

編號：CCMP93-RD-051

# 利用基因晶片系統以及體外細胞培養系統 來分析中草藥冬蟲夏草對人類樹突狀細胞 免疫功能的影響

許志樸

國立清華大學

## 摘 要

中草藥在臨床上的運用已經累積了數千年的經驗。然而，以科學實驗的方法來驗證其對細胞或生物體的影響，仍處於起步階段。近年來，由於醫學科技的進步，中草藥科學化已經是時代的趨勢。為達到此一目標，首先要建立一套以科學實驗的方法，來評鑑中草藥在中醫典籍內所標示的療效。本計畫之目的是要利用基因晶片技術及樹突狀細胞為實驗架構的體外細胞培養系統，來分析中草藥冬蟲夏草對人類樹突狀細胞免疫功能的影響。希望藉著觀察冬蟲夏草對樹突狀細胞免疫功能及其基因表現圖譜之影響，進一步有效且可靠的了解冬蟲夏草對增強免疫功能的可能藥理機制。

本研究計畫將建立樹突狀細胞的體外細胞培養系統，並利用此一系統來分析中草藥冬蟲夏草對樹突狀細胞免疫功能的影響。在第一年我們如預期順利的建立人類樹突狀細胞體外培養系統、冬蟲夏草的鑑定、冬蟲夏草的品質控管、冬蟲夏草對樹突狀細胞分化與成熟之影響及人類基因晶片的測試實驗。由樹突狀細胞的細胞表面分子得知，冬蟲夏草水萃液會抑制未成熟的樹突狀細胞及成熟過程的樹突狀細胞表面分子的表現。未來將進一步利用其他的免疫實驗確認結果並配合基因表現圖譜的結果找出其相關免疫調控機制。

關鍵詞：中草藥、基因晶片技術、樹突狀細胞、體外細胞培養系統、基因表現、  
抗原呈獻細胞、冬蟲夏草、單核球細胞

Number: CCMP93-RD-051

# Using Gene Chip Technology and *ex vivo* Cell Culture System to Analyze the Dendritic Cell Immune Function Affected by Chinese Herbal Medicine-*Cordyceps Sinensis*

Jih-Yang Hsu

National Tsing-Hua University

## ABSTRACT

The Chinese herbal medicine has been administered in traditional Chinese therapy for well over two thousand years. However, the pharmacological study of Chinese herbs on biological objects is still in its infancy. Modernization of Chinese medicine has provoked great interests from bio-medical researchers globally. The objective of this proposal is to analyze the dendritic cell immune function affected by *Cordyceps sinensis* using cDNA micorarray technology and dendritic cell-based *ex vivo* cell culture system. The effects of *Cordyceps sinensis* on cellular immune responses will be measured. Specifically, global gene expression profiles on dendritic cells will be examined with or without the influence of *Cordyceps sinensis*. These gene expression patterns will be further analyzed in order to study possible pharmacological mechanisms mediated by *Cordyceps sinensis*.

In the first year, we have established a dendritic cell-based *ex vivo* cell culture system and accomplished phylogenic as well as chemical fingerprinting analysis on *Cordyceps* sample. The effects of *Cordyceps sinensis* water extract on the differentiation/maturation process of dendritic cells were being examined. We also performed a mock experiment to test the microarray system. Our results indicate that *Cordyceps sinensis* may inhibit the differentiation process of immature and

mature dendritic cells. In the second and third year, we will carry out more related biological experiments and microarray experiments to further confirm this observation and try to characterize its underlying molecular mechanisms.

Keywords : Chinese herbal medicine, gene chip technology, dendritic cells, *ex vivo* cell culture system, gene expression, antigen-presenting cells, *Cordyceps sinensis*, monocytes

## 壹、前言

中草藥及天然藥物對於治療疾病與維護人體健康的重要性，已經逐漸被海內外醫界所肯定。例如美國於1947年通過的Dietary Supplement Health and Education Act中放寬對天然藥物的管制，此舉使得美國保健品市場上，各種含有天然藥物成份的商品大量湧現，也蔚為一股美國大眾食品保健的風潮。中醫累積了數千年的經驗，在治療疾病上有其獨特的理論體系。中醫對人體的臨床經驗比現今使用之動物實驗更能直接地反應出藥物對人體的作用。近年來傳統中國醫藥愈來愈受到一般民眾所認同以及政府與醫界的肯定和重視，為了加速中草藥之科學化，應利用現代科技來加以評鑑，客觀地對於各種中草藥，以科學實驗的方法來衡量其對人體生理的影響，使其更能對整個人類社會產生貢獻。

