



中國醫藥大學  
醫學研究所  
碩士學位論文

應用蛋白質體學技術探討松杉靈芝萃取物抑制人類  
卵巢癌細胞株 SKOV-3 生長之分子機轉

A proteomics approach to the molecular mechanism of  
growth inhibition by *Ganoderma tsugae* extracts in human ovarian  
cancer SKOV-3 cells

指導教授：高銘欽教授

研究生：王以均

中華民國九十六年七月

中國醫藥大學 醫學研究所

碩士候選人學位考試

論文題目

中文：應用蛋白質體學技術探討松杉靈芝萃取物抑制人類卵巢癌細胞株 SKOV-3 生長之分子機轉

英文：A proteomics approach to the molecular mechanism of growth inhibition by *Ganoderma tsugae* extracts in human ovarian cancer SKOV-3 cells

本論文係 王以均 於中國醫藥大學醫學研究所完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

考試委員：

王以均  
高銘欽  
梁心怡  
鍾學光  
李灼榮

所長：

醫學研究所 黃志揚  
所長

中華民國 九十六年 七月 二十日

## 摘要

靈芝在中國及東亞各國醫療保健和文化生活中的應用已有源遠流長的歷史。近年來，靈芝因其抗癌及免疫調節方面的功效而逐漸受到全球醫學界的重視。許多研究指出靈芝多醣具有促進免疫功能之活性，而靈芝三萜類化合物則能抑制腫瘤細胞生長，成為有潛力的抗癌藥物。本實驗室所使用的松杉靈芝子實體乾燥粉末經由薄層層析及高效液相層析技術鑑定其種源，且更進一步利用中草藥全球化聯盟主席鄭永齊院士所推廣的生物反應指紋分析平台，來監控靈芝萃取物之品質。結果顯示投予松杉靈芝甲醇萃取物的三組間之生物反應指紋圖譜極相似 (PSI 值 > 0.95)，而投予松杉靈芝甲、乙醇萃取物的兩大組間之生物反應指紋圖譜相似但不同。因此，生物反應指紋可作為中草藥品質管制的分析平台。本實驗室之前的實驗結果顯示，松杉靈芝之甲醇萃取物能抑制人類卵巢癌細胞株 SKOV-3 的生長。並且，根據創傷癒合實驗的結果，推測松杉靈芝甲醇萃取物亦能減緩 SKOV-3 細胞的移動能力。為闡明靈芝甲醇萃取物對於 SKOV-3 細胞造成諸多影響所牽涉的分子機轉，本論文利用蛋白質二維凝膠電泳分離，及介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀等蛋白質體學技術，探討投予靈芝甲醇萃取物後 SKOV-3 細胞整體蛋白質表現的改變。結果得到 51 個 Mascot 評分值大於 65，即 p 值小於 0.05 的蛋白質，其中，在投予靈芝甲醇萃取物後表現量明顯增加的蛋白質有 22 個，而明顯減少的蛋白質有 23 個。之後將其中 40 個蛋白質匯入 GeneGo Meta Core<sup>TM</sup>，進行訊號傳遞網絡圖的建立，並以西方墨點法輔證。最後，根據實驗結果以及相關文獻的探討，提出三個松杉靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 生長的可能訊號傳遞機轉：(1) 抑制 c-Src、c-Myc 及其下游基因的表現，而抑制了 SKOV-3 細胞的增生。(2) 影響 HSP90 及 HSP27 的正常功能，因而抑制 SKOV-3 細胞的增生及存活。(3) 抑制 SKOV-3 細胞醣解作用，因而降低細胞生長。本研究結果將可提供以中草藥對抗卵巢癌的可能細胞機轉與治療方法之參考依據。

關鍵詞：松杉靈芝;生物反應指紋;卵巢癌細胞株 SKOV-3;蛋白質體學;中草藥

## Abstract

*Ganoderma*, also known as Reishi or Lingzhi, has been used for medicinal purposes for centuries. This herb has gained considerable attention for its anti-tumor and immunomodulatory activities. We have investigated the extracts from the *Ganoderma tsugae* (*Gt*), one of the Lingzhi species locally cultivated in Taiwan, followed by TLC and HPLC profiles analysis and further monitored by genetic bioresponse fingerprinting (PhytoViewerBR, PhytoCeutica, Inc.). The bioresponse fingerprinting results reveal that the PSI (Phytomics Similarity Index) value for the 3 independent experiments is very similar ( $PSI > 0.95$ ), showing that the *Gt* extracts are in good quality. Moreover, our previous studies have shown that *Gt* methanol extracts have growth inhibition effects on the human ovarian cancer SKOV-3 cells, and decrease the oncogene expression. The wound closure assay result demonstrates that *Gt* methanol extracts also reduce SKOV-3 cells motility. To further unravel the molecular mechanism involved, a proteomics approach, 2-D electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, was used to tell the differential changes of protein expression profile in SKOV-3 cells after treatment with *Gt* extracts. Of the 51 noticeable altered protein spots with MOWSE Score  $> 65$  (i.e.,  $p < 0.05$ ), 22 are up-regulated and 23 down-regulated. Forty characterized proteins were loaded on the GeneGo Meta Core™ for building signaling network. Based on this signaling network followed by further Western blotting experiments, 3 possible molecular pathways leading to the growth inhibition of SKOV-3 cells by the *Gt* treatment have been proposed. Our results may provide possible cellular signaling networks of using the traditional Chinese medicine *Ganoderma tsugae* to treat ovarian cancer.

Keywords : *Ganoderma tsugae*; bioresponse fingerprinting; SKOV-3; proteomics; Traditional Chinese Medicine

## 誌謝

能順利完成學業，要感謝的人太多太多，我的父母家人、老師、學長姐、同學、學弟妹，謝謝你們。

回想剛上碩一時，可愛的佩宜、薰儀、阿菁，當然還有文議，使我很快融入研究生的生活。我們互相幫助，互相打氣，算得上是「共患難」的交情吧。生化科可愛的不只同學們，老師們也很熱心風趣，在生化科的日子是溫暖快樂的。

研究方面，要感謝的除了我敬愛的指導教授高銘欽老師和生化科的老師們之外，林靜茹老師也給予我很大的幫助。另外也要感謝賴建成老師、維儀、蛋白質體實驗室的欣儀、苒欣、玉晴，在質譜儀方面的大力幫忙。國防醫學院的學長姐們：宛玲學姐，宜臻學姐，世忠學長，建志學長，世瑋學長，漢鵬學長，謝謝你們的指導與關懷。也感謝「國立陽明大學微陣列與基因表現分析核心設施」幫忙我們進行 Affymetrix human genome array。至於最後的口試及論文寫作，多虧有高銘欽老師，白壽雄老師，鍾景光老師，李妙蓉老師，莊子超老師反覆審核指導，才能順利通過，真的十分感激。

這些日子陪伴我渡過快樂與悲傷的實驗室的各位：明翰學長，謝謝你的悉心教導，你是我們實驗室所有人最好最喜愛的「學長」。傑文學長，謝謝你時常讓我有好心情。育賢學長，建鈞學長，正祐學長，多謝你們分擔實驗室的大小事務。秀學，謝謝你常在我心煩時給予關心。佩怡，認真的妳對我幫助很大，謝謝。還要感謝永旭與涵方，你們的貼心常讓我感動，你們在時，實驗室總是歡笑不斷。由衷感謝實驗室的各位，這段我們一同走過的日子我一輩子都不會忘。

王以均 謹誌

2007.07.25



# 目 錄

	頁次
中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝辭	iii
目錄	iv
表目錄	viii
圖目錄	ix
縮寫表	x
第一章：緒論	1
第一節、研究緣起與目的	1
第二節、靈芝	3
壹、靈芝概述	3
貳、靈芝醫療相關研究	4
參、實驗用松杉靈芝來源	6
肆、靈芝種源及成分品質鑑定	6
第三節、基因體生物反應指紋	8
壹、中草藥全球化聯盟	8
貳、基因體生物反應指紋圖譜	8
第四節、蛋白質體學	9
壹、概述	9
貳、蛋白質體學的發展及應用	10
參、蛋白質二維凝膠電泳分離	10

肆、質譜儀	11
第二章：材料與方法	12
第一節、實驗材料	12
壹、細胞株	12
貳、松杉靈芝	12
參、化學試劑藥品	12
肆、主要器材儀器	15
第二節、實驗方法	16
壹、細胞株培養	16
貳、細胞株生長曲線	16
參、松杉靈芝甲醇萃取	17
肆、創傷癒合試驗(Wound closure assay)	17
伍、靈芝萃取物對細胞株半數抑制濃度(IC <sub>50</sub> )的測量(CCK-8 assay)	18
陸、細胞 RNA 的抽取、Affymetrix 人類微陣列分析以及基因體 生物反應指紋圖譜(Genomic Bioresponse Fingerprint)	18
柒、二維凝膠電泳(2-Dimension Gel Electrophoresis)及膠體影像分析	20
捌、膠體內蛋白質水解(In-gel digestion)	23
玖、介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀及資料庫應用	24
拾、西方墨點法(Western blotting)	25
第三章：結果	27
第一節、細胞株培養	27
第二節、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株的影響	27
壹、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株形態的影響	27
貳、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株移動能力的影響	27
參、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株的半數抑制濃度(IC <sub>50</sub> )	28

第三節、SKOV-3 細胞株對松杉靈芝萃取物的基因體生物反應指紋圖譜	28
第四節、以二維電泳、質譜分析及資料庫比對推測松杉靈芝對細胞的影響	29
壹、利用二維凝膠電泳及介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜 分析投予松杉靈芝甲醇萃取物後表現量有差異的蛋白質	29
貳、匯整比較所有經 2D-MS/MASCOT 分析所得之蛋白質	30
參、受松杉靈芝甲醇萃取物影響的蛋白質間的相互作用	31
第五節、推測並驗證靈芝萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長之分子機轉	32
壹、以西方墨點法確認松杉靈芝甲醇萃取物能抑制細胞內重要 訊息傳導以及生長相關蛋白質(c-Myc, ERK2, c-Src, HER2) 之表現量	32
貳、松杉靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長之可能分子機轉	32
第四章：討論	33
第一節、基因體生物反應指紋圖譜分析結果之意義	33
第二節、蛋白質體學研究方法討論	33
第三節、與本實驗結果相關的文獻評析與闡釋	34
第四節、實驗結果釋論	35
第五節、本研究提出的假說	39
第五章：結論	41
第六章：參考文獻	42
第七章：圖表	48
第一節、表	46
第二節、圖	56



附錄	75
附錄一、常見靈芝形態	75
附錄二、神農本草經及本草綱目對靈芝的記載	76
附錄三、靈芝主要成分	77
附錄四、台灣地區常見靈芝一覽表(許瑞祥教授發表)	78
附錄五、靈芝萃取物成分之 TLC、HPLC 分析鑑定	79
附錄六、細胞株培養方法	80
附錄七、CCK-8 assay 實驗設計	82
附錄八、SKOV-3 細胞株 RNA 抽取之品質鑑定(Quality control)	83
附錄九、Affymetrix Chips Service Report	84
附錄十、Genes number by PhytoViewerBR 2.2 processing	91
附錄十一、試劑及緩衝液配製	93
附錄十二、二維凝膠電泳條件	98
附錄十三、GeneGo Meta Core™ signaling networks legend	99

論文電子檔案上網授權書

# 表目錄

	頁次
表一、利用 PhytoViewerBR 2.2 分析 SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝萃取物 之 Affymetrix 人類微陣列基因表現資料進行各組間 PSI (Phytomics Similarity Index) matrix 之分析比較	48
表二、Altered protein spots review	50
表三、比對 SKOV-3 細胞投予靈芝甲醇萃取物後 2D-MALDI/TOF (蛋白質表現) 及 Affymetrix (基因表現) 分析結果	54
表四、2D-MS 分析所得蛋白質之功能分類	55



# 圖目錄

	頁次
圖一、實驗流程圖	56
圖二、SKOV-3 細胞培養	57
圖 2.1、SKOV-3 細胞株形態	57
圖 2.2、SKOV-3 細胞株生長曲線	58
圖三、靈芝(粉末)甲醇萃取流程	59
圖四、靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株之影響	60
圖 4.1、靈芝甲醇及乙醇萃取物對 SKOV-3 細胞株生長形態之影響	60
圖 4.2、創傷癒合試驗(Wound closure assay)	61
圖五、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株之半數抑制濃度(IC <sub>50</sub> )測量	62
圖六、利用 PhytoViewerBR 2.2 分析 SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝萃取物之 Affymetrix 人類微陣列基因表現資料得到生物反應指紋圖譜	63
圖七、二維凝膠電泳及膠體影像分析	65
圖八、利用 GeneGo Meta Core™ 繪出各蛋白質相互關係之圖譜	67
圖九、表現量受靈芝甲醇萃取物所改變之生長相關蛋白質相關性網路圖	69
圖十、用西方墨點證明松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt)對 SKOV-3 細胞內 重要訊息傳導以及生長相關蛋白質表現量之影響	70
圖十一、靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長之可能分子機轉	74

## 縮寫表

2-DE	Two-Dimensional Gel Electrophoresis
ACN	Acetonitrile
APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
CAPZB	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CGCM	Consortium for Globalization of Chinese Medicine
DTT	1,4-Dithiothreitol
E2F1	E2F transcription factor 1
EEF2	Elongation factor 2
EFABP	Fatty acid-binding protein, epidermal
ENO1	Enolase 1
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FUBP1	myc far upstream element-binding protein
GSTP1	pi-class glutathione transferase
HCCA	Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP	Heat shock protein
IC <sub>50</sub>	The half maximal inhibitory concentration
IEF	Isoelectric Focusing
KHSRP	KH-type splicing regulatory protein

LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight
MeGt	<i>Ganoderma tsugae</i> methanolic extracts
P4HB	Prolyl 4-hydroxylase subunit beta
PKM2	Pyruvate kinase, pyruvate kinase 3
PMF	Peptide mass fingerprinting
PSI	Phytomics Similarity Index
PVDF	Polyvinylidene fluoride
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloroacetic acid
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin-layer chromatography
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor



# 第一章、緒論

## 第一節、研究源起與目的

距今五千至一萬年前，是我國新石器時代的早、中期，即傳說中的神農時代。神農氏有感於當時人民深受各種疾病及挨餓之苦，始遍嘗百草，試圖找出可食用及可癒病之植物。《淮南子·修務訓》：「神農乃始教民，嘗百草之滋味，當時一日而遇七十毒，由此醫方興焉」。宋代劉恕在《通外紀》中說：「民有疾病，未知藥石，炎帝始味草木之滋，嘗一日而遇七十毒，神而化之，遂作方書，以療民疾，而醫道立矣」。此即為我國醫藥之起緣。至明朝李時珍，窮三十餘年的努力，在1578年寫成了《本草綱目》(譯：The Compendium of Materia Medica)，全書共計190萬字，共有1892種藥。每種藥材都詳細地敘述了性味、產地、形態、採集方法、炮製過程、藥理研究、方劑配合等。另外還有10000多附方，分列於有關藥材之後，說明該藥在臨床上的實際應用。總結了我國人民在16世紀以前的藥學經驗，集明代以前歷代藥學成果之大成。由於他在書中批判了水銀“無毒”，久服“成仙”、“長生”等說法，當時皇帝大臣都信道士們的水銀煉丹，所以這部著作大書商們都不敢出版，直到他死後於西元1596年才與讀者見面。出版後立即引起了巨大的反響，人們到處傳播它，並進行翻刻，陸續被譯成日、德、英、法、俄等五國文字。

但自十七、十八世紀起，天主教耶穌會傳教士將西方醫學傳入中國，十九世紀中國國力漸微，西方傳教士在中國大量興建醫院、藥房，西醫學急速發展起來。1920-1940年國民政府採取排斥、抵制中醫的措施，認為提昇西醫學地位等同將國家現代化，至今，西方醫學已成為醫藥學研究的主流。

雖然大環境對中醫藥發展的壓迫巨大，但傳統中醫藥仍被保存並持續發展，且近幾年越發受到各國醫藥學界重視。2003年耶魯大學藥理系講座教授鄭永齊院士發起成立「中草藥全球化聯盟」(Consortium for Globalization of Chinese Medicine, CGCM)，旨在推動並促進全球中草藥研究發展，以造福全人類。

相較於神農時代，今日的醫學已飛躍到令人難以想像的地步，但全球人類依舊為百病所苦，尤其是癌症、AIDS 等疾病，對人類的威脅日益擴大。衛生署表示，自民國七十一年起，癌症即高居國人十大死因之首，其發生率與死亡率逐年增加，成為國人健康最主要的威脅。此外，癌症也造成國家社會重大經濟損失，除了每年一百億以上的直接醫療支出外，癌症所導致的國人罹病跟死亡也造成其他間接損失。更甚者，世界衛生組織國際癌症研究機構負責人於 2007 年 4 月 3 日說，到 2030 年，全球確診的癌症患者人數將比 2000 年時增加 1 倍以上，即到 2030 年，將有 2700 萬人確診為癌症，1700 萬人死於癌症，7500 萬人患有癌症，全球死於癌症的人數比死於肺結核、愛滋病和瘧疾三種疾病人數總和還多。故中華民國行政院會於民國九十六年六月通過「癌症防治法」草案，明定中央主管機關應建立癌症防治政策諮詢委員會，審議癌症防治政策及研究重點，協調整合癌症防治及研究資源。

卵巢癌是最致命的癌症之一，美國癌症學會提供的數據表明，在婦科癌症中，卵巢癌是婦女第五大“殺手”。卵巢癌因其在早期難以檢測，大多數患者(70%) 在癌症晚期才被確診，癌瘤已由骨盆腔蔓延到腹腔，而使治療效果降低且容易復發，70% 的患者會在 5 年內死亡。卵巢癌的治療包括手術、化學治療與放射治療，其中手術是最主要也是治療效果最佳的方式。通常較晚期的病灶，手術無法完全切除，會合併使用化學治療。

卵巢癌的化學治療通常使用組合式藥物，第一線化療藥物處方是紫杉醇 (Paclitaxel, Docetaxel) 合併投予鉑類化合物 (Carboplatin, Cisplatin)，或鉑類化合物合併 Cyclophosphamid 等 (Kerbrat *et al.*, 2001; McGuire *et al.*, 1996; Swenerton *et al.*, 1992; Vasey *et al.*, 2001)。一般而言，化療藥物常見的副作用反應是噁心和嘔吐、腹瀉或口腔潰瘍，患者容易被感染、血小板降低(瘀青或易出血)，同時體力變得較差等症候。

為了尋求更安全有效的治療藥物來對抗卵巢癌，本實驗室早期致力於癌症基因治療 (Chuang *et al.*, 2003; Chuang *et al.*, 2002a; Chuang *et al.*, 2002b; Kao *et al.*,

1998a; Kao *et al.*, 1998b)，更在中國文化大學陳精祥教授的大力支持下，使用中國千年來皆被譽為「上品」「仙草」的靈芝，來研究其是否能有效抑制卵巢癌細胞生長，並進一步利用蛋白質體學研究方法(二維凝膠電泳及質譜儀分析)探討其中的分子機轉。

## 第二節、靈芝(*Ganoderma*，*Reishi*，*Lingzhi*)

### 壹、靈芝概述

葛洪所著《抱朴子》一書中，依質地將靈芝分類為「石芝、木芝、肉芝、菌芝、草芝」。梁代陶弘景再將靈芝依其外部形態色澤分為「青芝、赤芝、黃芝、白芝、黑芝、紫芝」等六芝。六芝皆非指單一種類，而是六類群體。以赤芝而言，常見的紅色靈芝有 *G. lucidum*、*G. tsugae* 兩種。紫芝則為 *G. neojaponicum* 和 *G. sinense*。

靈芝子實體的外觀由菌傘及菌柄所構成，其形如意，色彩繽紛，光彩奪目(附錄一)，自古即受文人墨客的青睞，更有「靈芝生玉地，朱草被洛濱。榮華相晃耀，光彩曄若神。」---曹植《詠靈芝》的詩句流傳千古。中國古老傳說中，靈芝是天帝之幼女瑤姬夭折後被封於巫山，其精魄所依。中國人當它是與神仙有關的神秘瑞草，禮記：「王者仁慈，即生芝草，故曰靈始。」據傳，古代宮廷若發現靈芝即作國泰民安、風調雨順的象徵，故有「瑞草」之稱。

靈芝在中國及東亞各國醫療保健和文化生活中的應用有源遠流長的歷史，早在兩千多年前的《神農本草經》中，靈芝就被列為草部「上品」類藥，無毒且沒有副作用。《本草綱目》中亦記載：「靈芝無毒、明目、補肝氣、安精魂、益心氣、補中，增智慧、不忘、益腎氣、利關節、益肺氣、治痔、利尿道、益精氣、堅精骨、治耳聾、好顏色、久服輕身不老、延年神仙。」，因而亦廣被稱為「仙草」。

## 貳、靈芝醫療相關研究

靈芝在中國醫學一直佔有崇高地位，是最吉祥珍貴的調理滋補益類藥材。而東漢時期《神農本草經》，將靈芝分在上品類藥中之最高品，並強調『久食輕身不老、延年神仙』。所謂上藥乃指「以養命為目的，無毒，長期服用，不具副作用。此等藥材能輕身、滋補元氣、防止老化，並有延命的效果」。明朝李時珍所著《本草綱目》中，更將六類靈芝詳加說明。

1950年代開始靈芝的大量人工栽培，為靈芝的科研及產品開發提供了充足的原料。靈芝改善慢性支氣管炎、哮喘、冠心病、心絞痛、高脂血症、神經衰弱、肝炎、白血球減少症等的藥用價值於1970年代由中國大陸地區所發表臨床報告所證實，也引發現代醫藥學界對靈芝研究的高度興趣。1980年代後靈芝的化學研究發展很快，至今從靈芝中已分離出幾百種化合物。靈芝的主要有效成分有靈芝多醣(polysaccharides)，三萜類化合物(triterpenoids)、靈芝腺苷(adenosine)、生物鹼類(alkaloids)、赤芝孢子內酯(ganosporelactone)、赤芝孢子酸(ganodericacid)、靈芝纖維素、多肽、氨基酸、蛋白質和微量元素等，其中最重要的是靈芝多糖、三萜類化合物等。許多體內及體外試驗皆顯示，靈芝多醣(多為靈芝水溶性成分)具有促進免疫功能之活性。另外，靈芝三萜類化合物(水溶性低，多溶於甲醇、乙醇)則能經由直接毒殺癌細胞而抑制腫瘤生長，成為有潛力的抗癌藥物。

### 1. 多醣體(polysaccharides)

多醣體為靈芝主要成分之一，水溶性高，具有抗腫瘤(Gao *et al.*, 2003; Miyazaki and Nishijima, 1981; Wang *et al.*, 1997; Wasser and Weis, 1999)和免疫調節(Lei and Lin, 1992; Lieu *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1997)功能。

靈芝多醣體抗腫瘤之作用機制並非直接抑制或毒殺癌細胞(Lei and Lin, 1992)，而是經由提高免疫力來達到抗癌效果。靈芝的高分子多醣體以 $\beta(1\rightarrow3)$ 主鏈及 $\beta(1\rightarrow6)$ 支鏈結構組成，又稱為 $\beta$ -glucan。人體內並沒有分解 $\beta$ -glucan的酵素，而許多免疫細胞(自然殺手細胞、細胞毒殺T細胞、嗜中性白血球、單核球和巨噬



細胞等)具有 $\beta$ -glucan受體(Goldman *et al.*, 1988), 因此靈芝多醣體具有顯著調節免疫機制的功效。在小鼠活體實驗模式中, 松杉靈芝水萃取物能促進干擾素及脾臟自然殺手細胞毒殺腫瘤細胞, 且呈現劑量關係(Won *et al.*, 1992)。亦有研究證實, 小鼠口服或腹腔注射靈芝多醣體, 有顯著劑量相關的腫瘤抑制(Gao *et al.*, 2003)。靈芝多醣體能增加細胞激素(cytokines)的分泌而促進T細胞增殖, 並能增強巨噬細胞、殺手細胞、溶酶體的活性等, 從而進行抑癌作用(Lei and Lin, 1992; Lieu *et al.*, 1992)。另外, 靈芝多醣體被証實能有效抑制活體模式肉瘤細胞的轉移(Hwang *et al.*, 1989)。

## 2. 三萜類化合物(triterpenoids)

三萜類化合物為靈芝另一主要成分。目前被分離鑑定出的靈芝三萜類化合物多達上百種, 結構上大多為具有三十個碳原子的羊毛固醇(lanostanoid)四環三萜類, 此類似荷爾蒙的固醇類結構可能是其具有廣泛生理功能的原因。

許多研究指出, 三萜類化合物具抗氧化、保肝、降血脂、抗發炎, 以及抗高血壓(Kabir *et al.*, 1988; Zhu and Li, 1999)等功效。而Toth在離體模式中提出靈芝三萜類能毒殺癌細胞。另有研究指出, 對於肝癌細胞株Huh-7, 靈芝三萜類能抑制其蛋白激酶C (PKC)活性, 並活化有絲分裂活化蛋白激酶JNK, 使細胞在G2期停止(Lin *et al.*, 2003)。也有研究指出靈芝三萜類經由抑制乳癌(MDA-MB-231)及前列腺癌(PC-3)細胞之AP-1及NF-kappaB活性, 以及抑制uPA和uPA receptor (uPAR)的表現, 來抑制其移動的能力(Sliva *et al.*, 2002)。在小鼠活體實驗模式中發現, 靈芝三萜類化合物能抑制脾臟及肝臟的血管新生(angiogenesis)、腫瘤生長及轉移(Kimura *et al.*, 2002)。松杉靈芝三萜類化合物亦曾被證明有細胞毒殺性(cytotoxicity), 因其能誘發Hep3B細胞凋亡(apoptosis), 並使細胞週期停滯(cell cycle arrest) (Gan *et al.*, 1998), 但目前並沒有較完整的分子機轉被發表出來。



### 3. 其他成分

Mizushina等人指出，lucidenic acid O和lucidenic lacton能抑制真核細胞DNA聚合酶和人類免疫缺乏病毒的反轉錄酶(Mizushina *et al.*, 1999)。而靈芝中所含的腺苷(adenosine)，被提出具有抗血小板凝集的作用(Shimizu *et al.*, 1985)。另外，靈芝一種類似免疫球蛋白的成分，Ling-Zhi-8(LZ-8)，具有免疫調節的功能(van der Hem *et al.*, 1996)。至於靈芝有機鍺(organic germanium, Ge-132)，被提出能增強免疫能力及治療骨質疏鬆(Fujii *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1998)。

### 參、實驗用松杉靈芝來源

本實驗所用之松杉靈芝(天生靈芝)子實體粉末，是由中國文化大學陳精祥教授(羅桂英菌種場，桃園縣青溪里光文街 55 號)所栽培提供。

### 肆、靈芝種源及成分品質鑑定

根據1979年Alexopolus所建立的真菌分類系統，靈芝應是屬於真菌界(Myceteae)、真菌門(Eumycota)(亦有一說為無鞭毛菌門(Amastigomycota)、擔子菌綱(Basidiomycetes)、無蕈褶目(Aphyllorphorales)、多孔菌科(Polyporaceae)(又有一說為靈芝菌科(Ganodermataceae))中的靈芝屬(*Ganoderma*) 蕈類。Gano=亮，derma=皮；即子實體具有光亮的表皮，因菌蓋有漆狀分泌物(laccate)。靈芝屬(*Ganoderma*)目前的分類，正式記錄有50種，台灣約有15種，其中常見種類以靈芝(*G. lucidum*)、熱帶靈芝(*G. tropicum*)及南方靈芝(*G. australe*)等三種最多；而人工栽培最多者則以松杉靈芝(*G. tsugae*)與靈芝(*G. lucidum*)為主。

大多數文獻中，所謂「靈芝」指的是「*G. lucidum*」。在目前以形態為主的真菌分類系統下，形態差異為物種間判斷的重要指標，但事實上，就外形上極難將*G. lucidum*與其他紅色靈芝(赤芝)做很好的辨別(附錄一)，因為靈芝子實體形態分化時易受環境的影響，造成的外觀形態多形性現象。中草藥(包括靈芝)研究長久以來一直有「同名異物」(同一種名稱在不同地區指的其實是不同的植物)及「同

物異名」(不同地區對於同一種植物有不同的稱呼)的障礙有待突破，且不同產地、不同栽培方式就有可能造成藥物成分或含量的差別。台灣大學許瑞祥博士等人，曾利用隨機擴增基因的多形性圖譜來比較各品種間全基因組成上的特性，由於是以全基因為模版，因此擴增所得的全基因多形性圖譜相當於生物反應指紋圖譜(bioresponse fingerprint)，可被用於同種間不同品種鑒定的依據(Hseu *et al.*, 1996)。許博士等人為確認靈芝屬中代表種靈芝*G. lucidum*物種與學名間的一致性，收集了各國的靈芝*G. lucidum*菌株和標本，並參考Steyaert, Ryvardeen, Gilbertson和Wright等人對靈芝複合種*G. lucidum* complex的概念，將形態相近的擬熱帶靈芝*G. ahmadii*、*G. carnosurn*、松杉靈芝*G. tsugae*、紫光靈芝*G. valesiacum*、*G. oregonense*、*G. oerstedii*、狹長孢靈芝*G. boninense*、無柄靈芝*G. resinaceum*和*G. preifferi*等菌株共同進行分析比較。結果證明*G. lucidum*在各地區所指的並非為同一物種，且在松杉靈芝*G. tsugae*菌株間的確出現同名異物的情形，可見所謂紅色的靈芝無論是靈芝*G. lucidum*或松杉靈芝*G. tsugae*，在不同的國家或地區裏，同一學名所指的可能並不是相同的種。因此在文獻中有關靈芝*G. lucidum*的複雜成分與多種功效是否僅為一種靈芝所具有便值得深思了。

本實驗室許世忠學長曾做*G. tsugae*，*G. lucidum*及*G. formosanum*粉末萃取物的薄層層析(Thin-layer chromatography, TLC)及高效液相層析(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)(附錄五)，三者的圖譜形態相似但有明顯地不同。本篇研究中，更進一步利用Affymetrix Human Genome Array(人類基因微陣列分析)，來探討人類細胞株對*G. tsugae*的萃取物有何種生物反應(bioresponse)。此項分析具有相當於生物指紋圖譜的功效，能清楚區分不同品種靈芝，甚至是同種靈芝不同溶劑萃取物間生物反應的差別。另外，亦可從人類基因微陣列分析所得的寶貴資料中挖掘出許多有用的資訊(data mining)。

