附实验测量血清中抗卵蛋白素之免疫球蛋白生成量。把每一组剂量所测得的数值与阴性对照组作比较, 若 p 值小于 0.05, 即代表有显著差异。

[0172] 结果

[0173] 1. 自然杀手细胞 (natural killer cells) 活性分析 (非专一性免疫调节测试)

[0174] 小鼠宰杀后, 取出其胰脏以分析其自然杀手细胞 (natural killer cells) 活性 ; 与阴性对照组比较, 实验组在 E/T 比值 (Effector/Target ratio) 小于 12.5 不具有显著性,

与阴性对照组比较,喂食高剂量 FIP-gts 实验组与阳性对照组在 E/T 比值小于 25 具有显著性,与阴性对照组比较,喂食低、高剂量 FIP-gts 实验组与阳性对照组在 E/T 比值小于 50 具有显著性。实验显示 FIP-gts 增加自然杀手细胞的活性。(表 7)

[0175] 表 7

		E/T ratio			
组别	小鼠数				
		12.5	25.0	50.0	
[0176]	A	10	17.5± 8.69	25.5± 8.16	26.9± 6.57
	B	10	25.7± 8.59	34.9± 8.20*	38.8± 6.80*
	C	10	23.9± 10.52	32.8± 7.92*	38.1± 7.66*
	D	10	25.2± 9.85	33.9± 10.16*	38.7± 9.22*

[0177] 此试验以流式细胞仪分析自然杀手细胞之细胞毒杀活性 (cytotoxicity assay)。

[0178] (*) 表示与阴性对照组之统计分析之显著性

[0179] E :反应者细胞, T :目标细胞

[0180] A :阴性对照组 B :喂食低剂量 FIP-gts 实验组

[0181] C :喂食高剂量 FIP-gts 实验组 D :阳性对照组

[0182] 2. 巨噬细胞 (Macrophages) 活性分析 (非专一性免疫调节测试)

[0183] 小鼠宰杀后,由其腹部取出巨噬细胞,以 FITC 绿色荧光标定的大肠杆菌 (FITC-E. coli) 加在取出之巨噬细胞,让其吞噬,再以流式细胞仪分析巨噬细胞活性;与阴性对照组比较,喂食低、高剂量 FIP-gts 实验组的感染剂量 (MOI, multiplicity of infection) = 30 时具有显著性;实验显示 FIP-gts 增加巨噬细胞的活性。(表 .8)

[0184] 表 8.

组别	小鼠数	MOI=30		MOI=50	
[0185]	A	10	42.17± 8.89	46.33± 12.57	
	B	10	54.85± 8.73*	52.30± 9.05	
	C	10	53.09± 15.73*	49.74± 9.18	
	D	10	51.07± 8.43	46.11± 6.66	

[0186] 此试验以流式细胞仪分析巨噬细胞之吞噬活性。

[0187] (*) 表示与阴性对照组比较之统计分析之显著性

[0188] MOI :multiplicity of infection, 感染剂量

[0189] A :阴性对照组 B :喂食低剂量 FIP-gts 实验组

[0190] C :喂食高剂量 FIP-gts 实验组 C :阳性对照组

[0191] 3. 血清抗体的获得 (非专一性免疫调节测试)

[0192] 小鼠喂食 FIP-gts 前与被宰杀后,采取其血液以分析血液中免疫球蛋白浓度变化,以分析喂食 FIP-gts 不同剂量实验组与阴性对照组间的差异。血清中免疫球蛋白 G (IgG) 的浓度在喂食 FIP-gts 前显示与阴性对照组比较,喂食高剂量 FIP-gts 与阳性对照组都有统计显著差异,而血清中免疫球蛋白 M (IgM) 的浓度在喂食不同剂量 FIP-gts 实验组与阴性对照组间无统计显著差异。(表 .9)

[0193] 表 9

		Ig G (μg/ml)	
组别	小鼠数		
		喂食 FIP-gts 前	小鼠被宰杀后
[0194]			
A	10	431.06± 103.42	980.11± 163.89
B	10	504.22± 114.57	1324.55± 249.15*
		Ig M (μg/ml)	
组别	小鼠数		
		喂食 FIP-gts 前	小鼠被宰杀后
[0195]			
A	10	356.87± 24.59	461.84± 103..5
B	10	333.17± 54.36	500.54± 46.09

[0196] 此实验以酶联免疫吸附实验分析 (ELISA, enzyme-link immunosorbent assay) 血清中的免疫球蛋白。

[0197] (*) 表示与阴性对照组比较之统计分析之显著性 ($p < 0.05$)

[0198] A: 阴性对照组 B: 喂食高剂量 FIP-gts 实验组

[0199] 4. 细胞激素之分泌量 (专一性免疫调节测试)

[0200] 以刺激物 (洋刀豆血球凝集素或脂多糖或卵蛋白素) 刺激脾脏细胞, 在经过 48 ~ 72 小时培养之后, 以酶联免疫吸附实验测量细胞激素之含量。在经过洋刀豆血球凝集素之刺激后, 介白质素 -2 于低浓度的松杉灵芝蛋白组之分泌量, 明显高于阴性对照组之分泌量; 在经过卵蛋白素之刺激后, 介白质素 -2 于每一种浓度的松杉灵芝蛋白组与阳性对照组之分泌量, 明显高于高于阴性对照组之分泌量。

[0201] 在经过洋刀豆血球凝集素之刺激后, 肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 于每一种浓度的松杉灵芝蛋白组与阳性对照组之分泌量, 明显高于高于阴性对照组之分泌量。在经过卵蛋白素之刺激后, 干扰素 - γ (IFN- γ) 于高浓度的松杉灵芝蛋白组与阳性对照组之分泌量, 明显高于高于阴性对照组之分泌量。

