

編號：CCMP96-RD-022

## 研發中藥應用在狼瘡腎炎的治療

江伯倫  
國立台灣大學

### 摘 要

#### 研究目的：

全身性紅斑狼瘡是全身性自體免疫疾病的主要代表疾病，它的病徵是會產生許多自體抗體來對抗自己的組織，如紅血球、血小板、關節和腎臟等，而造成各種器官的破壞。其中最會影響到患者預後的器官便是腎臟，許多患者便是因為腎臟受到侵犯而導致慢性腎絲球腎炎，最後甚至因為腎臟衰竭和尿毒症死亡。目前應用在全身性紅斑狼瘡的治療主要是類固醇或是一些免疫抑制劑，基本上還是會造成相當嚴重的副作用。所以開發中草藥應用到全身性紅斑狼瘡的治療，一直有相當多的研究者致力於此一方面的研究。而在本研究中，我們將利用試管內培養的樹突細胞加入中藥來評估中藥是否具有治療的潛力，主要評估的標準是了解中草藥是否可以促進介白質-10的製造，而達到改善狼瘡腎炎的目的。

#### 研究方法：

我們將找出能夠誘發樹突細胞製造介白質-10的中藥物，再應用到狼瘡小鼠的治療上，以了解是否可以有效地抑制自體抗體的製造，同時也達到改善腎臟發炎的情形。因此，我們將給予中草藥經由口服或是腹腔內注射的方式來治療NZB/W F1小鼠，以了解其可能的治療效果，尤其是針對腎臟部份的病理變化。如果治療有效時，我們將進一步研究其機轉，包括血管增生的情形，和血中相關發炎性細胞激素的濃度。經由此一動物模式的建立，可以利用來研發更多種中草藥應用到全身性紅斑狼瘡治療上的應用。

#### 結果與討論：

我們篩選出靈芝多醣體PS-G，它能夠有效誘發樹突細胞製造介白質，因此將PS-G使用腹腔注射的方式對NZB/W F1小鼠進行為期七週的治療，治療結果顯示小鼠血中的抗dsDNA抗體與抗ssDNA抗體相較於控制組皆有略微下降的趨勢。此外利用蛋白尿的嚴重程度作為指標，受治療的三組小鼠皆有長期顯著減輕腎絲球腎炎的情形，並能維持較長的生命期。而我們也發現受

PS-G治療的小鼠，其周邊血中調節性T細胞之比例有顯著的升高，這可能也是疾病緩解的原因之一。基於以上的研究成果，說明了靈芝多醣體PS-G對於紅斑性狼瘡小鼠的確具有顯著的治療效果，值得進行新治療方法的開發與藥效的研究。

關鍵詞：腎炎、全身性紅斑狼瘡、中藥

Number:CCMP96-RD-022

# Study on Exploring the Therapeutic Application of Chinese Herbs with *in vitro* and *in vivo* System

Bor-Luen Chiang

National Taiwan University

## ABSTRACT

### **Aim:**

Systemic lupus erythematosus is a multi-organ autoimmune disease characterized by abnormal presence of autoantibodies against a range of self-antigens. Binding of autoantibody with its antigen will result in immune complex deposition on capillary wall of joint and kidney. The consequences may be arthritis, serositis, vasculitis, and glomerulonephritis, which is regarded as the most serious pathologic symptom of SLE. In this proposal, we like to establish an animal model of lupus for the study of Chinese traditional drugs.

### **Method:**

We use dendritic cells as the screening platform to select particular Chinese herbs which can induce the production of anti-inflammatory cytokine IL-10. In this way we suggest the polysaccharide components of *Gernoderma luciderm* (PS-G) has therapeutic potential of treating lupus. Hence we treated NZB/NZW F1 (BWF1) lupus-prone mice intraperitoneally with different dose of PS-G once a week for total 7 weeks. The effects of PS-G on the level of autoantibody against double-stranded DNA (dsDNA) or single-stranded DNA (ssDNA) in serum were detected by ELISA; the severe glomerulonephritis (GN) was determined by multistix, the renal histopathology was observed by immunofluorescence, and the change of peripheral lymphocytes subpopulation was analyzed by flow cytometry.

### **Results and Discussion:**

PS-G induces maturation of bone marrow-derived DC by enhancing the expression of DC surface markers and costimulatory molecules *in vitro*. PS-G also induce IL-10 production in dendritic cells. Administration of PS-G decreased the

level of anti-dsDNA and anti-ssDNA antibody in lupus mice. In addition, alleviation of proteinuria and prolonged life span was also noted in the mice receiving PS-G. Furthermore, we also found that the percentage of peripheral Treg cells was increased.

Thus we believe the result will provide an excellent model to study the therapeutic effect of Chinese traditional drugs on the disease development of lupus in the future.