### 第三節、基因體生物反應指紋

#### 壹、中草藥全球化聯盟

中草藥科學研究為當今全球新興研究趨勢，世界各國競相投入大量資源與人力於其中。「中草藥全球化聯盟」(Consortium for Globalization of Chinese Medicine, CGCM)於2003年由耶魯大學藥理系講座教授鄭永齊院士發起成立。參與發起的16個國際研究機構分別來自北京、上海、香港與台灣，其中國家衛生研究院與中研院並列台灣代表。CGCM為一非營利組織，設立目的在集結國際眾多知名研究機構之力，推動並促進全球中草藥研究發展。CGCM總部設於香港大學，在2006年8月時已擴增至61個會員。CGCM底下設有六個工作小組：1.臨床工作小組、2.品質管理工作小組、3.資料庫工作小組、4.藥草來源工作小組、5.對外事務與工業聯繫工作小組、6.智慧財產權工作小組；致力於臨床試驗、品質管理、資料庫以及藥草來源這四個技術平台之發展。最終目標在於促使中草藥(1)通過美國FDA認證及(2)成為國際處方藥物。

(詳請見 <http://www.tcmedicine.org/en/default.asp>)

#### 貳、基因體生物反應指紋圖譜

「中草藥全球化聯盟」發起人之一的鄭永齊院士，為推動全球中草藥研究發展，首先會面對到的問題之一即是必須將中草藥標準化—除了必須釐清各藥物間「同名異物、同物異名」的情形，另外也必須考量到中草藥產地及栽培方式對中草藥成份造成的不確定影響等。排除掉上述問題後，才有可能將中草藥標準化，以改善之前各地中草藥研究結果間難以相互應證溝通的遺憾及窘境。鄭院士等人從另一角度來進行中草藥標準化，他們研發出「基因體生物反應指紋圖譜 (Genomic Bioresponse Fingerprint)」分析平台，利用 Affymetrix Human Genome Array 及軟體 PhytoViewer BR，來分析細胞對於中草藥投予所產生的基因表現變化，以及其變化模式的相似度，根據相似度指數(Phytomics Similarity Index, PSI)

判斷不同中草藥製劑是否符合標準。此種分析的理論基礎是：若是兩批植物藥製劑(botanical preparations)含有相同(same)且含量相當(similar level)的細胞反應成份(cell responding ingredients)，則會使同一細胞株的基因表達產生相似的模式(similar patterns of gene expression)。

基因體生物反應指紋圖譜分析平台目前仍在持續發展改良，相信有朝一日會成為全球中草藥研究發展不可或缺的一環。

## 第四節、蛋白質體學

### 壹、概述

生物體內進行反應的單位以蛋白質為主，並非核酸，所以要了解生命的奧秘，首先就要對蛋白質有深入的了解。蛋白質體(proteome)這個集合名詞最早是在1994年的Siena二維電泳會議(2-D Electrophoresis Meeting, 1995)中，由威爾金斯(Marc Wilkins)(目前蛋白質體系統公司的副總裁兼生物資訊主管)及其同事首次提出，用來表達某生物中根據所有基因體所表現出來之所有蛋白質的集合總稱。蛋白質體學是研究多種蛋白質組成的系統，蛋白質體學的焦點，放在「系統」的行為，而不是「單一組成」的行為(Daniel, 2002)。

蛋白質體要比基因體複雜得太多，舉例來說，人類約有30,000到40,000個基因，但經由轉錄後剪裁及轉譯後修飾將可能產生數十萬種以上不同種類的蛋白質。此外，蛋白質體學主要的概念意涵與研究內容相當廣泛，包括：蛋白質身分鑑定、蛋白質之同形體(isoform)分析、蛋白質之修飾鑑定、蛋白質之動態表現量測定、蛋白質之大量表現、蛋白質之折疊立體結構、蛋白質與蛋白質間之交互作用、蛋白質與其他分子間之交互作用、蛋白質複合物之組合、蛋白質之生化活性、蛋白質之分佈位置等。



## 貳、蛋白質體學的發展及應用

質譜分析蛋白質技術以及電腦功能的不斷開發與創新，高效能鑑定蛋白質成為實際可行，而使得蛋白質體學能夠蓬勃且快速發展，因而正式進入了「後基因體時代-蛋白質體學開始」的階段，為21世紀生物科技最主要的研究趨勢。

利用蛋白質體學技術能在短時間內大規模分析樣品內眾多蛋白質身份，生物醫學界有越來越多的研究人員開始將此技術利用於基礎及臨床醫學上。研究人員可從蛋白質體學角度來探討某兩種樣本之間(如發病組織與正常組織、腫瘤與非腫瘤、致病菌與非致病菌、或是處理同一藥物前後，或處理不同藥物)其整體蛋白質表現之狀況，及背後所隱含的意義與分子作用機轉，而找出導致疾病發生的可能原因、藥理機制等等。

## 參、蛋白質二維凝膠電泳分離

蛋白質體學的研究方法，主要包括：待測蛋白質的分離 (Analytical protein separations)，蛋白質的分解 (Protein digestion)，質譜儀的分析，和database的搜尋 (Mass spectrometry analysis and database searching)。目前蛋白質體研究最普遍使用的實驗方式是結合二維凝膠電泳與質譜儀，常見的有介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀 (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight / Mass Spectrometry；MALDI-TOF/MS) 及液相層析串聯質譜儀 (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry；LC-MS)。

1975年 O'Farrell 首先發展出利用蛋白質二維凝膠電泳 (Two-Dimensional Electrophoresis；2-DE) 技術分離大腸桿菌中的蛋白質。其第一維等電點聚焦乃是利用蛋白質具不同等電點之特性，使蛋白質在 pH 梯度膠中移動分離，接著第二維 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)則再將蛋白質依其分子量大小作分離。當時 O'Farrell 分離出約 1100 個蛋白質染色點，且具有相當好的再現性(O'Farrell, 1975)。二維凝膠電泳無疑為分離成份複雜的蛋白質樣品的一個強而有力的工具。



#### 肆、質譜儀

質譜儀的分析是蛋白質體學研究當中極為重要的一環。90 年代末期，質譜儀離子源的發展有了重要突破，Koichi Tanaka 以介質輔助雷射脫附游離法 (MALDI)，以及 John B. Fenn 以電灑法 (electrospray ionization, ESI) (Banks *et al.*, 1994)，分別成功的偵測到蛋白質分子，開啟了蛋白質研究分析的新紀元。至於質譜儀器本身也不斷被研發改良，提高了蛋白質分析的解析度 (resolution)、精確性 (accuracy)、質量範圍 (mass range)，以及分析通量 (throughput) 等。因應分析需求的不同，可將質譜儀串聯使用，並且與多種離子源做搭配。

Cleveland 等人，於 1977 年首先提出胜肽質量指紋圖譜 (peptide mass fingerprinting, PMF) 的概念 (Cleveland *et al.*, 1977)。但直到 1993 年，才由 Henzel 等人以介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀 (MOLDI-TOF MS) 配合電腦資料庫搜尋演算，證實能以 PMF 進行蛋白質身分之鑑定 (Henzel *et al.*, 1993)。

## 第二章、材料與方法

### 第一節、實驗材料

#### 壹、細胞株

SKOV-3：人類卵巢癌上皮細胞株。

ATCC Number：HTB-77

培養於 37°C，5% CO<sub>2</sub>

DMEM/F-12 細胞培養液，含有 10 %胎牛血清。

#### 貳、松杉靈芝

松杉靈芝(天生靈芝)粉末之甲醇萃取物：天生靈芝粉末由中國文化大學陳精祥教授(羅貴英菌種場，桃園縣青溪里光文街 55 號)提供。依標準操作程序(圖二)進行甲醇萃取。

#### 參、化學試劑藥品

1. 下列產品購自美國 Amresco 公司(波仕特代理)：

Tris (Cat. no. 0826-1KG)，Agarose (Cat. no. 0710-250G)，

TEMED (Cat. no. 0761-25ML)

2. 下列產品購自美國 J.T.Baker 公司(友和代理)：

Urea (Cat. no. 4204-01)，Glycerol (Cat. no. 2136-01)，

Glycine (Cat. no. 4059-02)，Ammonium persulfate (APS) (Cat. no. 0762-01)，

2-Propanol (Cat. no. 9084-03)，Acetonitrile (ACN) (Cat. no. 9017-03)，

Acetic acid, Glacial (Cat. no. 9508-03)，

Sodium chloride (NaCl) (Cat. no. 3624-05)，HEPES (Cat. no. 4018-04)，

Ammonium bicarbonate (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) (Cat. no. 3003-01)，

Ethanol (Cat. no. 8006-05)

3. 下列產品購自美國 SIGMA 公司(友和代理)：

CHAPS (Cat. no. C9426-5G) , Iodoacetamide (IAA) (Cat. no. I1149-25G) ,  
2-Mercaptoethanol (2-ME) (Cat. no. M3148-100ML) ,  
Bovine serum albumin (BSA) (Cat. no. A2153-50G) ,  
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Cat. no. P2850) ,  
Protease Inhibitor Cocktail (Cat. no. P8340)

4. 下列產品購自美國 BIO-RAD 公司：

40% Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (Cat. no. 163-1113) ,  
Mineral oil (Cat. no. 163-2129) ,  
30% Acrylamide/Bis (37.5:1) (Cat. no. 161-0158) ,  
Bradford protein assay dye (Cat. no. 500-0006) ,  
ReadyStrip IPG strips (Cat. no. 163-2007(pH 3-10), 163-2009(pH 3-10 NL),  
163-2008(pH 4-7))

5. 下列產品購自日本 Wako 純藥工業株式會社(友和代理)：

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Cat. no. 196-08675) ,  
Tween-20 (Cat. no. 167-11515)

6. 下列產品購自 Visual protein (友和代理)：

VisPRO (Cat. no. VP1001-500)

7. 下列產品購自美國 Mallinckrodt chemicals (友和代理)：

Anhydrous Methyl Alcohol (Cat. no. 3041-68)

8. 下列產品購自 BIOSYNTH AG 公司(友和代理)：

1,4-Dithiothreitol (DTT) (Cat. no. D8200)

9. 下列產品購自瑞士 Roche 公司：

Protease inhibitor cocktail tablet (Cat. no. 11836.153.001)

10. 下列產品購自美國 Promega 公司(勁因代理)：  
Sequencing Grade Modified Trypsin (Cat. no. V5111)
11. 下列產品購自日本 Dojindo 化學研究所(誠心堂代理)：  
Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Cat. no. CK04)
12. 下列產品購自 GIBCO 公司(量子代理)：  
0.25%(1X) Trypsin-EDTA (Cat. no. 25200-072) ,  
Trypan blue (0.4%) (Cat. no. 15250-016) , DPBS (Cat. no. 21600-010)
13. 下列產品購自 HyClone 公司(岑祥代理)：  
FBS (Cat. no. SV30014.03 , Lot NO. FQK24935) ,  
DMEM/F-12 1:1 (Cat. no. SH30023.02)
14. 下列產品購自德國 Riedel-de Haën 公司(友和代理)：  
Magnesium chloride ( $MgCl_2$ ) (Cat. no. 31413) ,  
Trifluoroacetic acid (TFA) (Cat. no. 61030)
15. 下列產品購自德國 MERCK 公司：  
Potassium chloride (KCl) (Cat. no. 1.04936.1000)
16. 下列產品購自瑞士 Fluka 公司(友和代理)：  
NP-40 (Cat. no. 74385)
17. 下列產品購自美國 BIOTECHX 公司：  
Ultraspec Water (RNase Free) (Cat. no. BL-5611)
18. 下列產品購自美國 Invitrogen 公司：  
TRIZOL reagent (Cat. no. 15596-026)
19. 下列產品購自法國 Fermentas 公司：  
PageRuler Unstained Protein Ladder (Cat. no. SM0661)  
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Cat. no. SM1811)
20. 下列產品購自 Bruker Daltonics Corporation：  
Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix (Cat. no. 208241)

21. 下列產品購自 Affymetrix, Inc. :
- GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array
22. 下列產品購自 SANTA CRUZ Biotechnology, Inc. :
- Antibodies : ERK 2 (C-14) (Cat. no. sc-154)
- p-ERK (E-4) (Cat. no. sc-7383)
- c-Myc (9E10) (Cat. no. sc-40)
23. 下列產品購自 Cell Signaling Technology, Inc. :
- Antibodies : Phospho-c-Myc (Thr58/Ser62) (Cat. no. 9401)
- Phospho-Src Family (Tyr416) Antibody (Cat. no. 2101)
24. 下列產品購自 Calbiochem :
- Anti-c-ErbB2/c-Neu (Ab-3) Mouse mAb (3B5) (Cat. no. OP15)
25. 下列產品購自 CHEMICON International, Inc. :
- Mouse anti-actin monoclonal antibody (Cat. no. MAB1501)
26. 下列產品購自 ROCKLAND-Inc. :
- IRDye 800 Conjugated Affinity Purified anti-Mouse IgG  
(Cat. no. 610-132-121)
- IRDye 800 Conjugated Affinity Purified anti-Rabbit IgG  
(Cat. no. 611-132-122)

#### 肆、主要器材儀器

1. 二氧化碳培養箱 : MCO-20AIC, SANYO Electric Biomedical Co, Ltd
2. 恆溫水浴槽 : B206-T2, FirStek Scientific, USA
3. 倒立式顯微鏡 : OLYMPUS CK2
4. 自動粒子計數儀 (Coulter Counter) : COULTER COUNTER<sup>®</sup> Cell and Particle Counter<sub>Z1™</sub>, Beckman Coulter, Inc.
5. 真空旋轉濃縮乾燥設備 : N-1000S + SB-1000, EYELA, Japan



6. 水流抽氣機：AS-1, EYELA, Japan
7. 恆溫循環水槽：NCB-1200, EYELA, Japan
8. 冷凍離心機：Allegra™ X-22R Centrifuge, Beckman Coulter, Inc.
9. 等電點聚焦電泳設備：PROTEAN® IEF Cell, Bio-Rad Laboratories
10. SDS-PAGE兩片式電泳設備：PROTEAN® II xi 2-D Cell, Bio-Rad Laboratories
11. 電源供應器：Amersham Biosciences Electrophoresis Power Supply EPS 1001
12. 旋轉真空乾燥機：Savant SC110
13. 介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀：MALDI-TOF/TOF Bruker ultraflex
14. 分析天秤：AL104, Mettler-Toledo International Inc.
15. 二維電泳膠體掃瞄器：EPSON PERFECTION™ 4990 PHOTO
16. Odyssey® Infrared Imaging System, LI-COR Biosciences, Nebraska, USA.

## 第二節、實驗方法

### 壹、細胞株培養 (附錄六)

(參照「高銘欽教授實驗室細胞培養標準操作程序」，編撰者:李宜臻)

#### 一、解凍細胞

#### 二、繼代培養及分盤

#### 三、凍存細胞

### 貳、細胞株生長曲線

1. 將細胞用 1X TE 自細胞培養盤打下，加 9 ml 細胞培養液均勻打散，置於 15 ml 離心管中。
2. 取出 1ml 細胞懸浮液放入已有 9 ml DPBS 的 15 ml 離心管中(10 倍稀釋)，準備計算細胞數目，其餘 9 ml 細胞懸浮液以 1000 rpm 離心 5 分鐘。

3. 自 10 倍稀釋的細胞懸浮液取出 1 ml，加入已有 19 ml Isoton 的小杯中( $10 \times 20 = 200$  倍稀釋)，用 Coulter Counter 計算細胞數。
4. 於 96 孔盤中分別種入  $1 \times 10^4$ ， $3 \times 10^4$ ， $1 \times 10^5$  cells/well 三種細胞濃度，各 24 wells(8 天 $\times$ 3 重複=24 well)
5. 將 96 孔盤置於恆溫培養箱中培養。
6. 第二天(day 1)，先用顯微鏡觀察細胞生長狀況，用 1 ml 1X TE 將三種細胞濃度各打下 3 個 well，均勻打散後分別置於 9 個微量離心管(eppendorf)
7. 將 96 孔盤放回恆溫培養箱中培養。
8. 自各 eppendorf 取細胞懸浮液 1 ml，分別加入已有 19 ml Isoton 的小杯中(20 倍稀釋)，用 Coulter Counter 計算細胞數，並紀錄之。
9. 第三天(day 2)的相同時間點，重複 day 1 的實驗操作至 day 8。
10. 整理 day 1~day 8 的數據，繪製細胞株生長曲線。

#### 參、松杉靈芝甲醇萃取 (如圖三)

1. 秤取 2g 松杉靈芝粉末於 500 ml 錐形瓶，加入無水甲醇 200 ml，Parafilm 密封瓶口。
2. 室溫下震盪(約 160~200 rpm) 24 小時。
3. 抽氣過濾 2 次，將靈芝粉末不溶的顆粒濾除，保留澄清濾液。
4. 利用減壓濃縮的原理使濾液之溶媒蒸發，最終得到硬膠狀或塊狀的靈芝甲醇萃取物。
5. 精秤所得的靈芝甲醇萃取物，每 100 mg 萃取物以 1 ml 無水甲醇回溶之。
6. 回溶的靈芝甲醇萃取物通過  $0.22 \mu\text{m}$  濾膜，分裝於 eppendorf， $-30^\circ\text{C}$  儲藏。  
(stock: 100 mg/ml)

#### 肆、創傷癒合實驗(Wound closure assay)

1. 於 24 孔盤中種入  $3 \times 10^5$  cells/well(全滿)。

2. 第二天，抽掉細胞培養液，改用只含 0.1% FBS 的細胞培養液。
3. 第三天，配製含不同濃度靈芝甲醇萃取物的細胞培養液(0.1% FBS)
4. 顯微鏡觀察 24 孔盤細胞生長情況，確定細胞生長及形態正常，抽掉細胞培養液(留下少許 medium 在 well 中)
5. 用 tip 在每個 well 底部畫出一條中分直線(wound)，並在 24 孔盤底部做記號(作為每次顯微鏡觀察位置的基準)
6. 用 DPBS 將每個 well 輕輕沖洗一次之後吸去
7. 加入含不同濃度靈芝甲醇萃取物的細胞培養液(0.1% FBS)，將 24 孔盤放回恆溫培養箱中培養。
8. 於不同時間點用顯微鏡觀察各 well 細胞創傷(wound)癒合的情形，並照相。
9. 根據相片來分析不同濃度的靈芝甲醇萃取物對於細胞株創傷癒合的影響。

#### 伍、靈芝萃取物對細胞株半數抑制濃度(IC<sub>50</sub>)的測量(CCK-8 assay)

1. 將 96 孔盤劃分為 4 區(附錄七)，第一列及第八列為 blank，只有 medium，不種細胞，其餘每 well 種入  $3 \times 10^3$  cells/90  $\mu$ l medium。
2. 第二天，於各 well 中加入 10  $\mu$ l 不同濃度之靈芝萃取物以及靈芝萃取物溶媒(作為對照組)。(總體積 100  $\mu$ l)
3. 72 小時後(第四天)，於各 well 中加入 10  $\mu$ l CCK-8，將 96 孔盤放回恆溫培養箱。
4. 2 小時後將 96 孔盤取出，用 ELISA reader 測吸光值。(最大吸光波長：450 nm)
5. 經過換算得到細胞生長抑制百分比，以及靈芝萃取物對細胞株之半數抑制濃度(IC<sub>50</sub>)。

#### 陸、細胞 RNA 的抽取、Affymetrix 人類微陣列分析以及基因體生物反應指紋圖譜(Genomic Bioresponse Fingerprint)

##### 一、均質化(Homogenization)

1. 將細胞培養盤(Petri dish)中細胞培養液吸去，DPBS 輕輕沖洗一次之後吸去，

細胞培養盤倒置於擦手紙上，使殘餘液體滴下。

2. 加入 1.2 ml TRIZOL 均勻的潤濕細胞，進行細胞裂解(cell lysis)。
3. 用 cell scrapper 將細胞刮下。
4. 用針筒及 NO.18 針頭將 cell lysate 反覆抽吸 15 次，再將 cell lysate 移到 eppendorf 中，靜置 5 分鐘。

## 二、相分離(Phase separation)

5. 加入 240  $\mu$ l chloroform，震盪 15 秒
6. 離心 12,000 $\times$ g，30 分鐘，4 $^{\circ}$ C
7. 用 P200 pipetment 小心將水層(最上層)移到新的 eppendorf

## 三、RNA 沉澱

8. 將 600  $\mu$ l IPA 加入水層，混合，靜置 30 分鐘，4 $^{\circ}$ C
9. 離心 12,000 $\times$ g，30 分鐘，4 $^{\circ}$ C
10. 用 P200 pipetment 移除上清液
11. 沿 eppendorf 管壁輕輕加入-20 $^{\circ}$ C 預冷的 75%乙醇(in RNase-free H<sub>2</sub>O)，輕輕搖晃 eppendorf，使 pellet 晃動。
12. 用 P200 pipetment 移除上清液

## 四、RNA 回溶

13. 將 pellet 及管壁上殘留的液體吹乾(不要全乾，會不好回溶)。
14. 用 30-50  $\mu$ l RNase-free H<sub>2</sub>O 將 pellet 回溶(輕輕 pipette 數次)。

## 五、RNA 品質控制(quality control)

### ● RNA 純度(quality)檢測

- 1) 分光光度器檢測(Spectrophotometric analysis) —  $A_{260} / A_{280} = 1.9 \sim 2.1$
- 2) 1.2%瓊脂糖凝膠電泳分析(Agarose gel electrophoresis analysis)

— 28S rRNA: 5 kb (4.5 kb)

18S rRNA: 2 kb (1.9 kb)

5S tRNA: 0.1 ~ 0.3 kb

● RNA 含量(quantity)檢測

分光光度器檢測(Spectrophotometric analysis)

$$— A_{260} \times 40 \times \text{Dilution factor} = \text{___ ng/}\mu\text{l RNA}$$

六、利用 PhytoViewerBR 2.2 分析 Affymetrix 人類微陣列基因表現資料得到生物反應指紋圖譜(Bioresponse fingerprint)

1. 開啟 PhytoViewerBR 2.2 軟體，將 Affymetrix data 匯入(import)
2. Filter by gene name—將有 AFFX 開頭的 gene(用於 gene chip calibration)去除
3. Filter by gene signal—將訊號 300 以下的 gene 去除
4. Filter by detection call—將各組 data 中有偵測到(at least one present)的 gene 留下
5. Filter by change call—將與 control 組相比，mRNA 量有變化(Increase or Decrease)的 gene 挑出
6. Filter by ratio—將 mRNA 變化(Increase or Decrease)量大於 4.5 倍的 gene 挑出
7. Intersect—將經過一連串 filter 後所得的 data 作交集分析，得到各組 data 中都有出現的 gene，並做 PSI(phytomics similarity index)分析。
8. Union—將經過一連串 filter 後所得的 data 作連集分析，得到所有出現於各組 data 中的 gene，並做 PSI 分析。

柒、二維凝膠電泳(2-Dimension Gel Electrophoresis) (參考：鄒宛玲，2006)

一、樣品製備(Sample preparation)

1. 將加藥(對照組：1% MeOH，實驗組：600  $\mu\text{g/ml}$  MeGt) 24 小時之 SKOV-3 細胞收成 pellet
2. 加入 pellet 體積 3 倍的 2-DE lysis buffer(使用前加 Bio-Lyte 3/10 Ampholyte 0.2%，及 50mM DTT)
3. 超音波震盪 3 分鐘
4. 離心 13,000 rpm, 4 °C, 20 分鐘
5. 取上清液



※ TCA/Acetone 蛋白質沉澱純化(protein precipitation)

6. 加入 10%TCA/Acetone(使用前加 20 mM DTT)，vortex  
(10%TCA/Acetone 與 protein sample 的體積比為 TCA/Acetone : sample = 9 : 1)
7. 使 protein 在 -20 °C 沉澱 45 分鐘至 2 小時
8. 離心 13,000 rpm, 4 °C, 10 分鐘
9. 用 P200 將上清液盡量移除
10. 加入-20°C 預冷的 Acetone 500  $\mu$ l (使用前加 20 mM DTT)，vortex
11. spin down
12. 用 P200 將上清液盡量移除
13. 重複 10~12 步驟 3 次
14. 用微量吸管尖(tip)伸入 eppendorf 吹至無液體或半乾即可，過乾則不易回溶
15. 加適量二維凝膠電泳細胞裂解液(2-DE lysis buffer)將蛋白質回溶(必要時使用超音波震盪)
16. 離心 13,000 rpm, 4 °C, 10 分鐘
17. 取上清液
18. Bradford 蛋白質定量
19. 取已定量好的蛋白質樣品 105.6  $\mu$ g(for pH 3-10 strip) or protein sample 144  $\mu$ g  
(for pH 4-7 strip), 加 2-DE lysis buffer (with fresh DTT, IPG buffer)將體積補足到 320  $\mu$ l, 再加微量 bromphenol blue (sample concentration : 99  $\mu$ g/300 $\mu$ l or 135 $\mu$ g/300 $\mu$ l)

二、一維等電點聚焦(Isoelectric Focusing)

1. 將 IPG strips 從-20 °C 冰箱拿出來在室溫下稍回溫
2. 用去離子水沾濕的小濾紙片覆蓋等電點聚焦盤(IEF focusing tray)兩旁的電極線，輕壓使濾紙片與電極線密合無氣泡。
3. 取 300  $\mu$ l 蛋白質樣品溶液，均勻加入等電點聚焦盤中(兩旁靠近電極約 1 cm 處不要加)，切勿有氣泡。



4. 用鑷子撕去 IPG strips 表面的塑膠片，將凝膠面朝下，標有 pH 值的一端朝正極，覆於蛋白質樣品溶液上，切勿有氣泡。
5. 靜置 1 小時
6. 緩慢滴加 2 ml 礦物油，將 strips 完全覆蓋。
7. 等電點聚焦盤置於 PROTEAN IEF cell，開使進行 Rehydration(水合)及蛋白質等電點聚焦。(IEF Program 之設定如附錄十二)
8. IEF 結束後，用去離子水輕輕沖洗 strips 背面，拭鏡紙吸去多餘水分、礦物油及多餘樣品。

### 三、第二維 SDS-PAGE

1. 配膠 (18 cm×18 cm×1.5 mm, 12 % acrylamide gel, 49 ml, 凝膠時間約 2 小時)，可暫存於 4°C，使用前切記要回溫
2. 低熔點瓊脂糖凝膠(overlay agarose)用水浴加熱溶解，將 gel 底部補平，以防氣泡影響電流
3. 將 strips 凝膠面朝下，置於 rehydration(水合)/equilibration(平衡) tray，加入 equilibration buffer I (4 ml/strip)
4. 搖晃 20 分鐘
5. 用去離子水輕輕沖洗 strips 背面，拭鏡紙吸去多餘水分、equilibration buffer I，加入 equilibration buffer II (4 ml/strip)。
6. 搖晃 20 分鐘
7. 用 running buffer 將 strip rinse(要避免泡泡)
8. 先加些許 running buffer(要避免泡泡)幫助 strip (gel side in)滑入兩玻璃片間 (strip 與 acrylamide gel 間不可有氣泡)
9. 倒出 running buffer，用濾紙將 well 間多餘的液體吸去
10. 濾紙片沾 5  $\mu$ l protein ladder，放於 strip 旁 (勿放太邊緣，marker 會不清楚)
11. 用 Overlay agarose(<60°C)進行封膠
12. 設定冷卻循環水槽的 cooler 於 15°C

### 13. 跑膠 (要 stir)

#### 四、膠體內蛋白質固定(Gel fixation)

1. 跑膠結束後，將膠泡在 running buffer 中搖晃 5 分鐘
2. 將膠泡在 fixation buffer 中搖晃 0.5~1 小時進行膠體固定
3. 用去離子水 wash，10 分鐘，三次

#### 五、膠體染色(VisPRO stain)

1. 將膠泡在 30 ml solution (1)中搖晃 15 分鐘
2. 用去離子水洗 2 次，倒掉去離子水
3. 迅速倒入 30 ml solution (2)，均勻搖晃至膠體呈白色
4. 用去離子水洗 2 次
5. 將膠體影像掃描存檔以待分析(PDQuest Image Analysis software；Biorad)
6. 用 PE 保鮮袋將膠體及少許去離子水以封口機密封，存於 4°C

#### 捌、膠體內蛋白質水解(In-gel digestion)

##### 一、退染(Destain)

1. 將從 2D gel 截切下的 spots 裝在用甲醇浸泡過，烘乾的 1.5 ml 微量離心管
2. 加入 1 ml 去離子水，震搖 10 分鐘
3. 移除液體
4. 加入 100  $\mu$ L 的 50% ACN / 25 mM Ammonium bicarbonate，震搖 15 分鐘
5. 移除液體
6. 重複一遍 4，5 步驟

##### 二、脫水(Dehydrate)

1. 加入 100  $\mu$ L 的 100% ACN，震搖 5 分鐘
2. 移除液體
3. 旋轉真空乾燥約 5-10 分鐘(至 gel 變成白色粒狀，能在微量離心管中彈跳方可)

##### 三、胰蛋白酶水解(Digest)

1. 加入 3  $\mu\text{L}$  的 Trypsin solution(20 ng/ $\mu\text{L}$ , in 25 mM Ammonium bicarbonate)
2. 於 4  $^{\circ}\text{C}$  靜置 1 小時
3. 加入 3-5  $\mu\text{L}$  的 25 mM Ammonium bicarbonate
4. 將微量離心管密封於 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 overnight

#### 四、蛋白質提取(Extract)

1. 加入 2-5  $\mu\text{L}$  的 1% TFA / 100% ACN
2. 超音波震盪 10 分鐘
3. 靜置 10 分鐘
4. 離心 1,000 $\times$ g, 30
5. 取上清液