冬蟲夏草為傳統中藥中之珍貴藥材。清初（西元1757年）吳儀洛所編《本草從新》中首見“冬蟲夏草”之名。至西元1832年趙學敏所編《本草綱目拾遺》中對冬蟲夏草有更詳盡的補述，謂其“出四川江油縣化林坪，夏為蟲冬為草，長三寸許，下跌六足，脰以上絕類蠶，羌俗採為上藥，功與人參同”又如“冬在土中身活如老蠶，有毛能動，至夏則毛出土上，連身俱化為草，若不取至冬復化為蟲”。而將其視為神奇的生物，並且是高貴的藥材。其實所謂的“冬蟲夏草”、“蟬花”、“白殭蠶”等都是昆蟲寄生性真菌，近代學者將其列於冬蟲夏草屬（*Cordyceps*）中<sup>(1)</sup>。一般所謂的冬蟲夏草專指寄生於蝙蝠蛾幼蟲所形成的蟲菌複合體。真菌於冬季前後侵入蟲草蝙蝠蛾的幼蟲體內，待菌絲充滿體內，蟲即僵死。到了夏季，從死蟲的頭頂上長出菌座，露出土面，地下部分則形成菌核。子實體和菌核採收後就是名貴的滋補品—冬蟲夏草。

冬蟲夏草屬於子囊菌綱，麥角菌目，麥角菌科，蟲草屬。棲息於西藏、喜馬拉雅山、四川省、雲南省、青海省等內地，標高3,000-4,000公尺高山地帶，寄生於蝙蝠蛾的幼蟲。每年5-8月間雪溶後自土中掘出帶菌柄之蟲體，除去外層泥土，曬乾再噴酒使軟，整理平整後，用微火烘乾，而成中醫視為滋肺補腎的高貴藥材。謂其味甘酸、性平、氣香、無毒、入肺腎二經。有強壯、益肺腎、補精髓、保肺氣、實理、補虛、解毒、止血、化痰之功效<sup>(1)</sup>。

根據近年來對於冬蟲夏草於藥理及臨床應用方面的研究，可歸納為下列幾個大項：

## 一、肝臟方面

冬蟲夏草菌絲水萃液可誘發小鼠肝臟的代謝呈現高能量狀態<sup>(2)</sup>。冬蟲夏草可以增加小鼠肝臟重量，增強肝臟內 Kupffer 細胞之吞噬功能與產生細胞激素 IL-1 (interlukin-1)、干擾素 IFN (interferon) 和腫瘤壞死因子 TNF (tumor necrosis factor) 的能力<sup>(3,4)</sup>。冬蟲夏草具有增強免疫力之功能，故被應用於治療慢性 B 型肝炎病患，有改善肝功能，並可顯著提高患者血漿白蛋白、降低  $\gamma$  球蛋白 ( $\gamma$ -globulin) 的含量<sup>(5)</sup>。

## 二、腎臟方面

冬蟲夏草可保護腎小管近曲小管，減輕 gentamycin 之毒性，使 aminoglycoside 和 kanamycine 所引起之急性腎衰竭獲得改善<sup>(6,7)</sup>。冬蟲夏草能夠改善 adriamycin 引起的腎功能衰竭，包含促進血紅素的生成、改善蛋白尿症狀，對減輕腎絲球的傷害相當有幫助<sup>(8)</sup>。冬蟲夏草能夠改善腎衰竭病患的腎功能、降低腎組織損傷、促進腎小管細胞的再生與腎小管的過濾功能的修復，冬蟲夏草對腎臟的功效可能與下列機制有關：1. 促進老鼠的腎上腺皮質細胞分泌腎上腺皮質酮 (corticosterone)<sup>(9)</sup>；2. 保護腎小管細胞鈉幫浦的活性<sup>(7)</sup>；3. 減輕腎小管細胞脂質過氧化的損傷和鈣離子之含量<sup>(7)</sup>。

冬蟲夏草能減輕 cyclosporin A 對腎移植病人的腎毒性<sup>(10)</sup>，並可以促進脾臟的淋巴球分裂，增加其產生細胞激素 IL-2 之能力。隨著腎功能的改善，其 BUN (blood urea nitrogen) 與肌酸酐 (creatinine) 的量也明顯下降<sup>(11)</sup>。