Keywords: Nephritis, systemic lupus erythematosus, Chinese herbs

## 壹、前言

全身性紅斑狼瘡的主要致病機轉是喪失了對自體抗原的耐受性，病人的免疫系統因此會製造出多種不同的自體抗體(Tan et al 1997; Steinberg et al 1990)。這些自體抗體會辨認一些細胞內重要的組成物，包括構成遺傳物質的DNA，核小體和小核糖蛋白等。其中抗DNA抗體被認為會導致病理變化，所以在疾病的發生上扮演了相當重要的角色(Amoura et al 1994; Minota et al 1996; Mohan et al 1993; Morino et al 1995)。這些抗DNA抗體會導致腎臟的病變，甚至會造成慢性腎衰竭而使病人因為尿毒症死亡。在臨床上，目前對全身性紅斑狼瘡的治療主要是以類固醇和免疫抑制劑為主，但是這些藥物無法讓疾病完全根除，同時也具有相當高的副作用。因此，為求患者能夠在較少的副作用下得到較好的治療，此疾病需要更積極發展出更新的治療方法(Marino et al 2000)。我們研究室已在過去幾年將全身性紅斑狼瘡的T細胞抗原找出來，同時利用T細胞認識的組蛋白(histone)的peptide來進行治療，結果在紅斑性狼瘡小鼠得到相當不錯的療效(Jouanne et al 1999; Suen et al 2004)。但是，這類的療法需要針對每個患者分別找出其主要的抗原決定位，所以在實際的應用上受到限制(Harrison et al 2000; Kaliyaperumal et al 1999)。因此目前對於此疾病的新型治療方法之研究仍然十分迫切。

目前已知造成全身性紅斑狼瘡的相關基因頗為多元，曾有研究指出至少需要四個潛在基因的變異方能造成此疾病(Schur P. H., 1995)，因此應用在全身性紅斑狼瘡的動物模式也有相當多的種類，小鼠品系中包括NZBxNZW F1、NZB.bm12、MRL.lpr/lpr和NZBxSWR F1，都會自發性生成抗DNA抗體，也會因為腎臟受到侵犯而導致腎衰竭(Chiang et al 1990)。其中又以NZBxNZW (NZB/W) F1小鼠的病程最接近人類的疾病，這些小鼠大約在四個月大時會開始發展出抗DNA抗體，而且隨著年紀增加而升高。同時，會在六個月大時開始出現蛋白尿的情形，最後也會出現尿毒症而死亡。而與人類的全身性紅斑狼瘡最類似的是病徵亦主要發生在雌鼠，並且雄鼠的生命期明顯地要比雌鼠來得長。所以本研究計畫將利用NZB/W F1小鼠作為全身性紅斑狼瘡的動物模式來進行中醫藥療效的測試，以了解是否能夠開發出有效的中藥應用到狼瘡的治療。

目前對紅斑性狼瘡的致病機轉雖然還不是完全清楚，但有研究顯示在NZB/W F1小鼠可以觀察到B細胞不正常的活化現象，而導致大量自體抗體的製造(Atkinson et al 1985; Chen et al 2001; Klinman et al 1993)。但

由於造成紅斑狼瘡病變的抗體幾乎大部分都是IgG，顯示了其中也是需要T細胞的參與，才能夠使得這些自體抗體進行抗體的同型轉換(Burlingame et al 1993; Rozzo et al 1994)。進一步的研究也顯示這些參與的T細胞可能是以第二型T輔助細胞為主，所以會製造出較多的抗體(Cawley et al 1993; Chen YC et al 1997; Hahn et al 2001; Lin et al 1995)。而在疾病的後期，則是因為這些抗體造成組織的破壞，所以一些發炎性細胞激素，如IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ，也可能扮演重要角色，甚至促使B細胞產生更多的抗體。所以，目前對全身性紅斑狼瘡的研究顯示，雖然其中有遺傳的因素參與其中，但是仍然是一個多因子遺傳的形式，同時隨著疾病進展的過程會有相當多種免疫細胞參與其中(Chused et al 1987; Steinberg et al 1990; Tan et al 1997; Theofilopoulos et al 1989)。

近年來，調節性T細胞(regulatory T cells)被認為在免疫疾病的調控上扮演了一個相當重要的角色。目前已經知道體內會產生一群CD4+CD25+的T細胞，這群自然發生的T細胞可以降低其他的免疫反應，包括如器官移植、自體免疫疾病和過敏疾病等。因此，最近幾年有許多研究者都集中力量在找出一些方法或是藥物，能夠有效地誘導出這群調節性T細胞，而應用在疾病的治療上。有些調節性T細胞的確被發現是可以誘發出來，稱為第一型調節性T(Tr1)細胞。

這群細胞被發現可以分泌高量的IL-10，因此可以抑制其他免疫反應。而我們的研究也發現如果利用能夠表現高量IL-10的樹突細胞與T細胞培養後可以誘導能夠分泌IL-10的T細胞，而這群T細胞也可以分泌IL-10，因此可以抑制其他T細胞的反應。

我們在今年的研究計畫中將篩選中草藥能夠刺激分泌樹突細胞分泌介白質-10，再進一步了解這些草藥是否能夠有效地抑制自體免疫性的狼瘡發病。IL-10以往被認為是與第二型T輔助細胞的活性有關，而後來逐漸發現其活性與抗發炎有關。在許多發炎性疾病的恢復期便可以觀察到IL-10逐漸上升，顯示這些降發炎反應的細胞激素扮演著一個重要的角色。而最近幾年IL-10受到大家的重視，主要是因為在許多研究中發現調節性T細胞會分泌IL-10，所以IL-10的角色更是益發重要。目前除了自然發生的調節性T細胞外，還有另外一群T細胞被發現會分泌TGF- $\beta$ ，被稱為第三型T輔助細胞，也被發現可以抑制其他免疫細胞的反應。

因此此一研究計畫主要是建立一個系統來研發是否可以經由試管內的方式來評估中草藥，尤其是著重於這些中草藥是否能夠刺激樹突細胞分泌IL-10。由於我們初步的研究成果顯示靈芝的多醣PS-G，和雷公藤