#### 玖、介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀(MALDI-TOF)及資料庫應用

1. 點盤 — 取 0.5  $\mu\text{L}$  sample，輕點於 target (Anchor chip) 中央，待 sample 自然風乾後，再點 0.5  $\mu\text{L}$  HCCA matrix 於 sample 上，自然風乾。
2. MALDI-TOF 雷射激發及質譜分析設定

雷射激發設定 — Auto-PMF (auto-run method)

Initial laser power : 22%      Maximal laser power : 30%

Fire initially : 3 shots with a laser power of 25%

Peak selection : Use masses from 1,000 Da to 2,500 Da

Sum up 500 satisfactory shots in 100 shot steps

質譜分析及 Mascot 資料庫搜尋(protein identification)設定

— FlexAnalysis Method : Internal Calibration PMF\_Yvonne.FAMSMETHOD

BioTools MS Method : Tryptic Map 100ppm

Taxonomy : Homo sapiens (human)

Database : NCBI nr      Enzyme : Trypsin

Global Modifications : Carbamidomethyl(C)

Variable Modifications : Oxidation(M)

Missed Cleavages  $\leq 1$

Mass Tol. MS : 100ppm

Mass values : MH<sup>+</sup> Monoisotopic

3. 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) , PROXEON ProteinCenter<sup>TM</sup> (<http://www.proxeon.com>) , ExPASy (<http://au.expasy.org>)等資料庫搜尋各蛋白質之相關資訊, 並利用 GeneGo Meta Core<sup>TM</sup> (<http://portal.genego.com>)繪出各蛋白質相互關係之圖譜(signaling networks)

#### 拾、西方墨點法(Western blot)

##### 一、樣品製備(Sample preparation)

1. 將細胞收成 pellet
2. 加入約與 pellet 體積等量的 HEPES/NP-40 cell lysis buffer(使用前加 Protease inhibitor Cocktail, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Ser/Thr-PhosphataseInhibitor Cocktail)
3. 超音波震盪 1 分鐘
4. 離心 13,000 rpm, 4 °C, 20 分鐘
5. 取上清液
6. Bradford 蛋白質定量
7. 取已定量好的蛋白質樣品, 加適量 HEPES/NP-40 cell lysis buffer 及 2X sample buffer, 將各樣品的蛋白質含量及體積調為一致
8. 水浴法將各樣品沸煮 3 分鐘
9. 待樣品自然冷卻後再置於-20 °C 儲藏

##### 二、製膠 (可暫存於 4°C)

凝集膠 : 5 % acrylamide gel

分離膠 : 10 % acrylamide gel

##### 三、跑膠

上膠：70V，30 分鐘

下膠：110V，1.5 小時

#### 四、蛋白質轉漬(transfer)

75V，3.5 小時

#### 五、Immunoblotting

1. 將轉漬完成的 PVDF membrane 泡入 5%脫脂牛奶(in TBST)中，室溫下搖晃 1 小時 (或 4 °C overnight)
2. 取出 PVDF membrane，再泡入含有一級抗體的 5%脫脂牛奶 in TBST(或 5% BSA in TBST)中，室溫下搖晃 1 小時 (或 4 °C overnight)
3. 取出 PVDF membrane，泡入 TBST 中，搖晃(wash)10 分鐘，三次
4. 取出 PVDF membrane，再泡入含有二級抗體的 5%脫脂牛奶 in TBST 中，室溫下搖晃 1 小時
5. 取出 PVDF membrane，泡入 TBST 中，搖晃(wash)10 分鐘，三次
6. 用 Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System 掃描，分析



## 第三章、結果

### 第一節、細胞株培養

依照「高銘欽教授實驗室細胞培養標準操作程序」(編撰者:李宜臻)進行細胞培養。SKOV-3 細胞株為人類卵巢癌上皮細胞株，其形態如圖 2.1 所示。為徹底掌握細胞生長速率及形態，進行 SKOV-3 細胞株生長曲線的繪製，如圖 2.2 所示。由生長曲線可推知 SKOV-3 細胞株倍增時間(doubling time)如同 ATCC 所記載，約為 48 小時。

### 第二節、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株的影響

#### 壹、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株形態的影響

如圖 4.1 所示，SKOV-3 細胞株原本形態規則，似菱形或紡錘形，略圓，飽滿，排列緊密。投予靈芝(甲醇或乙醇)萃取物 0，100，500，1000  $\mu\text{g/ml}$  後，隨著給予靈芝萃取物濃度的增加，SKOV-3 細胞形態越顯狹長且不規則，細胞數量也漸次減少，至最高濃度時細胞全部死亡，顯微鏡下只見小碎片般的殘骸。由此可知靈芝甲醇及乙醇萃取物對 SKOV-3 細胞株有生長抑制，甚至具毒殺作用。

#### 貳、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株移動能力的影響

創傷癒合試驗(Wound closure assay)結果如圖 4.2 所示，松杉靈芝甲醇及乙醇萃取物對 SKOV-3 細胞傷口癒合的影響大致相同。投予 30  $\mu\text{g/ml}$ (小劑量)靈芝甲醇及乙醇萃取物的組別，則觀察到其傷口癒合速度較 control 組為快，48 小時就已完全癒合。投予 100  $\mu\text{g/ml}$ (大劑量)靈芝甲醇及乙醇萃取物的組別其傷口癒合速度明顯較慢，第 48 小時以後幾乎不見任何進展，第 72 小時可見到靠近傷口中心的細胞部份出現形態變異，在第 96 小時，靠近傷口中心細胞形態變異的情形益加明顯，甚至有部分細胞死亡，導致傷口復又擴大。由實驗結果可知靈芝甲醇及

乙醇萃取物在 30  $\mu\text{g/ml}$ (小劑量)下會促進 SKOV-3 細胞傷口癒合速率，表示可能增加 SKOV-3 細胞移動速率；在 100  $\mu\text{g/ml}$ (大劑量)下，會抑制 SKOV-3 細胞傷口癒合速率，表示可能降低 SKOV-3 細胞移動速率或移動能力。

### 參、松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株的半數抑制濃度( $\text{IC}_{50}$ )

利用 CCK-8 assay (其原理與 MTT 相似)，松杉靈芝甲醇及乙醇萃取物對 SKOV-3 細胞株的半數抑制濃度( $\text{IC}_{50}$ ) 如圖 5 所示。松杉靈芝甲醇萃取物對細胞株之  $\text{IC}_{50}$  約為 300  $\mu\text{g/ml}$ ；松杉靈芝乙醇萃取物對細胞株之  $\text{IC}_{50}$  約為 200  $\mu\text{g/ml}$ 。且由生長抑制曲線可看出，松杉靈芝甲醇萃取物對 SKOV-3 細胞株的生長抑制作用濃度範圍為 100-800  $\mu\text{g/ml}$ ，而松杉靈芝乙醇萃取物則為 100-300  $\mu\text{g/ml}$ ，明顯比松杉靈芝甲醇萃取物窄。

## 第三節、SKOV-3 細胞株對松杉靈芝萃取物的基因體生物反應

### 指紋圖譜

利用 PhytoViewerBR 2.2 分析 SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝萃取物 24 小時之 Affymetrix 人類微陣列基因表現資料，得到生物反應指紋圖譜(Bioresponse fingerprint) 如圖 6 所示。圖上每一橫紋即代表一個 gene，顏色表示投予松杉靈芝萃取物後，此 genes 之 mRNA transcripts 量與 control 組相比增加或減少的程度。(圖 6a) 經過連集分析(得到出現於各組 data 中的所有 genes)得到 671 個 genes，由圖可看出投予松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt: 600  $\mu\text{g/ml}$ )的組別(Me2~Me4)與投予松杉靈芝乙醇萃取物(EtGt: 400  $\mu\text{g/ml}$ )的組別(Et6、Et7)，其 gene expression 具有不同但相似的颜色 profile。(圖 6b) 經過連集分析得到 376 個 genes，比(圖 6a)分析得到的基因數少，代表(Me2~Me4)間的重疊性更高。(圖 6c)經過交集分析(篩選同時在各組 data 中皆有出現的 genes)得到 139 個 genes。(圖 6d)

(Me2~Me4)經過交集分析得到 198 個 genes，比(圖 6c)分析得到的基因數多，同樣代表投予松杉靈芝甲醇萃取物的三組間其重疊性更高。

另外，同樣利用 PhytoViewerBR 2.2 分析 SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝萃取物之 Affymetrix 人類微陣列基因表現資料，進一步將各組間之 bioresponse 的相似度做統計分析，得到各組間之 PSI matrix ((phytomics similarity index; PSI value, 0: complete difference, 1: complete similarity) 如表 1 所示。結果顯示投予松杉靈芝甲醇萃取物的三組間之 bioresponse 極相似(PSI value > 0.95)，而投予松杉靈芝甲、乙醇萃取物的兩大組間之 bioresponse 相似但不同。

#### 第四節、以二維電泳、質譜分析以及資料庫比對推測靈芝對 SKOV-3

##### 細胞株蛋白質表現的影響

##### 壹、利用二維凝膠電泳及介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜分析投予松杉靈芝甲醇萃取物後表現量有差異的蛋白質

一開始使用 pH3-10 linear 及 non-linear 的等電點 pH 梯度膠來進行二維凝膠電泳，目的是先觀察大 pH 值範圍中，投予松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt)後表現量有差異的蛋白質大都出現在哪個 pH 值範圍，如圖 7a, 7b 所示。經二維膠體影像分析軟體 PDQuest Image Analysis software 處理，表現量有差異的蛋白質點大都出現在 pH4-7 範圍中。為了將 pH4-7 範圍間的蛋白質點看的更清楚，採用 pH4-7 linear 的等電點 pH 梯度膠如圖 7c 所示。

經 PDQuest 分析得 106 個差異蛋白質點，將蛋白質點切取下來，作膠體內蛋白質水解(In-gel digestion)，用 MALDI-TOF 分析，經過 MASCOT 資料庫比對 (MOWSE Score > 65 are significant,  $p < 0.05$ )，得到 51 個不同的蛋白質(詳見表二)。有少部份蛋白質點經 MALDI-TOF/MASCOT 分析含有相同蛋白質(皆為 tubulin 及 keratin)，但 PDQuest 分析這些蛋白質點並非一致增加或下降。

## 貳、匯整所有經 2D-MS/MASCOT 分析所得之蛋白質

表 3 中將 SKOV-3 細胞投予靈芝甲醇萃取物之 2D-MALDI/TOF (蛋白質表現) 及 Affymetrix (基因表現) 分析結果做對照，結果在兩種分析中表現量皆上升的蛋白質(或基因)有 4 個，分別為 HSPA5 (heat shock 70kDa protein 5; HSP70)，SLC3A2 (lymphocyte activation antigen 4F2 large subunit)，HSP90B1 (heat shock protein 90 kDa beta member 1; HSP90)，P4HB (prolyl 4-hydroxylase subunit beta)；而在兩種分析中表現量皆下降的蛋白質(或基因)有 5 個，分別為 CAPG (actin-regulatory protein CAP-G)，LASP1(LIM and SH3 protein 1)，TUBB4 (tubulin, beta 4)，HNRPK(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)，Cnn3 (calponin 3)。另外，ECHS1(short chain enoyl-CoA hydratase)，CAPZB (capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta)，PKM2 (pyruvate kinase, pyruvate kinase 3) 的 microarray 數據顯示其基因表現下降，與蛋白質的上升表現相反。

表 4 中將 2D-MALDI/TOF 分析得到的 51 個蛋白質依功能分類，大致分為 chaperone，代謝相關蛋白，細胞骨架蛋白，細胞骨架結合蛋白，與胞內物質運輸相關之蛋白質，異質性細胞核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)，轉錄因子，調節 mRNA splicing 的蛋白質，轉錄活化的輔因子，轉譯因子，生長因子，溶酶體及蛋白酶體相關蛋白，具解毒功能的蛋白質，具抗氧化功能的蛋白質，甲狀腺素結合蛋白，一般性酵素蛋白，以及其他蛋白質。

較引人注意的是，表 4 中出現的 hnRNP，轉錄因子，調節 mRNA splicing 的蛋白質，轉錄活化的輔因子及轉譯因子的蛋白質表現量都是下降的，值得去探討它們之間的關聯性以及是否與靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長機制有關。另外，表 4 中出現的所有 chaperone 的蛋白質表現量都是上升的，這也有進一步探討的必要。



### 參、受松杉靈芝甲醇萃取物影響的蛋白質間的相互作用

本實驗室使用 GeneGo Meta Core™ (<http://portal.genego.com>)繪出各蛋白質相互關係之圖譜(signaling networks)以作為後續研究方向的參考。圖 8a, 8b 是套用不同模式所繪製出的 signaling networks, 分別有 23 個及 12 個受靈芝影響表現量改變的蛋白質被繪入 signaling networks。

綜觀此二圖, 對照二維凝膠電泳及直譜儀分析數據, 挑選出與生長相關且互具關聯性的蛋白質, 繪出 SKOV-3 細胞內表現量受靈芝甲醇萃取物所改變之部分生長相關蛋白質間的相互關係網路圖(圖 9)。

由圖 9 中可以發現數個與細胞內重要生長訊息傳導有關的蛋白質, 會被受靈芝影響表現量的蛋白質所調控, 包括 c-Myc, c-Src, HER2, AKT/PKB, ERK/MAPK, AKT, HIF1A 等。投予靈芝甲醇萃取物的組別中, 具有促進 c-Myc, c-Src oncoprotein 表現之功能的 hnRNPK(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K), FUBP1(myc far upstream element-binding protein), KHSRP(KH-type splicing regulatory protein), TRRAP(transformation/transcription domain-associated protein) 蛋白質表現量皆減少, 暗示 c-Myc, c-Src 表現可能也會減少。但相反的, 同時也見到 HSP90, HSP70, HSP27 等 chaperone 表現量增加, 這些 chaperone 會使 c-Myc, c-Src, HER2, AKT/PKB, ERK/MAPK, vimentin 等訊息傳導相關的重要蛋白質結構穩定具活性的功能。

本實驗須確認的是, 在投予靈芝甲醇萃取物後, c-Myc, c-Src, HER2, AKT/PKB, ERK/MAPK 等蛋白質表現及其活性究竟是上升抑或下降。若能證明這些蛋白質的確受靈芝甲醇萃取物抑制, 則就可能揭露松杉靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長的部分分子機轉。



## 第五節、推測並驗證靈芝甲醇萃取物抑制細胞生長之可能分子機轉

### 壹、以西方墨點法確認松杉靈芝甲醇萃取物能抑制細胞內重要訊息傳導和生長相關蛋白質(c-Myc, ERK2, c-Src, HER2)之表現量

由圖 10 a-d 可看出, c-Myc, ERK2, c-Src, HER2 及其磷酸態(活性態)蛋白質表現在松杉靈芝甲醇萃取物較小劑量(150  $\mu\text{g/ml}$  MeGt, 即 0.5 個  $\text{IC}_{50}$ )下會稍微升高, 但劑量升高到 300  $\mu\text{g/ml}$  MeGt (即 1 個  $\text{IC}_{50}$ ), 以及 600  $\mu\text{g/ml}$  MeGt (即 2 個  $\text{IC}_{50}$ )時, c-Myc, ERK2, c-Src, HER2 及其磷酸態(活性態)蛋白質表現均有不同程度的減少, 其中表現量受抑制最為顯著的是 p-ERK2。

Western Blotting 的結果初步顯示 c-Myc, c-Src, HER2, AKT/PKB, ERK/MAPK 等蛋白質表現及其活性的確受靈芝甲醇萃取物抑制。

### 貳、靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長之可能分子機轉

根據上述所有實驗結果, 推測出一部分靈芝甲醇萃取物(MeGt)抑制 SKOV-3 細胞生長之可能分子機轉, 如圖 11 所示。

(1) MeGt 使具有促進 *c-myc* 及 *c-src* DNA 轉錄的 hnRNPK, KHSRP, FUBP1 蛋白表現量減少, 可能從而抑制 c-Myc 及 c-Src oncoproteins 及其下游基因的表現, 達到抑制癌細胞增生的作用。

(2) 由於 MeGt 促使 heat shock protein 表現, 但同時卻看到 HER2, c-Src, ERK2 等蛋白表現量減少, 因此推測, MeGt 可能抑制了 HSP90, HSP70 及 HSP27 穩定其 client proteins, 包括 HER2, c-Src, ERK2, AKT, HIF1A(hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit), vimentin 等, 的功能, 使其 client proteins 不具功能性, 或無法被運送, 甚至被降解, 達到抑制癌細胞 survival 的作用。

(3) MeGt 直接或間接抑制 enolase 及 LDHB(L-lactate dehydrogenase B chain) 蛋白質的表現, 使醣解作用下降, 細胞產能下降, 因而降低了癌細胞的增生能力。

## 第四章、討論

### 第一節、基因體生物反應指紋圖譜分析結果之意義

本實驗結果顯示(圖 6, 表 1), 松杉靈芝甲、乙醇萃取物使 SKOV-3 細胞株產生不同但部份相似的反應, 表示松杉靈芝甲、乙醇萃取物可能具有部份相似或相同生物反應成分。而投予松杉靈芝甲醇萃取物的三組重複實驗間之 bioresponse 極相似 (PSI value > 0.95)。

Bioresponse fingerprint 顏色分布圖, 可一眼看出不同藥物所造成的 bioresponse profile, 當多批藥物同時測驗時, 差異性大的組別可立即被分辨。而 PSI 分析, 是以統計方式呈現細胞對各批藥物的 bioresponse 相似程度, PSI 數據為判斷各批藥物間成份相似度的最大依據。由此可知, Bioresponse fingerprinting 分析平台極有潛力做為中草藥品質鑑定的利器。

### 第二節、蛋白質體學研究方法討論

本實驗使用蛋白質體學的研究方式, 篩選出被松杉靈芝所改變的 51 種蛋白質。可預測, 若經由等電點 pH 梯度膠種類的改變, SDS-PAGE 膠體比例的調整, 2-DE / MALDI-TOF / MASCOT 將能近乎全方面的篩選出被松杉靈芝所改變的各種蛋白質。但是, 蛋白質體學研究方式所帶來的大量結果數據及相關資訊的分析處理和判讀, 甚至比實驗操作本身更為艱難費時。並且, 2-DE / MALDI-TOF / MASCOT 研究結果必須配合其它實驗方式, 例如 Western blotting, Q-PCR, 螢光染色等, 以驗證 2-DE 結果及推論。

從二維凝膠電泳開始一直到 MASCOT 資料庫比對是一連串環環相扣的實驗操作, 當中任一步驟的差錯都可能造成樣品污染或最後數據判讀的困擾。在本實驗中, 經由數次挖取不同膠上的相對蛋白質點, 對照其最後資料庫比對結果, 確認每次操作具有良好的重複性。表二中凡是具有兩個編號的點即為經過重複挖取

者，如編號(3-7101，5-7104)，(4-0208，5-1301)，(8-5705，10-5705)及其他數對蛋白質點的資料庫比對結果，幾乎是相同的蛋白質。

但是有少部份蛋白質點經 MALDI-TOF/MASCOT 分析含有相同蛋白質，但 PDQuest 分析這些蛋白質點並非一致增加或下降，此種情形造成判讀這些蛋白質表現究竟被 MeGt 促進或抑制時的不確定。由於這些蛋白質皆為 actin，tubulin 或 keratin，因此不能排除是樣品處理過程中遭外界污染所導致，故為了避免增加接下來推斷分子機轉時的複雜性及不確定性，在分子機轉分析時 actin，tubulin，keratin 是被屏除在外的。但同時，也不能排除這些細胞骨架蛋白非一致增加或下降的情形不是由於細胞內複雜的調控機轉所造成，因此有關這部份的分子機轉機轉，尚待日後進一步的研究。

### 第三節、與本實驗結果相關的文獻評析與闡釋

#### 壹. 靈芝與細胞骨架

2004 年發表的一篇文章指出，靈芝乙醇萃取物能抑制人類膀胱癌細胞生長 (G2/M arrest)，並促進 actin 聚合 (polymerization) (Lu *et al.*, 2004)。作者觀察到，在小於引起細胞毒性的靈芝乙醇萃取物劑量下，細胞內 F/G-actin ratio 增加，表示 actin 細胞骨架的聚合作用增加，利用共軛焦螢光顯微鏡也看到 F-actin 的增加。作者發現由於細胞骨架過於穩固，相對的其移動性便被降低，但 F-actin 增加的詳細機轉尚未明瞭。本實驗中利用 2-DE/MS 的研究策略，亦發現許多細胞骨架及細胞骨架相關蛋白之表現量被松杉靈芝甲醇萃取物所改變，其中也包括 actin 和調控 F-actin 聚合及穩定的蛋白質 (nebulin, CAPZB, PKM2, HSP27 等)。同樣的，本實驗也證實 SKOV-3 細胞的創傷癒合速度被減緩，那麼，是否也是由於 F-actin 聚合的增加所導致，將是一個有趣的研究方向。

## 貳. 松杉靈芝與紫杉醇(taxol)

對細胞骨架造成影響最出名的藥物就是 taxol，它會使 microtubule (由  $\alpha/\beta$  tubulin 所構成) 過於穩定，細胞分裂無法順利進行而停在具有多核的 G2/M 期，最終導至細胞凋亡。

2005年的一篇研究以蛋白質體研究方式探討投予 Paclitaxel 後，子宮頸癌細胞株產生了哪些蛋白質變化 (Lee *et al.*, 2005b)。文章表列出有改變的蛋白質中，有幾個是在本篇研究中也有提到的，如 TRIO，HSP70，c-Myc 等，其增加或減少的趨勢也和本篇研究的結果相符。雖然只有這些蛋白質重疊，以目前的證據不能推斷 taxol 與靈芝的作用機轉是否有相似之處，但這也是一種可能的想法。

## 第四節、實驗結果釋論

經過一系列實驗，找到了 51 個因投予松杉靈芝甲醇萃取物而表現量改變的蛋白質(表 2)，再經整理分析後，挑出了當中相關性較高的幾個蛋白質，推測可能的路徑機轉(圖 11)。下面以蛋白質功能性作分類並討論松杉靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 生長的可能機轉。

### 1. Chaperones

Chaperones 的功能在幫助蛋白質的摺疊，或維持蛋白質的構造及功能。大多數的 chaperones 是 heat shock proteins (HSPs)，這些蛋白質會在細胞遭受高溫或其他壓力(stress)時增加，以保護蛋白質的構造與功能。一般而言 HSPs 的增加會使細胞逃離程式性凋亡。本實驗 51 個蛋白質中的 chaperone 包括 HSP90，HSP70 及 HSP27，它們的蛋白質表現量在投予松杉靈芝甲醇萃取物後都增加了，這應該是由於靈芝萃取物對細胞造成 stress 所致。

HSP90 分子量 90kDa，負責維持許多與細胞增生及存活有關的蛋白質的構造



及功能，包括 Raf, Akt, ErbB2, Bcr-Abl, HIF-1, p53 等。也因此，許多種癌症治療皆可由抑制 HSP90 來著手。譬如 HSP90 抑制劑 tanespimycin (KOS-953, 17-AAG) 作為癌症治療藥物已進入臨床第二期試驗，而其與 Herceptin 合併治療 HER2/neu-positive 乳癌也進入了臨床第二期試驗，據研究，tanespimycin 與 Herceptin 併用可降低 HER2/neu-positive 乳癌細胞的抗藥性。目前進入臨床試驗的 HSP90 抑制劑大多由天然物 geldanamycin 經結構修飾而成，但研究人員仍在尋找更小分子的抑制劑，以期有更安全的 therapeutic index。

HSP70 是一種 cell cycle-dependent chaperone，它在 G1/S 期是最多的，且受到 c-Myc 調控 (Kao *et al.*, 1985; Wu and Morimoto, 1985)。HSP70 尚會穩定 caspase-3 & -7 的 precursor 構造，使 caspase 不能被切割成活化態 (Komarova *et al.*, 2004)，從而使 vimentin (一種主要的 intermediate filament) 不致被 caspase-7 降解。

HSP27 會與 vimentin 結合，穩定其可溶型態(soluble type) (Lee *et al.*, 2005a)。可溶態的 vimentin 能與活化態(phosphorylated)的 Erks、importin  $\beta$ 、及 dynein 等組合成一個向核運送的單位(a retrograde transport unit) (Perlson *et al.*, 2005)。另有文獻指出，HSP27 可作為上皮卵巢細胞癌患者預後的指標 (Geisler *et al.*, 1998)。

綜合而言，HSP90，HSP70 及 HSP27 的增加應會使細胞存活及增生，但實際觀察下來，SKOV-3 細胞的生長及存活數量確實受松杉靈芝萃取物抑制。另外，Western Blotting 結果顯示 HSP90 的 clients，如 p-ERK2 及 ErbB-2，蛋白質表現量皆被靈芝抑制 (圖 10b, 10d)。故松杉靈芝甲醇萃取物雖使 HSP90，HSP70 及 HSP27 的蛋白質表現量增加，但可能沒有正常的活性，抑或是無法與 clients 結合。但當然也有其他可能，靈芝萃取物是經由其他機轉抑制 ErbB-2 及 p-ERK2 的產生，而非影響 chaperones 的功能，本實驗室郭漢鵬學長的研究中就曾指出，松杉靈芝萃取物能經由抑制 c-erbB2 的 promotor 使 ErbB-2 蛋白質表現減少 (郭漢鵬, 2006)。故尚需用 IP-Western 針對 HSP90, HSP70, HSP27 與其 client proteins 的結合做進一步確認。



## 2. Transcription factors/mRNA processing proteins/Tranlation factors

HNRPK, HNRPH1, FUBP1, KHSRP(FUBP2), TRRAP, EEF2 等，都是位於細胞中負責調控轉錄，RNA processing 及轉譯的蛋白質 (Chou *et al.*, 1999; He *et al.*, 2000; Sakamuro and Prendergast, 1999)。c-Src, c-Myc (Michelotti *et al.*, 1996; Ritchie *et al.*, 2003) 的蛋白質表現量深受它們的調控。於本實驗中觀察到，HNRPK, HNRPH1, FUBP1, KHSRP(FUBP2), TRRAP, EEF2(elongation factor 2) 的蛋白質表現量在投予松杉靈芝甲醇萃取物後一致減少。

TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) 會做為輔因子，與 c-Myc 或 E2F1 (E2F transcription factor 1) 的 transactivation domain 結合，促進它們的 transactivation activity (Sakamuro and Prendergast, 1999)。

由於松杉靈芝甲醇萃取物使 HNRPK, HNRPH1, FUBP1, KHSRP(FUBP2), TRRAP, EEF2 的表現皆減少，因此理論上 c-src, c-myc 及其下游基因的表現量也應該會減少。由 Western Blotting 的結果的確可看出 c-Myc oncoproteins & c-Src 表現量有降低之趨勢(圖 10a, 10c)。這提供了一個松杉靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 生長的可能機轉。

## 3. Cytoskeletons / Cytoskeleton-binding proteins

本實驗中發現因靈芝而改變的細胞骨架及相關結合蛋白有 keratin (2, 3, 8, 9, 74), actin ( $\alpha$ 1,  $\beta$ ,  $\gamma$ 1), beta-tubulin (2b, 2c, 4), Cnn3, LASP1, nebulin, CAPG, PKM2, dynein, Tara (TRIO binding protein), CAPZB, Vimentin 等。這些 keratin, actin 及 tubulin 當中有部份出現之前有討論過的表現增減不一致的情形，故在分子機轉分析時 actin, tubulin, keratin 並不在考慮之列；這些細胞骨架蛋白絕對不是不重要，只是需要更多更精確的實驗結果以作為判斷依據。

細胞骨架可分為 microfilament, microtubule 及 intermediate filament 三大類。Microfilament 由 F-actin, G-actin 構成，G-actin 相互聚集便形成 F-actin。CapG, CAPZB, nebulin 會與 F-actin, 穩定 F-actin。PKM2 則具有促進 F-actin 聚合的作

用。Microtubule 由  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin 構成，功用在提供機械支援力，並且為細胞內的「公路」，提供胞內運輸的途徑，亦會形成紡錘體與星狀體。Dynein 是胞內主要的運輸蛋白之一，他能攜帶 vesicle，沿著 microtubule 進行運送。Intermediate filament 是最穩定的細胞骨架成分，主要起支撐作用，並維持細胞核形態的穩定性，亦與胞內物質的運輸密不可分。Keratin 及 vimentin 都屬於 intermediate filament。

HSP27 具有穩定 vimentin 可溶性的作用。Intermediate filament 對於活性態 ERK/MAPK 的運輸是必要的 (Perlson *et al.*, 2005)，並且能防止 p-ERK 被去磷酸化 (Perlson *et al.*, 2006)。根據 2-DE 影像分析，HSP27 及 vimentin 在投予靈芝後都有上升，則其下游的 c-Myc 表現量可能會增加。西方墨點法結果卻顯示，c-Myc 表現下降雖不顯著，但的確有減少的趨勢。因此，如同之前所猜測的，松杉靈芝萃取物或許抑制了 HSP27 的功能，使 vimentin 的可溶構造不穩定，無法進行運輸。又或者，靈芝萃取物純粹是如先前所推測，經由抑制 HNRPK, HNRPH1, FUBP1, KHSRP, TRRAP 蛋白質表現量從而抑制 c-Myc 蛋白質表現。

#### 4. Metabolic proteins

根據實驗結果，Enolase, LDHB, EFABP (fatty acid-binding protein, epidermal) 的蛋白質表現量下降，ECHS1, PKM2 則是上升。Enolase 為醣解作用的第九個酵素，而 LDHB 掌管無氧醣解作用的最後一個步驟。當此二者同時下降，細胞產能減少，可能因而抑制了細胞生長。但 PKM2，醣解作用的第五個酵素，於本實驗中是上升的。有關這部分尚有待釐清。

Enolase 的轉錄受 HIF1 所調控，而 HIF1 的下游 gene 還包括 VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF- $\beta$  (platelet-derived growth factor  $\beta$ ), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), EPO (Erythropoietin) 等。Kimura 等人在 2002 年發表，靈芝三萜類化合物能抑制由 VEGF 誘發的血管新生 (angiogenesis) (Kimura *et al.*, 2002)。因此推測，松杉靈芝萃甲醇提取物可能經由抑制 HIF1 及 VEGF，而具

有抗血管新生的作用。但此推測仍需進一步的證實。

## 5. Detoxification proteins

GSTP1 (pi-class glutathione transferase)是具有解毒功能的蛋白質，在遇到有毒物質時，能發揮細胞保護的功效。GSTP1 能催化親核性攻擊使 glutathione (GSH) 還原，再利用還原態的 glutathione 與內生性或外生性的疏水親電子型化合物相接合，使其親水性增加，有利於被代謝或排除 (Hayes and Strange, 1995; Rushmore and Pickett, 1993)。GSTP 能對抗的外生性毒物包括烷化基抗癌藥物及抗生素類抗癌藥物，例如 chlorambucil 及 doxorubicin 等。許多研究都證明，GSTP1 過表現與人類癌症的發生，發展，以及藥物抗性有關，並與病患存活率呈反向相關 (Black and Wolf, 1991; Shah *et al.*, 1997; Tew, 1994)。而在許多人類癌症中都被報告出有 GSTP 表現上升的情形，包括肺癌，大腸癌，卵巢癌，睪丸癌，膀胱癌，口腔癌，和腎臟癌等 (Green *et al.*, 1993; Katagiri *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994)。

投予松杉靈芝甲醇萃取物後，發現 GSTP 蛋白質表現降低，這對於抗癌細胞生長而言，無疑是個好消息。更值得深思的是，GSTP 降低，意味著靈芝與其他抗癌藥併用的價值。此外，若是對於靈芝抑制 HSP90 功能的推測能被證實，其對於減低癌細胞抗藥性的能力將會是靈芝運用在臨床上的重點。

## 第五節、本研究提出的假說

綜合實驗結果及文獻探討，本研究提出三個松杉靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長的可能機轉：

(1) 松杉靈芝甲醇萃取物抑制 HNRPK, HNRPH1, FUBP1, KHSRP(FUBP2), TRRAP, EEF2 蛋白質的表現，因而使 *c-src*, *c-myc* 及其下游基因的表現量減少，從而抑制了 SKOV-3 細胞的增生。

(2) 松杉靈芝甲醇萃取物可能抑制 HSP90, HSP70, 及 HSP27 的正常的活性, 抑或是其與 clients 結合的能力, 而使許多與細胞增生和存活有關 (Raf, Akt, ErbB2, HIF-1 等) 以及負責細胞內運輸(vimentin)的蛋白質構造功能不穩定, 而抑制 SKOV-3 細胞增生及存活。

(3) 松杉靈芝甲醇萃取物使 Enolase 和 LDHB 蛋白質表現量下降, 癌細胞醱解作用被抑制, 因而降低 SKOV-3 細胞生長。



## 第五章、結論

本實驗中，先後使用了生物反應指紋圖譜(bioresponse fingerprinting)分析平台，及蛋白質體學的研究方式，探討松杉靈芝甲醇萃取物抑制人類卵巢癌細胞株 SKOV-3 生長的分子機轉，結果顯示：

一、生物反應指紋圖譜分析平台能敏銳的分辨出藥物的異同及程度，極有潛力做為中草藥品質鑑定的利器。

二、2-DE / MALDI-TOF-MS 蛋白質體學的研究方式可大量而有效的篩選出經松杉靈芝處理後卵巢癌細胞內產生改變的各種蛋白質。

三、松杉靈芝甲醇萃取物可能的作用機轉：

- (1) 抑制 c-Src、c-Myc 及其下游基因的表現，而抑制了 SKOV-3 細胞的增生。
- (2) 影響 HSP90 及 HSP27 的正常功能，因而抑制 SKOV-3 細胞的增生及存活。
- (3) 抑制 SKOV-3 細胞醣解作用，因而降低細胞生長。



## 第六章：參考文獻

2D Electrophoresis: From Protein Maps to Genomes. Proceedings of the International Meeting. Siena, Italy, September 5-7, 1994. *Electrophoresis* 16:1077-1322, 1995.