[0202] 上述结果呈现于表 10, 松杉灵芝蛋白能够促进细胞机素之分泌

[0203] 表 10、脾脏之细胞激素分泌量

	组别	动物 样本数	培养液	洋刀豆血球凝集素	脂多醣	卵蛋白素
				IL-2 (pg/ml)		
	A	10	10.71± 3.30	3224.48± 257.61	19.74± 6.64	16.68± 2.96
	B	10	11.01± 2.91	3674.83± 800.84	21.52± 5.78	25.58± 7.18
	C	10	12.28± 7.90	3783.18± 892.71	22.47± 4.76	26.90± 7.01*
	D	10	11.60± 5.26	3364.50± 494.03	21.05± 6.05	28.52± 14.01*
				TNF-α(pg/ml)		
[0204]	A	10	4.14± 5.21	14.26± 3.51	169.25± 104.31	4.93± 5.91
	B	10	3.68± 4.67	18.29± 4.06*	186.97± 84.15	6.00± 6.46
	C	10	3.22± 5.92	19.94± 4.47*	243.64± 146.35	6.15± 6.62
	D	10	4.72± 6.02	18.77± 3.63*	227.41± 122.00	5.90± 6.10
				IFN-γ(pg/ml)		
	A	10	8.29± 6.19	2297.73± 842.49	14.95± 9.64	4.16± 4.44
	B	10	8.19± 5.19	2451.23± 879.89	16.78± 6.33	10.54± 4.35
	C	10	8.45± 5.53	2404.08± 623.07	20.70± 16.67	18.67± 11.70*
	D	10	8.30± 5.37	2269.64± 328.37	15.12± 8.55	13.05± 10.52*

[0205] 以酶联免疫吸附实验测量脾脏细胞激素之含量。

[0206] * :表示与阴性对照组比较之统计分析之显著性

[0207] A :阴性对照组 B :喂食低剂量 FIP-gts 实验组

[0208] C :喂食高剂量 FIP-gts 实验组 D :阳性对照组

[0209] 5. 血清中抗卵蛋白素之免疫球蛋白生成量 (专一性免疫调节)

[0210] 在研究松杉灵芝蛋白之前,将该实验动物先进行免疫、再激活,并在宰杀该实验动物前,自后眼窝采取血液样本。以酶联免疫吸附实验测量血清中抗卵蛋白素之免疫球蛋白生成量。

[0211] 在研究、先免疫以及再激活前,抗卵蛋白素之免疫球蛋白 G(IgG)、抗卵蛋白素之免疫球蛋白 M(IgM) 以及抗卵蛋白素之免疫球蛋白 E(IgE) 于每一组的条件下,并无显著差异。

[0212] 在宰杀动物前,抗卵蛋白素之免疫球蛋白 G 于每一种浓度的松杉灵芝蛋白组与阳性对照组之生成量,明显高于高于阴性对照组之生成量。抗卵蛋白素之免疫球蛋白 M 于高浓度的松杉灵芝蛋白组与阳性对照组之生成量,明显高于高于阴性对照组之生成量。但是卵蛋白素之免疫球蛋白 E 于每一组之生成量,没有明显差异。

[0213] 上述结果表示于表 11 中,松杉灵芝蛋白可以促进血清中抗卵蛋白素之免疫球蛋白的生成量。

[0214] 表 11、血清中抗卵蛋白素之免疫球蛋白生成量 (特异性免疫调节测试)

[0215]

组别	动物 本数	样 本数	研究前	OVA		
				Pre_OVA	OVA_2	OVA_4
Anti-OVA IgG, EU						
A	10		0.0012±0.0010	0.0040±0.0015	0.3531±0.0497	0.6018±0.0600
B	10		0.0013±0.0007	0.0044±0.0014	0.3691±0.0390	0.6928± 0.0983*
C	10		0.0017±0.0011	0.0045± 0.0016	0.3588± 0.0427	0.7091± 0.0869*
D	10		0.0014±0.0007	0.0051± 0.0023	0.3699± 0.0452	0.7084± 0.0669*
Anti-OVA IgM, EU						
A	10		0.0444± 0.0137	0.0527± 0.0159	0.1402± 0.0551	0.1404± 0.0334
B	10		0.0471± 0.0178	0.0647± 0.0249	0.1490± 0.0459	0.2254± 0.0764
C	10		0.0450± 0.0139	0.0587± 0.0201	0.1472± 0.0344	0.2655± 0.1472*
D	10		0.0432± 0.0204	0.0650± 0.0217	0.1469± 0.0376	0.2571± 0.1665*
Anti-OVA IgE, EU						
A	10		0.0045± 0.0020	0.0110± 0.0023	0.0374± 0.0085	0.1247± 0.0542
B	10		0.0052± 0.0036	0.0128± 0.0037	0.0414± 0.0065	0.1416± 0.0634
C	10		0.0065± 0.0066	0.0114± 0.0031	0.0444± 0.0075	0.1470± 0.0521
D	10		0.0040± 0.0017	0.0110± 0.0015	0.0437± 0.0087	0.1321± 0.0516

[0216] 以酶联免疫吸附实验测量抗血清中卵白蛋白素之免疫球蛋白生成量。

[0217] * :表示与阴性对照组比较之统计分析之显著性

[0218] $EU = (A_{\text{样本}} - A_{\text{阴性对照组}}) / (A_{\text{阳性对照组}} - A_{\text{阴性对照组}})$

[0219] A :阴性对照组 B :喂食低剂量 FIP-gts 实验组

[0220] C :喂食高剂量 FIP-gts 实验组 D :阳性对照组

[0221] 实施例十二 :FIP-gts 或 FIP-fve 对第二型糖尿病小鼠血糖之影响

[0222] 每六只雄鼠一组,分别接受以下测试 ;