## 三、心血管系統方面

冬蟲夏草富含腺嘌呤核苷 (adenosine)，能抑制血小板的凝集<sup>(12)</sup>。在兔子體內試驗中，冬蟲夏草的醇萃液能抑制主動脈內皮表面形成血栓與血小板凝集之數目<sup>(13)</sup>。冬蟲夏草的萃提取物可降低大白鼠之血壓，並增加血管舒張活性和動脈血流量<sup>(14-15)</sup>，冬蟲夏草的醇萃液物可增強天竺鼠對鈉鉀離子幫浦抑制劑 (ouabain) 所產生心律不整之耐受性<sup>(16)</sup>。

## 四、抗癌作用方面

冬蟲夏草及其萃提取物的成份具有冬蟲夏草素 (cordycepin)、冬蟲夏草多醣體 (polysaccharides) 和其它腫瘤生長抑制劑，故冬蟲夏

草及其萃取物能夠抑制多種腫瘤細胞株 K562、Vero、Wish、Calu-1、Raji、Jurkat、WM-1341、HL-60、RPMI-8226 及 U937 等細胞的生長<sup>(17-19)</sup>。老鼠植入腹水癌細胞株 Ehrlich ascites carcinoma 細胞和纖維瘤細胞株 Meth A fibrosarcoma 細胞後，冬蟲夏草水萃液可提高老鼠之存活率與存活時間<sup>(20)</sup>。冬蟲夏草可以活化殺手細胞（NK cells），減少黑色素瘤細胞株 B16 細胞在老鼠肺臟形成之株落<sup>(21)</sup>。在 C57BL/6J 老鼠植入肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma 細胞及黑色素瘤細胞株 B16 細胞後，冬蟲夏草水萃液能夠降低這些腫瘤細胞株轉移到肝臟的程度<sup>(22)</sup>。冬蟲夏草可以增加人類肝腫瘤細胞株 HA22T/VGH 細胞表面分子 MHC-II（major histocompatibility complex class-II）的表現量，並提高免疫系統監測癌細胞的效率<sup>(23)</sup>。

## 五、免疫系統方面

### （一）對淋巴球的影響

冬蟲夏草能夠增強老鼠周邊血液與脾臟的幫助型 T 細胞（T helper cell）的數量及存活率，提高幫助型 T 細胞對抑制型 T 細胞（T suppressor cell）數量的比值，降低幫助型 T 細胞受免疫抑制劑 prednisolone acetate 及 cyclophosphamide 造成之免疫抑制作用<sup>(24)</sup>。可延長小鼠同種異體移植（allograft）皮膚的存活期，其效果類似 cyclosporin A<sup>(25)</sup>

### （二）對吞噬細胞的影響

冬蟲夏草水萃液可促進人類周邊血液單核細胞（human blood mononuclear cells, PBMC）產生干擾素 IFN- $\gamma$ 、腫瘤壞死因子 TNF- $\alpha$  和細胞激素 IL-1，其可以活化人類單核球細胞株 U937 細胞的成熟分化與吞噬能力<sup>(17)</sup>。冬蟲夏草水萃液也可活化肝臟巨噬細胞 Kupffer 細胞吞噬功能與產生細胞激素 IL-1、干擾素 IFN 和腫瘤壞死因子 TNF<sup>(5)</sup>。

### （三）對自然殺手細胞（NK cells）的影響

提高自然殺手細胞的活性，拮抗 cyclophosphamide 所引起之自然殺手細胞活性降低<sup>(24)</sup>。冬蟲夏草能提高小鼠、正常人、白血病患者體內自然殺手細胞活性，增加淋巴球細胞表面分子 CD16 的表現與毒殺白血病細胞株 K562 細胞之能力<sup>(26)</sup>。

## 六、自體免疫疾病方面

冬蟲夏草可以抑制 NZB/NZW F1 及 MRL-lpr/lpr 品系之小鼠產生 anti-dsDNA 抗體，增加小鼠的存活率，延長小鼠壽命，並減輕自體免疫系統侵犯腎臟的程度<sup>(27-28)</sup>。