會刺激樹突細胞製造IL-10，所以將進一步研究這兩種中草藥是否能夠在體內達到治療狼瘡小鼠的目的。同時，我們也將進一步研發其他中草藥，以了解是否有更多的藥物能夠刺激樹突細胞分泌IL-10。同時，也進一步研究這些中草藥應用到狼瘡小鼠治療有效的可能機轉。

靈芝是被廣泛使用的中藥之一，許多研究報告已指出它的療效相當廣泛，包括了抑制腫瘤增生，緩解高血壓、高血糖等等(Miyazaki et al 1981)。靈芝含有多種有效成分，如三帖類，核苷酸，而其中多醣體成分特稱為PS-G，前人研究已經證實PS-G具有增進自然殺手細胞活性，以及增強T細胞與巨噬細胞分泌細胞激素TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的效果；另外，PS-G也能防止嗜中性白血球走向細胞凋亡的命運(Lee et al 1995, Won et al 1989, Hsu et al 2002)。

而先前對於人類周邊血中樹突細胞的研究，發現PS-G可以促進抗發炎激素IL-10的產生(Lin et al, 2005)，因此我們進一步藉由狼瘡小鼠的樹突細胞平台來檢測此一現象，若PS-G同樣也能夠調節狼瘡小鼠中樹突細胞的免疫活性，則很有可能藉著樹突細胞的功能，進一步調控其他免疫細胞的活性，進而減緩紅斑性狼瘡的自體免疫現象。

## 貳、材料與方法

### 一、樹突細胞培養

小鼠犧牲後，由腿骨中取出骨髓細胞，加入生長素GM-CSF與細胞激素IL-4，培養六天後可使骨髓中的幹細胞分化成為樹突細胞，以作為篩選中藥的細胞平台。

### 二、樹突細胞表面抗原分析

分化完全的樹突細胞，利用螢光抗體標定多種表面分子之後，以流式細胞儀分析各種標記分子的表現量，以判定樹突細胞之成熟程度。

### 三、樹突細胞分泌介白質的測定

將分化完成的樹突細胞與待測藥物共同培養兩天之後，收取上清液並利用三明治型ELISA進行培養液中介白質含量的分析。

### 四、中草藥來源

靈芝的多醣體則是利用PS-G來進行研究，PS-G的成份主要為多醣，而其中所含有的蛋白質不到5%。PS-G由陽明大學李旭生教授實驗室所純化提供。

### 五、小鼠

NZB/NZW F1的雌鼠購自Jackson Lab或是台大醫學院的動物中心。這些動物被飼養於台大醫學院動物中心，以12小時輪流的方式控制其光線。在本次實驗的動物實驗部分，已經由台大醫學院的動物管理委員會審查通過。

### 六、注射治療

實驗中使用四個月大的NZB/NZW F1小鼠，共分成四組，每組九隻。實驗組小鼠分別經由腹腔注射的方式給予不同劑量的靈芝多醣體PS-G：高劑量小鼠每隻給予5mg，中劑量給予1mg，而低劑量組小鼠接受0.1mg之PS-G的注射。控制組小鼠接受PBS鹽溶液注射以作為對照。從小鼠滿17週起每週注射一次，進行為期七週的治療。而小鼠在治療過程前三週起定期經由眼窩後採血的方式取得血樣，以偵測血清中自體抗體的濃度。

### 七、自體抗體的ELISA

血清中的抗dsDNA和ssDNA抗體分別利用標準的ELISA來加以測定。簡單來說，將10 $\mu$ g/ml of mBSA (methylated BSA)覆蓋於96-well plate上靜置於4 $^{\circ}$ C隔夜再加入7.5 $\mu$ g/ml的ssDNA和dsDNA。SsDNA是將DNA加熱處理20分鐘後置於冰上20分鐘。在4 $^{\circ}$ C隔夜靜置後，會進一步利用PBST加以清洗，再於4 $^{\circ}$ C靜置隔夜。要測定抗體濃度時，將取得的血

清加到適當的well中，在37°C靜置45分鐘後再於室溫靜置10分鐘。我們也利用抗-DNA單株抗體融合瘤，10F10細胞株，來作為陽性對照。而在這些處理後我們會再加入horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse-chain-specific抗體。最後再加入顯色的2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)溶液來當成peroxidase的受質，而反應最後利用10% SDS來終止。而其中的吸光度則是利用405nm的吸光來加以分析。抗-DNAIgG的濃度是跟單株抗體10F10的ELISA units (EU/ml)來表示。由74ng/ml of 10F10單株抗體產生的OD值定義為1 EU/ml for anti-DNA IgG。

#### 八、蛋白尿

由20週開始便進行蛋白尿的測定，主要是利用multistix (Bayer, Auckland, New Zealand) on a scale of 0 to 4+, where 0/trace = negative, 1+ = 30, 2+ = 100, 3+ = 300, and 4+ = over 2000 mg/dl。蛋白尿在2+以上定義為出現嚴重的腎絲球腎炎。

#### 九、腎臟的病理切片檢查

為了進一步了解靈芝多醣體PS-G是否能夠改善狼瘡小鼠腎臟發炎的情形，我們將由小鼠身上取下的腎臟利用福馬林加以固定後，再進一步固定後進行H&E染色，以檢查腎臟組織受侵犯的情形。

此外，有部份的腎臟組織將包埋於OCT中，利用來進行冷凍切片及染色，以了解是否有抗體和補體的沈積。使用冷凍切片機將腎臟組織切成5 $\mu$ m的切片，再利用有螢光的抗小鼠IgG和C3的抗體來與組織切片一同培養，再利用螢光顯微鏡來觀察。