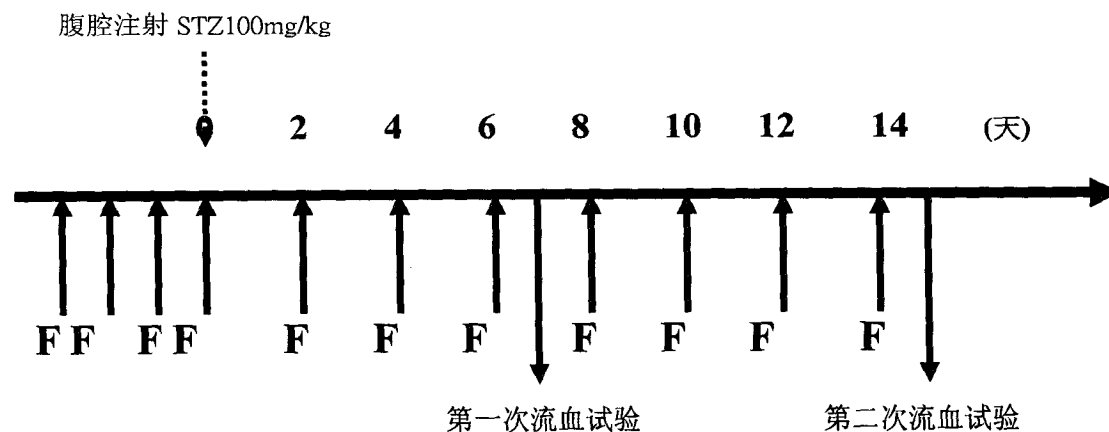
[0223] 分组一 :没有注射 Strptozotocin(100mg/kg)

[0224] 分组二 :注射 Strptozotocin(100mg/kg)

[0225] 分组三 :注射 Strptozotocin(100mg/kg) 及 FIP-gts $2 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ / 只

[0226] 分组四 :注射 Strptozotocin(100mg/kg) 及 FIP-fve $50 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ / 只 FIP-fve 是由 Flammulina velutipes (金针菇) 中所制得。

[0227]



[0228] 流血试验测血糖。

[0229] F :喂食 FIP-gts ($2 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ / 只) 或 FIP-fve ($50 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ / 只) 血糖测试之

实验结果如下 (mg/dl) ;

[0230]		分组一	分组二	分组三	分组三
[0231]	七天	141.7±2	238.3±91	146.3±35	150.3±40
[0232]	十四天	125.3±8	270.7±80	207.7±75	176.7±59
[0233]	以上结果证实, FIP-gts 或 FIP-fve 明显降低由化学物质引发第二型糖尿病的小鼠的血糖值。				

[0234] 序列表

[0235] <110> 益生生技开发股份有限公司

[0236] <120> 真菌免疫调节蛋白之用途

[0237] <130> 6P04098-TW

[0238] <160> 3

[0239] <170> PatentIn version 3.2

[0240] <210> 1

[0241] <211> 111

[0242] <212> PRT

[0243] <213> Ganoderma speciosis

[0244] <400> 1

[0245] Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Arg Leu Ala Trp Asp Val Lys Lys

[0246] 1 5 10 15

[0247] Leu Ser Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly Arg Gly Asn Pro Asn Asn

[0248] 20 25 30

[0249] Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Lys Val Leu Thr Asp Lys Ala Tyr

[0250] 35 40 45

[0251] Thr Tyr Arg Val Ala Val Ser Gly Arg Asn Leu Gly Val Lys Pro Ser

[0252] 50 55 60

[0253] TBr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys Val Asn Phe Leu Glu Tyr

[0254] 65 70 75 80

[0255] Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn Thr Ile Gln Val Phe Val

[0256] 85 90 95

[0257] Val Asp Pro Asp Thr Asn Asn Asp Phe Ile Ile Ala Gln Trp Asn

[0258] 100 105 110

[0259] <210> 2

[0260] <211> 111

[0261] <212> PRT

[0262] <213> Ganoderma tsugae

[0263] <400> 2

[0264] Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Arg Leu Ala Trp Asp Val Lys Lys

[0265] 1 5 10 15

[0266] Leu Ser Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly Arg Gly Asn Pro Asn Asn

[0267]	20	25	30
[0268]	Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Lys Val Leu Thr Asp Lys Ala Tyr		
[0269]	35	40	45
[0270]	Thr Tyr Arg Val Ala Val Ser Gly Arg Asn Leu Gly Val Lys Pro Ser		
[0271]	50	55	60
[0272]	Tyr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys Val Asn Phe Leu Glu Tyr		
[0273]	65	70	75
[0274]	Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn Thr Ile Gln Val Phe Val		
[0275]	85	90	95
[0276]	Val Asp Pro Asp Thr Asn Asn Asp Phe Ile Ile Ala Gln Trp Asn		
[0277]	100	105	110
[0278]	<210> 3		
[0279]	<211> 114		
[0280]	<212> PRT		
[0281]	<213> Flammulinana velutipes		
[0282]	<400> 3		
[0283]	Ser Ala Thr Ser Leu Thr Phe Gln Leu Ala Br Leu Val Lys Lys Ile		
[0284]	1	5	10
[0285]	Asp Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly Arg Gly Thr Pro Ser Ser Tyr		
[0286]	20	25	30
[0287]	Ile Asp Asn Leu Thr Phe Pro Lys Val Leu ThrAsp Lys LYs Tyr Ser		
[0288]	35	40	45
[0289]	Tyr Arg Val Val Val Asn Gly Ser Asp Leu Gly Val Glu Ser Asn Phe		
[0290]	50	55	60
[0291]	Ala Val Thr Pro Ser Gly Gly Gln Thr Ile Asn Phe Leu Gln Tyr Asn		
[0292]	65	70	75
[0293]	Lys Gly Tyr Gly Val Ala Asp Thr Lys Thr Ile Gln Val Phe Val Val		
[0294]	85	90	95
[0295]	Ile Pro Asp Thr Gly Asn Ser Glu Glu Tyr Ile Ile Ala Glu Trp Lys		
[0296]	100	105	110
[0297]	Lvs Thr		