Banks, J.F., Jr., Shen, S., Whitehouse, C.M., and Fenn, J.B. (1994). Ultrasonically assisted electrospray ionization for LC/MS determination of nucleosides from a transfer RNA digest. *Analytical chemistry* 66, 406-414.

Black, S.M., and Wolf, C.R. (1991). The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacology & therapeutics* 51, 139-154.

Chou, M.Y., Rooke, N., Turck, C.W., and Black, D.L. (1999). hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Molecular and cellular biology* 19, 69-77.

Chuang, T.C., Lee, Y.J., Liu, J.Y., Lin, Y.S., Li, J.W., Wang, V., Law, S.L., and Kao, M.C. (2003). EBNA1 may prolong G(2)/M phase and sensitize HER2/neu-overexpressing ovarian cancer cells to both topoisomerase II-targeting and paclitaxel drugs. *Biochemical and biophysical research communications* 307, 653-659.

Chuang, T.C., Way, T.D., Lin, Y.S., Lee, Y.C., Law, S.L., and Kao, M.C. (2002a). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 may act as a transforming suppressor of the HER2/neu oncogene. *FEBS letters* 532, 135-142.

Chuang, T.C., Yu, Y.H., Lin, Y.S., Wang, S.S., and Kao, M.C. (2002b). The N-terminal domain of SV40 large T antigen represses the HER2/neu-mediated transformation and metastatic potential in breast cancers. *FEBS letters* 511, 46-50.

Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* 252, 1102-1106.

Daniel, H. (2002). Genomics and proteomics: importance for the future of nutrition research. *The British journal of nutrition* 87 *Suppl* 2, S305-311.

Fujii, A., Kuboyama, N., Yamane, J., Nakao, S., and Furukawa, Y. (1993). Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats. *General pharmacology* 24, 1527-1532.

Gan, K.H., Fann, Y.F., Hsu, S.H., Kuo, K.W., and Lin, C.N. (1998). Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of natural products* 61, 485-487.

Gao, Y., Zhou, S., Jiang, W., Huang, M., and Dai, X. (2003). Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. *Immunological investigations* 32, 201-215.

Geisler, J.P., Geisler, H.E., Tammela, J., Wiemann, M.C., Zhou, Z., Miller, G.A., and Crabtree, W. (1998). Heat shock protein 27: an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology* 69, 14-16.

Goldman, R. (1988). Characteristics of the beta-glucan receptor of murine macrophages. *Experimental cell research* 174, 481-490.

Green, J.A., Robertson, L.J., and Clark, A.H. (1993). Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours. *British journal of cancer* 68, 235-239.

Hayes, J.D., and Strange, R.C. (1995). Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free radical research* 22, 193-207.

He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O'Connell, B., Benham, C.J., and Levens, D. (2000). Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression. *The EMBO journal* 19, 1034-1044.

Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., and Watanabe, C. (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5011-5015.

Hseu, R.S., Wang, H.H., Wang, H.F., and Moncalvo, J.M. (1996). Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Applied and environmental microbiology* 62, 1354-1363.

Hwang, P.K., Tugendreich, S., and Fletterick, R.J. (1989). Molecular analysis of *GPH1*, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 9, 1659-1666.

Kabir, Y., Kimura, S., and Tamura, T. (1988). Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of nutritional science and vitaminology* 34, 433-438.

Kao, H.T., Capasso, O., Heintz, N., and Nevins, J.R. (1985). Cell cycle control of the human HSP70 gene: implications for the role of a cellular E1A-like function. *Molecular and cellular biology* 5, 628-633.

Kao, M.C., Law, S.L., Chuang, T.C., and Lin, Y.S. (1998a). In vitro gene transfer in mammalian cells via a new cationic liposome formulation. *Oncology reports* 5, 625-629.

Kao, M.C., Liu, G.Y., Chuang, T.C., Lin, Y.S., Wu, J.A., and Law, S.L. (1998b). The N-terminal 178-amino-acid domain only of the SV40 large T antigen acts as a transforming suppressor of the HER-2/neu oncogene. *Oncogene* 16, 547-554.

Katagiri, A., Tomita, Y., Nishiyama, T., Kimura, M., and Sato, S. (1993). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein and GSTP1-1 in testis cancer. *British journal of cancer* 68, 125-129.

Kerbrat, P., Lhomme, C., Fervers, B., Guastalla, J.P., Thomas, L., Tournemaine, N., Basuyau, J.P., Cohen-Solal, C., Duvillard, P., Bachelot, T., *et al.* (2001). Ovarian cancer. *British journal of cancer* 84 Suppl 2, 18-23.

Kimura, Y., Taniguchi, M., and Baba, K. (2002). Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer research* 22, 3309-3318.

Komarova, E.Y., Afanasyeva, E.A., Bulatova, M.M., Cheetham, M.E., Margulis, B.A., and Guzhova, I.V. (2004). Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell stress & chaperones* 9, 265-275.

Lee, J.S., Zhang, M.H., Yun, E.K., Geum, D., Kim, K., Kim, T.H., Lim, Y.S., and Seo, J.S. (2005a). Heat shock protein 27 interacts with vimentin and prevents insolubilization of vimentin subunits induced by cadmium. *Experimental & molecular medicine* 37, 427-435.

Lee, K.H., Yim, E.K., Kim, C.J., Namkoong, S.E., Um, S.J., and Park, J.S. (2005b). Proteomic analysis of anti-cancer effects by paclitaxel treatment in cervical cancer cells. *Gynecologic oncology* 98, 45-53.

- Lei, L.S., and Lin, Z.B. (1992). Effect of Ganoderma polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte response. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 27, 331-335.
- Lieu, C.W., Lee, S.S., and Wang, S.Y. (1992). The effect of Ganoderma lucidum on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer research* 12, 1211-1215.
- Lin, S.B., Li, C.H., Lee, S.S., and Kan, L.S. (2003). Triterpene-enriched extracts from Ganoderma lucidum inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life sciences* 72, 2381-2390.
- Lu, L., Qian, Y., Hu, Z., and Ye, Y. (1998). [Study on certified reference material of germanium in Ganoderma lucidum]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* 27, 283-284.
- Lu, Q.Y., Jin, Y.S., Zhang, Q., Zhang, Z., Heber, D., Go, V.L., Li, F.P., and Rao, J.Y. (2004). Ganoderma lucidum extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. *Cancer letters* 216, 9-20.
- McGuire, W.P., Hoskins, W.J., Brady, M.F., Kucera, P.R., Partridge, E.E., Look, K.Y., Clarke-Pearson, D.L., and Davidson, M. (1996). Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 334, 1-6.
- Michelotti, E.F., Michelotti, G.A., Aronsohn, A.I., and Levens, D. (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Molecular and cellular biology* 16, 2350-2360.
- Miyazaki, T., and Nishijima, M. (1981). Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of Ganoderma lucidum. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 29, 3611-3616.
- Mizushina, Y., Takahashi, N., Hanashima, L., Koshino, H., Esumi, Y., Uzawa, J., Sugawara, F., and Sakaguchi, K. (1999). Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, Ganoderma lucidum. *Bioorganic & medicinal chemistry* 7, 2047-2052.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry* 250, 4007-4021.

Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., and Fainzilber, M. (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45, 715-726.

Perlson, E., Michaelevski, I., Kowalsman, N., Ben-Yaakov, K., Shaked, M., Seger, R., Eisenstein, M., and Fainzilber, M. (2006). Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *Journal of molecular biology* 364, 938-944.

Ritchie, S.A., Pasha, M.K., Batten, D.J., Sharma, R.K., Olson, D.J., Ross, A.R., and Bonham, K. (2003). Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. *Nucleic acids research* 31, 1502-1513.

Rushmore, T.H., and Pickett, C.B. (1993). Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *The Journal of biological chemistry* 268, 11475-11478.

Sakamuro, D., and Prendergast, G.C. (1999). New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* 18, 2942-2954.

Shah, P.L., Scott, S.F., Geddes, D.M., Conway, S., Watson, A., Nazir, T., Carr, S.B., Wallis, C., Marriott, C., and Hodson, M.E. (1997). An evaluation of two aerosol delivery systems for rhDNase. *Eur Respir J* 10, 1261-1266.

Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y., and Inada, Y. (1985). Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 33, 3012-3015.

Sliva, D., Labarrere, C., Slivova, V., Sedlak, M., Lloyd, F.P., Jr., and Ho, N.W. (2002). *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 298, 603-612.

Swenerton, K., Jeffrey, J., Stuart, G., Roy, M., Krepart, G., Carmichael, J., Drouin, P., Stanimir, R., O'Connell, G., MacLean, G., *et al.* (1992). Cisplatin-cyclophosphamide versus carboplatin-cyclophosphamide in advanced ovarian cancer: a randomized phase III study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 10, 718-726.

Tew, K.D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer research* 54, 4313-4320.



van der Hem, L.G., van der Vliet, J.A., Kino, K., Hoitsma, A.J., and Tax, W.J. (1996). Ling-Zhi-8: a fungal protein with immunomodulatory effects. *Transplantation proceedings* 28, 958-959.

Vasey, P.A., Atkinson, R., Coleman, R., Crawford, M., Cruickshank, M., Eggleton, P., Fleming, D., Graham, J., Parkin, D., Paul, J., *et al.* (2001). Docetaxel-carboplatin as first line chemotherapy for epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer* 84, 170-178.

Wang, S.Y., Hsu, M.L., Hsu, H.C., Tzeng, C.H., Lee, S.S., Shiao, M.S., and Ho, C.K. (1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International journal of cancer* 70, 699-705.

Wasser, S.P., and Weis, A.L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical reviews in immunology* 19, 65-96.

Won, S.J., Lin, M.T., and Wu, W.L. (1992). *Ganoderma tsugae* mycelium enhances splenic natural killer cell activity and serum interferon production in mice. *Japanese journal of pharmacology* 59, 171-176.

Wu, B.J., and Morimoto, R.I. (1985). Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 6070-6074.

Zhang, L., Xiao, Y., and Priddy, R. (1994). Increase in placental glutathione S-transferase in human oral epithelial dysplastic lesions and squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 23, 75-79.

Zhu, M., and Li, R.C. (1999). Receptor binding activities of *Schefflera* triterpenoids and oligosaccharides. *Planta medica* 65, 99-103.

郭漢鵬. 2006. 松杉靈芝萃取物抑制神經膠原致癌基因表現之研究. 國防醫學院生物化學研究所碩士論文

鄒宛玲. 2006. 應用蛋白質體學的技术探討在卵巢癌細胞株中猿病毒腫瘤抗原氮端片段抑制神經膠原致癌基因表現的分子機轉. 國防醫學院生物化學研究所碩士論文

## 第七章、圖表

### 第一節、表

Table 1 利用 PhytoViewerBR 2.2 分析 SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝  
萃取物之 Affymetrix 人類微陣列基因表現資料進行各組間  
PSI (Phytomics similarity index) matrix 之分析比較

(a)

MeGt vs. EtGt  
- union-1

	Me2	Me3	Me4	Et6	Et7
Me2	1	0.9369	0.9221	0.7564	0.7297
Me3		1	0.8996	0.7477	0.7117
Me4			1	0.7841	0.7453
Et6				1	0.9506
Et7					1

(b)

Union-1

	Me2	Me3	Me4
Me2	1	0.9722	0.9558
Me3		1	0.9593
Me4			1

(c)

**MeGt vs. EtGt  
- intersect**

	Me2	Me3	Me4	Et6	Et7
Me2	1	0.9828	0.9703	0.7751	0.7574
Me3		1	0.9779	0.7788	0.7472
Me4			1	0.8293	0.7994
Et6				1	0.9879
Et7					1

(d)

**Intersect**

	Me2	Me3	Me4
Me2	1	0.982	0.9713
Me3		1	0.9778
Me4			1

### Tab. 1 PSI (Phytomics Similarity Index)

SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝萃取物 24 小時，抽取其 total RNA，利用 Affymetrix 人類微陣列基因表現技術分析其 mRNA 量的改變；經過 PhytoViewerBR 2.2 聯集分析(a, b)，得到所有出現於各組 data 中的 genes，及交集分析(c, d)，得到各組 data 中都有出現的 genes。各組間相似度以 PSI value(0~1; 0, complete difference; 1, complete similarity)來表示。由 PSI matrix 可看出投予松杉靈芝甲醇萃取物的組別(Me2~Me4)與投予松杉靈芝乙醇萃取物的組別(Et6、Et7)，其 gene expression 不同但相似(a, c)。若只比較投予松杉靈芝甲醇萃取物的組別(Me2~Me4)，則 PSI value 皆大於 0.95，表示此三組間極相似。

**Table 2 Altered protein spots review**

	Spot:	same spot:	Match to:	accession number:	MOWSE Score:	Sequence coverage:	Peptides matched / selected:	Theor. MW (kDa)	Exp. MW (kDa)	Theor. PI (pH)	Exp. PI (pH)	Fold change:
1	3-1105	5-1109	CATZ, Cathepsin Z precursor (Cathepsin X) (Cathepsin P), <b>CTSZ</b>	Q9UBR2	175	9%		27.15	37.27	5.48	4.26	37.41
2	3-6001	5-6001	<b>CAPG</b> , Macrophage capping protein (Actin-regulatory protein CAP-G)	P40121	137	10%		38.52	8.48	5.88	6.88	0.06
			FABPE, Fatty acid-binding protein, epidermal (E-FABP) (Psoriasis-associated fatty acid-binding pr), <b>FABP5</b> , EFABP	Q01469	113	11%		15.03		6.82		
3	3-6501	5-6501	HNRH1, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H), <b>HNRPH1</b>	P31943	442	24%		49.1	23.55	5.89	7.16	0.5
			PSA2, Proteasome subunit alpha type 2 (EC 3.4.25.1) (Proteasome component C3), <b>PSMA2</b>	P25787	128	20%		25.77		7.12		
4	3-7001	5-6002	<b>HINT1</b> , Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (Adenosine 5'-monophosphoramidase)	P49773	125	29%		13.67	7.69	6.46	7.25	0.06
5	3-7101	5-7104	<b>LASP1</b> , LIM and SH3 domain protein 1 (LASP-1) (MLN 50)	Q14847	324	31%		29.72	36.61	6.61	6.72	0.34
6	3-E	5-5003	* TBB2, Tubulin beta-2 chain, <b>TUBB</b>	P07437	483	25%		49.67	35.23	4.78	5.91	0.5
			* TBB2C, <b>TUBB2C</b>	P68371	448	22%		49.83		4.79		
			<b>LDHB</b> , L-lactate dehydrogenase B chain (EC 1.1.1.27) (LDH-B) (LDH heart subunit) (LDH-H)	P07195	250	20%		36.51		5.72		
7	4-0103	5-1103	<b>GNL3</b> , Guanine nucleotide-binding protein-like 3 (Nucleolar GTP-binding protein 3) (Nucleostemin)	Q9BVP2	233	11%		62	38.86	9.2	4.15	2.44
			<b>HDGF</b> , Hepatoma-derived growth factor (HDGF) (High-mobility group protein 1-like 2) (HMG-1L2)	P51858	85	12%		26.79		4.7		
8	4-0208	5-1301	VIME, Vimentin, <b>VIM</b>	P08670	1614	67%		53.52	48.19	5.06	4.01	3.11
			GRP78, 78 kDa glucose-regulated protein precursor, <b>HSPA5</b> , BIP, heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	P11021	797	25%		70.48		5.01		
9	4-0902	5-1802	4F2, 4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc), solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2 isoform f, <b>SLC3A2</b> , 4F2HC, 4T2HC	P08195	518	25%		57.94	113.4	5.2	3.76	2.16
10	4-F	5-1101	ENPL, Endoplasmic precursor, Heat shock protein 90 kDa beta member 1, (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP94) (Tumor rejection antigen 1), <b>HSP90B1</b> , GP96	P14625	391	10%		90.18	37.36	4.73	3.93	4.72
			VIME, Vimentin, <b>VIM</b>	P08670	186	14%		53.52		5.06		
11	5-1802	4-0902	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2 (HNRPU2), <b>HNRPUL2</b>	Q1KMD3	84		18/77	85.1	113.4	4.85	3.76	2.16
12	5-1101	4-F	PCTAIRE protein kinase 1, isoform CRA_b, <b>PCTK1</b> , PCTGAIRE	gil119579699	65	31%		56.34	37.36	6.92	3.93	4.72
13	5-7104	3-7101	LIM and SH3 protein 1, <b>LASP1</b> , Lasp-1	Q14847	112		12/24	29.72	36.61	6.61	6.72	0.34
			Zinc finger protein 578, <b>ZNF578</b>	Q96N58	73		10/24	42.6		9.42		

14	5-7002		* Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9) (Keratin-9), <b>KRT9</b>	P35527	73		13/58	62.14	8.0	5.19	7.71	0.24
15	5-5213		* tubulin, beta 2C, isoform CRA_b	gil119608775	84	20%	9/24	48.79	47.17	4.74	6.22	0.07
			tubulin, beta 4, <b>TUBB4</b>	P04350	70		8/24	49.59		4.78		
			* tubulin, beta 2B, isoform CRA_c, <b>TUBB</b>	gil119575532	69		7/24	32.93				
16	5-2212		* actin, beta, <b>ACTB</b>	Q96HG5	163	45%	19/45	40.2	45.82	5.48	5.24	0.02
			* actin, gamma 1 propeptide, <b>ACTG1</b>	P63261	162		19/45	41.66		5.31		
			actin, alpha 1, skeletal muscle, <b>ACTA1</b>	Q5T8M7	76		11/45	37.82		5.39		
17	5-1301		vimentin, <b>VIM</b>	P08670	201	68%	32/113	53.52	48.19	5.06	4.01	3.11
			vimentin variant	Q53HU8	188		32/113					
18	8-2401		* keratin 2, <b>KRT2</b>	P35908	91		17/88	65.87	27.56	8.07	3.87	0.15
			keratin 3, <b>KRT3</b>	gil109148552	71		15/88					
19	8-6304		dynein, axonemal, heavy polypeptide 3, <b>DNAH3</b>	gil24308169	75		44/94	474				5.25
			keratin 6 irs4, K6IRS4, keratin 74, <b>KRT74</b>	gil27901524	69		15/63	58.2				
20	8-9601		dynein, axonemal, heavy polypeptide 3, <b>DNAH3</b>	gil24308169	75		48/69	474				3.04
			Tara, HRIHFB2122, KIAA1662, <b>TRIOBP</b>	gil12006358	66		16/72	68.4				
21	8-5705	10-5705	KHSRP protein, <b>KHSRP</b> , KSRP, MGC99676, FBP2, FUBP2, KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	Q5U4P6	176		23/55	72.9	94.77	8.0	6.51	0.02
			KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2), isoform CRA_c	gil119589503	176		23/55	73.07				
			transformation/transcription domain-associated protein, isoform CRA_a, <b>TRRAP</b> , TR-AP	gil119597099	71		11/55	179.88				
22	8-5612		FUBP1 protein, <b>FUBP1</b> , FBP, FUBP	Q96AE4-2	94	29%	18/32		80.3		6.78	0.31
23	9-8703		* keratin 9 (type I keratin 9), <b>KRT9</b>	gil55956899	86	28%	15/52	62	29.17	5	7.04	3.36
24	9-4311		* keratin 2, <b>KRT2</b>	P35908	70		12/58	65.87	49.02	8.07	6.09	0.32
25	9-5211	10-5211	Tetratricopeptide repeat protein 19 (TPR repeat protein 19), <b>TTC19</b>	Q6DKK2	67		9/38	42.46	41.18	5.57	6.85	0.25
26	10-5705	8-5705	KHSRP protein, <b>KHSRP</b> , KSRP, MGC99676, FBP2, FUBP2, KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	Q5U4P6	168	43%	29/66	73.07	94.77	7.02	6.51	0.02
27	10-5211	9-5211	protein disulfide isomerase family A, member 3, isoform CRA_a, phospholipase C-alpha, ER-60 protease, <b>PDIA3</b> , ERp60, GRP57	gil119597640P30101	133	32%	19/46	54.93	41.18	6.45	6.85	0.25
28	10-8602	8-8602	Chain A, Heat-Shock 70kd Protein 42kd Atpase N-Terminal Domain, <b>HSPA5</b>	gil6729803	82	43%	12/62	41.8	28.56		8.23	2.92
			* keratin 9, <b>KRT9</b> , K9, EPPK	gil55956899	99	38%	20/66	61.95		5.0		
29	10-6302	8-6302	* keratin 2, <b>KRT2</b>	gil47132620	75	31%	17/88	65.39	25.26	8.85	5.78	34.29
30	10-16-6303	16-6303	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, <b>HNRPK</b> , CSBP, TUNP	Q5T6W5	113	40%	17/54	48.77	58.63	5.53	5.54	0.24
31	10-16-7209		protein disulfide isomerase family A, member 3, isoform CRA_a, phospholipase C-alpha, ER-60 protease, <b>PDIA3</b> , ERp60, GRP57	gil119597640	143	44%	23/68	54.93	46.52	6.45	5.99	0.42
32	10-16-1701	16-1701	* Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9), <b>KRT9</b>	P35527	68	29%	11/47	62.1	35.17	5.06	4.73	2.95
			heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa), isoform CRA_b, <b>HSPA5</b> , MIF2, FLJ26106, GRP78, BIP	gil119608027	65		11/47	70.48		5.01		



33	10-16-9902	16-9902	enolase 1, <b>ENO1</b> , NNE, PPH, MPB1	P06733	139	50%	17/73	47.14	39.74	7.71	6.7	0.18
34	16-8504		elongation factor 2, <b>EEF2</b>	gi 181969	77	34%		39.75	30.05	5.81	6.39	0.21
35	16-1701	10-16-1701	Vimentin, <b>VIM</b>	P08670	159	41%	20/43	53.52	35.17	5.06	4.73	2.95
36	16-1506		* Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (K2e), <b>KRT2</b>	P35908	66	20%		65.87	29.5	8.07	4.91	0.13
37	16-2204		Chain , Human Protein Disulfide Isomerase, Nmr, 40 Structures	gi 2098329	94	53%	7/25	13.25	53.23	5.91	4.76	3.25
			prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor, <b>P4HB</b> , Prolyl 4-hydroxylase subunit beta, Cellular thyroid hormone-binding protein, PDI, <b>PO4HB</b>	P07237	76		11/25	55.29		4.69		
38	16-5002		* ACTB protein, <b>ACTB</b>	Q96HG5	78	37%		40.2	41.05	5.48	5.38	2.27
			* actin, gamma 1 propeptide, <b>ACTG1</b>	gi 4501887				41.77				
39	16-6303	10-16-6303	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform a variant, <b>HNRPK</b> , CSBP, TUNP	gi 62088704	103	28%	15/16	48.77		5.35		0.24
			heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform <b>CRA_f</b>	gi 119583084	103		15/16	48.77				
40	16-6502		chromosome 10 open reading frame 30, <b>C10orf30</b> , MGC35247	gi 55959077	67	41%		13.14	28.93	9.82	6.04	2.27
41	16-1413		* Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (K2e)(Keratin 2), <b>KRT2</b>	P35908	97	37%	19/80	65.83	26.85	8.85	4.9	0.26
			nebulin, isoform <b>CRA_f</b> , <b>NEB</b>	gi 119631909	72		61/98	777.44				
42	16-9902	10-16-9902	enolase 1 variant	Q53FT9	107	39%	17/73		39.74		6.7	0.18
			enolase 1, <b>ENO1</b> , NNE, PPH, MPB1	P06733	107		17/73	47.04		6.99		
43	17-8402		* tubulin beta polypeptide, <b>TUBB</b>	Q5JP53	184	59%	21/56	47.77	48.2	4.7	6.09	6.68
44	17-4410		* KRT9 protein, <b>KRT9</b>	Q0UJ47	90	34%	14/70	107.9	50.09	4.82	5.07	0.44
45	17-7213		calponin 3, acidic, <b>Cnn3</b>	Q9DAW9	110	58%	21/50	36.56	34.9	5.64	6.02	0.33
46	17-8011		heat shock protein 27, <b>HSPB1</b> , Hsp25, HSP27, HSP28, heat shock 27kDa protein 1	P04792	89	62%	10/69	22.43	15.69	9.06	6.26	2.85
			Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor (Short chain enoyl-CoA hydratase), <b>ECHS1</b>	P30084	88		12/69					
47	17-4308		* actin, gamma 1 propeptide, <b>ACTG1</b>	P63261	170		22/24	41.66	43.83	5.31	5.25	0.44
			* beta actin, <b>ACTB</b>	P60709	152		20/24	41.61		5.29		
48	17-4306		* ACTB protein, <b>ACTB</b>	gi 15277503	194		23/30	40.54	42.61		5.22	0.31
			* actin, gamma 1 propeptide, <b>ACTG1</b>	gi 40225338	90		10/30	18.72				
49	17-9007		78 kDa glucose-regulated protein precursor, BiP protein (GRP 78) (Heat shock 70 kDa protein 5), <b>HSPA5</b>	Q3S4T7	130	26%	16/21	72.46	19.89	4.92	6.62	9.09
50	17-6110		capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta, isoform <b>CRA_a</b> , F-actin capping protein beta subunit, <b>CAPZB</b>	Q5VVZ6 Q32Q68	155	61%	15/49	29.56	21.38	6.55	5.73	3.2
51	17-7009		Chain W, Crystal Structure Of The Mammalian 20s Proteasome At 2.75 A Resolution	gi 21465650	73	42%	9/49	25.6	18.22	5.81	5.99	10.4
52	17-3503		cytokeratin 8, <b>KRT8</b>	gi 181573	133	53%	28/113	53.53	56.65	5.38	4.92	775.96
53	17-6005		glutathione transferase, <b>GSTP1</b> , GST3	P09211	163	57%	14/24	23.57	12.14	5.32	5.63	0.47
54	17-8016		* Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9) (Keratin-9), <b>KRT9</b>	P35527	144	49%	22/95	62.32	15.54	5.06	6.34	755.49
55	17-4009		cathepsin D preproprotein, <b>CTSD</b>	P07339	81		15/93	37.85	19.07	5.6	5.3	2.29

56	17-6004	peroxiredoxin 2 isoform a, thiol-specific antioxidant protein, <b>PRDX2</b> , TSA, TDPX1, Natural killer cell-enhancing factor B	P32119	118		10/27	21.76	10.3	5.67	5.6	2.69
57	17-7415	EDAR-associated death domain, isoform CRA_b, <b>EDARADD</b>	gi 119590454	78	32%	7/18	24.2	45.97	4.67	6.04	0.43
58	17-8401	pyruvate kinase, pyruvate kinase 3 isoform 1, Pyruvate kinase isozymes M1/M2, <b>PKM2</b> , PK3, cytosolic thyroid hormone-binding protein (EC 2.7.1.40)	P14618	150		25/80	58.52	52.09	9.31	6.07	2.56
59	17-7210	*Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9), <b>KRT9</b>	P35527	126	55%	26/48	62.32	33.31	5.06	5.99	3.28
60	17-8501	pyruvate kinase 3 isoform 1 variant, <b>PKM2</b>	P14618	133	41%	20/62	58.52	54.75	9.31	6.07	2.4
61	17-3402	cytokeratin 8, <b>KRT8</b>	gi 181573	101	41%	47/87	53.53	52.73	5.38	4.92	2.78

<備註>

Probability Based MOWSE Score : Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 65 are significant ( $p < 0.05$ ). For a score that is exactly on the default significance threshold, ( $p < 0.05$ ), the expectation value is also 0.05. Increase the score by 10 and the expectation value drops to 0.005. The lower the expectation value, the more significant the score.

