

編號：CCMP93-RD-009

探討靈芝免疫調節功能蛋白抑制終端酶活性進而限制肺癌細胞生長機制

柯俊良

中山醫學大學

摘 要

靈芝一直以來被視為傳統中藥的翹楚，在細胞和動物實驗證實靈芝具有保護肝臟、抗腫瘤等功能。腫瘤的治療一直是生物醫學領域相當被重視的焦點，尤其近年來許多學者著重於促進腫瘤細胞死亡來達到減緩腫瘤形成的目的。由 Hanahan 和 Weinberg 等人指出癌症形成的六大特徵其中擁有無限次複製能力是癌化過程中必備的條件 (Hanahan and Weinberg, 2000)，所以終端酶在癌化過程中扮演著不可或缺的角色。最近有文獻指出在裸鼠模式中發現服用茶多酚類化合物 epigallocatechin gallate (EGCG) 後會明顯抑制腫瘤生長及染色體終端酶活性 (Naasani et al, 2003)，因此增加中草藥對於抗癌方面的科學證據。綜合以上觀點本計畫著重於 FIP-gts 抑制終端酶活性作用機制進而抑制癌細胞的生長，達到抗癌的作用。我們初步實驗證實松杉靈芝蛋白 (FIP-gts) 會造成 A549 肺癌細胞皺縮並抑制細胞生長，然而對人類正常肺纖維母細胞 MRC-5 毫無影響。接著進一步分析是否有抗腫瘤的特性，首先以染色體終端酶重覆增幅步驟 (Telomeric Repeat Amplification Protocol, TRAP assay) 分析有無處理 FIP-gts 後肺癌細胞細胞株 A549 終端酶活性表現，結果發現隨著 FIP-gts 濃度增加其活性減少呈現劑量關係，以半定量和定量 RT-PCR 分析結果發現 hTERT mRNA 隨著 FIP-gts 濃度增加而減少轉錄表現量，接著以 luciferase 活性分析，結果發現隨著 FIP-gts 濃度增加而減少 hTERT promoter 活性。接著並將其構築完成的 hTERT-pGL3 在經一系列的缺失短小突變決定其 FIP-gts 所影響的位置，結果發現在 -196 to -177 的區域為 E-box site，主要是 bHLHZ 蛋白家族所結合的區域，其中 c-Myc 為轉錄因子會直接影響 htert 轉錄活化。然而我們發現重組 FIP-gts 並不會影響 c-Myc 蛋白的表現量但會降低磷酸化的表現。而

我們利用 EMSA 證實 c-Myc 蛋白明顯降低與 E-box 結合能力。本實驗研究結果證實松杉靈芝菌絲體中純化的免疫調節功能蛋白具有抗癌的功效。此免疫調節蛋白可應用於抑制肺癌細胞的終端酶活性。所以將來有發展出治療或搭配其他抗癌藥物一起處理抵抗腫瘤並減少腫瘤細胞的再復發。

關鍵詞：松杉靈芝、免疫調節蛋白、染色體終端酶

Number: CCMP93-RD-009

Blocking Telomerase by Fungal Immunomodulatory Protein, FIP-*gts*, from Ganoderma Tsugae is a Major Mechanism for Limiting the Growth of Human Lung Cancer Cells

Jiunn-Liang Ko

Chung Shan Medical University

ABSTRACT

Telomerase expression is the hallmark of tumor cells in which this ribonucleoprotein complex activation may therefore be a rate-limiting or critical step in cellular immortalization and oncogenesis. Fungal immunomodulatory proteins, FIP-*gts*, were found in *Ganoderma tsugae*. The protein has been implicated which activates human peripheral blood mononuclear cells. However, the effect of FIP-*gts* in cancer cells has not clearly been described. In the present study, we expressed and purified the recombinant fungal immunomodulatory protein (reFIP-*gts*) in *E.coli*. First, treatment of A549 cells with reFIP-*gts* significantly inhibited their growth but not affect in MRC-5, which is human normal lung fibroblast. We demonstrate that reFIP-*gts* suppressed telomerase activity in a concentration-dependent manner. Repression of telomerase activity preceded a decrease in expression of the telomerase catalytic subunit (hTERT) and at the mRNA level, suggesting that the reFIP-*gts* decrease in telomerase activity may be regulated telomerase subunit transcription. These results were also confirmed by transient transfections of A549 cells with pGL3-Basic plasmid

constructs containing the functional hTERT promoter sequences cloned upstream of a luciferase reporter gene with reFIP-*gts*. Further analysis by luciferase assays using a series of constructs containing unidirectionally deleted fragments revealed that a 19-bp region (-196 to -177) was show clearly the FIP-*gts* transrepresses the hTERT promoter through an E-box located downstream of the hTERT transcription initiation site. Finally, electrophoretic mobility shift assays demonstrated that the binding activity of c-Myc transcriptional factor to the E-box sequence on the hTERT promoter was inhibited in response to reFIP-*gts*. These results show that FIP-*gts* could suppress telomerase activity and inhibited by transcriptional regulation of hTERT via a c-Myc responsive element-dependent mechanism. Our findings provide new insights into both the anticancer function of FIP-*gts* and the regulation of hTERT/telomerase expression, will be a very promising a chemopreventive agent candidate.

Keywords : *Ganoderma tsugae*, immunomodulatory proteins, telomerase

壹、前言

癌症起因是由於細胞的多重基因發生突變或缺失以及細胞不正常增殖的表現，導致其 DNA 複製及細胞週期脫離正常軌道。在突變過程中往往促使與抑制癌症相關基因受損。從細胞遺傳學的觀點認為上皮細胞增生或癌化可區分為兩大類型：第一類型主要以 Microsatellite instability neoplasias 為主（簡稱 MIN），但它大部分仍保有正常染色體型態，第二類主要以 Chromosomal instability neoplasias（簡稱 CIN）（Lengauer, et al., 1998）。MIN 的分子機制已較清楚的了解與 DNA mismatch repair 缺陷有關。然而對於 CIN 的發生雖然有些報導指出與有絲分裂關卡（mitotic checkpoint）受損有關、非同源性末端結合（nonhomologous end-joining）和 DNA 複製能力喪失可能有關，更指出增加氧化性傷害與染色體中終端序列（telomere）受損及 CIN 的形成有關，但主要造成 CIN 的分子機制仍未明瞭。而大多數人類癌症患者的基因體多屬於 CIN 形式，因此許多相關研究皆努力朝向為何及如何導致基因體不穩定的機制研究。

一、染色體穩定與終端序列及細胞衰老關係

染色體終端序列（telomere），含有簡單重複（tandom repeat）DNA 序列，主要位於染色體的兩端，扮演著穩定 DNA 結構及避免染色體遭受到破壞或不正常重組現象，與維持染色體的完整及穩定性有關（Blackburn et al., 1991）。哺乳類及人類其染色體終端序列都是由 5'-TTAGGG-3' 所構成，其全長為 15Kb（Greider et al., 1996）。一般真核生物的染色體 DNA 呈現直線狀，當 DNA 在進行半保留方式複製（semiconservative replication）時，引子合成酵素（primase）會先製造引子（primer）黏附在親代帶染色體 DNA 上，然後 DNA 聚合酵素 III 就會複製出子代股（daughter strand）複製完畢之後，另外一個 DNA 聚合酵素 I 會將引子移走，連接酵素（ligase）將縫隙（gap）補滿。但卻無法將子代股的 5' 端填滿因而產生染色體終端複製問題（end replication problem）而留下缺口。所以細胞在每次分裂時其染色體終端大約會減少 50-60bp，如此一來經過 100 次細胞分裂之後終端序列便會逐漸消失，細胞便會衰老（senescence）或死亡（Wynford et al., 1997）。這現象可由纖維母細胞（fibroblast）的體外（In vitro）實驗結果證實，即染色體終端長度與細胞分裂次數有很大關連性（Harley et al., 1990）。然而生殖細胞情形有別於體細胞，例如卵母

細胞或精母細胞，其染色體終端長度並不會隨著細胞分裂以及年齡的增加而有顯著的減短。研究發現這情形主要是因 germ line 組織的終端酵素 (telomerase) 呈現活化的狀態，使得能維持終端序列的一定長度，而不受染色體複製問題影響變短 (Counter et al., 1992)。然而終端酵素的活化是否與防止染色體終端序列的縮短有關，並且在維持染色體完整性或細胞老化及腫瘤的形成上扮演何種角色。

二、終端酶結構與其活性表現

染色體終端酶 (telomerase) 是一種核糖核蛋白酵素，屬於特殊的 DNA 聚合酶，過去的研究發現，終端酶與很多癌症的激發或形成有密切關係，其原來的機制是用來產生和支持真核細胞的染色體終端 DNA (Biessmann et al., 1992)。染色體終端酶主要由三個次單元 (subunit) 所構成：

- (一) telomerase RNA：簡稱 h.TR，位於第 3 對染色體 3q21-q28，主要當作複製模版，含有重複的 11 個核苷酸 5'-CUAACCCUAAC-3' 序列，此序列會與染色體終端 (TTAGGG) 互補。先前研究 germ line 組織與腫瘤細胞會比正常細胞及組織更容易表現出 telomerase RNA 次單元。在人類細胞株終端酶的複製模版發生突變通常會影響到本身活性的表現。1995 年 Feng 利用基因選殖方式 (cloning) 將選殖出來 telomerase RNA 與 (anti-sence) 反股 telomerase RNA 序列共同轉染至人類子宮頸癌 (HeLa) 細胞株，結果發現會導致染色體終端序列縮短，以及產生細胞死亡情形 (Feng et al., 1995)。
- (二) telomerase associated protein：簡稱 h.TP，位於第 14 對染色體 14q11.2，早期是在單細胞纖毛蟲發現，其分子量分別為 80 及 95 kDa (P80 & P95)。P80 主要功能是與 telomerase RNA 鍵結與終端酶有相互關連性，另一個 P95 主要是鍵結在終端序列上，可能與穩定終端酶結構有關 (Harrington et al., 1997)。但 h.TP 其調控終端酶機制並不清楚，在 1996 年 Autexier 認為 telomerase associate protein 並不是影響染色體終端酶活性的重要次單元 (Autexier et al., 1996)。
- (三) telomerase catalytic subunit：簡稱 h.TERT，位於第 5 對染色體 5p15.33，最早從原生動物所分離純化，其分子量為 123 kDa (P123)，以及在釀酒酵母菌中發現，簡稱 EST2 反轉錄酵素。