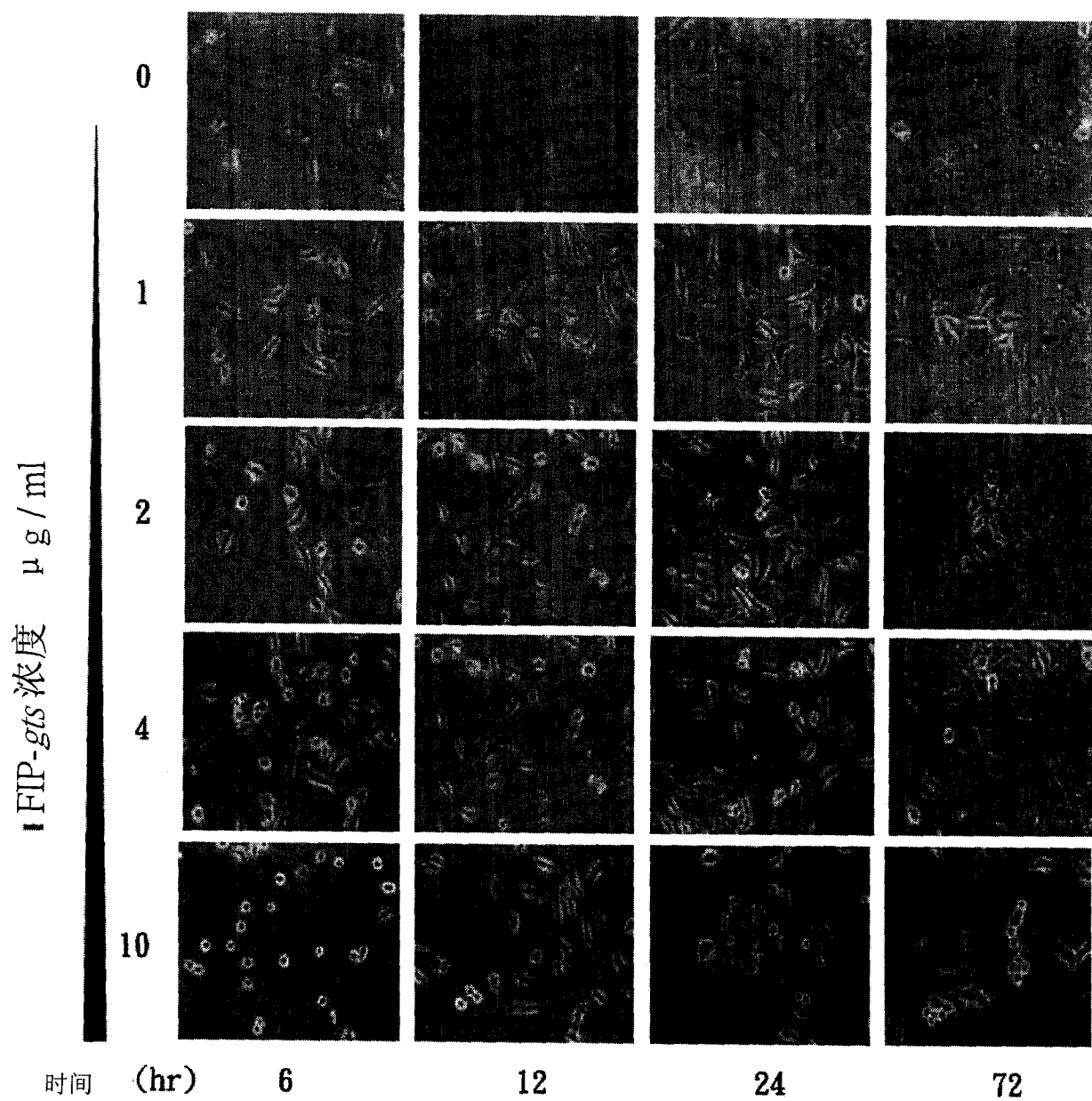


图 1

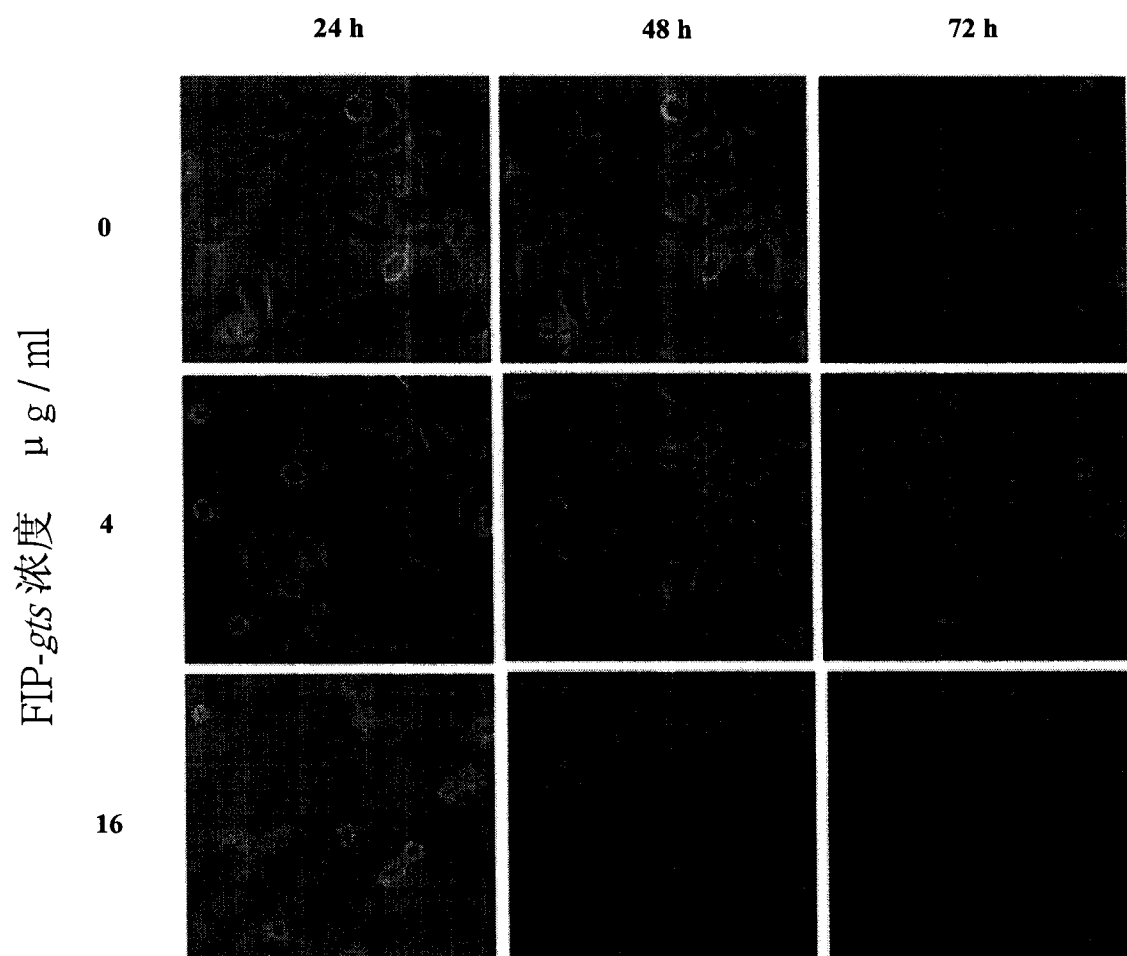