## 七、呼吸系統方面

冬蟲夏草甲醇萃取液能抑制細胞激素 IL-1 $\beta$ 、細胞激素 IL-6、腫瘤壞死因子 TNF- $\alpha$ 、細胞激素 IL-8 mRNA 之表現，並活化細胞激素 IL-12 和干擾素 IFN- $\gamma$  mRNA 的表現，使體內免疫反應偏向細胞性免疫反應，抑制 B 細胞產生 IgG2、IgE<sup>(29)</sup>。促進支氣管平滑肌擴張，並抑制血小板凝集，使氣喘發作時的幫助型 T 細胞第二型 (Th2) 免疫反應轉向幫助型 T 細胞第一型 (Th1)，降低氣喘的嚴重程度，具有平喘的效果<sup>(30,31)</sup>。

## 八、抗氧化方面

增加老鼠超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的生成與活性，促丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 生成量降低，SOD 具有清除自由基與降低脂質過氧化的功能，故能保護細胞、避免組織傷害<sup>(32)</sup>。

## 九、其他相關的功能

冬蟲夏草萃取液對正常小鼠有降低血糖、降低血清中膽固醇與三酸甘油酯含量的功能<sup>(33)</sup>。抗菌作用方面，冬蟲夏草對結核桿菌的生長有抑制效果<sup>(34)</sup>。冬蟲夏草能活化老鼠睪丸間質細胞株 Leydig 細胞分泌睪固酮 (testosterone)<sup>(35)</sup>。

樹突狀細胞 (dendritic cell, DC) 最早是在真皮中被發現，稱之為蘭氏細胞。直到 1973 年 Steinman 等人從老鼠的脾臟、淋巴結、Peyer's patch 分離出一種較大之星形細胞，由相位差顯微鏡下可觀察到此細胞具有許多偽足，因其特殊之形態，故將之命名為樹突狀細胞<sup>(36,37)</sup>。1992 年，Inaba 等人發現了從小鼠的骨髓培養出大量樹突狀細胞的技術後<sup>(38)</sup>，吸引了研究人員大量的投入樹突狀細胞的研究，使得樹突狀細胞的功能在過去幾年內已被逐漸解開謎團。

樹突狀細胞為最有效率的抗原呈現細胞，其能有效的刺激 B 細胞及 T 細胞反應，對於引發專一性免疫反應有著舉足輕重的影響力。樹突狀細胞在免疫系統中扮演著警衛的角色，平時以具有高度吞噬能力之未成熟狀態存在於周邊組織中待命，一但組織遭遇到外來病原菌侵

襲，便會將入侵之細菌、病毒等外來物吞噬後將之帶到附近之淋巴器官，同時樹突細胞亦會因為病原菌所釋出之一些物質例如脂多醣（Lipolysaccharide, LPS）之影響而達到成熟的狀態<sup>(39, 40)</sup>，而樹突狀細胞將處理後之抗原呈現，進而活化淋巴器官中之抗原專一性輔助型及毒殺型 T 細胞，最後達成清除病原菌之目的<sup>(40)</sup>。

在樹突狀細胞分化的過程中，大致上可以分成三階段，樹突狀細胞的先驅細胞（precursor DC, pre-DC）、未成熟的樹突狀細胞（immature DC, iDC）以及成熟的樹突狀細胞（mature DC, mDC）。在不同的階段中，除了細胞外觀上的差異外，在表面的 MHC-I、II、costimulatory factor 等表面分子的表現、抗原吞噬能力、與細胞移動相關的接受器及分泌細胞激素的情形等也會不同<sup>(40)</sup>。大致上，未成熟的樹突狀細胞其吞噬抗原的能力較高，而成熟的樹突狀細胞其與細胞活化及抗原呈現能力有關的 MHC 及 costimulatory 分子的表現較未成熟的樹突狀細胞高<sup>(40)</sup>。所以一般對樹突狀細胞的鑑定是以抗體作細胞表面分子的染色，以流式細胞儀分析。其中常用來鑑定樹突細胞的細胞表面分子，例如：與細胞黏附及活化功能有關的 CD11c、CD80 及 CD86；與抗原呈現的活性有關的 MHC-II 及接受 T 細胞活化訊號的 CD40<sup>(40, 41)</sup>。樹突狀細胞細胞表面標記的表現，代表著功能上的差異，如抗原的吞噬、細胞的遷移、抗原的呈現，都可藉由細胞表面標記的表現來做評估<sup>(40)</sup>。目前證實由人類血液中的單核球（monocyte）可以經由體外的培養，利用 granulocyte/macrophage colony-stimulating factor（GM-CSF）及細胞激素 IL-4 刺激，可使單核球衍生為樹突狀細胞<sup>(42)</sup>。