\*有部份蛋白質點經 MALDI-TOF 分析，乃含有相同蛋白質，但其二維膠體染色分析數據卻同時有兩倍以上增加及減少的相反情形出現

**Table 3 比對 SKOV-3 細胞投予靈芝甲醇萃取物後 2D-MALDI/TOF**

**(蛋白質表現) 及 Affymetrix (基因表現) 分析結果**

2D-increase	fold	2D-decrease	fold	2D-incompatible	fold
CTSZ	34.71	CAPG	0.06	KRT9	0.24
GNL3	2.44	FABP5, EFABP	0.06		0.44
HDGF	2.44	HNRPH1	0.5		3.28
VIM	3.11	PSMA2	0.5		3.36
	4.72	HINT1	0.06		2.95
	2.95	LASP1	0.34		2.92
HSPA5	3.11		0.34		775.5
	2.95	LDHB	0.5	ACTB	0.02
	2.92	ZNF578	0.34		0.44
	9.09	KHSRP	0.02		0.31
SLC3A2	2.16	TRRAP	0.02		2.27
HSP90B1	4.72	TUBB4	0.07	ACTG1	0.02
HNRPUL2	2.16	ACTA1	0.02		0.44
PCTK1	4.72	FUBP1	0.31		0.31
P4HB	3.25	EEF2	0.21		2.27
C10orf30	2.27	HNRPK	0.24	KRT2	0.13
DNAH3, dynein	5.25	NEB	0.26		0.26
	3.04	ENO1	0.18		0.32
KRT74	5.25	TTC19	0.25		0.15
TRIOBP	3.04	KRT3	0.14		34.29
HSPB1, HSP27	2.85	PDIA3	0.42	TUBB	0.5
ECHS1	2.85		0.25		0.07
CAPZB	3.2	Cnn3	0.33		6.68
KRT8	776	GSTP1	0.47	TUBB2C	0.5
	2.78	EDARADD	0.43		6.68
CTSD	2.29				
PRDX2	2.69				
PKM2	2.56				
	2.4				
Mammalian 20s Proteasome	10.4				

**Table 3** 上表整理 2D-MS 分析所得表現量有差異的蛋白質(共 51 個)，分列為左欄：2D-MS 分析中表現量增加(control 組的兩倍以上)的蛋白質(共 22 個)，中欄：表現量減少(control 組的二分之一以下)的蛋白質(共 23 個)，以及右欄：2D-MS 分析中表現量有增加亦有減少的蛋白質(共 6 個)。左欄中標紅色的蛋白質(HSPA5, SLC3A2, HSP90B1, P4HB)在 Affymetrix microarray 結果中亦見增加。中欄中標綠色的蛋白質(CAPG, LASP1, TUBB4, HNRPK, Cnn3)則是減少。左中二欄皆有出現的淺藍綠標記表示在 Affymetrix microarray 數據分析中，三個批次的結果並未完全相同，有可能是此基因表現有改變但不夠明顯。較奇特的是左欄中標藍色的蛋白質(ECHS1, CAPZB, PKM2)，其 microarray 數據顯示其基因表現下降，與蛋白質的上升表現相反。

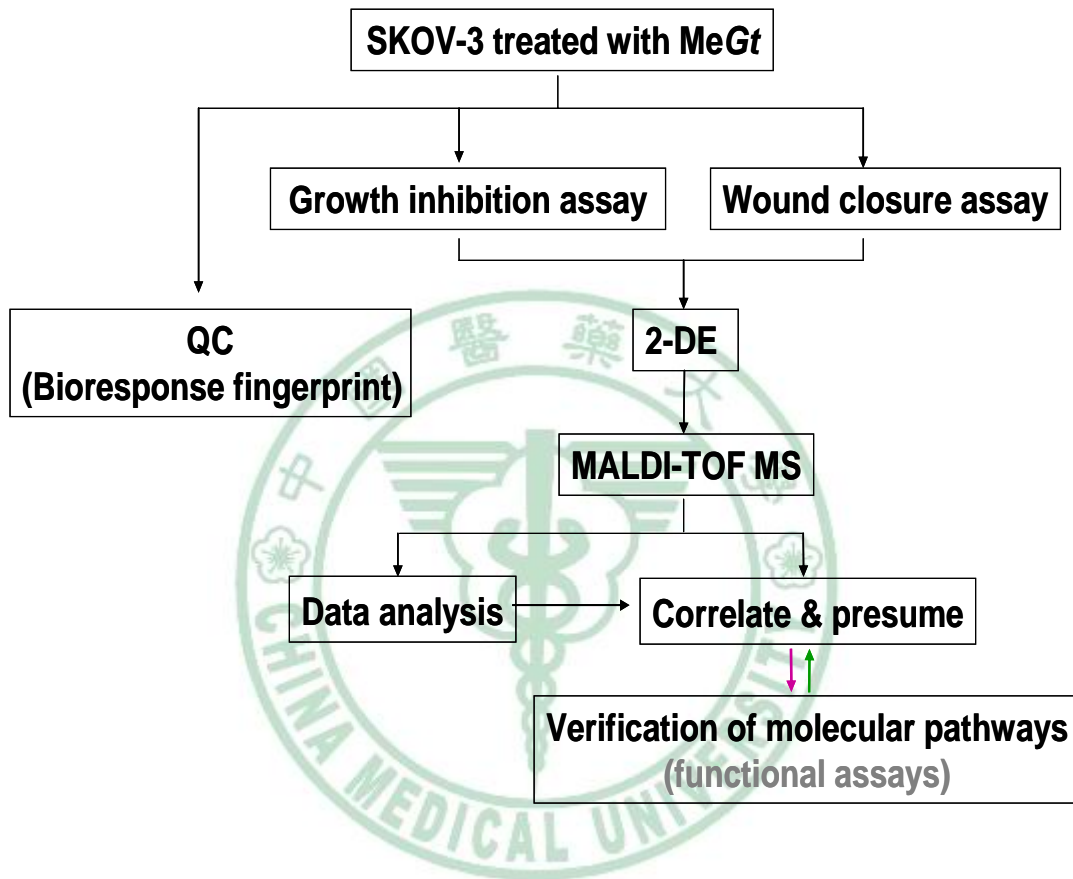
**Table 4 2D-MS 分析所得蛋白質之功能分類**

<b>Cytoskeleton / Cytoskeleton-binding protein</b>			
KRT8 KRT74 ↑ KRT9 KRT3 ↓ KRT2	ACTA1 ↓ ACTB ACTG1 tubulin, beta 2B tubulin, beta 2C tubulin, beta 4 ↓	Cnn3 ↓ LASP1 ↓ nebulin ↓ CAPG ↓ PKM2 ↑	dynein ↑ Tara ↑ CAPZB ↑ Vimentin ↑
<b>Chaperone</b>	<b>Metabolism</b>	<b>transport / trafficking</b>	<b>Growth factor</b>
HSP27 ↑ HSP70 ↑ HSP90 ↑	Enolase ↓ LDHB ↓ FABP ↓ ECHS1 ↑ PKM2 ↑	FABP ↓ SLC3A2,4F2HC ↑ dynein ↑ Vimentin ↑	HDGF ↑
<b>Transcription factors/mRNA processing protein/Tranlation factors</b>		<b>Detoxification</b>	<b>Antioxidant protein</b>
HNRPK ↓ FUBP1 ↓ TRRAP ↓	HNRPH1 ↓ KHSRP, FUBP2 ↓ EEF2 ↓	GSTP1 ↓	peroxiredoxin 2 ↑
<b>Lysosomal proteinase</b>	<b>Proteosome / Proteosomal proteinase</b>	<b>Thyroid hormone-binding protein</b>	<b>Generic enzyme</b>
cathepsin Z ↑ cathepsin D ↑	PSMA2 ↓ 20s Proteasome ↑	P4HB ↑ PKM2 ↑	ER-60 protease ↓ EDARADD ↓ P4HB ↑
<b>Others</b>			
C10orf30 ↑ GNL3 ↑ hnRNPUL2 ↑ PCTK1 ↑	HINT1 ↓ ZNF578 ↓ TTC19 ↓		

**Table 4** 分析所得的 51 個蛋白質，根據其功能可大致分類為：chaperone，代謝相關蛋白，細胞骨架蛋白，細胞骨架結合蛋白，與胞內物質運輸相關之蛋白質，異質性細胞核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)，轉錄因子，調節 mRNA splicing 的蛋白質，轉錄活化的輔因子，轉譯因子，生長因子，溶酶體及蛋白酶體相關蛋白，具解毒功能的蛋白質，具抗氧化功能的蛋白質，甲狀腺素結合蛋白，一般性酵素蛋白，以及其他蛋白質。表中箭號代表此蛋白質表現量(跟據其相對蛋白點的 2D 影像分析)為增加或減少，無箭號標示的蛋白質為在 2D 影像分析中表現量有增加亦有減少的蛋白質(共 6 個)。

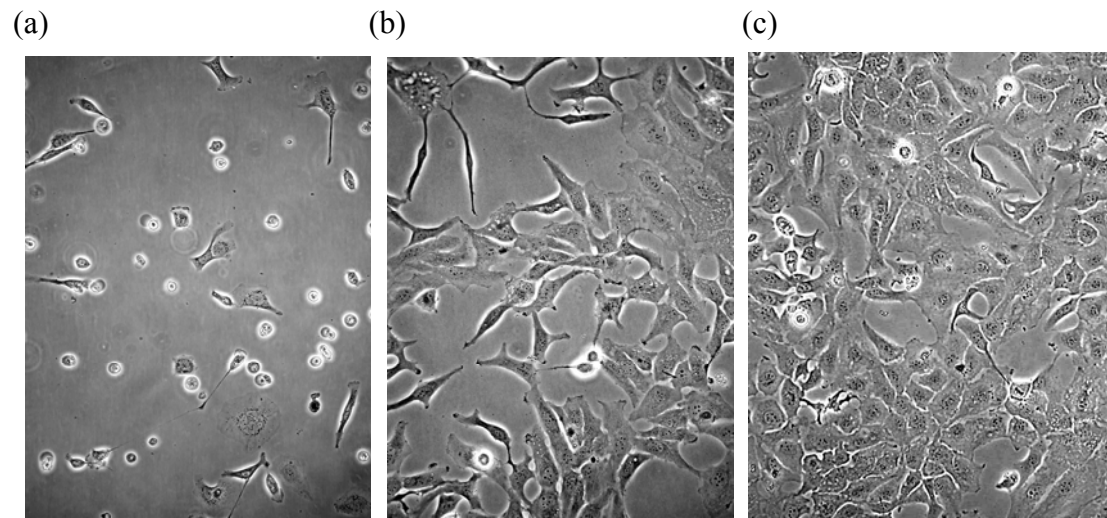
第二節、圖

Figure 1 實驗流程圖



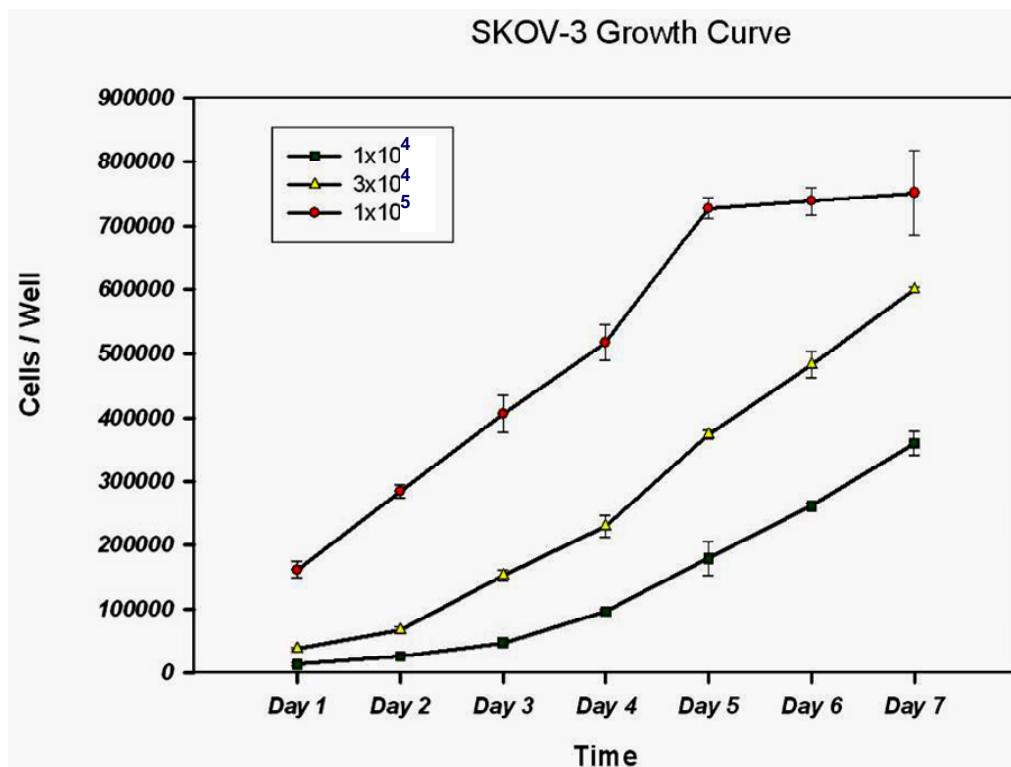


## Figure 2 SKOV-3 細胞培養



### Fig. 2.1 SKOV-3 細胞株形態

上圖為顯微鏡下觀察到的 SKOV-3 細胞形態，分別為：(a)細胞剛貼附至細胞培養盤時的型態，(b)細胞完全貼附展開時的型態，以及(c)細胞旺盛生長至細胞培養盤的八分滿時的型態。



**Fig. 2.2 SKOV-3 細胞株生長曲線**

於 96 孔盤中分別種入  $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  cells/well 三種細胞濃度，每日計算其細胞數變化，並繪製生長曲線圖。由圖可知，96 孔盤每 well 含超過  $1 \times 10^5$  顆細胞時，SKOV-3 細胞的生長曲線由滯期(lag phase)進入對數期(exponential or log phase)；細胞數高過  $7 \times 10^5$  顆/well 時，細胞生長進入停滯期(stationary phase)。由此生長曲線亦可得知 SKOV-3 細胞的倍增時間(doubling time)如同 ATCC 所記載，約為 48 小時。

Figure 3 靈芝(粉末)甲醇萃取流程

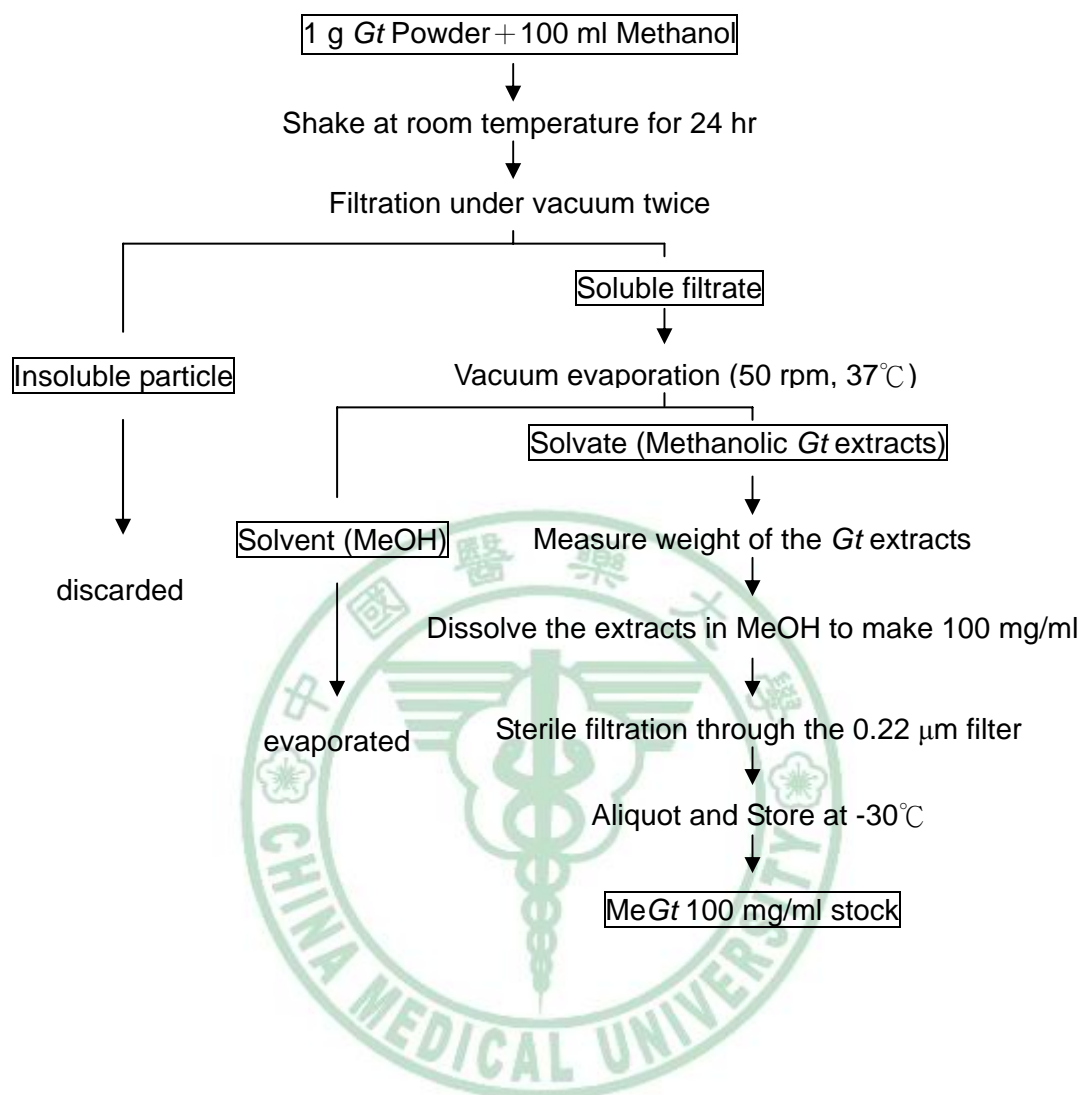
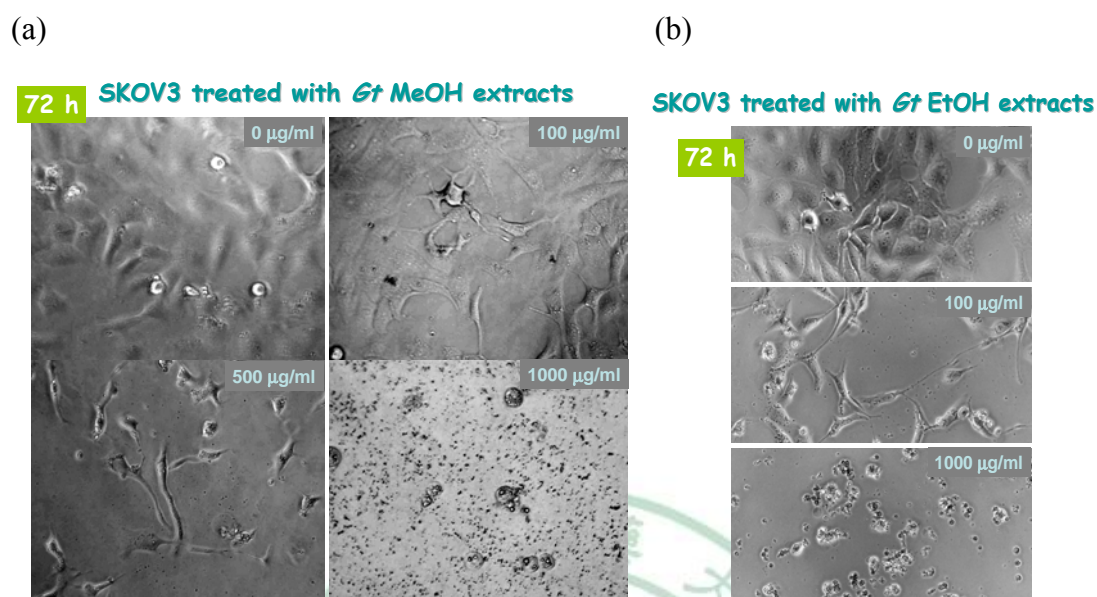


Fig. 3 靈芝(粉末)甲醇萃取流程

每公克靈芝粉末混合 100 ml 無水甲醇，室溫下震盪 24 小時，經過兩次過濾去除不溶的粒子，留下澄清濾液。再利用減壓濃縮的原理使濾液之溶媒蒸發，最終得到硬膠狀或塊狀的靈芝甲醇萃取物。精秤所得的萃取物，每 100 mg 萃取物以 1 ml 無水甲醇回溶之(stock: 100 mg/ml)，儲藏於-30°C 冰箱。(靈芝乙醇萃取之步驟與甲醇萃取相同，僅需將溶媒甲醇換成乙醇。)

## Figure 4 靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株之影響

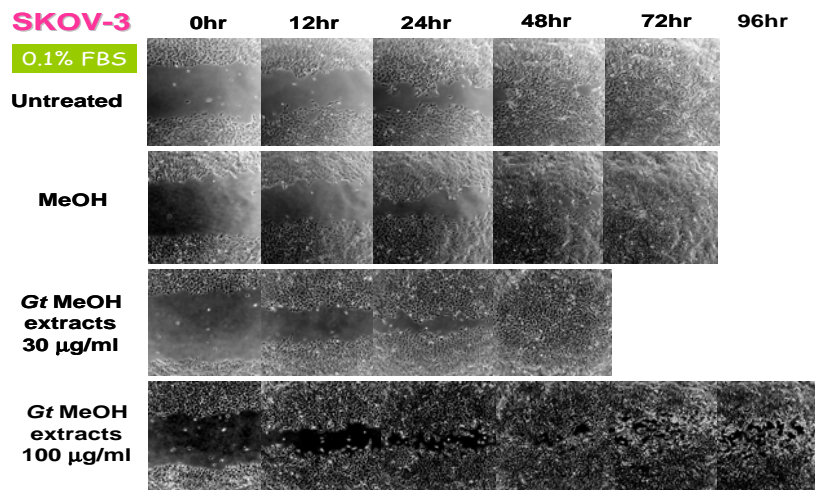


**Fig. 4.1 靈芝甲醇及乙醇萃取物對 SKOV-3 細胞株生長形態之影響**

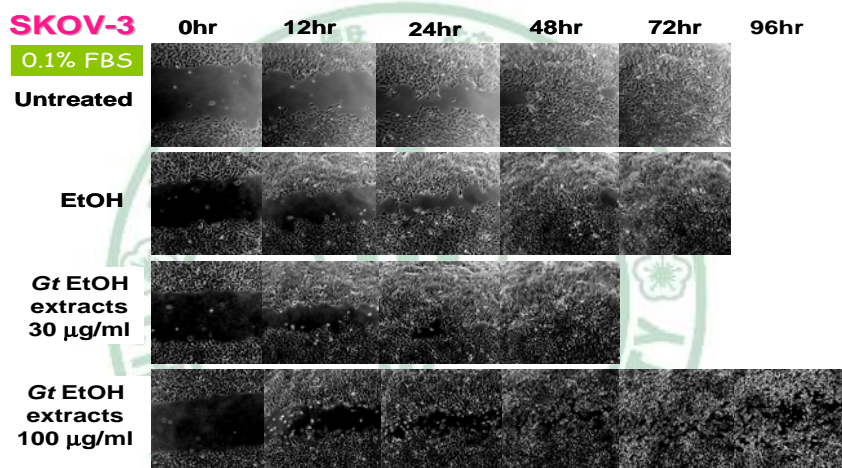
SKOV-3 細胞每盤種  $2 \times 10^5$  顆 cell，分別給予不同濃度 (a) 松杉靈芝甲醇萃取物 0, 100, 500, 1000  $\mu\text{g/ml}$ ，及 (b) 松杉靈芝乙醇萃取物 0, 100, 1000  $\mu\text{g/ml}$ ，作用 72 小時後，觀察細胞生長情形。隨著給予靈芝(甲醇或乙醇)萃取物濃度的增加，細胞數目減少以及細胞形態異常的情形越明顯。



(a)



(b)



**Figure 4.2 創傷癒合試驗(Wound closure assay)**

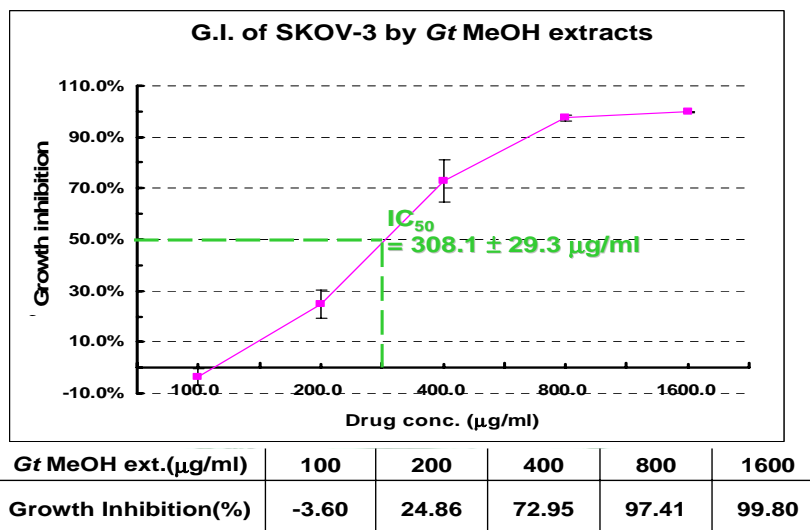
24-well 盤每 well 種  $2 \times 10^5$  顆 SKOV-3 細胞，隔天將細胞培養液中的 FBS 降到 0.1%，24 小時後，用微量吸管尖在 well 底部劃線造成傷口(wound)，並分別投予 (a) DPBS，0.1% MeOH，30 µg/ml，及 100 µg/ml 松杉靈芝甲醇淬取物 (b) DPBS，0.1% EtOH，30 µg/ml，及 100 µg/ml 松杉靈芝乙醇淬取物。每 12 小時觀察傷口癒合情形。實驗結果顯示，松杉靈芝甲醇及乙醇淬取物對 SKOV-3 細胞傷口癒合的影響大致相同。投予 0.1% 甲醇及乙醇的組別，其傷口癒合情形和 control 組(投予 DPBS)相仿，在第 72 小時就完全癒合。投予 100 µg/ml(大劑量)靈芝甲醇及乙醇淬取物的組別其傷口癒合速度明顯較慢，第 48 小時以後幾乎不見任何進展，第 72 小時可見到靠近傷口中心的細胞部份出現形態變異，在第 96 小時，靠近傷口中心細胞形態變異的情形益加明顯，甚至有部分細胞死亡，導致傷口復又擴大。至於投予 30 µg/ml(小劑量)靈芝甲醇及乙醇淬取物的組別，則觀察到其傷口癒合速度較 control 組為快，48 小時就已完全癒合。



Figure 5 松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株之半數抑制濃度(IC<sub>50</sub>)

測量

(a)



(b)

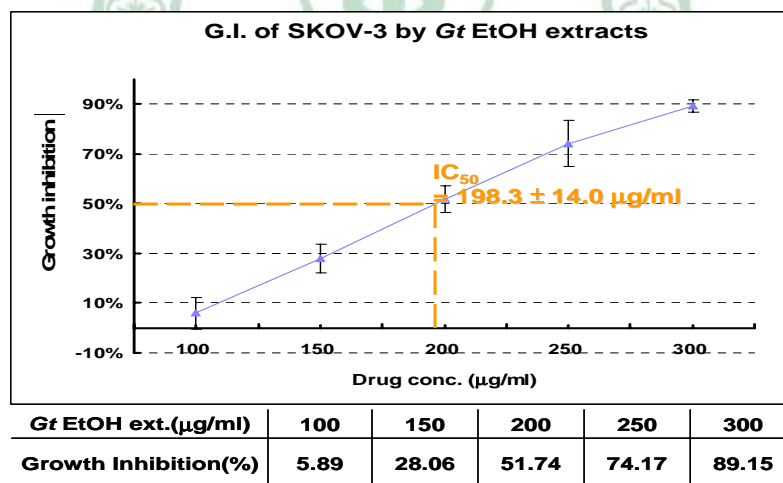


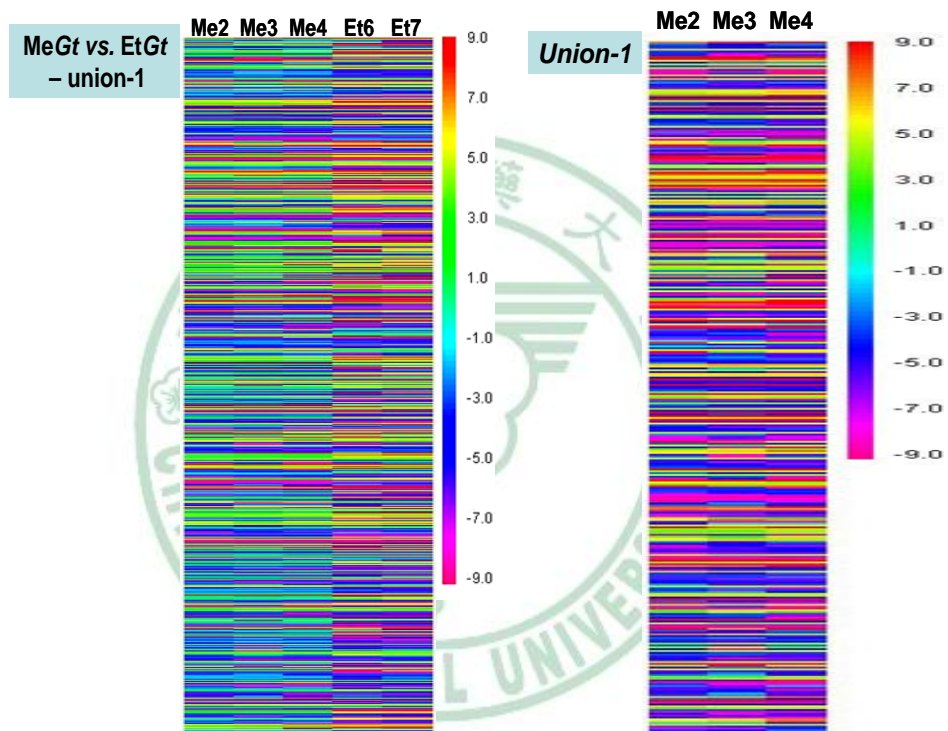
Fig. 5 松杉靈芝萃取物對 SKOV-3 細胞株之半數抑制濃度(IC<sub>50</sub>)