此外 Lingner 進行把釀酒酵母菌中的 EST2 移除的實驗中發現會導致終端序列縮短或細胞衰老。並且指出此次單元可能與延長終端序列有關，是催化終端酶活性的速率決定步驟 (Linger et al., 1997)。終端酶是 RNA 與蛋白質的複合酵素，其 RNA 模版會與染色體終端序列呈互補 (complementary) 關係，因此以 RNA 為模版時，在反轉錄酵素次單元催化作用之下，終端酵素可製造一段相同於終端的 DNA 連接在染色體 3' 端，使染色體不會因複製問題而縮短，使細胞具有無限分化能力 (Harley 1990, Counter 1992)。染色體終端酶會在缺失的終端序列增補 DNA，發生一連串的 DNA 複製與細胞分裂機制中 (Watson, 1972; Olovnikov, 1973)，其活性表現可能與惡性腫瘤形成及轉移性質有著密切關係 (Broccoli, et al., 1995)。一般正常體細胞是無法偵測到終端酶活性，但例外情形見於胚細胞、造血原細胞、淋巴球及表皮角質化細胞四種 (Broccoli et al., 1995)。

三、染色體終端酶與細胞腫瘤之間關係

有些學者認為，染色體終端酶的缺乏與人類體細胞的增生能力的減少有關，並且指出正常細胞之分裂能力有一定限制係由於染色體終端序列逐漸縮短的緣故 (Harley et al., 1990)。一個正常細胞其染色體終端序列長度會隨著細胞分裂次數增多而減短，以致無法一直增殖下去，但是腫瘤細胞較易渡過衰老死亡的危機期，可能是此時例如致癌基因 (myc) 激活終端酶活性表現，以修補或提供維持終端序列的長度。因此在癌症的形成過程當中，可能需要終端酶的活性來幫助細胞不斷分裂。染色體終端變短可視為是一種抑制腫瘤的機制。抑制終端酶活性表現可使細胞在分裂過程中漸漸失去染色體終端 DNA 片段，而延緩腫瘤的生長，甚至在造成細胞損傷之前死亡。癌細胞若能製造終端酵素的話，則便能維持染色體終端長度，細胞便可能會無限期的分裂與增生下去 (Greider & Blackburn 1996)。在正常的情況下，染色體終端酶的表現並非為所有器官及細胞的特徵，僅限於具有修補能力而能持續增生的體組織或細胞。在一般老鼠細胞的終端序列長度要比人類細胞的終端序列來得長，在老鼠的許多體細胞也常可偵測到終端酶的活性，且終端序列並沒有縮短現象 (Kipling & Cooke 1990)。然而在基因轉殖鼠 (transgenic mice) 的動物實驗中，發現終端酶是在癌化過程末期才出現的，而且並非百分之百的惡性腫瘤皆有終端酵素活性 (Blasco et al., 1996)，在基因移除老鼠 (knock out mice) 的

實驗中，卻意外發現移除了終端酵素 RNA 組成分 (mTR^{-/-}) 的老鼠，細胞內雖然沒有終端酶活性，但卻可存活達六代，而且仍然有培養成為不死細胞株的能力，也可以被病毒致癌基因轉型，並可在裸鼠 (nude mice) 身上產生腫瘤 (Blasco et al., 1997)。但在第五，第六代基因移除鼠 (mTR^{-/-})，其體內細胞汰換率 (turn over rate) 高的器官組織 (highly proliferative organ) 如骨髓，肝臟以及生殖器官 (如睪丸) 的細胞增殖能力都有下降的情形，因此終端酵素活性及維持終端序列長度的能力在這些細胞汰換率高的器官中，長期是相當重要。據推測，在正常老鼠細胞中，終端酵素的的存在可以反映出其容易不死的特性 (Prowse & Greider 1995)。染色體終端酶首先在人類癌症細胞中發現是在 1994 年，由 Counter 在卵巢癌中細胞發現。而在同年 Kim 也發現終端酶活性與人類癌症有關連性，他們在 101 例來自 12 種不同癌組織的檢體中，發現有 90 例可測出終端酵素活性，然而 50 例正常組織的對照組都沒有終端酵素活性存在。此外，在 100 例不死亡的細胞株中，也有 98 株具有終端酵素活性表現 (Kim et al., 1994)。之後陸續在這幾年的研究發現許多人類的腫瘤組織都可以偵測到終端酶活性，例如：胃癌 (Hiyama et al, 1995)、子宮頸癌、卵巢癌 (Kyo et al, 1996)、腦癌 (Counter et al, 1994)、前列腺癌 (Sommerfeld et al, 1996)、膀胱癌 (Lin et al, 1996)、急性骨髓性白血病 (Tenen et al, 1997)、乳癌 (Bednarek et al, 1997)、胰臟癌 (Hiyama et al, 1997)、肝癌 (Tahara et al, 1995)、尿道癌 (Ito et al, 1998)、結腸癌 (Hiyama et al, 1996)。此外腦膜瘤 (meningiomas) 雖然只有 50% 偵測到終端酵素活性，但其中高達 95% 在組織病理上確定為惡性腫瘤，顯示染色體終端酵素活性在這類癌症當中，為很好的預後指標 (Langford et al, 1997)。在人類 gliomas 的腫瘤分析中，抑癌基因 p53、pRb、PTEN、p16 (INK4a) 及 p14 (ARF) 缺失或減少，其 telomerase、EGFR 及 CDK4 則過量表現，且這類 telomerase 活性高的病人的預後也相當差 (Chakravarti A, et al., 2001)。至於肺癌組織染色體終端酶活性的研究上，較早由 Kim 等人報告在 18 例肺癌組織發現 18 例皆有此酵素活性，而正常 3 例組織無此活性 (Kim et al., 1994)。此外在 1995 年 Hiyama 分析 136 例肺癌病人組織終端酵素活性，結果發現在 125 例非小細胞肺癌 (NSCLC 即 non-small-cell lung cancer) 中有 98 例具有活性反應，其中腺癌佔了 45 例，鱗狀上皮細胞癌佔 46 例。此外 11 例小細胞肺癌 (SCLC 即 small-cell lung cancer) 均有活性表現。作者認為偵測染色體終端酶可當作診斷肺癌的生物指標 (Hiyama et al 1995)。

此外也有用支氣管沖出液來分析肺癌終端酵素活性 (Yahata et al, 1998)。之後在 1996 與 1999 年陸續有學者使用 TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) 染色體終端酶重覆增幅步驟分析法檢測肺癌，其結果是約有 70-80% 的肺癌具有染色體終端酵素活性表現，而在腫瘤附近的正常組織比較少被偵測到 (Hirashima et al, 1998, Marchetti et al, 1999)。

四、發展抑制終端酶活性策略

在許多癌症中可偵測到終端酶活性，而除了幹細胞、淋巴球、角質細胞及造血原細胞外，而一般正常組織及細胞中通常偵測不到此酵素活性。更進一步指出在 NSCLC 病人其終端酶活性與高度的細胞增殖速率及惡化程度有關。因此推測終端酶活性是肺癌其中一重要的預後因子，特別是終端酶活性低的其預後表現較佳。所以終端酶的活性控制可能是發展新型治療癌症策略的主要標的之一。而一般終端酶調控已非常清楚，特別是 *tert* (telomerase reverse transcriptase subunit) 的 mRNA 在腫瘤組織表現很高而正常組織表現特別低，而 hTR 及 hTEP 則不論在正常體組織或腫瘤組織其表現量皆一致。而將 *tert* 基因轉殖進入不會表現終端酶活性的細胞株，則足以表現出其酵素活性。因此，推測 *htert* 的轉錄活化可能是主要調控終端酶的決定步驟。

最近在 *tert* 的啟動子 (promoter) 區位以被選殖並定序出來，而影響其啟動子活性包括其 promoter 的序列具有高度的 GC 含量，且部分被甲基化，並影響其活性。另一主要影響啟動子活性主要原因是啟動子上有許多轉錄因子結合區位，包含 SP1、AP2 及 *c-myc* 等轉錄因子被確認與其調控有關。有些研究指出 *c-myc* 直接影響 *htert* 轉錄活化較重要 (Rachid D., et al., 2001)，進而增加啟動子活性，另有些研究報告在許多癌症細胞株中，說明了 *c-myc* 及 SP1 的結合具有協同增加 *htert* 等活性。也有許多研究針對細胞因子特別是抑癌基因如 p53、Rb (Johnson-Pais, T., et al., 2001) 及 protein phosphatase 2A 或訊息傳遞因子 AKT (Kang, S. S., et al., 1999) 等在不同癌症中，不管直接或間接抑制 telomerase 活性，然而在肺癌中的分子機制仍不清楚。Tert 的啟動子是屬於多重調控，除了 *myc* 結合到 E-box (在 -187 至 -182 位置外)，尚有 sp1 及 AP1 皆為正調控因子。然而在缺乏 E-box 的 motif 會明顯減少 TerT 啟動子的活性。但在肺癌細胞株 H1299 細胞中轉殖入此段缺乏 E-box 的 promoter 仍比 promoterless 的對照組活性高出許多，表示在細胞中仍有許多轉錄調控因子參與其調控。

五、松杉靈芝中之免疫調節能力

在一些食用菇類，如靈芝、草菇及金針菇中所純化分離出來的蛋白質，他們具有類似的胺基酸序列及免疫調節功能，我們以將此種類之蛋白質，命名為真菌類免疫調節蛋白質 (Fungal immunomodulatory proteins, FIPs) (Ko, et al., 1995)。尤其以靈芝在傳統中藥已成為翹楚，且已成為健康食品中的一員，對維持人體健康，有莫大作用。過去研究發現它具有抗過敏 (Chen, et al., 1992)、保護肝臟功能 (Lin, 1993)、抗腫瘤及增強免疫功能，但大多局限於粗萃取物 (Horner, 1993) 研究，或小分子化合物 (Kawagishi, 1993) 研究。直到 1989 年日本明治製藥從靈芝中純化得一免疫調節功能蛋白，LZ8 (Kino, 1989)，實驗結果發現 LZ-8 可以明顯的抑制全身性過敏反應，治療肝炎及預防糖尿病。具有 mitogenic 能力，且可抑制 CFW 老鼠由牛血清蛋白 BSA 所引起的 anaphylaxis。柯 (1995) 等人亦自另一可食用的菇類-金針菇 (FIP-fve) 發現與 LZ8 及免疫球蛋白的重鏈區之蛋白質結構有相當程度的相似性，且二級結構多為 β -Sheet，而測量其對於人類淋巴球細胞增殖能力時由以上實驗結果得知此蛋白質具有免疫調節活性。靈芝免疫調節功能蛋白質明顯增加 IFN- γ ，因此靈芝增加 CD2 表現，引起 rosette 形成，所以靈芝可藉著調節 immunocompetent cell 上 adhesion 分子 (Miyasaka, 1992) 來表現其藥性。而在先前的研究證實，靈芝免疫調節功能蛋白質會活化人類周邊血液單核球 (human peripheral blood mononuclear cells, HPBMCs)，並能夠促進 HPBMCs 與小鼠脾臟細胞的增生 (van der Hem, van der Vliet et al. 1995)，測量其對於人類淋巴球細胞增殖能力時，以 ^3H -thymidine 測量 DNA 之合成量，並以 PHA 作為對照組，結果發現 FIP-gts 只要 5 微克/毫升 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 即可達到促進人類淋巴球細胞最高的細胞增殖量 (Hsu 1996)。