近年來，生醫科技在高速自動化分析（High-Throughput Analysis）上有快速的進展，再加上人類基因體計畫已接近完成，使得許多原本在傳統生化實驗室中需要數年的時間才有可能得到的資訊，利用高速自動化分析則可以在數日之內取得同樣，甚至更多的資訊，其中基因晶片系統就是屬於這一類的分析系統。生物體絕大多數的生理現象都可說是和基因表現有密不可分的關係，例如：各類酵素及賀爾蒙之產生與否或其產量的多寡等與其基因之表現量有密切關係。更進一步說，細胞的分化（例如：皮膚細胞長成皮膚、肝臟細胞長成肝臟、甚至人之胚胎細胞長成人等）、細胞的正常分裂與否（例如：正常細胞與癌細胞）、細胞受外來刺激（例如：藥物、毒素、微生物、輻射及其它之物理或化學之刺激）之反應，以及生物體組織之其它健康狀



況，都是由其相關的基因之表現控制。換句話說，我們可由研究其相關的基因之表現而得知上述問題之端倪。傳統研究基因表現的方法一次只能同時研究最多十來個基因之表現行為，對於人類約三萬多個基因而言，要找出相關的基因，傳統的方法的確猶如大海撈針一般。而使用基因晶片研究基因表現，則一次能同時研究上萬個基因之表現行為。

根據文獻及先前研究的經驗，冬蟲夏草的水萃液對於免疫系統的巨噬細胞具有活化的作用<sup>(43)</sup>。然而，樹突狀細胞與巨噬細胞同為抗原呈現細胞且抗原呈現能力遠高於巨噬細胞，目前尚無利用冬蟲夏草於樹突狀細胞的研究報告，遂本計畫的目的是要利用現代化的尖端生物科技—基因晶片技術和目前相當受重視的免疫系統調節細胞—樹突狀細胞，為實驗架構，來分析中草藥珍品—冬蟲夏草對細胞免疫功能的影響。本計畫的執行結合了國內對於冬蟲夏草、微量分析、樹突狀細胞、基因晶片技術及生物統計等各相關領域的專家與權威，希望藉著觀察冬蟲夏草對樹突狀細胞基因表現圖譜的影響，進一步有效且可靠的了解，冬蟲夏草對調節樹突狀細胞免疫功能之可能機制，針對冬蟲夏草於樹突狀細胞之免疫調節功效做全盤性的評估。

## 貳、材料與方法

### 一、人類單核球衍生之樹突狀細胞 (human monocyte-derived dendritic cells) 的培養

本方法乃是參考 Romani 等人的作法經修飾後所得<sup>(42)</sup>。樹突狀細胞的來源是由人體血液中的單核球細胞分化衍生而來。本計畫向新竹捐血中心申請研究用全血，利用密度 1.077 的白血球分離液 (Ficoll Paque, Amersham Pharmacia)，將全血中的周邊血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 分離。人體周邊血液單核細胞取出之後，利用紅血球溶解液 (red blood cell lysis buffer, eBioscience)，去除殘餘的紅血球，再使用緩衝溶液 (Hanks's balanced salt solution, Gibco) 清洗三次。利用磁珠抗體分離 (Magnetic cell sorting, MACS) 的方法，使用人類單核球分離試劑 (human monocyte isolation kit II, Miltenyi Biotec) 純化人類單核球，最後利用流式細胞儀確認單核球的純度 >90% (圖一)。純化後的人類單核球，以無菌操作技術將細胞植入 24 孔細胞培養皿內，濃度為  $5 \times 10^5$  個/well，然後加入細胞激素 IL-4 (Recombinant human interleukin-4, Peprotec) 1000 unit 和 GM-CSF (Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor, Peprotec) 500unit 置於細胞培養箱內培養，37°C，5% CO<sub>2</sub>。每隔兩天換一次培養液。其中單核球經過細胞激素 IL-4 和 GM-CSF 培養六天之後，即被誘導分化為未成熟樹突狀細胞。