#### 十、利用螢光流體計數儀來分析免疫細胞的數目

我們進一步以螢光流體計數儀來分析小鼠血中調節性T細胞的數目，以了解經過注射PS-G的治療是否會改變小鼠體內的免疫細胞數目，而進一步影響到病情。

## 參、結果

### 一、樹突細胞篩選平台：

型態：在光學顯微鏡下可觀察到分化完全的樹突細胞在給予裂殖素刺激之後，呈現典型多觸角之型態，聚集成群，且在給予刺激之後可觀察到逐漸增生的現象（圖1）。

表面抗原分析：利用螢光抗體標定樹突細胞表面分子之後，以流式細胞儀分析可知，培養八天之後的樹突細胞具有特定表面分子CD11c，DEC205，及33D1，且加入靈芝多醣體PS-G培養之後，樹突細胞表現CD11C和33D1之量比起LPS組更高（PS-G組平均螢光強度MFI之值46.96及55.14，對比於LPS組之值分別為35.32及43.16）。而代表抗原呈現能力的MHCII，B7.1，B7.2也有高度表現量（PS-G組平均螢光強度分別為993.23，412.69，117.53，對照組分別為852.08，150.73，77.68，相比之下有顯著增高）。這些特徵顯示其為功能成熟的樹突細胞（圖2）。

### 二、靈芝多醣體PS-G增進樹突細胞分泌介白質-10：

將樹突細胞與靈芝多醣體PS-G共同培養之後發現，PS-G可以增進樹突細胞分泌介白質-10的能力。由圖三數據可知，對照組或是以LPS刺激的樹突細胞其分泌介白質-10的量在2000pg/ml以下，但加入25ug的PS-G的樹突細胞其介白質-10分泌量上升到13,000 pg/ml。且加入越高量的PS-G，此一效應越為明顯，至加入PS-G 100ug時，介白質分泌量已達24,000 ug/ml，是對照組的12倍。所有加入PS-G之組別與對照組相比，皆具有統計上的顯著差異（圖3）。

### 三、以靈芝多醣體PS-G治療狼瘡小鼠：

(一) 小鼠體內抗DNA抗體的濃度：NZB/W F1的小鼠其抗DNA抗體會隨著其年紀的增加而逐漸升高，從十八周起持續的監測可見此趨勢（圖4左），這些NZB/W F1小鼠從第十七周起接受每週一次腹腔內注射的PS-G，共持續七週。隔周採血後測得血清中自體抗體濃度以ELISA分析之結果顯示，經過PS-G治療的三組小鼠，血中的抗dsDNA抗體平均值皆有下降情形，且以高劑量組別最為顯著，中劑量次之（第十八周、二十周、二十六周）；到疾病後期逐漸變

為中劑量組下降最多（第二十八周、三十周）。抗ssDNA抗體的上升情形要到二十三周之後才逐漸明顯（圖4右），抗體濃度平均值亦有下降情形：在第二十三周時高劑量組別之降低最為顯著，中劑量次之；到疾病後期逐漸變為中劑量組下降最多（第二十六周、二十八周、三十周）。不過由於個體間差異過大，此一下降趨勢並未能達到統計上的顯著差異。（圖4）。

- (二) 狼瘡小鼠的蛋白尿與存活率：狼瘡小鼠產生蛋白尿的程度在三組治療組小鼠身上都有明顯的減輕。且給予PS-G的劑量愈高，此減緩情形愈顯著，由圖五數據可知，若以50%小鼠皆發生嚴重蛋白尿的時間點作為指標，則高劑量組治療小鼠可延後此現象達九周之久。PS-G高、中、低劑量分別與對照組相比皆有顯著差異( $P=0.0144$ 、 $0.026$ 、 $0.0218$ )，且持續達五個月（圖5）。同時，給予靈芝多醣體PS-G治療的小鼠其存活率也較長：若以50%小鼠死亡時間點作為存活率之比較基準點，則以靈芝多醣體PS-G治療之後平均可延長小鼠壽命10-15周（見圖6，低劑量組：10周、中劑量組：13.5周、高劑量組：15周），其中高劑量與中劑量的延長程度分別與控制組相比，也具有統計上的顯著差異（高劑量組： $P=0.0135$ 、中劑量組： $P=0.0285$ ）。
- (三) 狼瘡小鼠的腎臟病理變化：接受靈芝多醣體PS-G治療的小鼠，其腎臟利用螢光的檢查仍可偵測到抗體及補體的沉積。補體C3（圖7A）與免疫複合物沉積（圖7B）在腎絲球內的沉積情形，在中劑量、低劑量治療組小鼠，與控制組小鼠皆可被觀察到（圖7A、B之綠色部分）。
- (四) 周邊血液的調節性T細胞分析：為了解靈芝多醣體PS-G是否會影響到這些狼瘡小鼠的免疫細胞，我們定期採取血樣以分析小鼠血中的免疫細胞數目。而結果顯示在接受治療的狼瘡小鼠之血樣，其中調節性T細胞在血中T淋巴球所佔的比例有明顯而漸次地升高（以第十四周做為基準點，分別比較第二十周、二十七周、和第三十四周，有逐漸上升的趨勢），及至第三十四周時所有經過PS-G治療的小鼠組別皆已額外增加3%以上，但對照組小鼠幾無增加（圖8）。