六、研究目的

癌症起因中癌細胞擁有無限次複製能力是癌化過程中必備的條件 (Hanahan and Weinberg, 2000)。因此在癌症的形成過程當中，可能需要終端酶的活性來幫助細胞不斷分裂，且腫瘤細胞較易渡過衰老死亡的危機期通常亦伴隨著終端酶活性再活化染色體終端酶。本研究室曾發現當肺癌患者的腫瘤組織中若喪失終端酶活性其預後較佳。探討由松杉靈芝中所分離出的免疫調節蛋白，於處理肺癌細胞後，是否

可有效抑制肺癌細胞的終端酶活性，進而開發成防止肺癌惡化的中草藥。

- (一) 證實松杉靈芝中所分離出的免疫調節蛋白抑制終端酶活性。
- (二) 證實松杉靈芝中所分離出的免疫調節蛋白抑制 htert 的轉錄活性。
- (三) 定出 htert promoter 上與松杉靈芝中所分離出的免疫調節蛋白的 response element。
- (四) 找出參與松杉靈芝中所分離出的免疫調節蛋白抑制 htert 的轉錄活性的調控因子。
- (五) 此研究工作由於松杉靈芝中所分離出的免疫調節蛋白是針對應用於預防和抑制肺癌細胞的終端酶活性。所以將來有發展出治療或搭配其他抗癌藥物一起處理可抗腫瘤減少腫瘤細胞的再復發。

貳、材料與方法

一、實驗設計及研究方法

(一) 主要了解 FIP-*gts* 處理後在肺癌細胞中是否抑制染色體終端酶活性並分析參與此調控的調節因子。

以 TRAP 測試其 telomerase 活性，RT-PCR 分析其 mRNA 的表現量。另構築 htert promoter-luc 的螢光報告基因，探討其 FIP-*gts* 是否調控 tert promoter，而 FIP-*gts* 之所以抑制 telomerase 基因的 promoter 是直接或間接作用。

(二) 載體構築

構築 htert promoter-Luc 命名為 htertp-pGL3。

根據 Telomerase Catalytic Subunit promoter (tert-p) (Horikawa et al., 1999) 的基因選殖。將此 promoter 構築於 pGL3(basic) 的表現載體中，利用此 luciferase 活性分析才可得知其 promoter 活性。

(三) 確認 FIP-*gts* 是 htert promoter 的 repressor，FIP-*gts* 在肺癌細胞中可抑制細胞 telomerase 的活性。

將上述構築好的表現載體 FIP-*gts* 基因過量表現，以 TRAP 測試其 telomerase 活性，RT-PCR 分析其 mRNA 的表現量。另構築 htert promoter-luc 的螢光報告基因，探討其 FIP-*gts* 是否調控 tert promoter。

(四) 以 5'-Deletion 系列分析 htert promoter，為了了解 FIP-*gts* 所參與抑制 htert promoter 的所在位置。

以 htert promoter 為模板以 PCR 方式構築一系列 deletion promoter，可發現哪一段序列 FIP-*gts* 參與反應後的結合。

(五) 探討此 FIP-*gts* 抑制 htert promoter 作用是否直接作用或間接作用 - EMSA 方法分析 FIP-*gts* 是否會結合到此 promoter 區位：

1. 為了了解 FIP-*gts* 蛋白是否直接結合到此 promoter 區位，所以先以 E coli. pGEX 4T 表現載體方式表現 FIP-*gts* 基因，再與 biotin 標誌的 promoter 的 DNA 片段進行 gel mobility shift assay。若有結合，則表示 htert promoter 上有 FIP-*gts* 的結合區位。

2. 將 binding site 的序列，以 site direct mutagenesis 方法將此序列突變，確認 FIP-gts 抑制 htert 轉錄活性區位。若不結合表示是可能透過間接結合，而主要影響啟動子活性主要原因是啟動子上有許多轉錄因子結合區位，包含 SP1、AP2 及 c-myc 等轉錄因子被確認與其調控有關。
3. 細胞經過 FIP-gts 處理後的細胞核萃取液與不同段的 promoter DNA 片段進行 gel mobility shift assay。Deletion 系列方式分析後得知哪一段 response element 與 FIP-gts 過量表現，再分析此段 response element 是何轉錄因子結合位置。

二、材料：純化靈芝免疫調節功能蛋白

(一) 在大腸桿菌中表現融合蛋白重組 FIP-gts 與純化

1. 在大腸桿菌中表現融合蛋白

在大腸桿菌中表現融合蛋白的純化步驟如下：於前一天先製備 2 管菌液每管約 3mL LB，作為大量表現菌液的菌種 (PGEX4T-1-gts)，再製備含有 Ampicillin (50 μ g/mL) 之 LB broth 共 2 公升，取 40g LB Broth 溶於二次水中攪拌均勻再加入 1M MgSO₄ 20mL，最後補二次水到 2L，並分裝到 4 個大錐形瓶中，每瓶 500mL，以 121 $^{\circ}$ C，15 lb 滅菌 20 分鐘，待冷卻後加入 Amp (50mg/mL)，在各錐形瓶中加入 500 μ L 並混合均勻，再加入上述預先製備的小量菌種，每瓶加入 1.5mL，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中振盪培養 3 至 4 小時，直到 OD₆₀₀ 吸光值大於 0.5 即表示增菌已足夠。由於在表現載體上有 GST 基因，故此時每瓶各加入 250 μ L 的 1M IPTG 予以刺激，並更改培養箱溫度為 30 $^{\circ}$ C 繼續振盪培養達 3 小時，再將菌液以 4 $^{\circ}$ C，9,500rpm 離心 20 分鐘後，取 60mL resuspension buffer (需現配)【10mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM DTT, 60mg Lysozyme】將菌液沉澱物再懸浮，於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中作用 15 分鐘，即置於 -80 $^{\circ}$ C。隔日於 37 $^{\circ}$ C 水浴回溫後，再用超音波均質機在冰上打破細胞，每次約 10 秒，每次間隔 10 分鐘預冷，反覆共 6 次。之後加入 Dnase (10mg/mL) 及 RNase A (10mg/mL) 各 40 μ L，於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽中作用 15 分鐘，以 4 $^{\circ}$ C，12000rpm 離心 20 分鐘，小心吸出上清液準備通管柱 Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia)。此時需預留少量約 500 μ L 的粗

萃取液作為 SDS-聚丙烯電泳膠分析用以及測量粗蛋白液的 OD₂₈₀ 總濃度使用。

2. 融合蛋白的純化

以 50mL 的 PBS 緩衝液【150mM NaCl, 16mM Na₂HPO₄, 4mM NaH₂PO₄, pH 7.3】清洗 Glutathion sepharose 4 Fast Flow column (約 2mL), 再以 50mL 含 1mM DTT 的 PBS 緩衝液平衡管柱, 接著通入菌液上清液, 再以 50mL 的 PBS 緩衝液沖洗出無法專一附著於管柱上的蛋白質後, 測量 OD₂₈₀ 吸光值低於 0.05 後, 即可再加入 elution buffer 沖流約 50mL【5mM reduced form Glutathione, 50mM Tris-HCl, pH 8.0】把融合蛋白競爭下來, 以分液收集器收集每管約 2mL, 並測其在 280nm 波長的吸光值, 可得一蛋白吸收峰, 其純度可由 SDS-聚丙烯電泳進行分析。

3. 重組 FIP-gts 的純化

將 OD 值大於 0.5 的蛋白液收集起來, 每 1mg 融合蛋白以 0.2 Unit Thrombin (Roche) 酵素於 22°C 水浴下作用 48 小時, 以切斷 GST 與 FIP-gts 間之鍵結, 並於當中取少量樣品跑 SDS-PAGE 確定純化效果, 若尚未切完全, 則持續補充 Thrombin。利用 25 kDa 分子篩 (Centri/Por), 在 4°C 下以 5,000Xg 離心 10 分鐘後, 再加入 1 mL 二次水至上層, 相同的條件離心共二次, 以進一步沖出殘留於上層之 FIP-gts, 收集下層液, 再以 10 kDa 分子篩 (Amicon, MILLIPORE, Centricon Plus-20), 在 4°C 下以 5,000Xg 離心 10 分鐘以濃縮蛋白液, 所獲得的 reFIP-gts 純度可利用 SDS-聚丙烯電泳進行分析。

三、實驗步驟

(一) 利用染色體終端酶重覆增幅步驟 (Telomeric Repeat Amplification Protocol, TRAP assay) 分析 FIP-gts 對細胞終端酶活性的影響, 依據 Intergen TRAPEZE kit

1. 取蛋白萃取液 2 微升 (50ng/μL), 加入 5 微升 10X PCR buffer (100mM Tris-HCl, PH 9.0, 25mM MgCl₂, 500mM K₂O, 0.1% gelatin), 2 微升的 10mM dNTPs 和各 2 微升的 10pmol TS (Telomerase Substrate) primer 及 Cxa reverse primer, 加入 1 微升的 Hi-Tag DNA polymerase (5 單位/微升), 最後加入二次

蒸餾水至 50 微升作用 30°C，30 分鐘。反應條件：94°C，1 分鐘，54°C，1 分鐘，72°C，1 分鐘，上述條件進行 35 cycle，72°C 反應作用 10 分鐘，取 30 微升 PCR 產物，進行 110 伏特 2 小時，12% acrylamide gel 垂直電泳分析，最後用 ethidium bromide (EtBr) 染色觀察。

2. 染色體終端酶活性分析 (Total Product Generated, TPG)

將已用 ethidium bromide (EtBr) 染色過後的 acrylamide gel，利用數位化影像分析系統 (AlphaImager™200, Alpha Innotech Corporation) 在 UV 燈下依據染色強度作定量分析，其計算公式如下。

$$\frac{(\text{樣本未經過 RNase A 處理}-\text{樣本經過 RNase A 處理})}{(\text{未經過 RNase A 處理的 internal control})}$$

$$\frac{[\text{TSR8 (positive control)-CHAPS lysis buffer (negative control)}]}{(\text{TSR8 internal control})}$$