### 二、樹突狀細胞形態觀察與血液學染色

純化後的人類單核球，加入細胞激素 IL-4 1000unit 和 GM-CSF 500unit 置於細胞培養箱內培養，37°C，5% CO<sub>2</sub>。培養過程中，每天利用相位差顯微鏡 (Nikon) 觀察，並使用數位相機拍攝其細胞形態。在培養第六天，將樹突狀細胞取出，作成細胞抹片。利用劉氏染色 (Liu's stain) 後，使用顯微鏡 (Zeiss) 油鏡觀察，並使用數位相機拍攝其細胞形態。

### 三、冬蟲夏草樣本的品種鑑定

本計畫所使用的天然冬蟲夏草是購自台北市迪化街的中藥舖 (圖二)。18S rRNA 基因具有高複製數目以及在物種演化過程中具高保留性。因此，18S rRNA 基因常被用來做為物種鑑定分析。本計畫協同主持人許瑞祥教授實驗室採用 18S rRNA 基因定序的方法來鑑定我

們手邊所有樣品的菌種。首先將冬蟲夏草以液態氮處理後磨成粉狀，萃取冬蟲夏草的 DNA，利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 將 18S rRNA 基因中 NS3-NS6 區間的核酸序列放大 (NS3: GCAAGTCTGGTG CCAGCAGC C; NS6: GCATCACAGACCTGTT ATTGCCTC)<sup>(44)</sup>，依據最近幾篇期刊論文的結論，冬蟲夏草無性世代的菌種只有一種：中國被毛孢 (*Hirsutella Sinensis*)<sup>(44)</sup>。因此利用 rRNA 基因的限制酶 (*Cfo-I*) 水解多型性圖譜 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析，並將產物萃出 DNA 進行基因序列定序。最後結果將與中國被毛孢的基因序列比對。

#### 四、冬蟲夏草樣本的萃取

我們使用品種鑑定後無誤的冬蟲夏草，先置放於防潮乾燥箱三天去除水份，利用研磨機將冬蟲夏草磨成粉末。取 2g 的冬蟲夏草樣本粉末溶於 40mL 的去離子水中，置於 90°C 水浴中高溫萃取 2 小時。待樣品冷卻後，離心 600g，15 分鐘，取出上清液，使用 0.45μm 的濾膜過濾後再使用 0.22μm 的濾膜過濾。把過濾後的冬蟲夏草水萃液分裝至 1.5mL eppendorf 管內，置於零下 20°C 的冰箱內保存。

#### 五、冬蟲夏草樣本的成份分析與批次鑑定

##### (一) 利用感應耦合電漿質譜儀進行冬蟲夏草樣本的微量元素分析

中草藥方劑所含之重金屬元素，多屬微量之範圍。一般而言，中草藥物質成份的組成十分複雜。因此分析工作要有相當的準確度與精密度。本計畫協同主持人楊末雄教授實驗室在微量元素分析上相當有經驗，我們將同批購入的冬蟲夏草樣本隨機取出，利用密閉式微波消化技術將冬蟲夏草樣本消化後之樣品溶液，添加 2mL 之雙氧水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 進行趕酸至近乾，再以 1% HNO<sub>3</sub> 稀釋至 25mL，再進行上機測定 (ICPMS Metals Analysis)。

##### (二) 利用分光光譜儀進行冬蟲夏草水萃液的吸收光譜分析

我們利用上述冬蟲夏草樣本的萃取方法，分別隨機取出冬蟲夏草樣本進行萃取。萃取後的冬蟲夏草水萃液，利用連續波長分光光譜儀 (HITACHI U-2100) 進行吸收光譜分析，所選用的波段為 190nm-500nm (波長 500nm-1100nm 並無顯著的吸收光譜)。

### (三) 利用高效液相層析儀進行冬蟲夏草水萃液的吸收光譜分析

我們利用上述冬蟲夏草樣本的萃取方法，分別隨機取出冬蟲夏草樣本進行萃取。萃取後的冬蟲夏草水萃液，利用高效液相層析儀（HITACHI autosampler L-7200, HITACHI UV-detector L-7400, HITACHI Pump L-2130）進行吸收光譜分析，所選用的波長為 230nm。

## 六、細胞毒性試驗-MTT assay

本方法乃是參考 Joo 的作法經修飾後所得<sup>(45)</sup>，在活的細胞中，其細胞質有許多還原物質，會進行氧化還原反應。利用此一特性，將 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 加入後，會被活的細胞粒線體還原成紫色的 fomazan，再用 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 打破細胞並溶解 fomazan 後，使用 96 孔微盤分光光譜儀進行分析，以 570nm 測其吸光值，並扣除 630nm 測得的背景值。吸光值越大，表示活的細胞越多，以此評估細胞活性。