由這些研究結果顯示，接受PS-G治療的小鼠的確可以觀察到狼瘡病情改善，顯示靈芝多醣體PS-G的確有治療的效果。而我們的研究成果也顯示了利用樹突細胞篩選中藥的方式的確可以有具體的成效。

## 肆、討論

在此一研究計畫中我們利用靈芝多醣體PS-G來進行狼瘡小鼠的治療，在會引起狼瘡的NZB/W F1小鼠利用腹腔內注射的方式給予靈芝多醣體PS-G，結果發現靈芝多醣體PS-G可以有效地降低自體抗體的濃度，而且可以有效地減輕蛋白尿，並延長小鼠的生命期。同時，我們也進一步研究疾病減緩的可能機轉，發現在小鼠體內的調節性T細胞會明顯地增加。由於調節性T細胞能夠抑制一些特定免疫細胞的功能並防止其增生，因此可能靈芝多醣體PS-G藉由增進調節性T細胞的數量，造成對於免疫細胞功能的抑制，而達到改善自體免疫反應的效果。

## 伍、結論與建議

本研究計畫以樹突細胞為中草藥篩選平台，針對多種中草藥進行測試，得到潛力藥物PS-G，而應用在小鼠狼瘡模式顯示其對於紅斑性狼瘡的確具有顯著療效。以此研究成果在未來可以進一步研究其他中草藥之功效，如雷公藤、靈芝三帖類、樟芝萃取物等等。而未來針對靈芝多醣體PS-G如何達到減緩疾病徵狀的詳細機制仍有許多細節值得研究，待其機轉完全明朗之後，也相當有機會研發出新型療法應用到臨床治療上。

## 誌謝

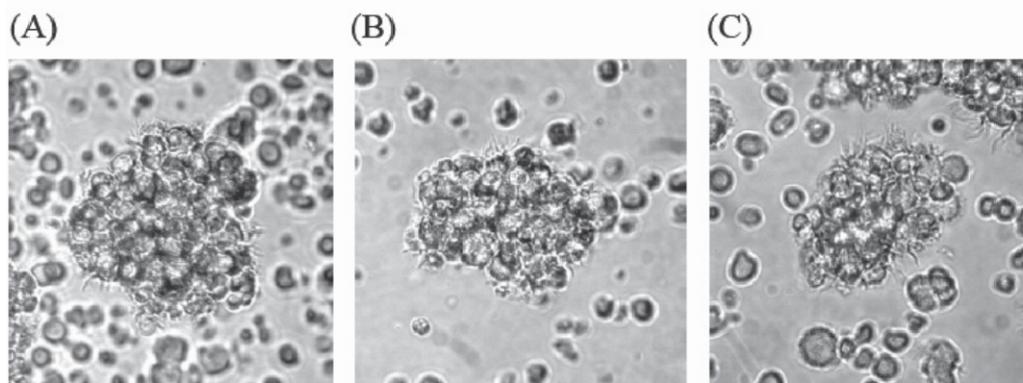
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號CCMP96-RD-022提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

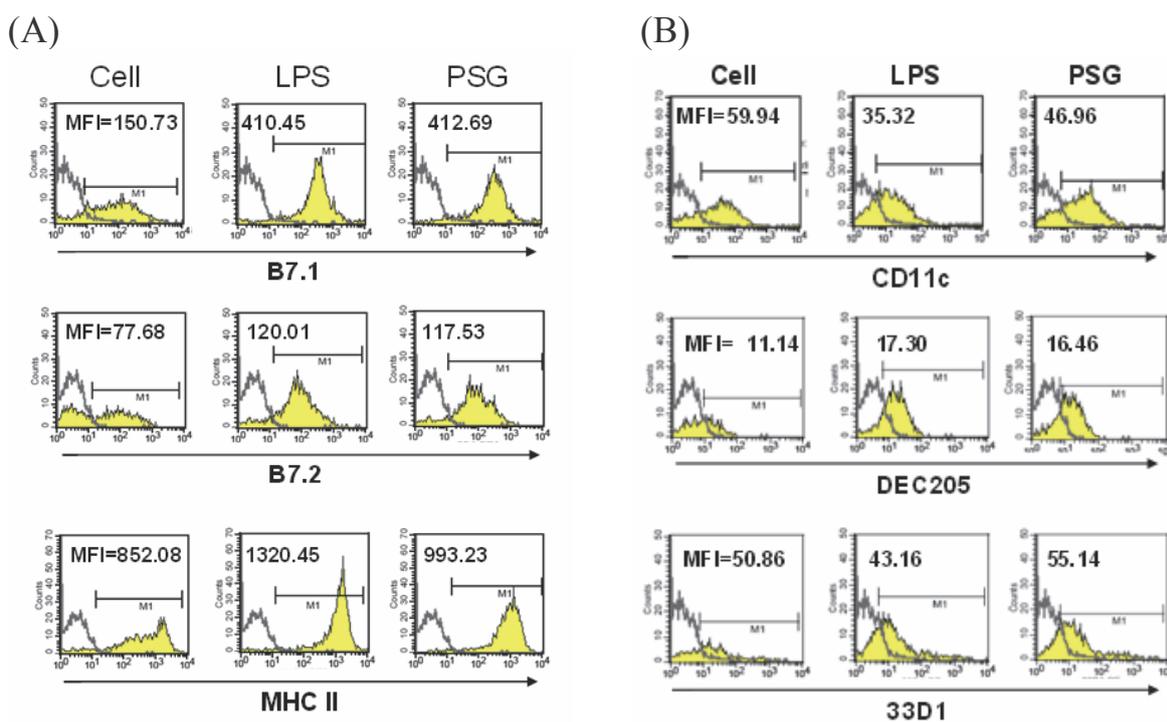
1. Robson MG, Walport MJ. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Allergy* 2001; 31(5): 678-85.
2. Singh RR. SLE: translating lessons from model systems to human disease. *Trends Immunol* 2005; 26(11): 572-9.
3. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. A disease with a complex pathogenesis. *Lancet* 2001; 358 Suppl: S65.
4. Kotzin BL. Systemic lupus erythematosus. *Cell* 1996; 85(3): 303-6.
5. Munoz LE, Gaip1 US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, et al. SLE-a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(9): 1101-7.
6. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003; 56(7): 481-90.
7. Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995; 4: 425-437.
8. Miyazaki T, Nishijima M. Studies on fungal polysaccharides, XXVII. Structural examination of a water-soluble, anti-tumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1981; 29: 3611-6.
9. Lee SS, Wei YH, Chen CF, Wang SY, Chen KY. Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*. *J. Chin. Med.* 1995; 6: 1-12.
10. Won SJ., Lee SS., Ke YH., Lin MT. Enhancement of splenic NK cytotoxic activity by extracts of *Ganoderma lucidum* mycelium in mice. *J. Biomed. Lab. Sci.* 1989; 2: 201-213.
11. Hsu MJ, Lee SS, Lin WW. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72: 207-216.
12. Lin YL, Liang YC, Lee SS, Chiang BL. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and the p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Leucoc. Biol.* 2005; 78: 533-543.
13. Suen JL, Chuang YH, Tsai BY, Yau PM, Chiang BL. Treatment of murine lupus using nucleosomal T cell epitopes identified by bone marrow-derived dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2004; 50(10): 3250-9.
14. Dubois EL HR, Demopoulos HB, Teplitz R. NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus. *JAMA* 1966; 195(4): 285-289.
15. Fu CL, Ye YL, Lee YL, Chiang BL. Effects of overexpression of IL-10, IL-12,