(二) 利用反轉錄酶鏈聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 分析 FIP-gts 對細胞終端酶反轉錄催化單元 mRNA 的影響

一般終端酶調控已非常清楚，特別是 tert (telomerase reverse transcriptase subunit) 的 mRNA 在腫瘤組織表現很高而正常組織表現特別低，而 hTR 及 hTEP 則不論在正常體組織或腫瘤組織其表現量皆一致。而將 tert 基因轉殖進入不會表現終端酶活性的細胞株，則足以表現出其酵素活性。因此，推測 htert 的轉錄活化可能是主要調控終端酶的決定步驟。

1. RNA 純化：

移除舊培養液，以 1×PBS 清洗兩次，再加入 600μL Slotion D (4M guanidium thiocyanate, 5mM β-MSH, 0.3M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH8.0, 20mM EDTA, 10% N-lauroyl sarcosine) 振盪混合 10 秒，加入 500μL 的 phenol:chloroform (v/v=1:1) 振盪混合 10 秒置於冰上 10 分鐘後，離心 12,000rpm, 4°C，吸取上清液並置換乾淨的 1.5 mL 微量離心管中，加入 1/10 體積的 4.4M 醋酸氨，pH5.2。再加入等體積的 isopropanol 振盪混合均勻，離心 12,000rpm, 4°C，15 分鐘。倒掉上清液，再用 75% 酒

精清洗一次，離心 12,000rpm，4°C，倒掉上清液，以 Speed Vacume 進行抽乾，約 5 分鐘抽乾的 pellet 加入 30μL 不等的 DEPC 處理過的滅菌二次水溶解 RNA。若無法完全溶解則可置於 dry bath 上加熱 50°C 幫助溶解。溶解的 RNA 以 DEPC 處理過的滅菌二次水稀釋 100，測其在 260nm 與 280nm 波長下的比值，其比值應大於 1.8 以上，並進行反轉錄反應作成 cDNA，其他的 RNA 儲存在 -80°C 冰箱中。

2. cDNA 的合成 (RT-PCR)：

本實驗使用 promega RT-PCR kit 作反應。方法如下：取 1μg 的 total RNA 加熱 70°C、10 分鐘後隨即放置冰浴中冷卻，再加入 25mM MgCl₂ 4μL，5×MMLV buffer 4μL，10mM dNTP Mixture 2μL，Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor 0.5μL，MMLV Reverse transcriptase 1μL，Oligo (dT)₁₅ Primer 1μL 及 Nuclease-Free Water 補至最終體積為 20μL。於 PCR 儀中進行下列反應：72°C、10 分鐘，42°C、60 分鐘，72°C、10 分鐘及 4°C、5 分鐘即合成 cDNA。可進行 PCR 反應，或儲存於 -20°C 冰箱中備用。

3. PCR (鏈聚合酶鏈鎖反應)：

取 0.5μg 的 cDNA，加入 10×PCR buffer 5 μL (100mM Tris-HCl, pH 9.0, 25mM MgCl₂, 500mM K₂O, 0.1% gelatin)，2μL 的 10mM dNTPs，及各 2μL 的 10pmole 引子分別為 HT-CS₁ 及 HT-CS₂ 其 PCR 產物為 328bp 大小。β-actin 的 5'端及 3'端引子 (primer) 當內對照組 (internal control)，並加二次蒸餾水至 50μL，上層加入 50μL 的礦物油，加熱 94°C、5 分鐘，最後加入 0.5μL 的 Hi-Taq DNA polymerase (5 單位/μL)。反應條件：94°C、1 分鐘；54°C、1 分鐘；72°C、2 分鐘，上述條件進行 30 cycles、72°C 反應 10 分鐘，作用結束後取 20μL 進行 1.5% agarose gel 電泳分析。

(三) 利用終端酶反轉錄催化單元啟動子區域 h.TERT-promoter 分析 FIP-gts 對於染色體終端酶反轉錄催化單元轉錄活性的影響

本實驗所使用的細胞株為 A549 的肺癌細胞株，培養在 37°C，5% CO₂ 培養箱。所用培養液為含 10%胎牛血清之 Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO)，並添加 100 U/mL 的 penicillin

及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 streptomycin。轉染方法乃採取 cationic liposome DOTAP {N[1(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate 的方式來進行 (BRL)。轉染時將質體 (pGL-3-tert-p, β -gal) 分別加入 DOTAP (1.5-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ plasmid) 加入 1.5mL Opti-DMEM (GIBCO) 培養液混勻, 於室溫靜置 20 分鐘。將轉染混合物加在 5×10^5 細胞培養 6 小時後, 再換新培養基 48 小時, 移去細胞培養液並以 PBS 清洗二次, 使用 luciferase 試劑組 (Promega)。使用冷光分析儀 (Tunel 20/20) 分析轉錄活性。

(四) 利用西方點墨法來分析 FIP-gts 是否影響調控因子蛋白表現量

取 A549 細胞以 5×10^5 個/盤種植至 60mm 培養皿中, 在 37°C 細胞培養箱中培養 16hr, 經加以不同濃度的 FIP-gts 處理約 24 小時後, 將便可將細胞收下。先以 PBS 清洗二次, 去除上清液加入 100 μL 的細胞均質緩衝液使細胞溶解, 置於冰上待全部樣品皆以製備完畢後再以超音波均質機在 4°C 下將細胞完全打破, 反覆兩次每次間隔 10min 以上, 之後再離心 12,000rpm, 4°C , 20min, 小心吸取上清液, 存放置另一乾淨滅過菌的 1.5mL 微量離心管中並進行蛋白質定量。使用 Bio-Rad protein assay (#500-0006) 測蛋白質濃度。接下來將樣品以 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法分析, 並在電泳分析完畢前 20min, 先準備一張大小相當的 Hybond-P membrane (Pharmacia), 須用甲醇浸潤一下約 15 秒, 改以二次水清洗 10min, 再浸泡於 transfer buffer 中約 10min 備用。將分析完畢的電泳片小心取下, 在半乾式轉漬器: Hoefer Semiphor Transfer 上, 依序放上 3 張事先的浸好 transfer buffer 的 3M 濾紙和 transfer buffer 浸潤過的 Hybond-P membrane, 電泳片、另外 3 張浸好 transfer buffer 的 3M 濾紙, 利用以半乾式轉漬法在電源供應器: Pharmacia Biotech power supply EPS 301, 以每平方公分 3mA 電流的條件下進行 60min, 使膠上的蛋白質由負極往正極的方向轉移到 Hybond-P membrane。將 transfer 好的 Hybond-P membrane 浸泡在含有 5% 脫脂奶粉的 1 倍 TTBS buffer 中, 於室溫下 shaking 1hr, 進行 blocking。將已 blocking 完成的 Hybond-P membrane 分別加入專一性的一級抗體。利用含有 3% 脫脂奶粉 TTBS buffer 稀釋下列一級多株 (polyclonal) 抗體: c-Myc (1:400) 和 p-c-Myc (1:1000) 等。於 4°C 下搖晃一個晚上 (至少 16hr)。隔天取出轉漬膜, 一級抗體以 1:100 的比例加入 2% 的 sodium

azide 作為防腐劑後可回收重複使用，接著以 100mL 3%脫脂奶粉之 1 倍 TTBS buffer 在室溫下清洗轉漬膜 2 次，每次 10min，再用 100mL 的 1 倍 TTBS buffer 在相同條件下室溫清洗 2 次，每次 10min。再以 3%脫脂奶粉之 1 倍 TTBS buffer 稀釋含有 anti-rabbit IgG-HRP 的二級抗體（1：5,000, Cell Signaling #7074）於室溫下振盪作用 1hr，重覆上述之清洗步驟。利用 E.C.L. 呈色劑，以 1：1 的方式加入 Enhanced luminol reagent 與 Oxidizing reagent 混合均勻，將 membrane 的正面朝下放入裝有呈色劑的盒子中作用 5min，以催化 HRP 呈色，並將螢光呈現在 X-光底片上，曝光時間約 3-5min，再以顯影劑及定影劑將影像沖洗出。

(五) 利用 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) 可快速分析 FIP-gts 是否透過其他調控因子影響染色體終端酶活性表現

當 A549 細胞生長於 6 公分的培養皿待生長至七、八分滿時，經加以不同濃度的 FIP-gts 處理約 24 小時後，將便可將細胞收下。首先將舊的培養液移除，並以 1x PBS 清洗兩次，再以 0.9 毫升 HEGD 緩衝液（25mM HEPES, 1.5mM EDTA, 1mM DTT, 10% glycerol, pH=7.6; 0.5mM PMSF, 10ug/mL leupeptin, 10ug/mL pepstatin）中以 0.9mL HEGD 緩衝液（25mM HEPES, 1.5mM EDTA, 1mM DTT, 10% glycerol, pH 7.6; 0.5mM PMSF, 10ug/mL leupeptin, 10ug/mL pepstatin, 10ug/mL aprotinin）刮下細胞，以低速離心於 4°C 7,000rpm (SORVALL RMC 14) 5 分鐘後，取細胞沉澱物加入 0.5 毫升 HEG (HEGD without glycerol) 混合均勻後，以玻璃細胞研磨器 (micro tissue grinder, Wheaton 公司) 研磨細胞約 40 下，離心於 4°C 7,000rpm (SORVALL RMC 14) 10 分鐘後去除上層液，於細胞沉澱物中加入 100 微升 HEGD-KCl (HEGD buffer 含有 0.5M KCl) 混合均勻後，在 4°C 振盪 1 小時，再離心於 4°C 14,000rpm (SORVALL RMC 14) 30 分鐘後收集上清液，並以 Bio-Rad protein assay 定量蛋白量；取 10 微克的核蛋白與上述研究所確認的 response element 進行 EMSA 分析。之後，使用 PIERCE 出品的 GEL Shift assay kit，依序加入 4 微升的 5x binding buffer、1 微升 (1 微克) 的 poly d (I-C)、1 微升 (1 微克) 的 poly L-lysine、再加入 2 微升的 100 pmole 已標定 Biotin 之 Response Element DNA 片段，之後其餘補水至 20 微升，混合後作用於室溫 (25°C) 15 分鐘便可進行直立式電泳操作。至於