由上述人類單核球衍生之樹突狀細胞的培養，在培養第六天，將細胞轉置於 96 孔微盤細胞培養皿內，濃度為  $2 \times 10^5$  個/200 $\mu$ L/well，然後分別加入細菌的脂多醣 (Lipolysaccharide, LPS) 及不同濃度的冬蟲夏草水萃液，置於細胞培養箱內培養 48 小時，37°C，5% CO<sub>2</sub>。在刺激第 44 小時，移除一半培養液 (100 $\mu$ L)，加入 MTT 0.5mg/mL，再置於細胞培養箱內培養 4 小時後加入 DMSO 打破細胞並溶解 fomazan 後，使用 96 孔微盤分光光譜儀 (Molecular Devices Versa Max) 進行分析，以 570nm 測其吸光值，並扣除 630nm 測得的背景值。此外，我們以不予處理的樹突狀細胞，利用序列稀釋的方法，製作標準曲線。最後將所得的吸光度轉換為細胞數進行分析。

## 七、利用流式細胞儀分析細胞表面標記的表現

本實驗參照 Takei 等人的作法經修飾後所得<sup>(46)</sup>。樹突狀細胞培養第六天加入細菌的脂多醣及不同濃度的冬蟲夏草水萃液刺激。刺激兩天後進行表面抗原分析，將樹突細胞濃度調整至  $2 \times 10^6$  個/mL，取上述溶液 100 $\mu$ L 加入可辨識各種表面抗原之帶有 FITC 或是 PE 的專一性抗體 (FITC-anti Human CD40; FITC-anti Human CD205; PE-anti Human HLA-DR; PE-anti Human CD11c; PE-anti Human CD80; PE-anti Human CD86, eBioscience)，於 4°C 之下反應 40 分鐘，後加入 3mL 1x

PBS 清洗三次，最後將每管細胞溶於 0.5mL 1x PBS 中，以流式細胞儀 (CyFlow, Partec) 進行分析。

## 八、人類基因晶片的製備與測試 (Mock) 實驗

本實驗室擁有台灣第一套 Brown 型基因晶片系統，由史丹佛大學 P. Brown 所發展的系統，以我們目前的製程可以在一片 22mm×75 mm 大小的玻片上點印超過三萬點的探針 (圖三)。本實驗室以 48 根狹縫針 (圖四) 進行點印工作，目前將 7,334 種克隆 (clone)，以每種四重覆的方式點印在玻片 (GAPS-II, Corning) 上，另外我們加入已知紅綠螢光比值的外加指示控制基因 (doping control) 作為品管控制，所以目前我們的基因晶片共有 32,448 點的探針。其詳盡方法如下：

### (一) 玻片備製與探針基因點印

由於 DNA 為帶負電物質，利用電荷正負相吸原理我們使用 GAPS-II 玻片，其將玻片上鍍有一層帶正電的 amino group，再藉由機械手臂將已經由 PCR 放大的探針 DNA 點印在玻片上。每點約含有 0.5-2.5nL 產物，直徑約為 120-200 $\mu$ m，玻片上點印的密度約可達 6,000spots/cm<sup>2</sup>。點印完成的玻片先進行預掃描 (Pre-scan)，以確認點印結果的好壞。玻片會經由蒸氣處理 (Rehydration)，使得所點印的 DNA 分佈能更均勻且點的邊界能更圓滑，之後再經過 UV-交叉結合 (UV-Crosslinking) 的處理，增強 DNA 探針與玻片的黏合。最後再經由阻斷結合溶液 (Blocking Solution) 將玻片表面上未點印 DNA 部分的正電中和，以避免在雜合過程中造成非專一性的結合 (Non-Specific Binding)。

### (二) 標的 cDNA 製備、螢光標定與雜合反應

本實驗利用非直接標記 (Indirect labeling) 的方法進行螢光標定，此方式可分為兩步驟進行 (圖五)。首先將樣品之 RNA 抽出後加入帶有 3 DNA 擷取序列 (Capture sequence) 的引子與寡腺苷鏈 (Poly-A) 互補，進行反轉錄合成一股新的 cDNA。接著將合成之 cDNA 覆蓋在已點上探針基因的玻片上，置入特製雜合反應夾 (Hybridization Chamber) 內，於 65°C 水浴槽中反應 16 小時，使得標的物與探針充分完成雜合反應。核酸序列互補的基因會藉由氫鍵鍵結配對，未配對的標的物再經由清洗步驟將之去