- TGF-beta and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. *Respir Res* 2006; 7(1): 72.
16. Suen JL, Chuang YH, Chiang BL. In vivo tolerance breakdown with dendritic cells pulsed with U1A protein in non-autoimmune mice: the induction of a high level of autoantibodies but not renal pathological changes. *Immunology* 2002; 106(3): 326-35.
  17. Lin LC, Chen YC, Chou CC, Hsieh KH, Chiang BL. Dysregulation of T helper cell cytokines in autoimmune prone NZB x NZW F1 mice. *Scand J Immunol* 1995; 42(4): 466-72.
  18. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2): 205-12.
  19. Looney RJ, Anolik J, Sanz I. New therapies for systemic lupus erythematosus: cellular targets. *Rheum Dis Clin North Am* 2006; 32(1): 201-15, xi.
  20. Wu WM, Lin BF, Su YC, Suen JL, Chiang BL. Tamoxifen decreases renal inflammation and alleviates disease severity in autoimmune NZB/W F1 mice. *Scand J Immunol* 2000; 52(4): 393-400.
  21. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 338-44.
  22. Ye YL, Suen JL, Chen YY, Chiang BL. Phenotypic and functional analysis of activated B cells of autoimmune NZB x NZW F1 mice. *Scand J Immunol* 1998; 47(2): 122-6.
  23. Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 1992; 175(5): 1213-20.
  24. Mihara M, Takagi N, Takeda Y, Ohsugi Y. IL-6 receptor blockage inhibits the onset of autoimmune kidney disease in NZB/W F1 mice. *Clin Exp Immunol* 1998; 112(3): 397-402.