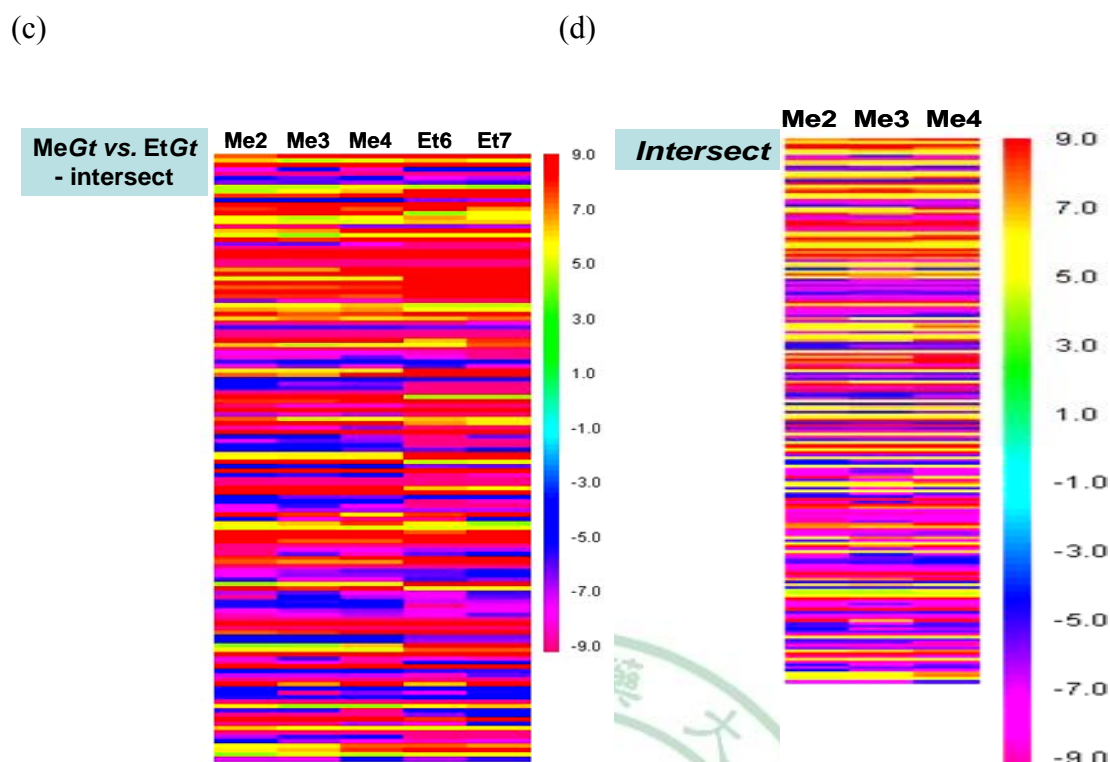
96 孔盤每 well 種入  $3 \times 10^3$  cells/90  $\mu$ l medium，隔天投予不同濃度的松杉靈芝甲醇萃取物(圖 3)、乙醇萃取物(圖 3)，72 小時後加入 CCK-8 試劑 10  $\mu$ l，37°C 作用 2 小時，用 ELISA reader 測吸光值(最大吸光波長：450 nm)。經過換算得到細胞生長抑制百分比，以及靈芝萃取物對細胞株之半數抑制濃度(IC<sub>50</sub>)。(a) 松杉靈芝甲醇萃取物對細胞株之 IC<sub>50</sub> 約為 300  $\mu$ g/ml；(b) 松杉靈芝乙醇萃取物對細胞株之 IC<sub>50</sub> 約為 200  $\mu$ g/ml。

Figure 6 利用 PhytoViewerBR 2.2 分析 SKOV-3 細胞株投予松杉靈  
芝萃取物之 Affymetrix 人類微陣列基因表現資料得到生物  
反應指紋圖譜(Bioresponse fingerprint)

(a)

(b)





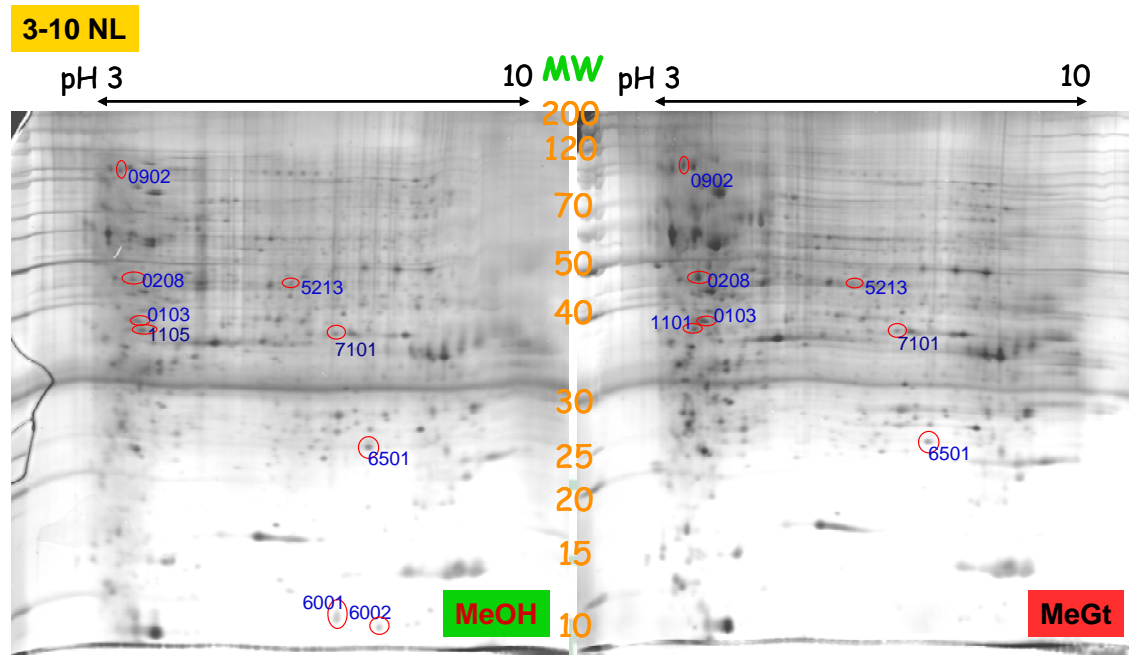
**Fig. 6 SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝萃取物之生物反應指紋圖譜**

SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝萃取物 24 小時，抽取其 total RNA，利用 Affymetrix 人類微陣列基因表現技術分析其 mRNA 量的改變；經過 PhytoViewerBR 2.2 聯集分析(a, b)，得到所有出現於各組 data 中的 genes，及交集分析(c, d)，得到各組 data 中都有出現的 genes。圖上每一橫紋即代表一個 gene，顏色表示此 genes 之 mRNA transcripts 量與 control 組相比增加或減少的程度。

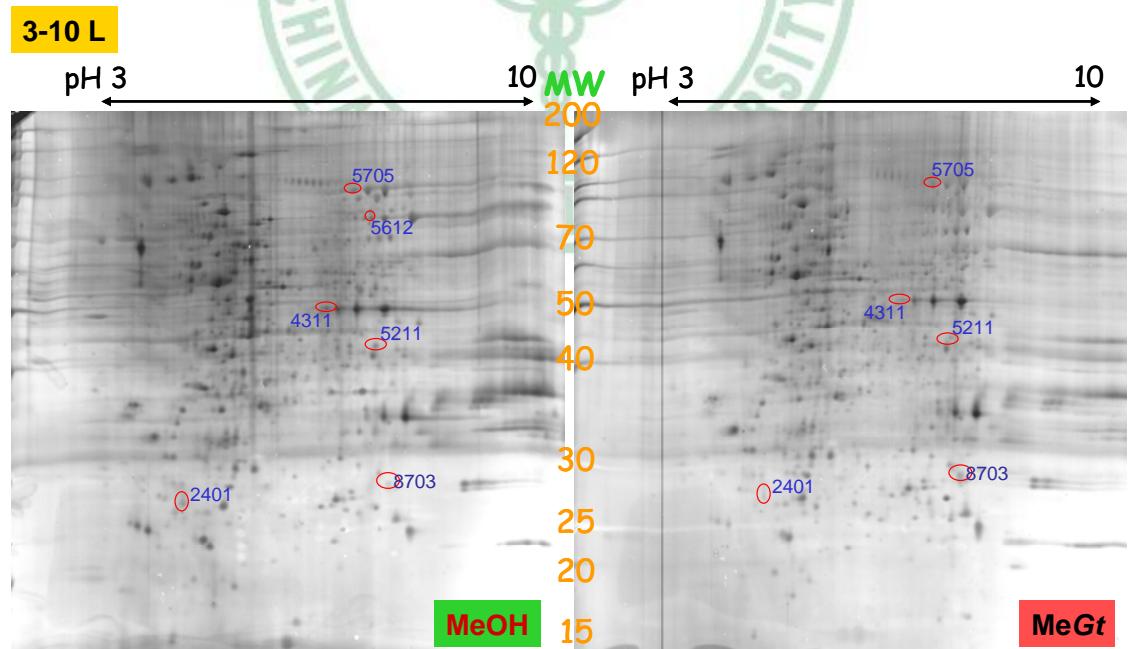
(a) 經過聯集分析得到 671 個 genes，由圖可看出投予松杉靈芝甲醇萃取物的組別(Me2~Me4)與投予松杉靈芝乙醇萃取物的組別(Et6、Et7)，其 gene expression 具有不同但相似的颜色 profile。(b) 投予松杉靈芝甲醇萃取物的組別(Me2~Me4)經過聯集分析得到 376 個 genes，比(a)分析得到的基因數少，代表(Me2~Me4)間的重疊性更高。由圖可看出(Me2~Me4)三組間，其各 gene expression 具有極相似的颜色 profile。(c) 經過交集分析得到 139 個 genes。表示松杉靈芝甲、乙醇萃取物使 SKOV-3 細胞株產生不同但部份相似的反應，也可能具有部份相似或相同的成分。(d) (Me2~Me4)經過交集分析得到 198 個 genes，比(c)分析得到的基因數多，同樣代表投予松杉靈芝甲醇萃取物的三組間其重疊性更高。

Figure 7 二維凝膠電泳及膠體影像分析

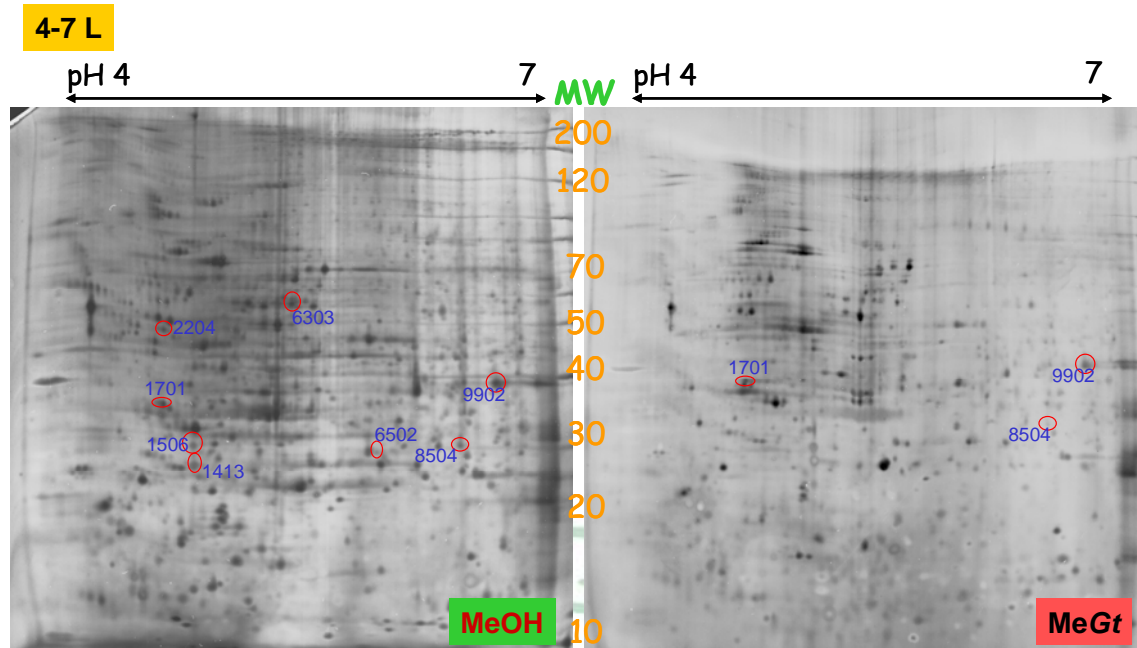
(a)



(b)



(c)



**Fig. 7 二維凝膠電泳染色後圖像(差異點)分析**

SKOV-3 細胞株投予松杉靈芝甲醇萃取物 600  $\mu\text{g/ml}$  及 10% 甲醇(Control 組)24 小時，抽取其 total protein，經過 TCA/Acetone 蛋白沉澱純化後，進行一維等電點聚焦(17 公分 pH3-10 梯度膠：105.6  $\mu\text{g}$  protein sample；pH4-7 梯度膠：144  $\mu\text{g}$  protein sample)，總電壓伏特小時：150,000 V $\cdot$ Hr。二維使用 10% SDS-PAGE 跑膠 7 小時至 bromophenol blue 跑至膠體下緣。膠體固定，染色，掃描後，利用 PDQuest Image Analysis software 分析，找出實驗及對照組中表現差異 2 倍以上的蛋白質點。分析得 106 個差異蛋白質點，將蛋白質點切取下來，作膠體內蛋白質水解(In-gel digestion)，用 MALDI-TOF 分析，經過 MASCOT 資料庫比對，得到 51 個不同的蛋白質(詳見表二)。



Figure 8 利用 GeneGo Meta Core™ 繪出各蛋白質相互關係之圖譜

(a)

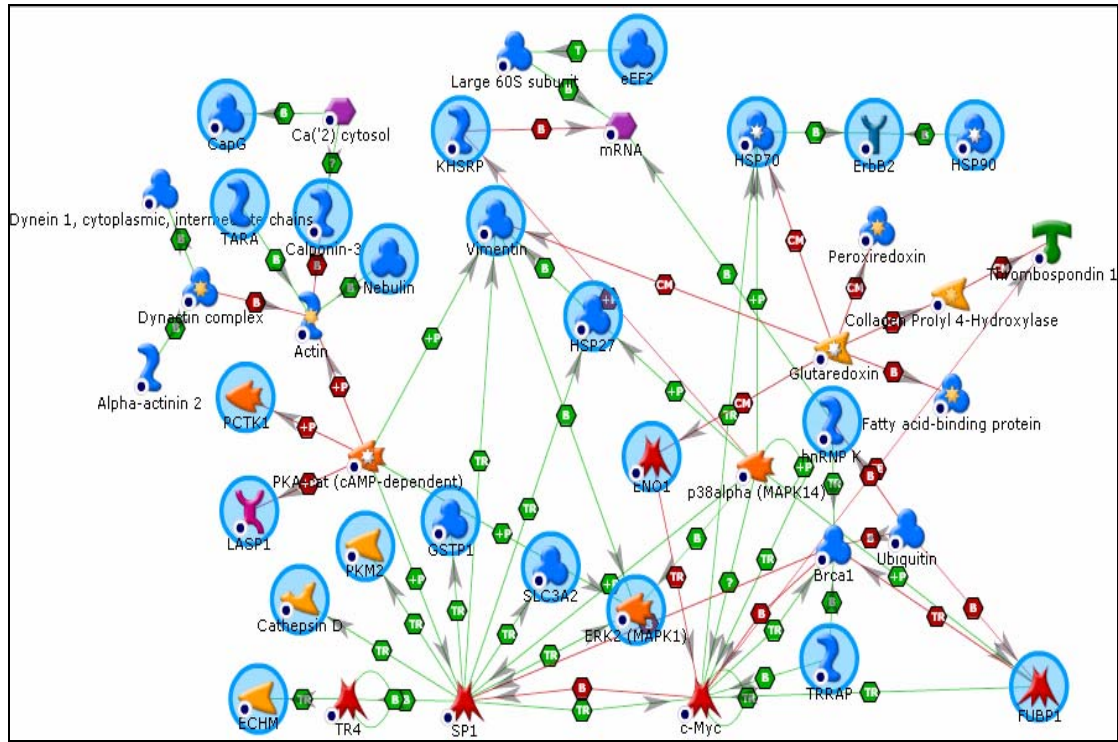
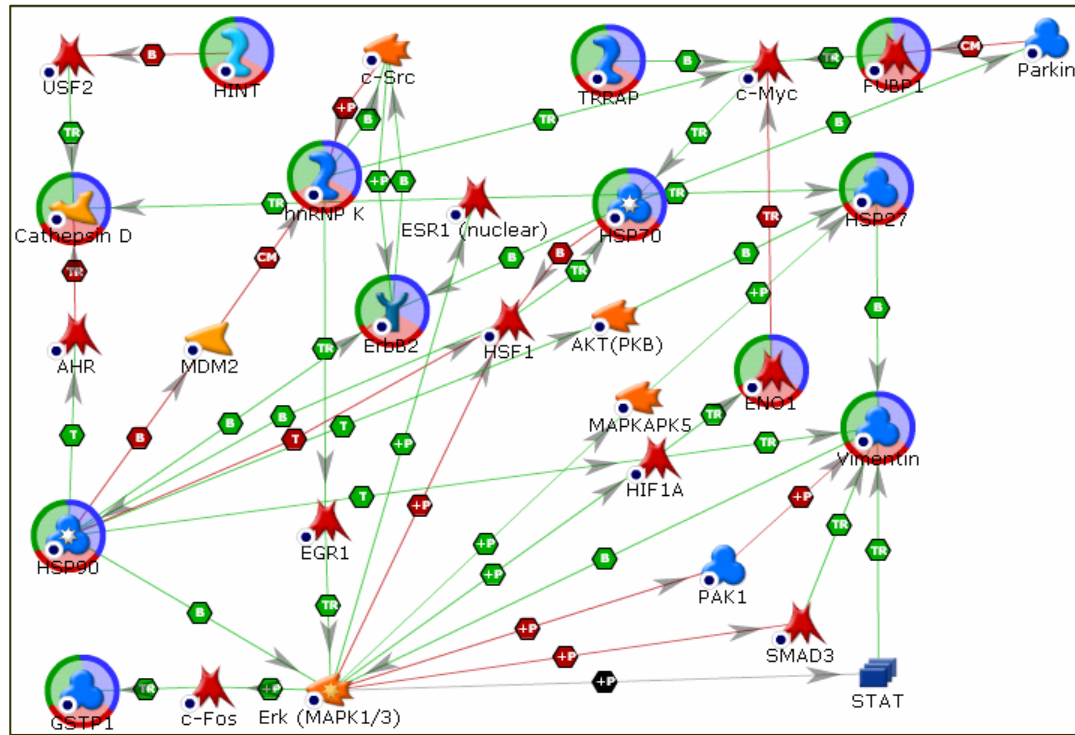


Fig. 8 a. Auto expand(自動延展)模式

將 MALDI-TOF 及 MASCOT 分析比對所得的蛋白質，剔除 actin，keratin，及 tubulin，剩餘共 40 個不同蛋白質，匯入 GeneGo Meta Core™ (<http://portal.genego.com>)，選擇 Auto expand 模式(即在所輸入的 subject(gene 或 protein)周圍繪出與其相關的 subgroup，當各 subject 的 subgroup 互相交會時，則延展停止)，繪製出 signaling network。Signaling network 繪製完成後，將無法繪入 network 的 subject 移除，即得到上圖。原本輸入的 subject 被繪入 network 的有 23 個。(Signaling network 圖示含義詳見附錄)

(b)

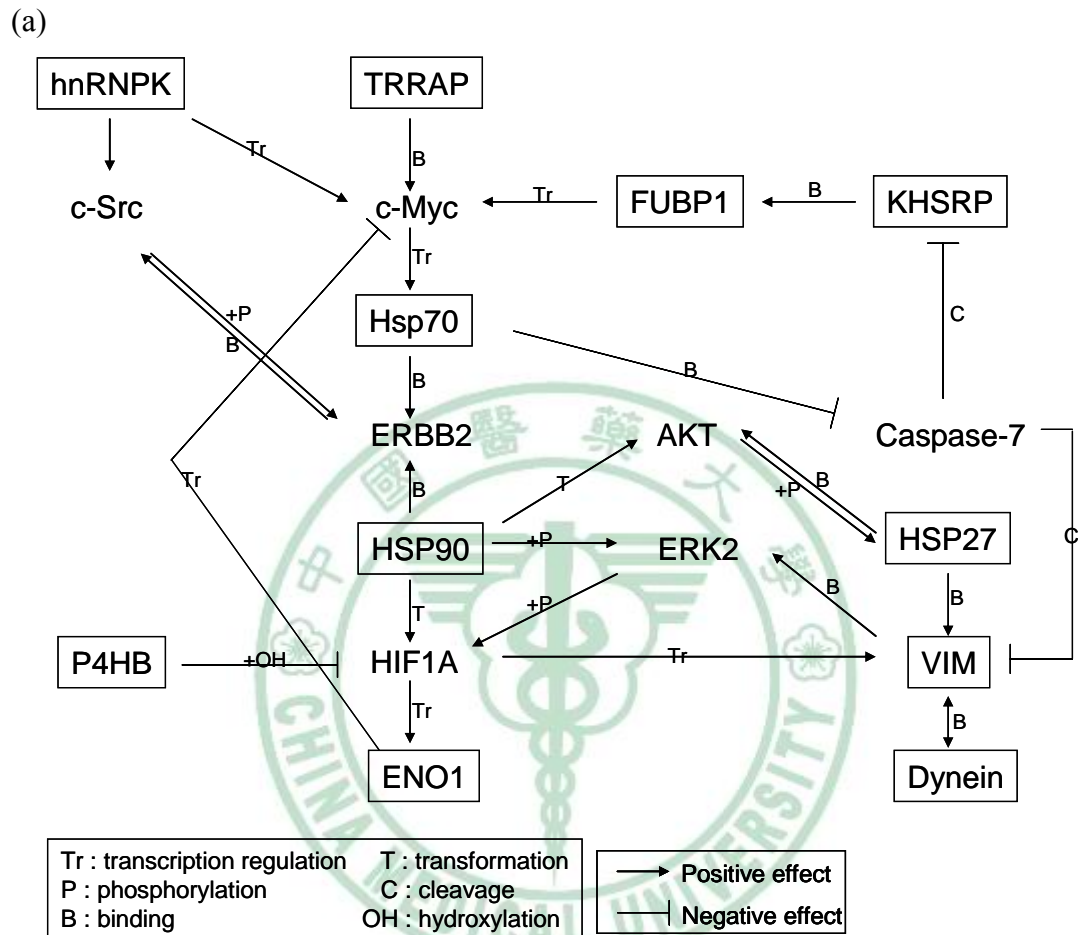


**Fig. 8 b. Shortest path(最短路徑)模式**

將 MALDI-TOF 及 MASCOT 分析比對所得的蛋白質，剔除 actin，keratin，及 tubulin，剩餘共 40 個不同蛋白質，匯入 GeneGo Meta Core™ (<http://portal.genego.com>)，選擇 Shortest path 模式(即根據 Dijkstra 的最短路徑演算法，繪出各 subject 間互相交會的最短路徑)，繪製出 signaling network。Signaling network 繪製完成後，將無法繪入 network 的 subject 移除，即得到上圖。原本輸入的 subject 被繪入 network 的有 12 個。(Signaling network 圖示含義詳見附錄)

Figure 9 表現量受靈芝甲醇萃取物所改變之生長相關蛋白質相關性

網路圖

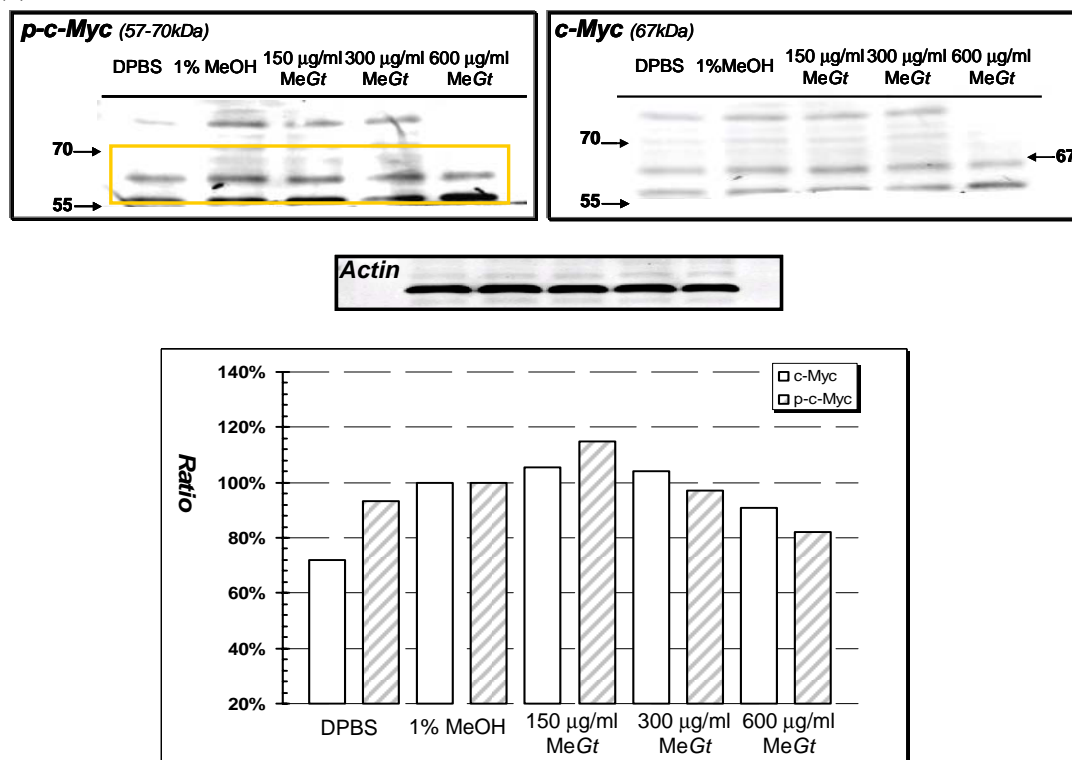


**Fig. 9** 參考 GeneGo Meta Core™ 所繪之 signaling network 以及二維凝膠電泳及直譜儀分析數據，挑選出與生長相關且互具關聯性的蛋白質，繪出 SKOV-3 細胞內表現量受靈芝甲醇萃取物所改變之部分生長相關蛋白質間相關性網路圖。在投予靈芝甲醇萃取物的組別中，具有促進 c-MyC，c-Src oncoprotein 表現之功能的 hnRNPK，FUBP，KHSRP，TRRAP 蛋白質表現量皆減少。相對的，由於投予靈芝所造成的 stress 促使 HSP90，HSP70，HSP27 等 chaperone 表現量增加，這些 chaperone 具有使許多訊息傳導相關的重要蛋白(如：c-MyC，c-Src，HER2，AKT/PKB，ERK/MAPK，vimentin 等)結構穩定具活性的功能。

**Figure 10** 用西方墨點證明松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt)對 SKOV-3

細胞內重要訊息傳導以及生長相關蛋白質表現量之影響

(a)