图 2

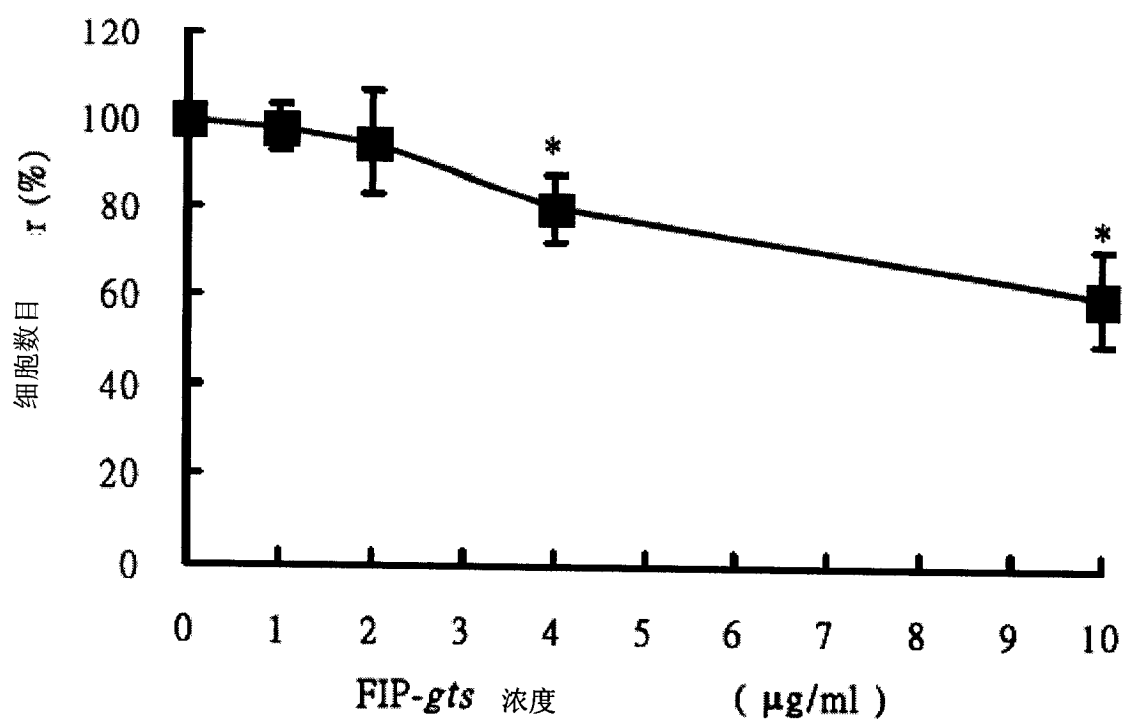
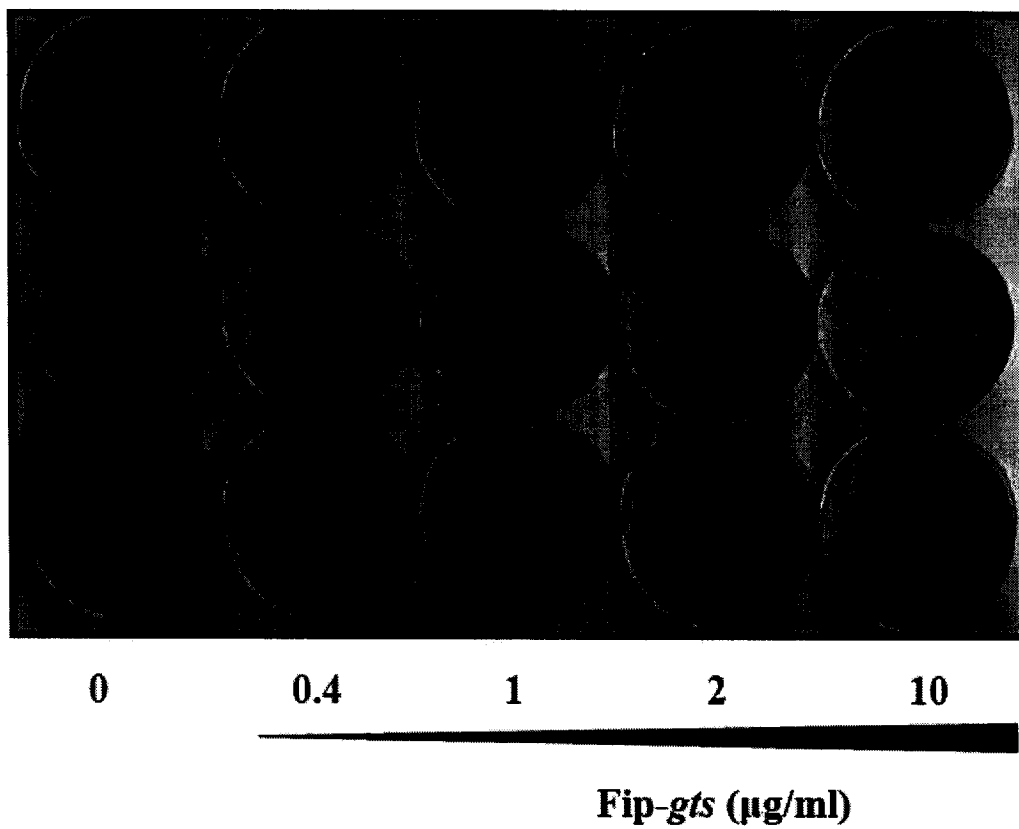