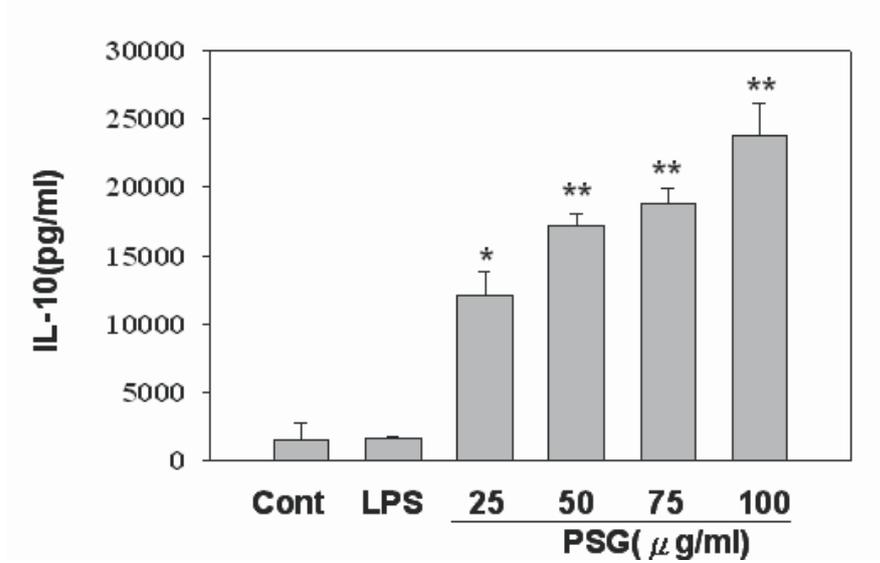
## 柒、圖、表



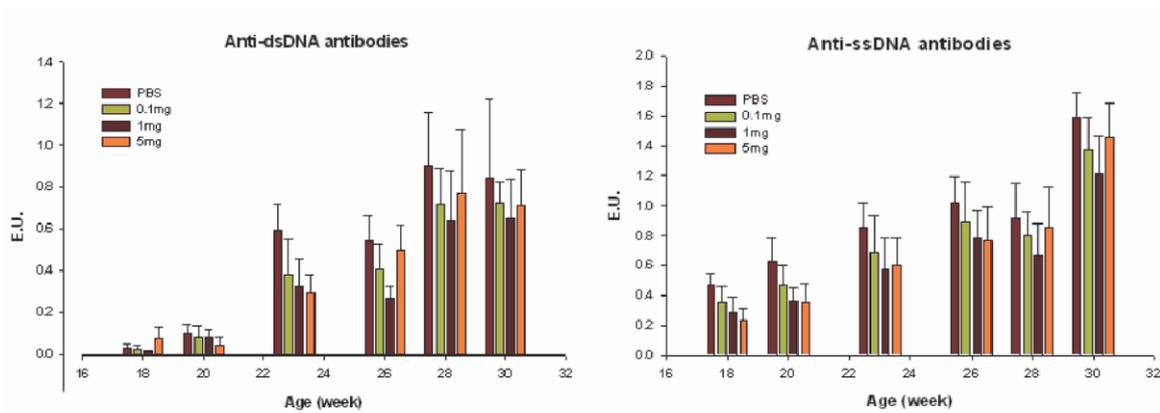
圖一 樹突細胞在不同藥物處理後之型態。(A)未受處理之型態，(B)以PS-G處理，(C)以LPS處理。



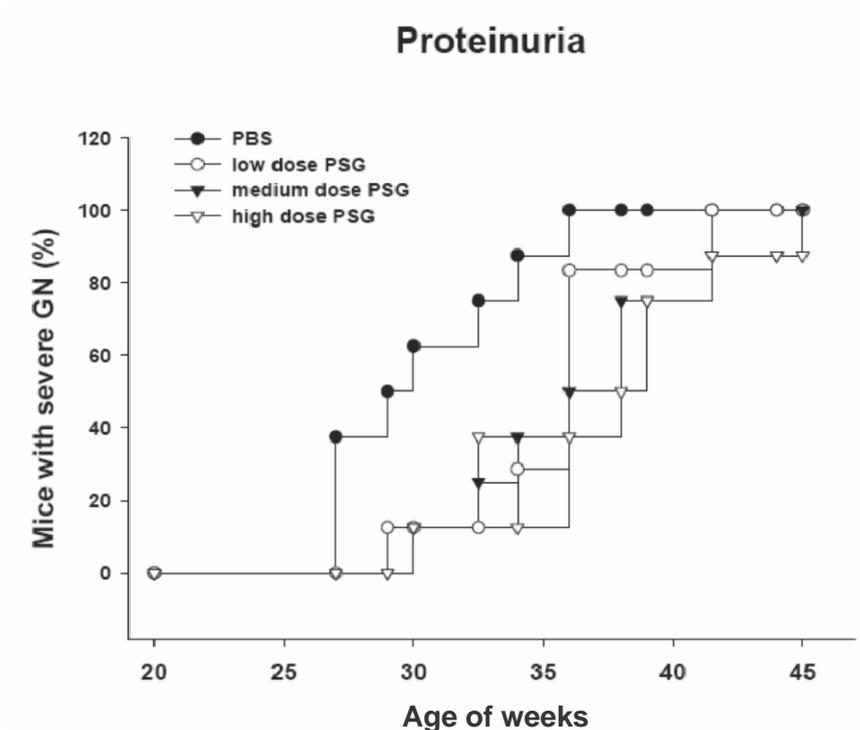
圖二 樹突細胞表面分子表現。(A)抗原呈現能力相關之分子標記，(B)樹突細胞特定表面分子，樹突細胞對於此兩類分子的表現量，在加入PS-G或LPS之後皆有明顯的上昇情形。