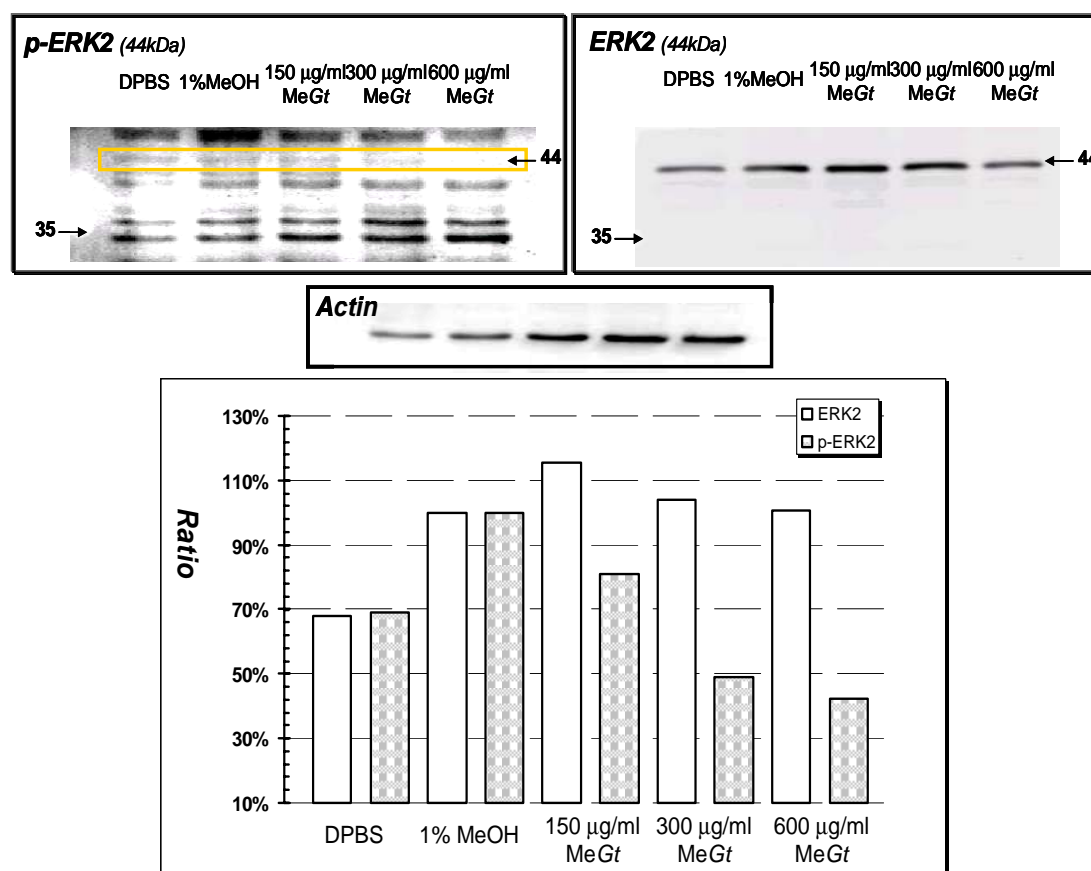


**Fig. 10 a** 松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt)對 SKOV-3 細胞內 c-Myc 及

**p-c-Myc (活性態 c-Myc)表現量的影響**

分別投予 SKOV-3 細胞 DPBS, 10%MeOH(對照組), 150 µg/ml MeGt (即 0.5 個 IC<sub>50</sub>), 300 µg/ml MeGt (即 1 個 IC<sub>50</sub>), 以及 600 µg/ml MeGt (即 2 個 IC<sub>50</sub>), 24 小時後收細胞 pellet, 抽 total protein, 進行 SDS-PAGE。由 Western blotting 結果顯示, 與對照組(表現量設為 100%)相比, 投予 150 µg/ml MeGt (0.5 個 IC<sub>50</sub>) 24 小時後, c-Myc 及 p-c-Myc 表現量有小幅增加。投予 300 µg/ml MeGt (1 個 IC<sub>50</sub>) 24 小時的組別, 其 c-Myc 及 p-c-Myc 表現量與對照組相仿。至於投予 600 µg/ml MeGt (2 個 IC<sub>50</sub>) 24 小時的組別, 可見其 c-Myc 及 p-c-Myc 表現量皆有減少的趨勢。

(b)

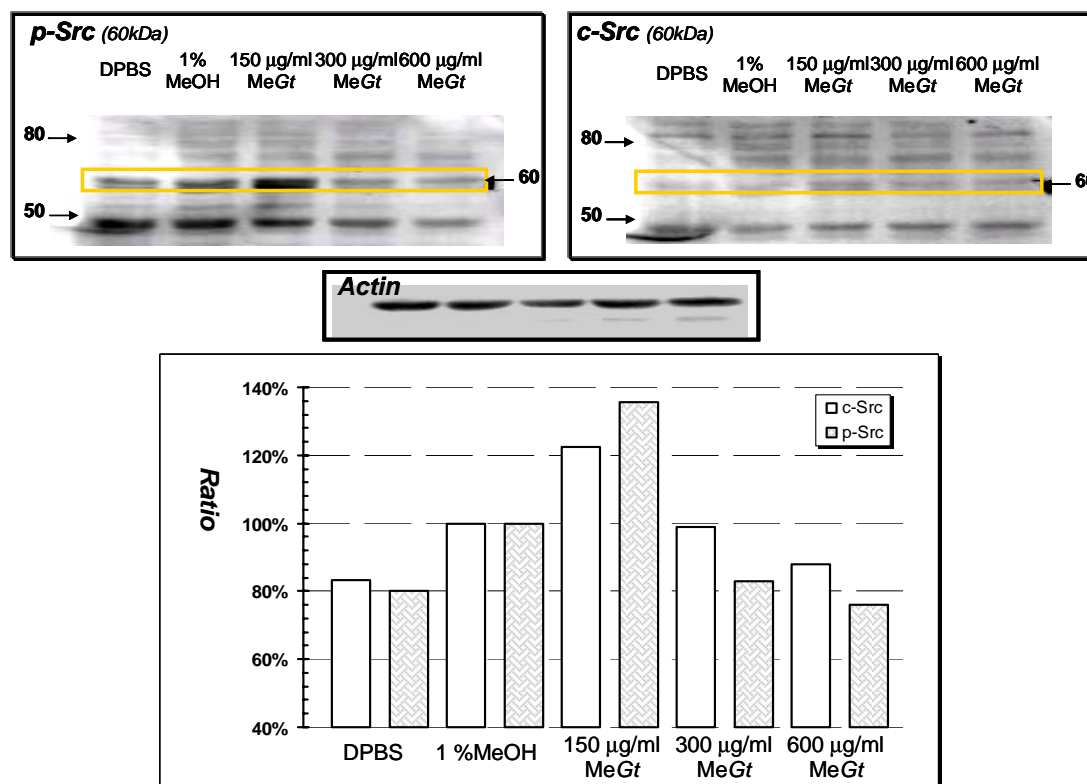


**Fig. 10 b 松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt)對 SKOV-3 細胞內 ERK2 及 p-ERK2 (活性態 ERK2)表現量的影響**

分別投予 SKOV-3 細胞 DPBS, 10%MeOH(對照組), 150 µg/ml MeGt (即 0.5 個 IC<sub>50</sub>), 300 µg/ml MeGt (即 1 個 IC<sub>50</sub>), 以及 600 µg/ml MeGt (即 2 個 IC<sub>50</sub>), 24 小時後收細胞 pellet, 抽 total protein, 進行 SDS-PAGE。由 Western blotting 結果顯示, 與對照組(表現量設為 100%)相比, 投予 150 µg/ml MeGt (0.5 個 IC<sub>50</sub>) 24 小時後, ERK2 表現量有小幅增加, 而 p-ERK2 表現量小幅減少。隨著劑量的增加, ERK2 表現量僅些微下降, 但 p-ERK2 表現量明顯大幅減少。



(c)



**Fig. 10 c** 松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt)對 SKOV-3 細胞內 c-Src 及 p-Src (活性態 Src)表現量的影響

分別投予 SKOV-3 細胞 DPBS, 10%MeOH(對照組), 150 µg/ml MeGt (即 0.5 個 IC<sub>50</sub>), 300 µg/ml MeGt (即 1 個 IC<sub>50</sub>), 以及 600 µg/ml MeGt (即 2 個 IC<sub>50</sub>), 24 小時後收細胞 pellet, 抽 total protein, 進行 SDS-PAGE。由 Western blotting 結果顯示, 與對照組(表現量設為 100%)相比, 投予 150 µg/ml MeGt (0.5 個 IC<sub>50</sub>) 24 小時後, c-Src 及 p-Src 表現量皆增加。投予 300 µg/ml MeGt (1 個 IC<sub>50</sub>) 24 小時的組別, 其 c-Src 表現量與對照組相仿, 而 p-Src 表現量減少。至於投予 600 µg/ml MeGt (2 個 IC<sub>50</sub>) 24 小時的組別, c-Src 及 p-Src 表現量皆有明顯減少。

(d)

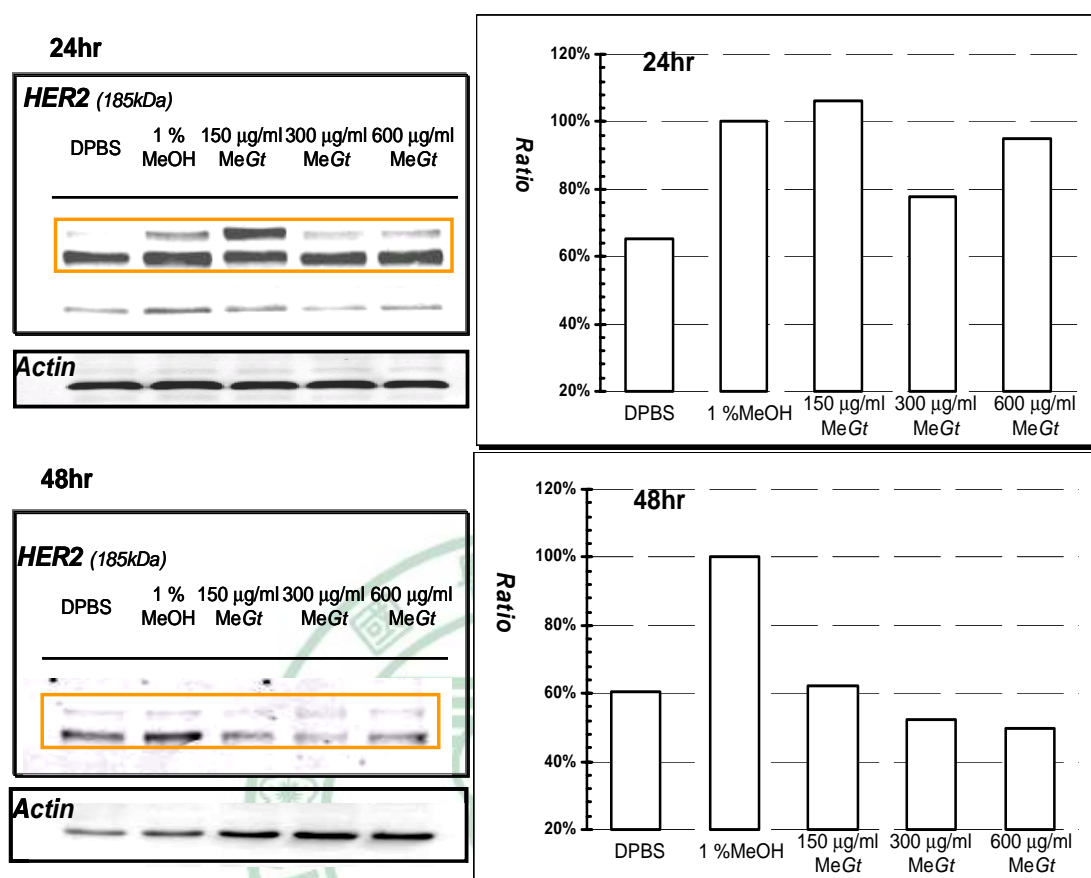


Fig. 10 d 投予松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt) 24及48小時，對SKOV-3

### 細胞內 HER2 蛋白表現量的影響

分別投予 SKOV-3 細胞 DPBS，10%MeOH(對照組)，150 µg/ml MeGt (即 0.5 個 IC<sub>50</sub>)，300 µg/ml MeGt (即 1 個 IC<sub>50</sub>)，以及 600 µg/ml MeGt (即 2 個 IC<sub>50</sub>)。24 小時後進行 Western blotting (上二圖)，結果顯示與對照組(表現量設為 100%)相比，投予 150 µg/ml MeGt (0.5 個 IC<sub>50</sub>)的組別，其 HER2 蛋白表現量增加。至於增加劑量至 600 µg/ml MeGt (即 2 個 IC<sub>50</sub>)，HER2 的表現量與對照組相去無幾。有趣的是，投予 MeGt 48 小時後，Western blotting (下二圖)結果顯示，此三種 MeGt 濃度皆明顯抑制 HER2 蛋白的表現量

Figure 11 靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長之可能分子機轉

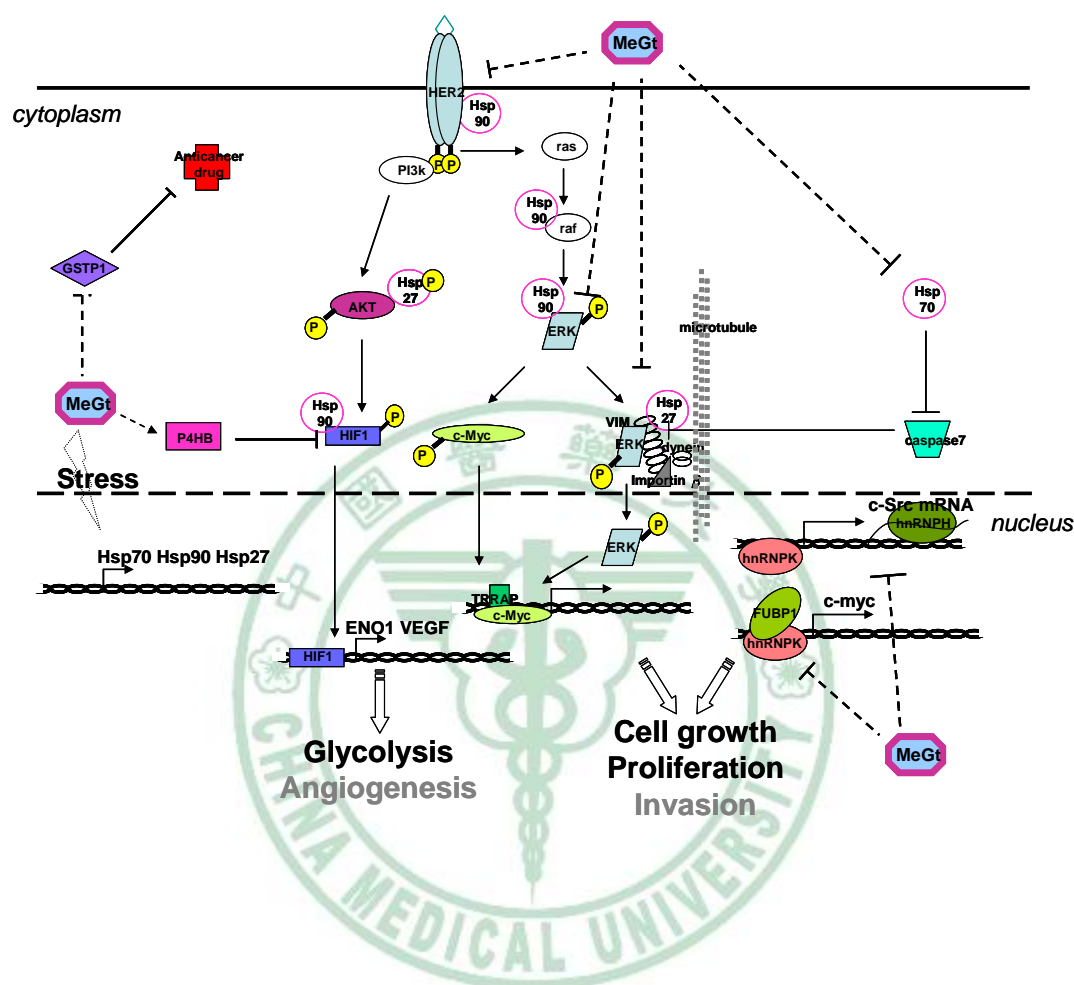


Fig. 11 靈芝甲醇萃取物抑制 SKOV-3 細胞生長之可能分子機轉圖。

根據之前之實驗結果及文獻搜尋，我們推測松杉靈芝甲醇萃取物(MeGt)抑制 SKOV-3 細胞生長可能的分子機轉，部分應如上圖所示：1) MeGt 使具有促進 c-myc 及 c-src 轉錄的 hnRNPK, KHSRP, FUBP1 蛋白表現量減少，從而抑制 c-myc 及 c-src 的表現。2) MeGt 可能抑制 HSP90, HSP70 及 HSP27 穩定 client proteins (包括 HER2, c-src, ERK2, AKT, HIF1A, vimentin 等) 的功能，使其 client proteins 不具功能性，或無法被運送，甚至被降解。3) MeGt 直接或間接抑制 enolase 的表現，使醱解作用下降，細胞產能下降。

# 附錄

## 附錄一、常見靈芝型態



*Ganoderma lucidum*  
(Photo : George Barron)



*Ganoderma tsugae*  
(Photo © David Work)



*Ganoderma applanatum*  
(Photo © 2003, 2005 J.K. Lindsey)



*Geastrum fornicatum*  
(Photo : GUIMBERTEAU)



附錄二、神農本草經及本草綱目對靈芝的記載

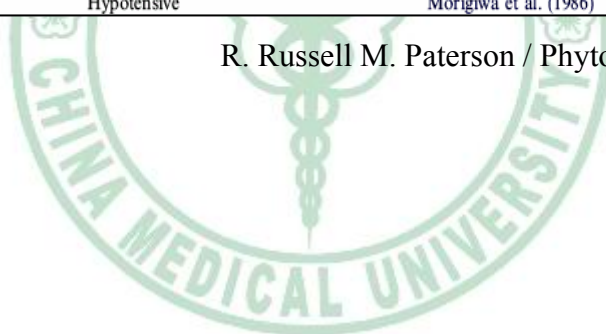




### 附錄三、靈芝主要成分

General compounds and effects of <i>Ganoderma</i> reported in the literature until 2004		
Compound	Effect	Reference
Adenosine	Antiplatelet aggregation	Kawagishi et al. (1993), Shimizu et al. (1985)
Lectins	Mitogenic	Ngai and Ng (2004)
Polysaccharides	Antifibrotic	Park et al. (1997)
	Antiherpetic	Eo et al. (1999a,b, 2000), Kim et al. (2000), Oh et al. (2000)
	Anti-inflammatory	Ukai et al. (1983)
	Hepatoprotective	Zhang et al. (2002)
	Hypoglycaemic	Hikino et al. (1985, 1989), Hikino and Mizuno (1989), Tomoda et al. (1986), Zhang and Lin (2004)
	Immuno-modulatory – anti-tumour	Gao et al. (2000a,b), Li et al. (2000), Li and Zhang (2000), Ooi et al. (2002), Sasaki et al. (1971), Sone et al. (1985)
	Miscellaneous (radiation protection, DNA damage, anti-oxidant)	Kim and Kim (1999b), Lee et al. (2001)
Protein (“LZ-8”)	Immunodulatory	van der Hem et al. (1995)
	Immunosuppressive	van der Hem et al. (1995)
Terpenoids and related compounds	Anti-bacterial	Smania et al. (1999)
	“Anti-complement”	Min et al. (2001)
	Anti-inflammatory	Kleinwächter et al. (2001)
	Anti-oxidant	Zhu et al. (1999)
	Antiplatelet aggregation	Shiao (1992)
	Antiviral	El-Mekkawy et al. (1998), Mothana et al. (2003)
	Cytotoxicity	Gao et al. (2002), Gonzalez et al. (2002), Kimura et al. (2002), Lin et al. (1991), Su et al. (2000), Wu et al. (2001)
	Enzyme inhibitors	Lee et al. (1998)
	Hepatoprotective	Chen and Yu (1999), Kim et al. (1999)
	Hypolipidemic (cholesterol inhibitors)	Komoda et al. (1989), Shiao (1992)
	Hypotensive	Morigiwa et al. (1986)

R. Russell M. Paterson / *Phytochemistry* 67 (2006)



附錄四、台灣地區常見靈芝一覽表(許瑞祥教授發表)

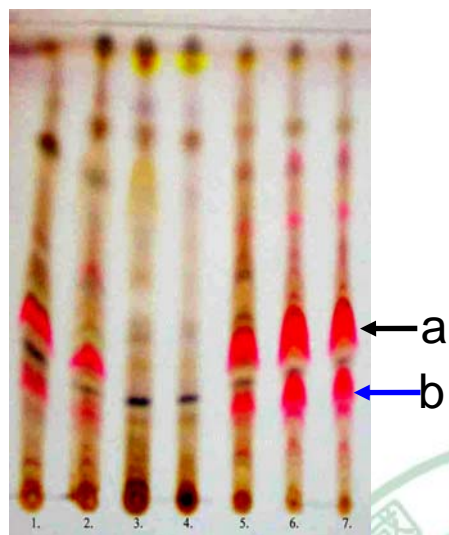
## Eight Common Species of Lingzhi in Taiwan

學名	子實體				孢子	寄生	俗名
	菌柄		菌蓋		大小(um)		
		顏色	形狀	漆光			
樹舌 <i>G. applanatum</i> (Pers)Pat.	無或短柄	灰白至灰褐色	半圓形 不規則形	無	7-10 X 4.3-6.2	闊葉樹 棕櫚 針葉樹	白芝、平蓋靈芝、 古梅靈芝、扁芝
台灣靈芝 <i>G. formosanum</i> Chang et Chen	有	暗紫色 黑紫色	近圓形 腎形	有	11.5-13 X 7-8.5	楓樹	紫芝、黑芝、玄芝
拱狀靈芝 <i>G. fornicatum</i> (Fr)Pat.	無或短柄	紅褐色至褐色	圓形近腎形	較弱	8.7-10.4 X 5.2-7	闊葉樹	無柄赤芝 紅樹舌
靈芝 <i>G. lucidum</i> (W. curt:Fr)Karst.	有或短柄	黃褐色 紅褐色	半圓形 腎形	有	8.5-11.2 X 5.2-7	闊葉樹	赤芝、相思赤芝 淺山赤芝
新日本靈芝 <i>G. neo-japo-nicum</i> Imaz.	有	褐色 紫褐色	近圓形 腎形	有	10-12.5 X 7-8.5	竹類	竹生赤芝、竹芝 紫芝
熱帶靈芝 <i>G. tropicum</i> (Jungh)Bres.	有	黃褐色 紫褐色	半圓形 漏斗形	較弱	8.5-11.5 X 5.2-6.9	豆科植物	赤芝、淺山赤芝 相思赤芝
松杉靈芝 <i>G. tsugae</i> Murr.	有	紅褐色 紫褐色	腎形 近扇形	有	9-11 X 6-8	針葉樹 闊葉樹	高山赤芝 赤芝
小孢子靈芝 <i>G. microsporum</i> Hseu.	無或短柄	古銅形 紫黑色	貝殼形 不規則形	有	6-8.5 X 4.5-5	柳樹	青芝

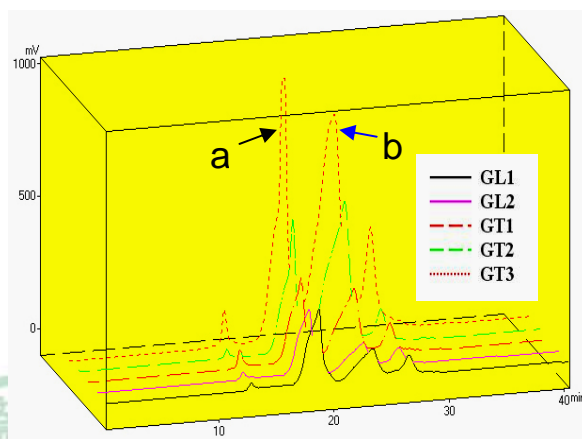
Hsu RH 許瑞祥，1993，靈芝概論

## 附錄五、靈芝萃取物成分之 TLC、HPLC 分析鑑定

(a)



(b)



(a) TLC profiles of *Ganoderma* sp.:

1. GL1 (*G. lucidum*)
2. GL2
3. GF1 (*G. formosanum*)
4. GF2
5. GT1 (*G. tsugae*)
6. GT2
7. GT3

(b) HPLC profiles of *Ganoderma* sp.

註：本圖摘自許世忠博士論文初稿

## 附錄六、細胞株培養方法

(參考「高銘欽教授實驗室細胞培養標準操作程序」，編撰者:李宜臻)

### 一、解凍細胞

1. 取 5 ml 細胞培養液分別加入 15 ml 無菌離心管和 25T 無菌培養盤備用。
2. 由細胞庫取出冷凍的細胞株，放入 37°C 水浴槽溶解之後取出。
3. 在無菌操作台內將冷凍管內的細胞懸浮液取出放入含 5 ml 細胞培養液的 15 ml 無菌離心管之中，以 1000 rpm 離心 5 分鐘。
4. 由離心機中取出 15 ml 離心管，吸去上清液，加入 3 ml 細胞培養液混合均勻，移入含 5 ml 細胞培養液的 25T 無菌培養盤；另取 0.5ml 的細胞懸浮液以 Trypan blue 計算細胞存活率
5. 將細胞置入恆溫培養箱中培養。

### 二、繼代培養及分盤

1. 將細胞培養液、1X TE 置於 37°C 水浴槽加溫 10-15 分鐘之後取出備用。
2. 從恆溫培養箱取出已長有 70%-80% 滿盤的細胞培養盤(flask)，經過顯微鏡觀察無任何的污染現象。
3. 吸去培養液，加入 10 ml DPBS 緩衝溶液緩慢沖洗一次之後吸去；再加入適量的 1X TE，均勻的潤濕細胞之後將細胞培養盤置於恆溫培養箱中 3-5 分鐘。
4. 輕拍培養盤身，見細胞由培養盤底順利剝離即置於無菌操作臺。
5. 以 9 ml 細胞培養液沖洗培養盤，取出細胞懸浮液加入無菌離心管均勻混和，取出約 0.5 ml 細胞懸浮液放入小管(ependorf)中，準備計算細胞數目。
6. 將離心管以 1000 rpm 離心 5 分鐘，離心之時計算細胞數目
8. 取出無菌離心管，吸去上清液，加入適量的細胞培養液稀釋成細胞懸浮液，放入無菌培養盤中。
9. 將細胞置於恆溫培養箱中培養。

### 三、凍存細胞

1. 取 90% 細胞培養液混合 10% DMSO，放在 4°C freezer 預冷 1 小時。在冷凍小管上須註明冷凍日期、細胞株名稱、冷凍者和細胞代數。將細胞培養液、1X TE 置於 37°C 水浴槽加溫 10-15 分鐘之後備用。
- 2~6. 同繼代培養分盤之步驟
7. 取出無菌離心管，吸去上清液，加入適量的冷凍細胞培養液稀釋成細胞懸浮液，取大約 1 ml 放入冷凍小管。
8. 將冷凍小管置於-80°C freezer 中 24 小時之後；移至液態氮筒中存放。





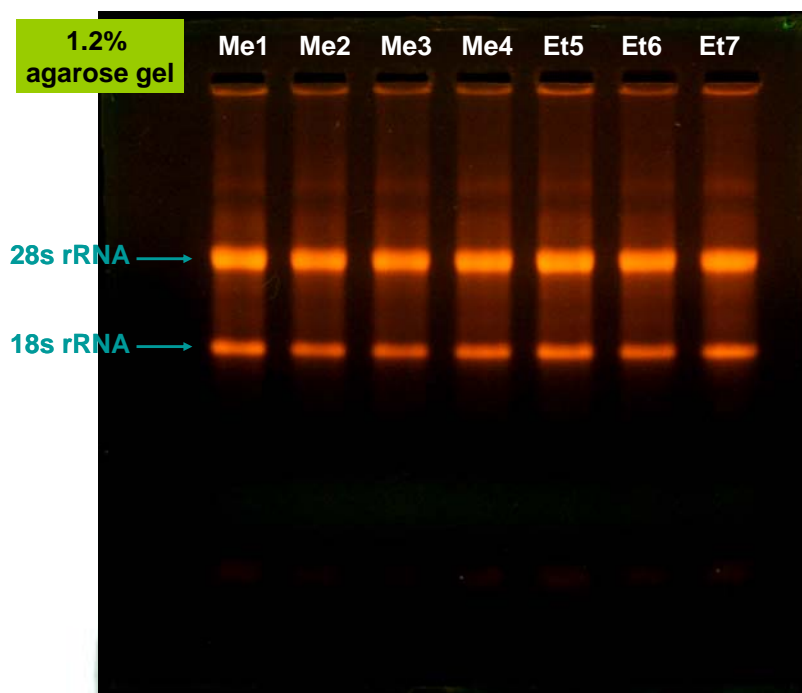
## 附錄七、CCK-8 assay 實驗設計

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	100 μg/ml	200 μg/ml	400 μg/ml	800 μg/ml	1600 μg/ml			100 μg/ml	150 μg/ml	200 μg/ml	250 μg/ml	300 μg/ml	←blank
B													
C			MeGt			MeOH	EtOH			EtGt			
D													
E													
F			DIWGt			DIW				DPBS			
G													
H	10 mg/ml	20 mg/ml	40 mg/ml	80 mg/ml	160 mg/ml								←blank

96 孔盤除第一列及第八列為 blank(只有 medium，不種細胞)之外，其餘每 well 種入  $3 \times 10^3$  cells/90μl medium。將 96 孔盤劃分為 4 區，分別為：(1) (A1-D6) 投予松杉靈芝甲醇萃取物 100, 200, 400, 800, 1600 μg/ml，以及投予甲醇的 control 組。(2) (A7-D12) 投予松杉靈芝乙醇萃取物 100, 150, 200, 250, 300 μg/ml，以及投予乙醇的 control 組。(3) (E1-H6) 投予松杉靈芝去離子水萃取物 10, 20, 40, 80, 160 mg/ml，以及投予去離子水的 control 組。(4) (E7-H12) 投予 DPBS。