图 3

(A)



(B)

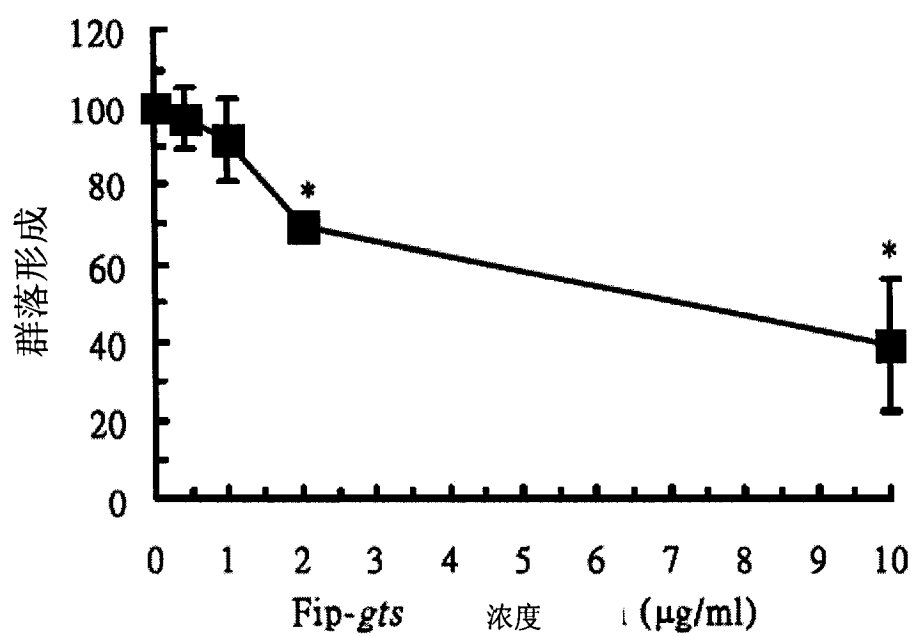
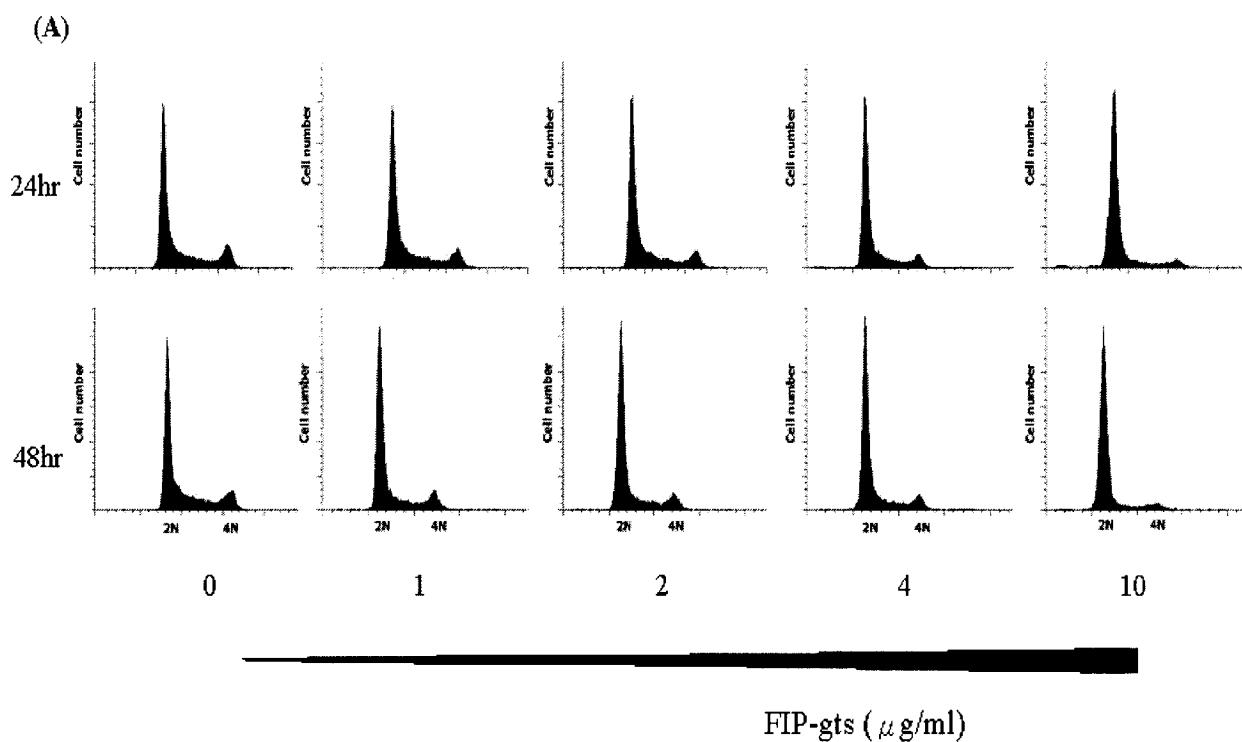