抗體測定的條件，首先抗體先與核蛋白在室溫下反應 30 分鐘之後再與已標定 Biotin 之 Response Element DNA 片段進行反應。本實驗選用 Hoefer 之直立式電泳槽，其步驟如下：首先製備 6% native gel，依序加入二次水 6 毫升、10X TBE buffer 1 毫升、40% acrylamide-bis acrylamide 1.5 毫升、Glycerol 1 毫升、1% ammonium persulfate 0.5 毫升、TEMED 15 微升混合均勻後，然後緩緩加入 1.0mm 厚度的直立式電泳槽膠台座中，然後將梳狀膠片 (comb) 放入，待凝固後小心取出梳狀膠片，所留下的凹槽可做為樣品加入之用。將製備好凝固的膠，先用 0.5x TBE running buffer 填滿，再將先前已作用好的 samples 與 5 微升的 loading buffer 混合均勻，然後緩緩注入至 native gel 的凹槽中，用 80volt 約跑 120 分鐘，直到樣品接近底部即可停止。在膠快跑完的前 10 分鐘，準備一張大小恰當的 Nylon membrane (Boehringer Mannheim GmbH 1209299)，先用 0.25x TBE buffer 浸泡 10 分鐘；將膠卸下之後，同時與 nylon membrane 及兩片濾紙一起浸在 transfer 緩衝溶液中 (使 DNA/protein 由負極往正極移動)，利用半乾式轉漬法以 350mA 120 分鐘，將膠上的 DNA 轉移到 nylon membrane 上。將 transfer 好的 nylon membrane 先經由 UV cross linker 以 120 mJ 3 分鐘後，使用 PIERCE detection kit 顯像，其步驟如下：先將 membrane 浸泡於 wash buffer 2 分鐘，再將 membrane 浸於 9 毫升的 blocking buffer 振盪 15 分鐘後，取 10 微升的 HRP 與新的 blocking buffer 5 毫升混合，然後將 membrane 放入其中，振盪 15 分鐘後，取出 membrane，置於 1x washing buffer 中振盪 5 分鐘後，倒掉再清洗一共 4 次，之後再將 membrane 放置於 Equilibration buffer 中振盪 5 分鐘，再與 substrate (Luminol 與 Peroxide 各取 1 毫升混合) 作用 5 分鐘後，再以 X 光底片 (Kodak Science Imaging Film) 感光 1-5 分鐘後即可顯影。

參、結果

一、大腸桿菌中重組 FIP-gts 的表現與純化

松杉靈芝免疫調節蛋白質的分離與純化主要利用遺傳工程方式選殖此蛋白之基因，將已構築完成含有 FIP-gts coding region 的 pGEX 4T-1 表現載體，轉形至大腸桿菌中表現，並利用 glutathione-Sepharose 4 Fast Flow 親和性管柱純化重組 FIP-gts 融合蛋白。接下來進一步使用 Thrombin 將 Glutathione S transferase 與重組蛋白間的鍵結切去，利用內含 25 kDa molecular weight cut 的分子篩離心管，將 26 kDa 的 GST 與 13 kDa 的重組 FIP-gts 分離開，則能得到較純的重組 FIP-gts 約 9 mg (圖 1)。

二、觀察重組 FIP-gts 對肺癌細胞株 A549 的存活率

首先以 0、2、4 和 8 μ g/mL 的重組 FIP-gts 處理 A549 細胞 48 小時，接著以 MTS 方法來進行觀察，MTS 是分析細胞內 dehydrogenase 的活性，所以可用來偵測細胞存活率；結果 A549 細胞經過 48 小時後對 FIP-gts 有感受性。其存活率會因為 FIP-gts 之濃度之增加而有下降的傾向，以處理 0 μ g/mL FIP-gts 48 小時後之細胞存活率為 100%，而處理 1、2、4 和 8 μ g/mL FIP-gts 48 小時後之 A549 細胞存活率分別為 79.7%、77.9%、72.2%、55.2%，所以顯示 FIP-gts 只能抑制細胞 50-58% 之生長。而在相同條件之下處理人類正常肺纖維母細胞 (MRC-5) 發現並不會抑制細胞生長 (圖 2)。

三、重組 FIP-gts 處理肺癌細胞 A549 後有效抑制染色體終端酶活性

本實驗目的主要觀察重組 FIP-gts 處理 A549 細胞後是否會影響細胞內染色體終端酶活性表現。染色體終端酶重覆增幅步驟 (Falchetti et al., 1998) 是主要偵測細胞染色體終端酶活性的指標之一，首先，先將 A549 cell 分盤至 60mm 培養皿，每盤細胞數目為 1×10^6 個，培養 18 小時。接著分別加入重組 FIP-gts 劑量為 0、2、4 和 8 μ g/mL，作用 48 小時後收集細胞萃取液，再利用高敏感度的非放射性染色體終端酶重覆增幅步驟偵測 A549 細胞內染色體終端酶活性。因此，取 100ng 細胞萃取物進行鏈聚合酶的增幅反應，電泳之後再用 EtBr 染色觀察。結果顯示在處理重組 FIP-gts 與未處理的細胞比較之下終端酶活性隨著 FIP-gts 濃度增加而減少，呈現劑量關係的反應 (圖 3)。

四、重組 FIP-gts 處理肺癌細胞後有效抑制終端酶反轉錄催化單元 mRNA

由圖三發現重組 FIP-gts 會影響終端酶活性表現，又已知終端酶反轉錄酶 (h.TERT) 為催化終端酶活性的酵素，而 h.TR 為終端酶另一個次單元體負責與終端序列結合。因此本實驗先利用半定量 RT-PCR 分析重組 FIP-gts 是否會抑制 h.TERT 或 h.TR mRNA 的表現。首先，將重組 FIP-gts 濃度為 0、2、4 和 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理 A549 細胞 24 小時之後再用 G.T.C method 方式純化 RNA，之後各取 2 μg total RNA 利用 RT-PCR kit (Promega) 合成 cDNA，接著進行反轉錄鏈聚合酶的增幅反應，最後用 2% agarose gel 電泳分析。結果發現在處理重組 FIP-gts 與未處理的細胞比較之下，A549 細胞內 h.TERT mRNA level 隨著 FIP-gts 濃度增加而減少，呈現劑量關係的反應，與圖二的結果相似。而 h.TR mRNA 的表現量並不會隨著 FIP-gts 濃度增加而改變 (圖 3A)。接著，利用定量 RT-PCR 分析，結果發現 h.TERT mRNA level 也是隨著 FIP-gts 濃度增加而減少 (圖 3B)。

五、重組 FIP-gts 抑制終端酶反轉錄催化單元的轉錄活性

由前面的實驗發現重組 FIP-gts 會抑制 A549 細胞中染色體終端酶活性，尤其在圖 3，催化染色體終端酶活性的 h.TERT 其 mRNA level 同樣也會受到 FIP-gts 作用。綜合二者實驗的結果得知染色體終端酶在蛋白質層次及 mRNA 層次皆會受到調控，因此接下來想要了解染色體終端酶的啟動子區域是否也會受到調控？首先根據 Horikawa 等人在 1999 年發表人類終端反轉錄酶啟動子區域中選殖一段 -548+50 構築在 pGL-3 basic vector 上，此外欲進一步探討其分子調控機制，所以同時選殖一系列 promoter deletion 的序列，其包括 h.TERT212：-212+50、h.TERT196：-196+50、h.TERT177：-177+50 亦構築在 pGL-3 basic vector 上 (圖 5A)。在成功選殖出一系列 h.TERT promoter 及 promoter deletion 序列之後，利用短暫轉染至細胞及 Luciferase 活性表現來分析 h.TERT promoter 受到重組 FIP-gts 處理後的轉錄活性表現。首先，將 h.TERT promoter 及 promoter deletion 載體與 β -gal (當 internal standard) 共同轉染至 A549 細胞 24 小時後再處理不同濃度重組 FIP-gts (0、2、4 和 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 24 小時，進行 luciferase 和 β -galactosidase 活性反應，最後再用冷光測定儀和分光光譜儀 (420nm) 偵測兩者活性表現。每組實驗均進行三重覆並求其螢光酵素表現的相

對活性 (Relative luciferase activity)。結果顯示隨著 FIP-*gts* 濃度增加而減少，呈現劑量關係的反應，與之前的結果相呼應 (圖 4)。

六、分析終端酶反轉錄催化單元上與重組 FIP-*gts* 的 response element

上述的研究結果發現重組 FIP-*gts* 有效地抑制 h.TERT 啟動子轉錄活性。因此想要更進一步瞭解是透過何種機制來抑制 h.TERT 啟動子轉錄活性。先將一系列逐漸縮短 h.TERT 啟動子序列-548--177 與 β -gal 質體 DNA 共同轉染至 A549 細胞內，再用重組 FIP-*gts* (8 μ g/mL) 處理細胞 24 小時後分析其轉錄活性。以上每組實驗均進行三重覆並求其螢光酵素的相對活性。結果顯示與未處理重組 FIP-*gts* 比較之下，在-548--196 啟動子區域皆會抑制啟動子轉錄活性。而在-177 啟動子區域則發現即使處理重組 FIP-*gts* 也不會抑制啟動子轉錄活性，因此由 promoter deletion 的結果發現重組 FIP-*gts* 抑制 h.TERT 啟動子轉錄活性的作用位置可能座落於-196~-177 區域 (圖 5B)。

七、重組 FIP-*gts* 抑制磷酸化 c-Myc 蛋白的表現

根據 Horikawa 等人在 1999 年發表人類終端反轉錄酶啟動子區域中指出-196~-177 為 E-box site 主要為 bHLHZ 蛋白家族所結合的區域，其中 c-myc 直接影響 htert 轉錄活化較重要 (Rachid D., et al., 2001)，進而增加啟動子活性，另有些研究報告在許多癌症細胞株中，說明了 c-Myc 及 SP1 的結合具有協同增加 htert 等活性，因此想要探討重組 FIP-*gts* 是否會影響 c-myc 的表現。首先，將重組 FIP-*gts* 濃度為 0、2、4 和 8 μ g/mL 處理 A549 細胞 24 小時之後收集細胞萃取液，以西方墨點法來觀察蛋白的變化。結果顯示重組 FIP-*gts* 明顯抑制 c-Myc 磷酸化的表現而 c-Myc 蛋白量則不會改變 (圖 6)，而磷酸化 c-Myc 會穩定結合到啟動子的區域，因此說明重組 FIP-*gts* 抑制人類終端反轉錄酶啟動子轉錄活性可能是減少 c-Myc 結合能力。

八、重組 FIP-*gts* 抑制 c-Myc 結合到終端反轉錄酶啟動子的能力

為了證實 c-Myc 受到重組 FIP-*gts* 作用下造成結合到終端反轉錄酶啟動子的能力下降。利用 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) 方法來證實。首先 A549 細胞生長於 6 公分的培養皿待生長至七、八分滿時，經加以不同濃度的 FIP-*gts* 處理約 24 小時後，將便可將細胞收下。結果顯示 c-Myc 結合能力隨著 FIP-*gts* 濃度增加而