## 附錄八、SKOV-3 細胞株 RNA 抽取之品質鑑定(Quality control)

### — 1.2%瓊脂糖凝膠電泳分析(Agarose gel electrophoresis analysis)



附錄九、基因體醫學國家型計畫微陣列與基因表現分析核心設施

國立陽明大學基因體中心基因表現分析中心

— Affymetrix Chips Service Report

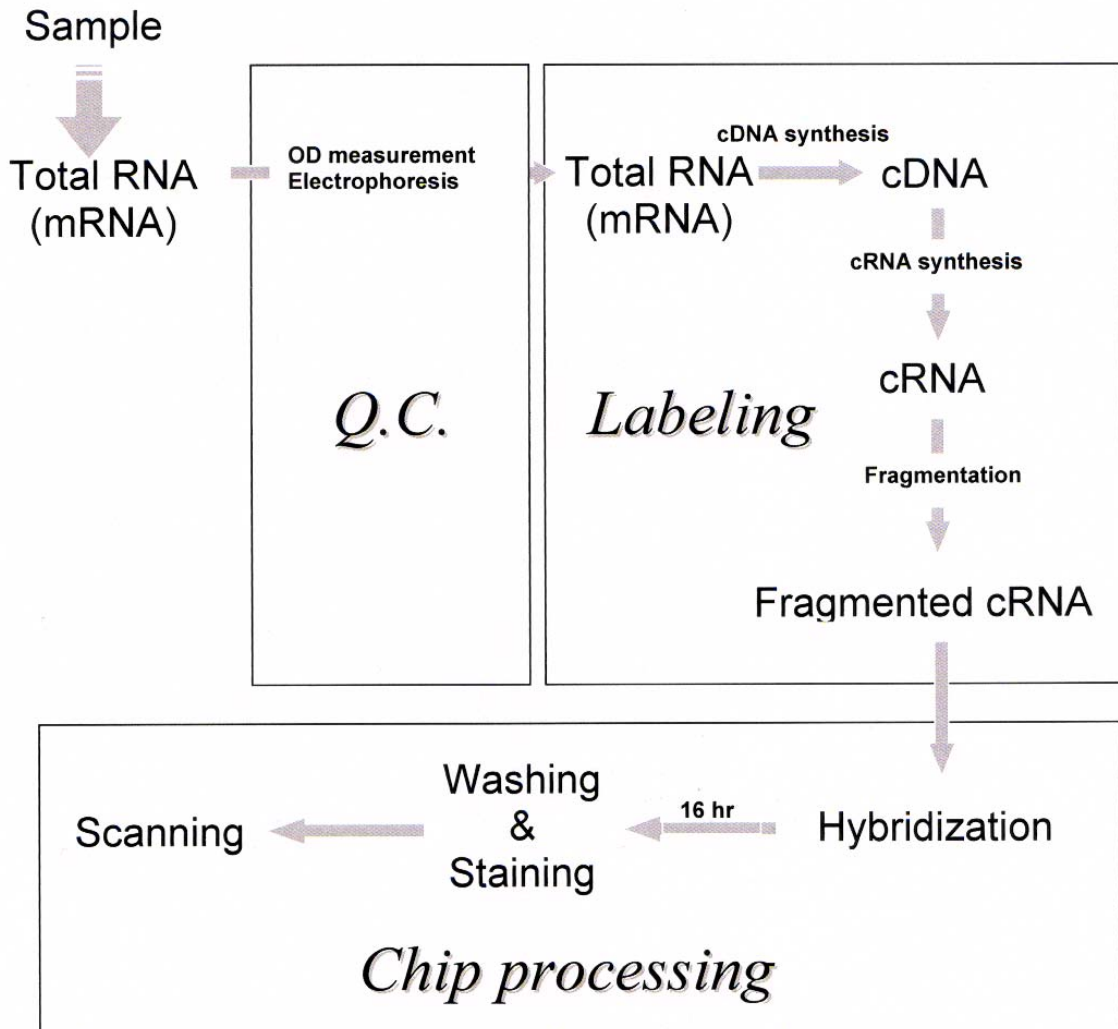
一、The Processing of Affymetrix Genechip



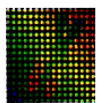
National Research Progress for Genomic Medicine  
Microarray & Gene Expression Analysis Core Facility

Project Code: MFHW-S0302-01

## The Processing of Affymetrix Genechip



## 二、RNA Quality Report



National Research Progress for Genomic Medicine  
Microarray & Gene Expression Analysis Core Facility

Project Code: MFHW-S0302-01

### RNA Quality Report

Operator: 鄧竹君 Date: 2007/3/29

- RNA Purity test

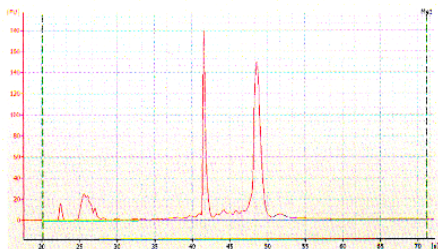
Measure by UV spectrophotometer and Agilent 2100 Bioanalyzer

Sample ID	ng/ $\mu$ l (>1000ng)	OD260/280 Ratio (1.8~2.1)	OD260/230 Ratio (1.5~3.1)	RIN (>8)	Approval (passed: <input checked="" type="checkbox"/> unpassed; <input type="checkbox"/> )
S0302-001-Me1	1771.41	1.92	2.12	9.7	<input checked="" type="checkbox"/>
S0302-002-Me2	1288.17	1.82	2.32	9.7	<input checked="" type="checkbox"/>
S0302-003-Me3	1472.07	1.89	2.25	9.7	<input checked="" type="checkbox"/>
S0302-004-Me4	1646.67	1.9	2.29	9.7	<input checked="" type="checkbox"/>
S0302-005-Et5	1688.85	1.91	2.27	9.6	<input checked="" type="checkbox"/>
S0302-006-Et6	1367.61	1.83	2.32	9.6	<input checked="" type="checkbox"/>
S0302-007-Et7	1378.95	1.86	2.3	9.6	<input checked="" type="checkbox"/>

Operator: 鄧竹君 Date: 2007/3/29

- RNA Quality test (by Agilent 2100 bioanalyzer)

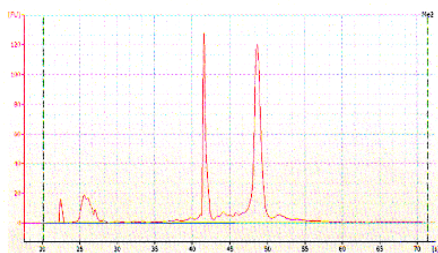
Sample: S0302-001-Me1



rRNA Ratio [28S / 18S] 1.73

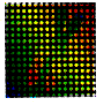
RIN 9.7

Sample: S0302-002-Me2

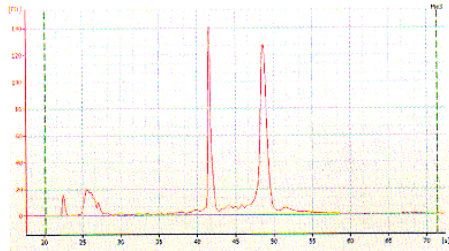


rRNA Ratio [28S / 18S] 1.75

RIN 9.7



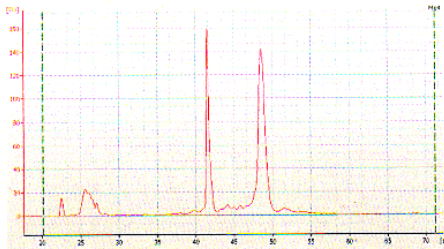
**Sample: S0302-003-Me3**



**rRNA Ratio [28S / 18S] 1.78**

**RIN 9.7**

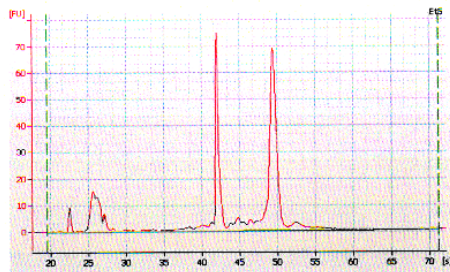
**Sample: S0302-004-Me4**



**rRNA Ratio [28S / 18S] 1.76**

**RIN 9.7**

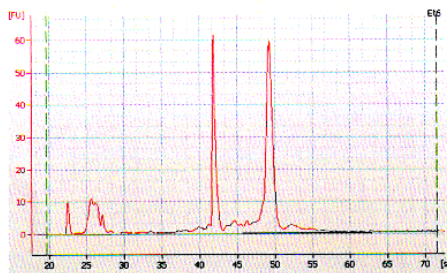
**Sample: S0302-005-Et5**



**rRNA Ratio [28S / 18S] 1.76**

**RIN9.6**

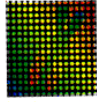
**Sample: S0302-006-Et6**



**rRNA Ratio [28S / 18S] 1.77**

**RIN 9.6**

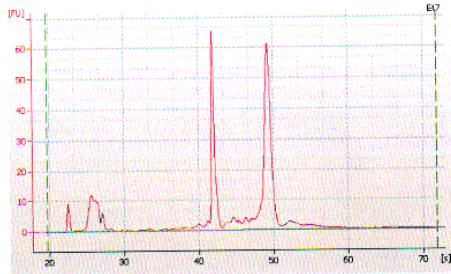




National Research Progress for Genomic Medicine  
Microarray & Gene Expression Analysis Core Facility

Project Code: MFHW-S0302-01

Sample: S0302-007-Et7



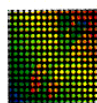
rRNA Ratio [28S / 18S] 1.7

RIN 9.6

Operator Signature: 徐丁君



### 三、Sample Labeling Report



National Research Progress for Genomic Medicine  
Microarray & Gene Expression Analysis Core Facility

Project Code: MFHW-S0302-01

## Sample Labeling Report

Operator: 鄧竹君 Date: 2007/4/10

#### ● Experiment setup and result

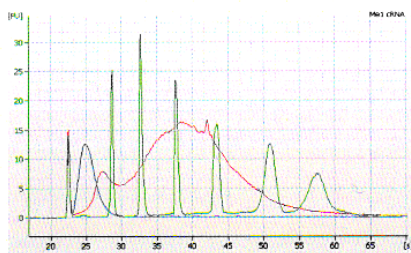
The concentration of cRNA should be more than  $0.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

Sample ID	cRNA synthesis		Fragmentation
	Input (ul)	Product. (ng/ul)	Approval
S0302-001-Me1	19.32	931.53	■
S0302-002-Me2	13.62	1321.98	■
S0302-003-Me3	13.85	1300.05	■
S0302-004-Me4	13.73	1311.15	■
S0302-005-Et5	15.02	1198.56	■
S0302-006-Et6	9.59	1878.09	■
S0302-007-Et7	9.89	1820.16	■

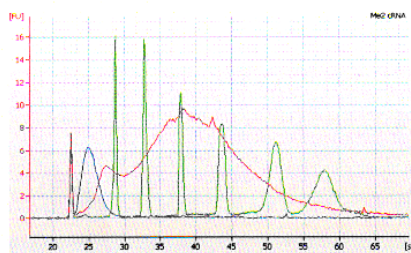
#### ● Result with cRNA fragmentation (Checked by Agilent 2100 Bioanalyzer)

- ⊙ The fragmented cRNA size should be distributed from 35 to 200 bases after a standard fragmentation procedure.
- ⊙ The RNA ladder is a set of six transcripts with lengths of 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0 kb.

Sample: S0302-001-Me1

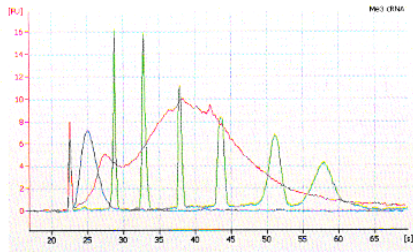


Sample: S0302-002-Me2

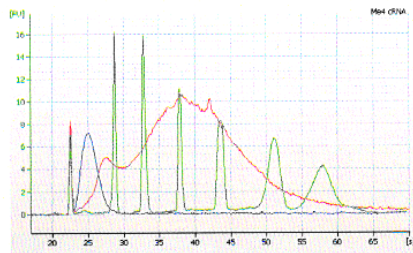




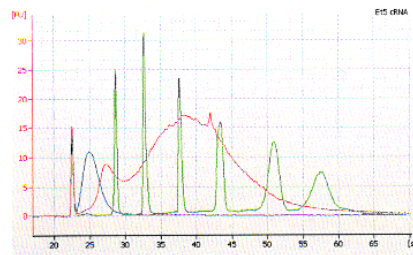
Sample: S0302-003-Me3



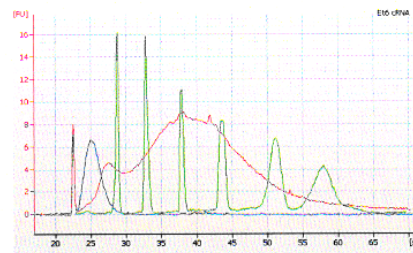
Sample: S0302-004-Me4



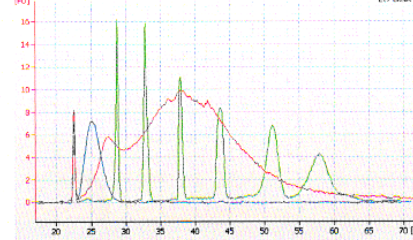
Sample: S0302-005-Et5



Sample: S0302-006-Et6

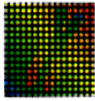


Sample: S0302-007-Et7



Operator Signature: 管 47 君

#### 四、Array Output Quality Report



National Research Progress for Genomic Medicine  
Microarray & Gene Expression Analysis Core Facility

Project Code: MFHW-S0302-01

## Array Output Quality Report

Operator: 鄧竹君      Date: 2007/4/11

The Expression Report file (.rpt) is included in the disc, which we gave to user. Most of the information about the array quality could be found in it.

For more details about the array quality check are introduced in the handbook: *GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals* which could be download from the web page: <http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>

**The quality of array control tests that we have done as shown below:**

Check Items	Descriptions	Definition
Array Image	Without seriously artifacts	OK
Background	20-100	OK
Noise	<10	OK
B2 Oligo Performance	Alternating pattern on border	OK
Image	Checkerboard pattern at corners	OK
	Array name	OK
Hybridization controls	BioB: 50%A; 50%P	OK
	bioC, bioD, and cre: P	OK
Internal control genes	Either 3'/5' probe set of GAPDH or 3'/5' probe set of actin < 3	OK

The data is output according of the expression analysis settings as shown below:

Scaling:		Normalization:	
User defined		User defined	1
All probe sets	500	All probe sets	
Selected probe sets		Selected probe sets	

The default settings are “scaling all probe sets to target signal: 500” and “normalization by user defined in value: 1”

Operator Signature: 鄧竹君

## 附錄十、Genes number by PhytoViewerBR 2.2 processing

### 1. Genes expression of SKOV-3 cells under the treatment of MeGt vs. EtGt

	MeGt			EtGt	
<b>import</b>	54675 / 27779 / 26896	54675 / 30574 / 24101	54674 / 30200 / 24475	54675 / 22186 / 32489	54675 / 20690 / 33985
<b>filter-by gene name</b>	54613 / 27744 / 26869	54613 / 30532 / 24081	54613 / 30154 / 24459	54613 / 22172 / 32441	54613 / 20677 / 33936
<b>filter-by signal (300)</b>	18211 / 9655 / 8556	18297 / 10103 / 8194	18252 / 10178 / 8074	18909 / 9358 / 9551	18856 / 9258 / 9598
<b>filter-by detection call (at least one present)</b>	18030 / 9560 / 8470	18105 / 9984 / 8121	18076 / 10076 / 8000	18480 / 9260 / 9220	18463 / 9173 / 9290
<b>filter-by change call (I or D)</b>	7900 / 3674 / 4226	6364 / 2529 / 3835	6521 / 2615 / 3906	8320 / 4581 / 3739	8295 / 4745 / 3550
<b>filter-by ratio (4.5)</b>	258 / 116 / 142	271 / 119 / 152	312 / 134 / 178	446 / 217 / 229	420 / 202 / 218
<b>intersect-MeGtvsEtGt</b>			139 / 66 / 73		
<b>union-1-MeGtvsEtGt</b>	671 / 286 / 385	671 / 292 / 379	671 / 288 / 383	671 / 301 / 370	671 / 300 / 371
<b>union-2-MeGtvsEtGt</b>	460 / 219 / 241	460 / 218 / 242	460 / 217 / 243	460 / 220 / 240	460 / 221 / 239
<b>union-3-MeGtvsEtGt</b>			254 / 116 / 138		
<b>union-4-MeGtvsEtGt</b>			183 / 86 / 97		
<b>union-5-MeGtvsEtGt</b>			139 / 66 / 73		

gene number: total/increased/decreased



## 2. Genes expression of SKOV-3 cells under the treatment of MeGt

	MeGt			
<b>import</b>	54675 / 27779 / 26896	54675 / 30574 / 24101	54674 / 30200 / 24475	
<b>filter-by gene name</b>	54613 / 27744 / 26869	54613 / 30532 / 24081	54613 / 30154 / 24459	
<b>filter-by signal (300)</b>	18211 / 9655 / 8556	18297 / 10103 / 8194	18252 / 10178 / 8074	
<b>filter-by detection call (at least one present)</b>	18030 / 9560 / 8470	18105 / 9984 / 8121	18076 / 10076 / 8000	
<b>filter-by change call (I or D)</b>	7900 / 3674 / 4226	6364 / 2529 / 3835	6521 / 2615 / 3906	
<b>filter-by ratio (4.5)</b>	258 / 116 / 142	271 / 119 / 152	312 / 134 / 178	
<b>intersect</b>	198 / 99 / 99			
<b>union-1</b>	376 / 149 / 227			
<b>union-2</b>	267 / 121 / 146			
<b>union-3</b>	198 / 99 / 99			

total / up-regulated / down-regulated

附錄十一、試劑及緩衝液配製

<2-DE Electrophoresis>

<b><u>2-DE Lysis buffer</u></b> (-80 °C)		<b>10 mL</b>
	Urea (FW:60.06)	4.8 g (8 M)
	CHAPS	0.2 g (4%)
	40% Bio-Lyte (IPG buffer)	<i>Add before use</i> (0.2-0.25%)
	DTT (FW: 154.25)	<i>Add before use</i> (50-65 mM)

<b><u>10% TCA in Acetone</u></b> (-20°C)		<b>225 ml</b>
	Trichloroacetic acid (FW:163.39)	25 g
	ddH <sub>2</sub> O	11~17.5 ml (till 25 ml)
	Acetone	200 ml
	DTT (FW: 154.25)	<i>Add before use</i> (20 mM)

<b><u>1% Bromophenol blue</u></b> (4°C)		<b>10 mL</b>
	Bromophenol blue	100 mg
	0.5 M Tris-HCl	1 ml

<b><u>1.5 M Tris-HCl</u></b> (pH 8.8)		<b>1 L</b>
	Tris-HCl (FW:121.14)	181.7 g

(4 ml / 17cm strip)	IEF buffer	DTT (FW: 154.25) (Add before use)	IAA (FW: 184.96) (Add before use)
<b>Equilibration buffer I</b>	4 ml	40mg (1%)	—
<b>Equilibration buffer II</b>	4 ml	—	100mg (2.5%)

<b><u>IEF buffer</u></b> (aliquots in -20°C)		<b>500 ml</b>
	Urea (FW:60.06)	210 g (7 M)
	SDS (FW:288.38)	12.5 g (2.5% w/v)
	1.5 M Tris	17 ml
	Glycerol	176 ml (35 %)
	ddH <sub>2</sub> O	till 500 ml (about 150 ml)
	1% Bromophenol Blue	1 ml

18×18 cm <sup>2</sup> (50ml/gel)	<b><u>ddW</u></b> (ml)	<b><u>1.5 M Tris-HCl</u></b> (pH 8.8)	<b><u>30%</u></b> <b><u>Acrylamide/Bis</u></b>	<b><u>10% SDS</u></b> (add before)	<b><u>10% APS</u></b> (add before)	<b><u>TEMED</u></b> (add)
-------------------------------------	---------------------------	--	---	---------------------------------------	---------------------------------------	------------------------------

		(ml)	(ml)	<i>use</i>	<i>use</i>	<i>before use</i>
<b>10 %</b>	19.8	12.5	16.7	2 ml/gel (0.4% w/v)	400 μl/gel	30 μl/gel
<b>11 %</b>	18.2		18.3			
<b>12 %</b>	16.5		20			

<b><u>Overlay Agarose</u></b> (2ml aliquots in 4°C, and melting at 100°C before use.)		<b>100 mL</b>
	Agarose	0.5 g
	1% Bromophenol blue	1 ml
	1X Running buffer	99 ml

<b><u>10X Running buffer</u></b>		<b>1 L</b>
	Tris-HCl	30.29 g
	Glycine(FW:75.07)	144.0 g
	SDS(FW:288.38)	20 g (2% w/v)

<b><u>Gel fixation solution</u></b>		<b>1 L</b>
	Methanol	250 ml (25%)
	Glacial acetic acid	100 ml (10%)
	ddH <sub>2</sub> O	till 1L

<Protein in-gel digestion for MALDI-TOF MS>

<b><u>50% ACN / 25mM Ammonium bicarbonate</u></b>		<b>100 mL</b>
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (FW: 79.06)	197.65 mg
	Acetonitrile	50 mL

<b><u>25mM Ammonium bicarbonate (pH 8.0)</u></b>		<b>100 mL</b>
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (FW: 79.06)	197.65 mg

<b><u>Trypsin solution</u></b> (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin (#V5111))	↓ Gently tap the vial on a lab bench to dislodge any powder clinging to the sides of the vial (20µg / vial).
	↓ Add 200µL of Trypsin Resuspension Buffer (50mM acetic acid) → 20µg / 200µL = 100ng / µL
	↓ Aliquot to 10µL/tube, and store at -20 °C
	↓ Thaw the 10µL aliquot, and dilute with 990µL 25mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> → 1µg / mL = 1ng / µL or Thaw the 10µL aliquot, and dilute with 40µL 25mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> → 1µg / 50µL = 20ng / µL
	↓ Aliquot to 100µL/ependorf, and store at -80 °C

<b><u>1% TFA / 100% ACN</u></b>		<b>100 mL</b>
	Acetonitrile	99 mL
	Trifluoroacetic acid	1 mL

<b><u>MALDI-TOF MS matrix solution</u></b> (prepare just before use, or 4°C for less than 1 week)		<b>1 mL</b>
	HCCA	1 mg
	0.1% TFA / 50% ACN	1 mL

<SDS-PAGE>

<b>0.5 M Tris-HCl</b> <b>(pH 6.8)</b>		<b>50 ml</b>	<b>500 ml</b>
	Tris-HCl	3.03 g	30.29 g

<b>2X sample buffer</b> (1ml aliquots at -80°C)		<b>25 ml</b>	<b>50 ml</b>
	<b>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</b>	6.25 ml	12.5 ml
	Glycerol	5 ml	10 ml (20%)
	SDS	1.025 g	2 g (4.1%)
	DTT (FW: 154.25)(or 2-ME)	775 mg	1.55 g (1 ml)
	ddW	till 25 ml	till 50 ml
	Bromophenol Blue	少許	少許

<b>10X Running buffer</b> (4°C)		<b>0.5 L</b>	<b>1 L</b>
	Tris-HCl	15.14 g	30.29 g
	Glycine(FW:75.07)	72.0 g	144.0 g
	SDS(FW:288.38)	5 g	10 g

<b>1X Transfer buffer</b> with 20% (or 10%) MeOH with or without 0.1% SDS (4°C)		<b>0.5 L</b>	<b>1 L</b>
	Tris-HCl	1.51 g	3.03 g
	Glycine	7.2 g	14.4 g
	10% (w/v) SDS	5 ml	10 ml
	Methanol	100 ml (or 50ml)	200 ml (or 100ml)

<b>10X TBS</b> <b>(pH 7.6)</b> (4°C)		<b>0.5 L</b>	<b>1 L</b>
	Tris-HCl	6.06 g	12.11 g
	NaCl(FW:58.44)	40 g	80 g

<b>1X Washing buffer</b> (TBST)		<b>1 L</b>	<b>2 L</b>
	10X TBS	100 ml	200ml
	Tween-20	1 ml	2 ml

<b>2X HEPES</b> (pH 7.0, 4°C)		<b>50 ml</b>	<b>100 ml</b>
	HEPES(FW:238.31)	0.48 g	0.95 g
	MgCl <sub>2</sub>	0.02 g	0.04 g
	KCl(FW:74.55)	0.08 g	0.15 g
	NP-40	0.5 ml	1 ml



<p><b><u>HEPES/NP-40</u></b>  <b><u>cell lysis buffer</u></b>  (4°C, -20°C)  <i>Add before use</i></p>		<b>5 ml</b>	<b>10 ml</b>
	2X HEPES	2.5 ml	5 ml
	5M NaCl	500 ul (0.15 g)	0.29 g
	NP-40	50 ul	100 ul
	Protease inhibitor Cocktail tablet	0.5 tablet (750 ul)	1 tablet/1.5 ml Q-water (-20°C)
	100 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (FW:183.9) (-20°C)	50 ul	100 ul
	Ser/Thr-Phosphatase Inhibitor Cocktail	50 ul	

<p><b><u>Stripping buffer</u></b>  (4°C)</p>		<b>100 ml</b>	<b>500 ml</b>
	10% (w/v) SDS	20 ml	100 ml
	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	12.5 ml	62.5 ml
	β-ME	694 ul	3.47 ml

	<b><u>ddW</u></b> (ml)	<b><u>Gel Buffer</u></b> (ml)	<b><u>10% SDS</u></b> (ml)	<b><u>30% Acrylamide/Bis</u></b> (ml)	<b><u>10% APS</u></b>	<b><u>TEMED</u></b> (ul)
<b>4%</b>	6.1	2.5	0.1	1.3	上膠 30 ul	7
<b>5%</b>	5.7			1.7		
<b>6%</b>	5.4			2.0		
<b>7%</b>	5.1			2.3		
<b>8%</b>	4.7			2.7		
<b>9%</b>	4.4			3.0		
<b>10%</b>	4.1			3.3	下膠 60 ul	
<b>11%</b>	3.7			3.7		
<b>12%</b>	3.4			4.0		
<b>13%</b>	3.1			4.3		
<b>14%</b>	2.7			4.7		

Stacking Gel(上膠) Buffer – 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

Resolving Gel(下膠) Buffer – 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

附錄十二、二維凝膠電泳條件

<一維等電點聚焦(IEF)>

<i>&lt;IEF Program for 17cm strip&gt;</i>			
<b>Rehydration</b>	50V		14Hr
<b>Run IEF</b>	Step 1 (去鹽)	250V(linear)	100Vhr
	Step 2 (去鹽)	1000V(linear)	400Vhr
	Step 3	10000V(linear)	15500Vhr
	Step 4	10000V(rapid)	67000Vhr
	Step 5	10000V(rapid)	67000Vhr
	Step 6	500V(rapid)	∞

<i>&lt;IEF Program for 7cm strip&gt;</i>			
<b>Rehydration</b>	50V		13Hr
<b>Run IEF</b>	Step 1(去鹽)	250V(linear)	250Vhr
	Step 2	4000V(rapid)	29750Vhr
	Step 3	500V(rapid)	∞
			Total 30K

<二維SDS-PAGE>

*for 17cm strip*

<b>Step 1</b>	0.25-0.5 W / gel	V and I to max	1 hr
<b>Step 2</b>	3-5 W / gel		1 hr
<b>Step 3</b>	12.5-15 W / gel		5 hr





































*for 7cm strip*

<b>Step 1</b>	30 V	I to max	20 min.
<b>Step 2</b>	110 V		1.5-2 hr











# 附錄十三、GeneGo Meta Core™ signaling networks legend




(a)



## Network Objects

Enzymes				Generic classes	
	Generic enzyme				Receptor ligand
KINASE		PHOSPHATASE			Transcription factor
	Generic kinase		Generic phosphatase		Protein
	Protein kinase		Protein phosphatase		Cell membrane glycoprotein
	Lipid kinase		Lipid phosphatase		Anchoring phospholipid
PHOSPHOLIPASE					Molecule
	Generic phospholipase				Inorganic ion
PROTEASE		GTPase			Reaction
	Generic protease		G-alpha		
	Metalloprotease		RAS - superfamily		
Channels/Transporters		Receptors		G protein adaptor/regulators	
	Generic channel		Generic receptor		G beta/gamma
	Ligand-gated ion channel		GPCR		Regulators (GDI, GAP, GEF)
	Voltage-gated ion channel		Receptors with enzyme activity		Heterotrimeric G-protein
	Transporter		Nuclear receptor		
Groups of objects				Adaptors/regulators	
	<b>Group of related object(s)</b> Group of objects with common properties				Generic binding protein
	<b>Protein complex</b> Group of proteins physically connected in a complex				Adaptor
	<b>User created group</b> Group of collapsed objects chosen by user				

(b)




Object highlighting	
Nodes and root nodes	
	<b>Found object</b> Object selected on the search pane
	<b>Manually selected node(s)</b> Object(s) selected by ctrl + click on it or by click + drag rectangle around it
	<b>Highlight by mouse over</b>
	<b>Highlight upstream objects</b> When the mouse is over an object (node on a network), the closest interacting nodes are highlighted in CYAN if the direction of interaction is <b>from</b> the initial object
	<b>Highlight downstream objects</b> When the mouse is over an object (node on a network), the closest interacting nodes are highlighted in yellow if the direction of interaction is <b>towards</b> the initial object
Root nodes	
	<b>Root node(s) for network expansion (building)</b> Object(s) from a user-specified uploaded list or from experiments
	<b>Initial object(s)</b> Object(s) chosen to build the pathways <b>from</b>
	<b>Intermediate object(s)</b> Object(s) situated along the pathway
	<b>Terminal object(s)</b> Object(s) the pathways terminate <b>on</b>
<b>Possible combinations of three above marks (except the first one)</b>	
	

Expression data	
	<b>Overexpressed gene(s)</b> Genes with higher conditional expression level compared to the experimental "control"
	<b>Underexpressed gene(s)</b> Genes with lower conditional expression level compare to the experimental "control"
	<b>Mixed-expressed gene(s)</b> Genes with conditional expression level statistically different from the experimental "control", with the "sign" of expression varying in different experiments















Other marks	
	<b>Red circle</b> The links terminated due to a restriction of the number of steps in network expansion. Network may be expanded from such nodes
	<b>Blue circle</b> The links terminated due to network truncation. Network may be expanded from such nodes

(c)


**Interactions between objects**

Functional interactions	
	<b>Positive effect</b>
	<b>Negative effect</b>
	<b>Unspecified effect</b>

Mechanisms	
Direct interactions	
	<b>Binding</b> Compound binds the enzyme or receptor
	<b>Cleavage</b> Cleavage of a protein at a specific site yielding distinctive peptide fragments. Proteolytic cleavage can be carried out by both enzymes and compounds
	<b>Covalent modifications</b> Protein activity regulation by covalent binding of a small chemical group to the aminoacids of an active site.
	<b>Competition</b>
	<b>Phosphorylation</b> Protein activity is altered via addition of a phosphate group
	<b>Dephosphorylation</b> Protein activity is altered via removal of a phosphate group
	<b>Transformation</b>
	<b>Transport</b>
	<b>Catalysis</b>
	<b>Transcription regulation</b>
Indirect interactions	
	<b>Influence on expression</b> Compounds change the expression level of target genes indirectly, for instance by binding to upstream receptors
	<b>Unspecified interactions</b> Mechanism is unknown
Logical relations	
	<b>Class relation</b> Object belongs to a generic group of related objects
	<b>Complex subunit</b> Active protein is a subunit of a protein complex