图 4



(B)

	时间	对照组	FIP-gts (μ g/ml)			
			1	2	4	10
G1 期	24 hr	58.2 $\pm$ 3.5	59.9 $\pm$ 3.0	62.0 $\pm$ 4.3	64.0 $\pm$ 6.2	75.5 $\pm$ 5.8
(%)	48 hr	60.6 $\pm$ 4.6	68.8 $\pm$ 0.3	72.6 $\pm$ 2.5*	76.1 $\pm$ 5.3*	82.1 $\pm$ 2.7*
S 期	24 hr	32.8 $\pm$ 2.5	30.9 $\pm$ 2.4	30.1 $\pm$ 2.9	27.2 $\pm$ 2.4	18.6 $\pm$ 3.2
(%)	48 hr	31.8 $\pm$ 5.2	25.1 $\pm$ 0.7	23.0 $\pm$ 0.1	20.0 $\pm$ 3.7	13.8 $\pm$ 2.3
G2/M 期	24 hr	9.1 $\pm$ 1.1	9.0 $\pm$ 2.5	7.9 $\pm$ 1.9	8.3 $\pm$ 3.8	5.9 $\pm$ 3.1
次 (%)	48 hr	7.6 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 2.6	4.0 $\pm$ 1.5	3.8 $\pm$ 0.4
SubG1 期	24 hr	0.2 $\pm$ 0.27	0.3 $\pm$ 0.22	0.4 $\pm$ 0.22	0.4 $\pm$ 0.32	0.9 $\pm$ 0.35
(%)	48 hr	0.2 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.33	0.4 $\pm$ 0.08	0.6 $\pm$ 0.42	1.6 $\pm$ 0.82