減少，呈現劑量關係的反應（圖 7）。Cold E-box 探針主要確定 E-box 相對位置；加入抗體主要來辨認結合的蛋白為 c-Myc。

肆、討論

過去的文獻指出染色體終端酶除了在生殖細胞、淋巴細胞和角質細胞外，大部正常細胞中是不具有活性 (Kim, Bjorklund et al. 1994)，然而大多數惡性腫瘤及肺癌所衍生的細胞株中終端酶是呈現活躍的狀態 (Shay and Bacchetti 1997)。因此認為終端酶在細胞不朽 (cell immortalization) 和腫瘤生成 (tumorigenesis) 過程中扮演一個重要角色。染色體終端酶是由 RNA 和蛋白所組成的複合酵素，主要有三個次單元分別為 h.TR、h.TEP 和 h.TERT，其中 h.TR 和 h.TEP 在正常及腫瘤細胞內皆可偵測其蛋白表現 (Blasco, Rizen et al. 1996; Harrington, McPhail et al. 1997)，h.TERT 只有在腫瘤細胞內才偵測到蛋白表現而在正常體細胞內則無法偵測到 (Nakamura, Morin et al. 1997)。因此認為 h.TERT 為終端酶活性的速率決定步驟 (rate-limiting)。近幾年研究發現調控終端酶活性是屬於多元性和複雜性，其調控層面包括基因轉錄 (gene transcription)、轉譯後蛋白與蛋白間交互作用 (post-translation protein-protein interaction) 和蛋白磷酸化 (protein phosphorylation) (Li, Cao et al. 1999)。就基因層面而言，c-MYC 蛋白目前被認為是影響 h.TERT 啟動子最明顯的轉錄因子，c-MYC 以 ZipHLH domain 與 Max 蛋白形成 heterodimer (MYC/Max)，會鍵結到 h.TERT 啟動子區域上 CACGTG 的位置 (又稱 E-box) 或相似的 DNA 序列 (又稱 E-box motif) 而活化啟動子轉錄活性 (Wang, Xie et al. 1998; Oh, Song et al. 1999)。在所有人類腫瘤和衍生細胞株中 85-90% 皆有表現出終端酶活性 (Dhaene, Van Marck et al. 2000)，所以終端酶活性可被當作偵測癌症初期的診斷指標 (Breslow, Shay et al. 1997)。此外，由於終端酶在腫瘤生成扮演重要角色因此它也可以當作癌症治療的標誌且也視它為抗癌的攻擊目標，因此許多終端酶抑制劑陸續被製作來使用如：h.TR 基因的 antisense 會抑制 h.TR 與終端序列鍵結而使終端酶失去作用 (Feng, Funk et al. 1995)，antisense oligonucleotide、peptide nucleic acids 及反轉錄酶抑制劑也會抑制終端酶活性 (Norton, Piatyszek et al. 1996; Glukhov, Zimnik et al. 1998; Pai, Pai et al. 1998)。許多臨床抗癌藥物在近幾年內也被研究出會降低終端酶如：5-fluorouracil、cisplatin 和 tamoxifen (Aldous, Marean et al. 1999; Terashima, Takiyama et al. 2000)，然而有許多學者質疑這些抗癌藥物可能是透過其它路徑將癌細胞殺死而造成終端酶活性下降，因此不認為是真的終端酶抑制劑 (Janusz et al. 2002)。

藉由提供訊號啟動細胞原有能力，以提升自我免疫能力達到抗病作

用的概念，正如同生物反應修飾劑(Biological response modifiers, BRMs) (Fuggetta et al., 1990)，一群可藉著調控宿主防禦系統，對抗腫瘤或免疫疾病的物質。這些物質與一般天然抗癌藥物作用機制不同，一般天然抗癌藥物多是抑制細胞中 DNA、RNA 及蛋白質的合成，而 BRMs 通常會結合至細胞表面專一受體，經由一系列 cascade 如：interferons、tumor necrosis factor 等細胞激素的增加，或引發抗體或補體的產生，進而達到提升體內免疫系統的能力，這群 BRMs 統稱為 immunomodulating agents。其來源各不相同，已知有四類，第一類為微生物及天然物分離得來，在微生物中以 *Mycobacterium Bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) 已被開發應用在臨床試驗，可作為結核病 (Tuberculosis, TB) 的疫苗 (Dietrich et al., 2003)，天然物中則有屬於 β -glucan 的 Lentinan (Chen et al., 2003) 等。第二類是人工合成物，如：muramyl dipeptide。第三類自抗癌藥物中發現的，如：cyclophosphamide (Ueno et al., 1994)。及目前發現之第四類，如由蕈類純化所得之蛋白，具有免疫調節功能且具有相當程度類似的胺基酸序列，這類蛋白質命名為真菌類免疫調節蛋白質 (Fungal immunomodulatory protein, FIP) (Hsu, 1996; Ko et al., 1995; Lin et al., 1997)，同時它們亦是一種 lectin (植物凝集素)，如：靈芝蛋白 LZ-8、金針菇蛋白 FIP-*fve* 及草菇中的 FIP-*vvo*。我國繼日本之後，在台大生化暨分生所及中研院院士林榮耀博士的指導下，也由松杉靈芝 (*Ganoderma tsugae*) 菌絲體當中純化得一免疫調節蛋白，將之命名為真菌免疫調節蛋白質，FIP-*gts* (Lin et al., 1997)，本實驗室亦曾嘗試自其子實體當中純化 FIP-*gts*，但發現子實體內所取得之蛋白質並無免疫調節功能，唯有在菌絲體中所萃取得蛋白質才具有功能，並已利用遺傳工程方式選殖此蛋白之基因，經比對後發現此基因之 DNA 序列與 *Ganoderma lucidum* 中的 LZ-8 序列相同，且活性相同，證實此二種蛋白質為同種蛋白質。經進一步研究其免疫調節機制，由先前的研究證實，靈芝免疫調節功能蛋白質會活化人類周邊血液單核球 (human peripheral blood mononuclear cells, HPBMCs)，並能夠促進 HPBMCs 與小鼠脾臟細胞的增生 (van der Hem et al., 1995)，測量其對於人類淋巴球細胞增殖能力時，以 ^3H -thymidine 測量 DNA 之合成量，並以 PHA 作為對照組，結果發現 FIP-*gts* 只要 5 微克/毫升 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 即可達到促進人類淋巴球細胞最高的細胞增殖量 (Hsu, 1996)，而與其及相似的金針菇蛋白 FIP-*fve* 濃度則須至 100 微克/mL，並且在使用 Dyna-bead 細胞分離系統，將 non-B 與 non-T 細胞分離後，發現 FIP-*gts* 只有在 Non-B 細胞群中具有細胞增生能力。

一般來說，在靈芝之中具有抗癌效果的主要以多醣體或是三萜類，由松杉靈芝 (*Ganoderma tsugae*) 菌絲體中純化的免疫調節功能蛋白—FIP-gts 具有誘發人類周邊血液單核球的增生和具有免疫調節活性 (Hsu, 1996)，但是 FIP-gts 對於癌症細胞的作用並沒有很清楚的被研究和探討，因此想要釐清是否具有抗癌的功效並分析其作用機制。

本實驗選用肺癌 A549 細胞，它是一株高度惡化的肺癌上皮細胞。當細胞處理 FIP-gts 在不同時間下，由顯微鏡下觀察其細胞型態，發現其細胞型態由飽滿的多邊形變成圓形緊密狀，且細胞與細胞之間鍵結的能力似乎也減弱，使細胞不能緊密的貼附在一起，形成鬆散、分散的一顆顆單獨的細胞。依照加入 FIP-gts 濃度而有程度上的不同，濃度越高其細胞緊縮成圓形的程度和細胞變形的也就越多。我們同時也利用正常的肺細胞 MRC-5 來研究 FIP-gts 對正常細胞的影響，結果發現 FIP-gts 對正常的肺臟細胞的細胞在形態並不會有明顯的變化，且觀察到 MRC-5 細胞不會受到 FIP-gts 的影響在處理 24 小時後都幾乎同時長滿整個培養皿。我們利用 MTS 實驗觀察 FIP-gts 對 A549 和 MRC-5 細胞的存活率，結果發現 A549 細胞會隨著 FIP-gts 濃度增加而下降，然而 MRC-5 細胞則不受影響，除了 A549 細胞外，另一株肺癌細胞 H1355 的存活率也會隨著 FIP-gts 濃度增加而明顯減少 (剩 30%)。因此可以推測 FIP-gts 只針對癌細胞造成細胞毒性而降低細胞的存活率。由於染色體終端酶在正常細胞中是不具有活性 (Kim, Bjorklund et al. 1994)，然而大多數惡性腫瘤及肺癌所衍生的細胞株中終端酶是呈現活躍的狀態。為了避免因細胞死亡而造成細胞染色體終端酶的活性的下降，我們選用 FIP-gts 濃度為 8 μ g/mL (仍有 55.2% 存活率)。我們利用高敏感度的非放射性染色體終端酶重覆增幅步驟偵測 A549 細胞內染色體終端酶活性，發現 FIP-gts 明顯抑制染色體終端酶的活性表現。已知終端酶反轉錄酶 (h.TERT) 為催化終端酶活性的酵素，而 h.TR 為終端酶另一個次單元體負責與終端序列結合。利用半定量及定量 RT-PCR 得知重組 FIP-gts 主要是抑制 h.TERT mRNA 的表現進而降低染色體終端酶的活性。調控終端酶活性是屬於多元性和複雜性，由前者實驗發現 h.TERT mRNA 會被重組 FIP-gts 有所抑制，表示屬於基因轉錄層次上的調控。由 Luciferase assay 也證實重組 FIP-gts 抑制 h.TERT 啟動子的轉錄活性，因此由上述的研究結果說明重組 FIP-gts 主要是抑制 h.TERT 轉錄活性進而抑制染色體終端酶的活性。接著利用 promoter deletion 方式發現重組 FIP-gts 主要作用在 -196~-177 位置，據 Horikawa 等人在 1999 年發表人類終端反轉錄酶啟動子區域中在 -196~-177 為 E-box site 主要是 bHLHZ 蛋白家族所結合的

區域，其中 c-Myc 為轉錄因子會直接影響 htert 轉錄活化。然而我們發現重組 FIP-gts 並不會影響 c-Myc 蛋白的表現量但會降低磷酸化的表現，通常磷酸化 c-Myc 蛋白會表現在細胞內並穩定結合到它的目標基因的啟動子上，一旦降低磷酸化的表現量會失去與啟動子的結合而導致啟動子轉錄活性下降。而我們利用 EMSA 證實 c-Myc 蛋白明顯降低與 E-box 結合能力。