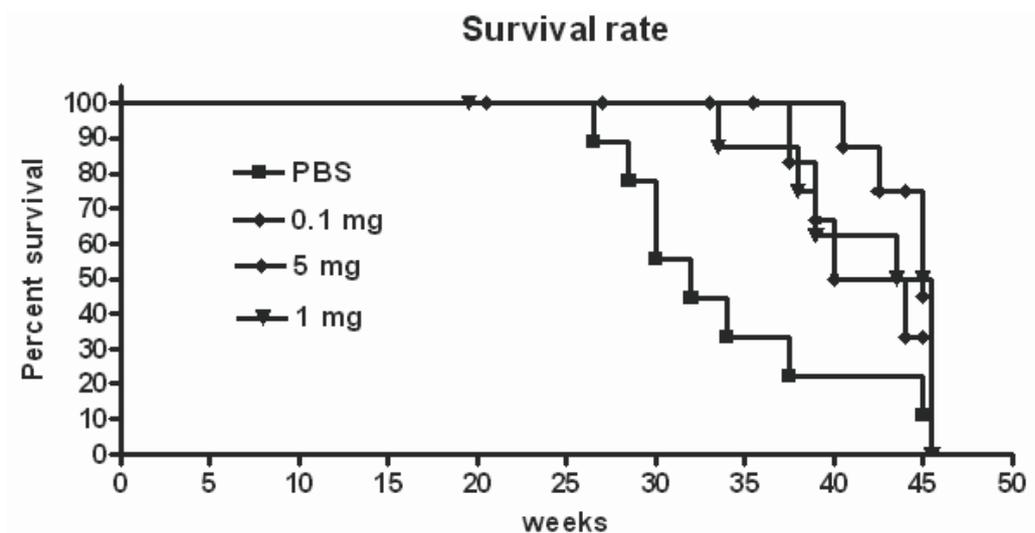
圖三 PS-G引發狼瘡小鼠樹突細胞分泌介白質-10。



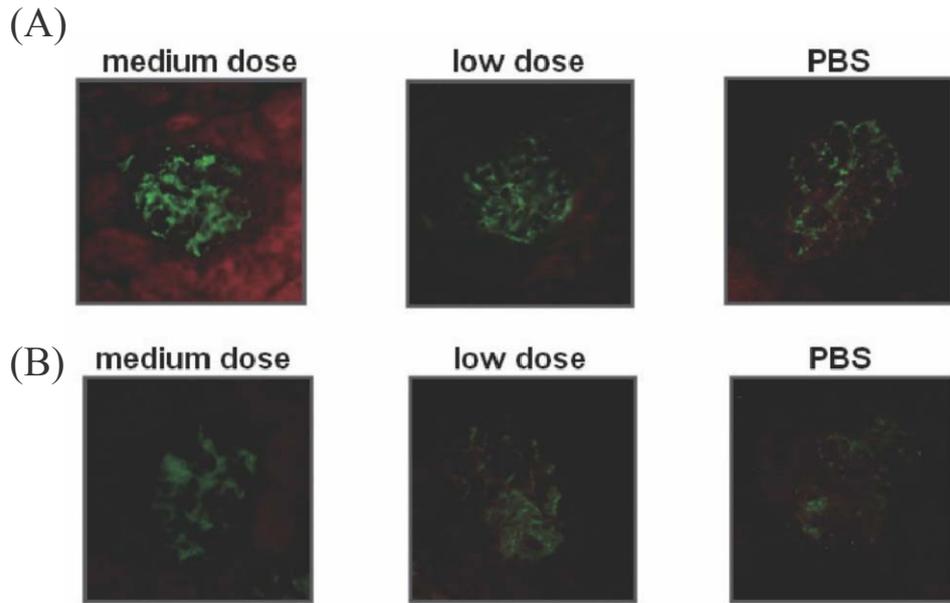
圖四 PS-G治療狼瘡小鼠過程中，小鼠周邊血所含抗DNA抗體之監測。由圖中可見治療組小鼠的抗體濃度平均值略為下降。



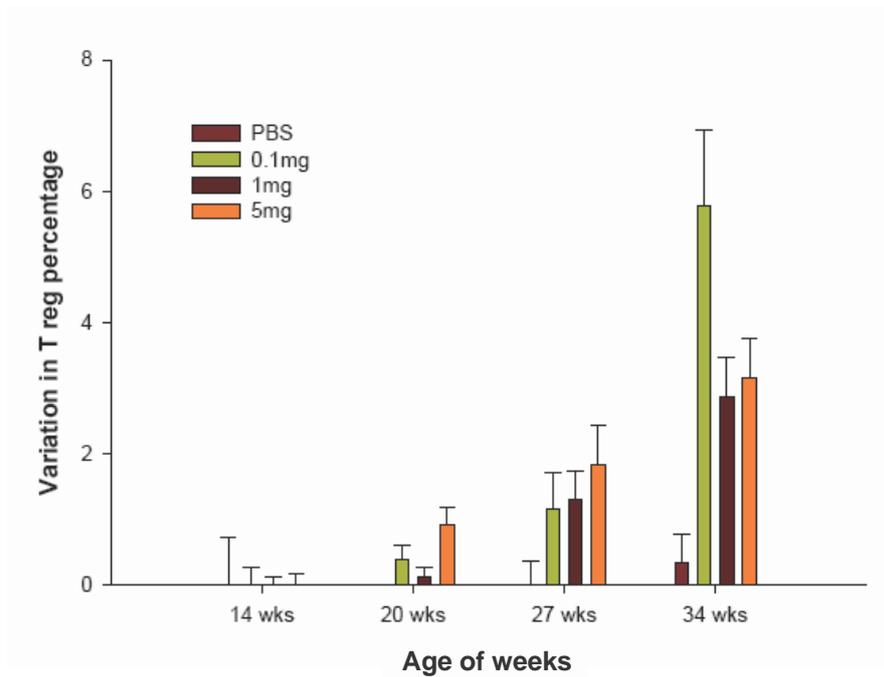
圖五 PS-G 治療狼瘡小鼠之蛋白尿情形。三組不同劑量治療的小鼠皆出現蛋白尿症狀減輕的現象，且具有統計上之顯著差異 ( $p=0.0122, 0.0260, 0.0218$  對應於高、中、低劑量組)。



圖六 經PS-G治療的狼瘡小鼠具有較長之生命期。其中尤以高劑量和中劑量治療組小鼠與對照組相比，具有統計上之顯著差異 ( $p=0.0135, 0.0285$ )。



圖七 狼瘡小鼠之腎臟病理切片，以螢光染劑檢測補體C3（圖七A）與免疫複合物沉積（圖七B）在腎絲球內的情形。



圖八 受治療小鼠其周邊血中調節性T細胞的比例。經由PS-G注射治療之後，小鼠血中調節性T細胞的比例與14週時相比皆有明顯之升高情形。