图 5

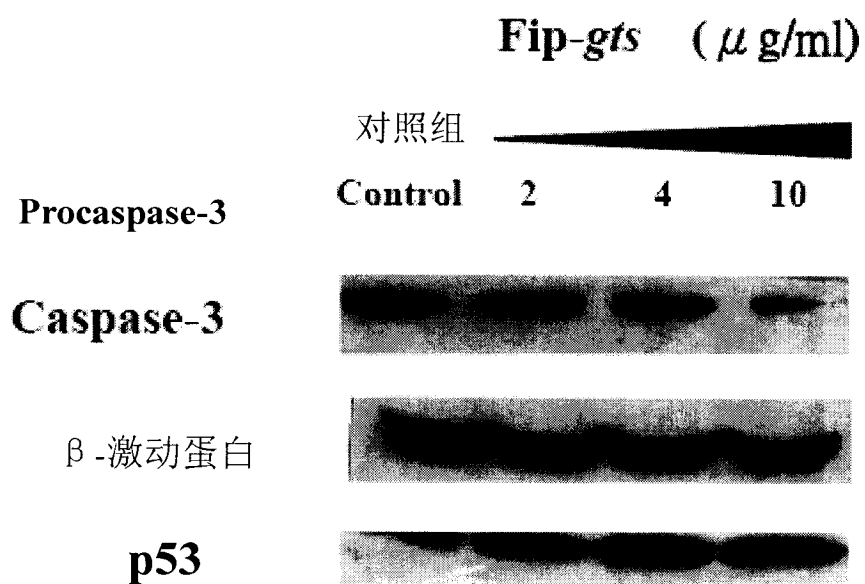


图 6

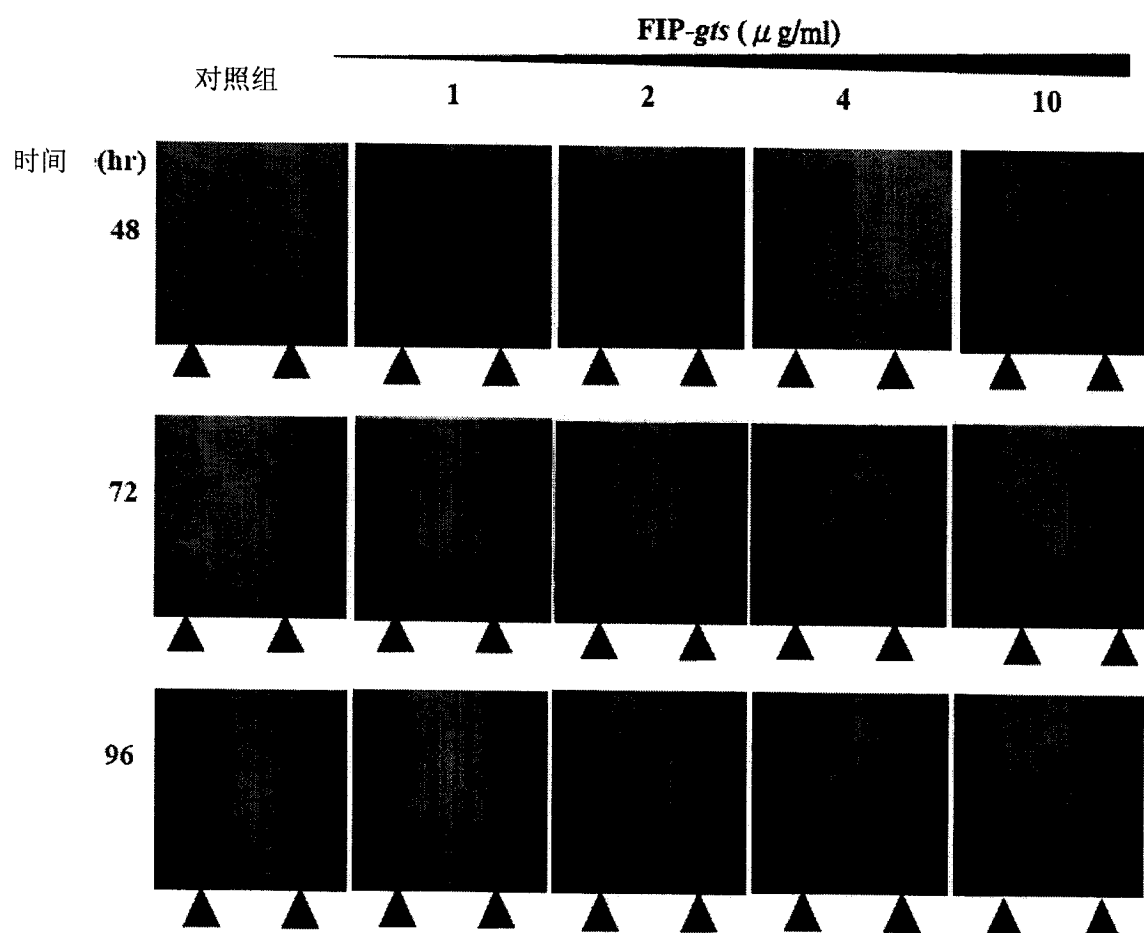


图 7

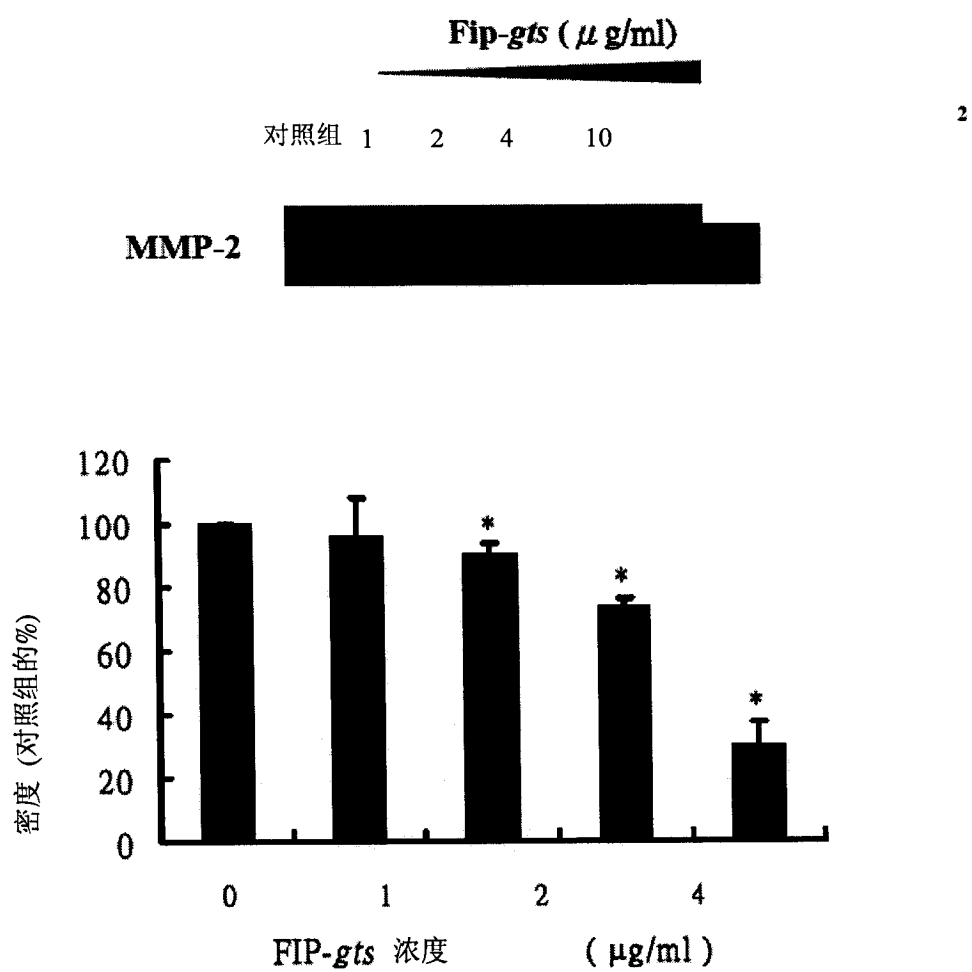


图 8