一般來說，在靈芝之中具有抗癌效果的主要以多醣體或是三萜類，而由以上種種研究顯示由松杉靈芝菌絲體中純化的免疫調節功能蛋白—FIP-gts 除了具有免疫調節活性外，也具有抗癌的功效。此免疫調節蛋白可應用於抑制肺癌細胞的終端酶活性。所以將來有發展出治療或搭配其他抗癌藥物一起處理可抗腫瘤減少腫瘤細胞的再復發。本研究的發現更增加中草藥對於抗癌方面的科學證據及可信度。

伍、結論與建議

本實驗室主要以遺傳工程方式重組松杉靈芝免疫調節蛋白質-FIP-*gts*，也已將此基因選殖並表現其蛋白質，接著利用 glutathione-Sepharose 4 Fast Flow 親和性管柱純化重組 FIP-*gts* 融合蛋白，最後得到約 15mg 的純蛋白質，此基因 DNA 序列與 *Ganoderma lucidum* 的 FIP-*gts* 序列相同，且活性相同。利用 MTS 實驗觀察 FIP-*gts* 對 A549 和 MRC-5 細胞的存活率，結果發現 A549 細胞會隨著 FIP-*gts* 濃度增加而下降，然而 MRC-5 細胞則不受影響。已知 80-90% 肺癌細胞染色體終端酶呈現高度活化的狀態且也是腫瘤細胞生存必要條件之一因此抑制染色體終端酶活性達到抗癌的效果。而研究結果得知 reFIP-*gts* 處 A549 細胞 48 小時後明顯抑制染色體終端酶活性且呈現 dose-dependent 關係。接著偵測 hTERT 及 hTRmRNA 表現，利用半定量及定量 PCR 方法分析 h 結果得知 reFIP-*gts* 處 A549 細胞 12 小時後明顯抑制 h.tert mRNA 表現量。本實驗初步結論認為 FIP-*gts* 主要透過抑制 htert mRNA。由 Luciferase assay 也證實重組 FIP-*gts* 抑制 h.TERT 啟動子的轉錄活性，因此由上述的研究結果說明重組 FIP-*gts* 主要是抑制 h.TERT 轉錄活性進而抑制染色體終端酶的活性。接著利用 promoter deletion 方式發現重組 FIP-*gts* 主要作用在 -196~-177 位置，為 E-box site 主要是 bHLHZ 蛋白家族所結合的區域，其中 c-Myc 為轉錄因子會直接影響 htert 轉錄活化。然而我們發現重組 FIP-*gts* 並不會影響 c-Myc 蛋白的表現量但會降低磷酸化的表現，通常磷酸化 c-Myc 蛋白會表現在細胞內並穩定結合到它的目標基因的啟動子上，一旦降低磷酸化的表現量會失去與啟動子的結合而導致啟動子轉錄活性下降。而我們利用 EMSA 證實 c-Myc 蛋白明顯降低與 E-box 結合能力。本實驗研究結果證實松杉靈芝菌絲體中純化的免疫調節功能蛋白具有抗癌的功效。可建議做為輔劑與其他抗癌藥物一起處理可抗腫瘤及減少腫瘤細胞的再復發。

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 CCMP93-RD-009 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. Autexier, C. and Greider, C.W. Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem.*, 21: 387-391, 1996.
2. Bednarek AK. Sahin A. Brenner AJ. Johnston DA. Aldaz CM. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin. Cancer Res.*, 3(1): 11-6, 1997.
3. Biessmann, H. and Mason, J.W. Genetics and molecular biology of telomeres. *Adv. Genet.*, 30: 185-249, 1992.
4. Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres. *Nature*, 350: 569-573, 1991.
5. Blasco MA. Lee HW. Hande MP. Samper E. Lansdorp PM. DePinho RA. Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91(1): 25-34, 1997.
6. Blasco MA. Rizen M. Greider CW. Hanahan D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat.Genet.*, 12(2): 200-4, 1996.
7. Blasco, M.A., Funk, W.D., Villeponteau, B. and Greider, C.W. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science*, 269: 1267-127, 1995.
8. Broccoli D. Young JW. de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)* 92(20): 9082-6, 1995.
9. Chakravarti A, Delaney M. A, Noll E., Black P.M., Loeffler J. S., Muzikansky A., Dyson N. J. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas. *Clin Cancer Res* 7(8):2387-95, 2001.
10. Counter CM. Hirte HW. Bacchetti S. Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)* 91(8): 2900-4, 1994.
11. Counter, C.M. , Avilion, A.A. , LeFeuvre, C.E. , Stewart, N.G. , Greider, C.W. , Harley, C.B. and Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.*, 11: 1921-1929, 1992.
12. Feng, J. et. al. The RNA component of human telomerase. *Science*, 269:

- 1236-1241, 1995.
13. Greider, C.W. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 65.1996.
 14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer *Cell*. 2000 Jan 7; 100(1): 57-70.
 15. Harley, C.B. , Futcher, A.B. and Greider, C.W. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature*, 345: 458-460, 1990.
 16. Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Amgen E. P., Bass, M. B., Arruda, I., Robinson, M. O. A Mammalian Telomerase-Associated Protein. *Science*, 275: 973-977, 1997.
 17. Hirashima T. Komiya T. Nitta T. Kobayashi M. Kawase I. [Prognostic significance of alterations in telomeric repeat length in patients with pathological stage I-II non-small cell lung cancer]. *Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine*. 56(5): 1264-71, 1998.
 18. Hiyama E. Gollahon L. Kataoka T. Kuroi K. Yokoyama T. Gazdar AF. Hiyama K. Piatyszek MA. Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J. Natl. Cancer I.*, 88(2): 116-22, 1996.
 19. Hiyama E. Kodama T. Shinbara K. Iwao T. Itoh M. Hiyama K. Shay JW. Matsuura Y. Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res.*, 57(2): 326-31, 1997.
 20. Hsu, C.-i. (1996). Study on the Fungal Immunomodulatory Proteins. Department of Medical Technology, college of medicine. Taipei, National Taiwan University.
 21. Ito H. Kyo S. Kanaya T. Takakura M. Inoue M. Namiki M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4(7): 1603-8, 1998.
 22. Kang, S. S., Kwon, T. Kwon, D. Y., and Do, S. I. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J. Biol. Chem.* 274, 13085-13090, 1999.
 23. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 23; 266(5193): 2011-5, 1994.

24. Kipling D. Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 347: 400-2, 1990.
25. Kyo S. Kanaya T. Ishikawa H. Ueno H. Inoue M. Telomerase activity in gynecological tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2(12): 2023-8, 1996.
26. Langauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396:643-649. 1998.
27. Langford LA. Piatyszek MA. Xu R. Schold SC Jr. Wright WE. Shay JW. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum. Pathol.*, 28(4): 416-20, 1997.
28. Lin Y and Kubota Y. Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2: 929-932, 1996.
29. Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T. R. Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science*, 276: 561-567, 1997.
30. Marchetti A. Bertacca G. Buttitta F. Chella A. Quattrocchio G. Angeletti CA. Bevilacqua G. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 5(8): 2077-81, 1999.
31. Naasani I, Oh-Hashi F, Oh-Hara T, Feng WY, Johnston J, Chan K, Tsuruo T. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2003 Feb 15; 63(4): 824-30.
32. Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.*, 41: 181-190, 1973.
33. Prowse KR. Greider CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci. of the U. S. A.* 92(11): 4818-22, 1995.
34. Rachid D., Frederique Z., Martine F. R., and John L. C. c-Myc-mediated Regulation of Telomerase Activity Is Disabled in Immortalized Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 29994-30001.
35. Sommerfeld HJ. Meeker AK. Piatyszek MA. Bova GS. Shay JW. Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.*, 56(1): 218-22, 1996.

36. Tahara H. Nakanishi T. Kitamoto M. Nakashio R. Shay JW. Tahara E. Kajiyama G. Ide T. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.*, 55(13): 2734-6, 1995.
37. Tenen DG. Hromas R. Licht JD. Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*, 90(2): 489-519, 1997.
38. van der Hem, L. G., J. A. van der Vliet, et al. (1995). "Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent." *Transplantation* 60(5): 438-43.
39. Watson, J.D. Origin of concatameric T4 DNA. *Nature New Biol.*, 239, 197-201, 1972.
40. Wu TC, Lin P, Hsu CP, Huang YJ, Chen CY, Chung WC, Lee H, Ko JL. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. *Lung Cancer*. 2003 Aug; 41(2): 163-9.
41. Wynford-Thomas D. Oncogenes and anti-oncogenes; the molecular basis of tumour behaviour. *J. Pathol.*, 165(3): 187-201, 1991.

柒、圖

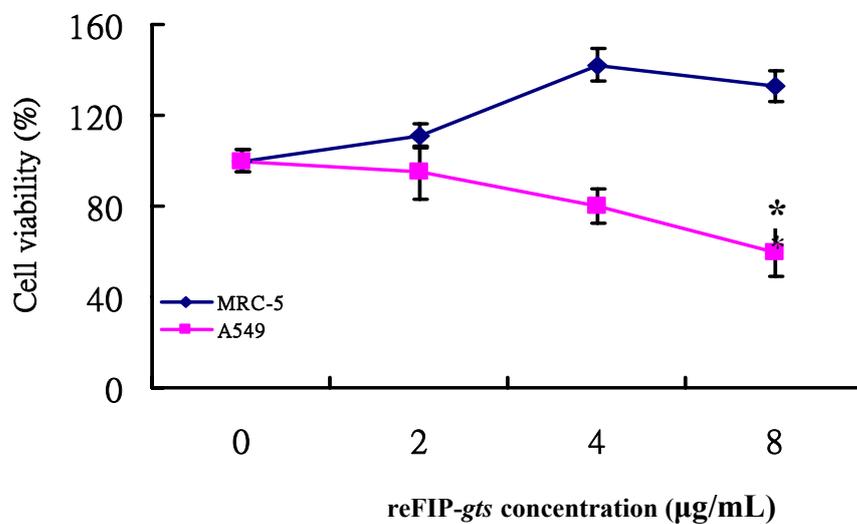


圖 1 重組 FIP-gts 影響肺癌細胞 A549 及正常細胞 MRC-5 細胞存活率能力之分析。

處理不同濃度的 FIP-gts 48 小時，最後 2 小時以 MTS kit (Promega) 分析細胞存活率，每點都是三重覆的平均值及標準差。

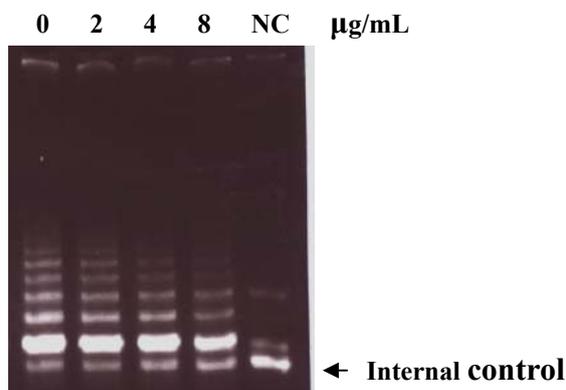
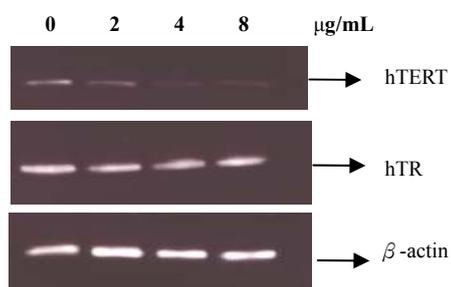


圖 2 重組 FIP-gts 對肺癌細胞 A549 染色體終端酶活性的影響分析。不同濃度 reFIP-gts 處理 A549 細胞株 48 小時，以 TRAP 方式分析染色體終端酶活性，36 bp 為內標。NC 表示負對照組，未加 telomerase 萃液。

(A)



(B)

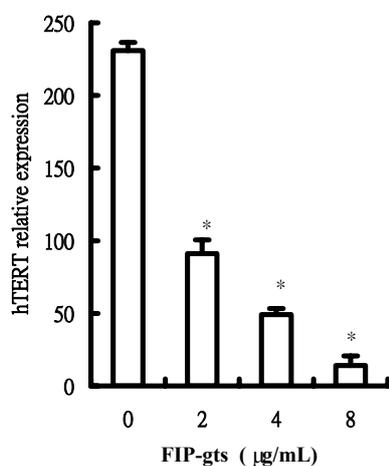


圖 3 重組 FIP-gts 對肺癌細胞 A549 染色體終端酶反轉錄酶 mRNA level 的影響分析。處理過 0, 2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$ reFIP-gts 24h 後萃取 RNA 分析(A) RT-PCR (B) Real-time PCR for hTERT, hTR and β -actin mRNA expression。每張圖形為三次重複實驗平均及標準差。以 Student S-test 統計分析與未處理細胞比較，星號(*)代表顯著意義， $P < 0.05$ 。

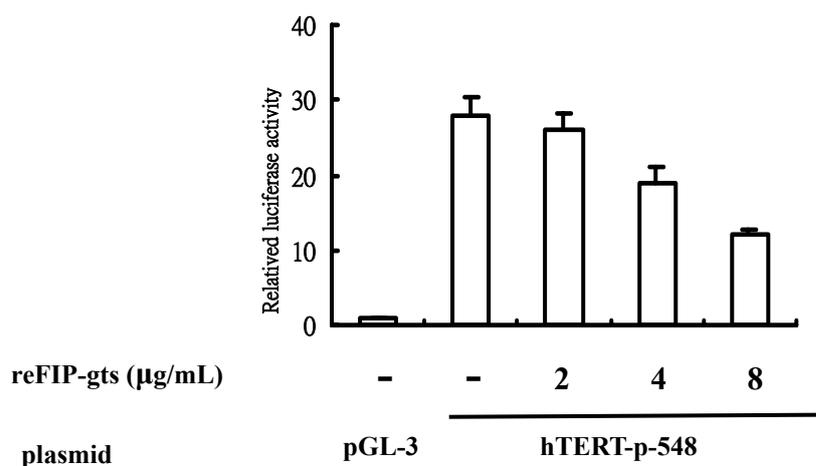
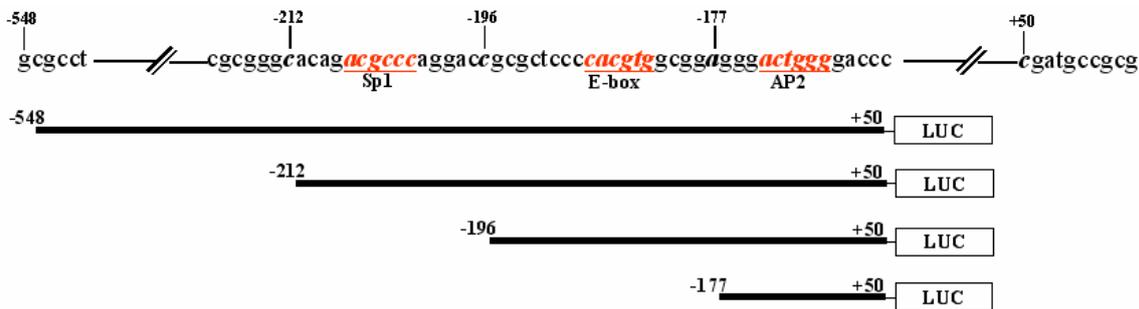


圖 4 分析重組 FIP-gts 對肺癌細胞 A549 染色體終端酶反轉錄酶轉錄活性的影響。A549 細胞轉染含 tert 上游 548bp 的 promoter 接合螢光報告基因 (luciferase)，分別處理不同濃度 reFIP-gts 24h，收集細胞萃取液進行 luciferase 活性分析。而轉錄活性分析經過與分析 β -galactosidase 活性校正。並與轉染 PGL3 basic plasmid 比較並以倍數方式表示。每張圖形為三次重複實驗平均及標準差。以 Student S-test 統計分析與未處理細胞比較，星號(*)代表顯著意義， $P < 0.05$ 。

(A)



(B)

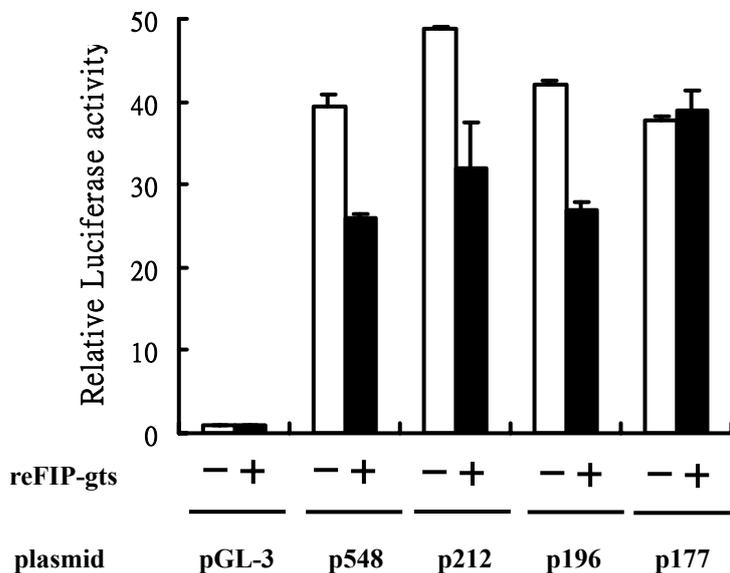


圖 5 分析重組 FIP-gts 在 h.TERT 啟動子區域上的分子調控。

(A)hTERT-luciferase 不同 deletion 組合的構築之圖示。LUC, luciferase; Numbers refer to the number of bases upstream (-) or downstream (+) of the ATG initiation codon of the hTERT gene.

(B)具有不同 response element 的 htert promoterg 受 FIP-gts 之調控。分別處理不同濃度 reFIP-gts 24h，收集細胞萃取液進行 luciferase 活性分析。而轉錄活性分析經過與分析 β -galactosidase 活性校正。並與轉染 PGL3 basic plasmid 比較並以倍數方式表示。每張圖形為三次重複實驗平均及標準差。以 Student S-test 統計分析與未處理細胞比較，星號(*)代表顯著意義， $P < 0.05$ 。

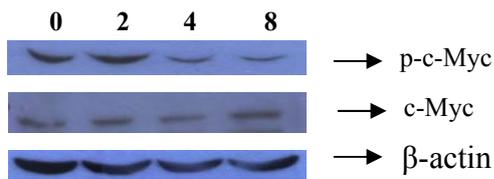


圖 6 分析重組 FIP-*gts* 對肺癌細胞 A549 中 c-Myc 蛋白表現的影響。

A549 細胞經處理 2, 4 or 8 μ g/mL 的 FIP-*gts* 48 小時，Western blot 分析 phospho-c-Myc and c-Myc proteins 表現量。以 β -actin protein 當作注入蛋白量的標準化。

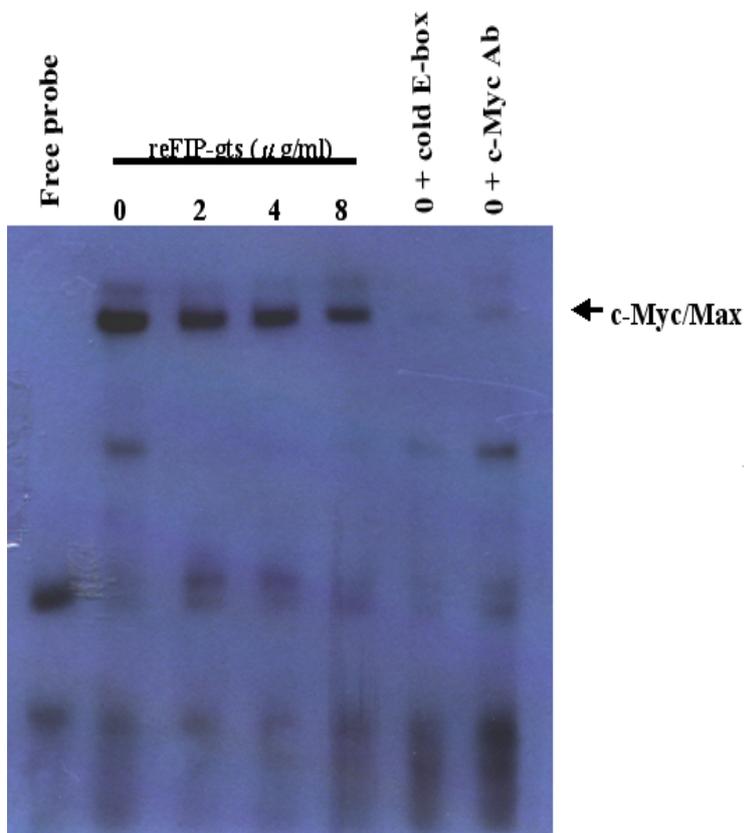


圖 7 分析重組 FIP-*gts* 對肺癌細胞 A549 中 c-Myc 與 E-box 區域結合能力的影響。

收集處理過不同濃度 reFIP-*gts* 48 小時後的核萃取液及 biotin 標誌的 E-box DNA 序列進行 EMSA 分析，Lane 6 未 biotin 標誌的 E-box 作競爭 Lane 7 含 anti-c-Myc antibody 作競爭。