除，此處為第一次雜合反應。由於合成之標的 cDNA 帶有 3 DNA 擷取序列 (Capture sequence)，我們再加入與擷取序列互補之序列與之進行第二次雜合反應，而此擷取序列的互補序列上額外帶有鍵結 45 個螢光染劑分子的小包裹。接著洗去未配對的染劑。

### (三) 影像掃描

反應完成之玻片經清洗處理後，利用掃描系統 (Axon Scanner) 掃描玻片上的螢光訊號 (圖六)。此系統包含一組紅光雷射 (波長 635nm) 激發 Cy5 螢光染劑，一組綠光雷射 (波長 532nm) 激發 Cy3 螢光染劑。激發出來的螢光分別以紅光濾光片 (波長 670nm) 測量 Cy5 發散光強度、綠光濾光片 (波長 570nm) 測量 Cy3 發散光強度。最後以光電倍增管 (PMT) 將光訊號轉成電訊號而放大成直接讀取之訊號。

### (四) 影像數據分析

取得影像檔之後，利用 GenePix Pro 5.0 軟體 (Axon Instruments) 進行圈點工作並分析影像檔。接著利用所得的資料，選取表現有顯著差異的基因。首先去除被軟體標示為壞點的基因，再依強度值依賴之區域權數迴歸配適處理 (Intensity Dependent Lowess Fit Normalization)，繼而以片中的針與針之關係來進行間距歸一化 (Within Slide Pinwise Scaling Normalization)；其次，排除訊雜比 (signal to noise ratio, SNR)；在此定義 SNR 為 (訊號值-背景值)/背景值的標準差) 小於 2 的基因。此分析條件依實際數據的不同，將做適當調整。

### (五) 測試 (Mock) 實驗

樹突狀細胞培養八天後，將樹突狀細胞離心 600g，10 分鐘，去除上清液。以 10mL 滅菌之 PBS 緩衝液清洗樹突狀細胞兩次。離心 600g，10 分鐘，去除上清液。加入 1mL TRIzol 試劑 (Invitrogen)，經振盪後離心。加入 0.2mL 氯仿 (chloroform)，振盪後離心 13,000g，20 分鐘，4°C。取出上清液置於新的 1.5mL eppendorf 管內，加入 0.5mL 異丙醇 (isopropanol)，混合均勻後離心 13,000g，30 分鐘，4°C，去除上清液。加入 1mL 75%酒精清洗，離心 13,000g，10 分鐘，4°C，去除上清液並將沉澱物乾燥。加入 10μL RNase-free water 重新溶解沉澱物，以 RNease kit (Qiagen) 進行純化在以 Agilent RNA 6000 LabChip kit (Agilent)

來鑑定 RNA 之品質（圖七）。將 total RNA 各取 5 $\mu$ g 利用上述（二）非直接標記（Indirect labeling）的方法進行螢光標定，標定上不同的螢光分子。之後，加入製備好的基因晶片進行雜合反應。將反應完成的玻片，經過清洗除去未參與雜合反應的標的物。最後利用上述（三）影像掃描及（四）影像數據分析的方法進行分析。

## 九、統計方法

利用 SPSS 套裝軟體，採 ANOVA 分析冬蟲夏草樣本，其重金屬含量各組之間的差異。採 paired student's T test 來分析樹突狀細胞標面標記的表現，其實驗組與對照組之間的差異。當  $p < 0.05$  表示兩組間有顯著差異，而  $p < 0.01$  表示兩組間有極顯著差異。

## 參、結果

本計畫規劃為三年計畫，在第一年的目的是要建立冬蟲夏草對於樹突狀細胞之影響評估平台及人類基因晶片的製備。以下為第一年執行的結果。

### 一、建立人類樹突狀細胞的體外培養系統

樹突狀細胞的來源是由人體血液中的單核球細胞分化衍生而來。本計畫向新竹捐血中心申請研究用全血，利用白血球分離液將全血中的周邊血液單核細胞分離後，再利用磁珠抗體分離純化人類單核球，單核球經過細胞激素 IL-4 和 GM-CSF 培養六天之後，即被誘導分化為未成熟樹突狀細胞。其細胞形態由相位差顯微鏡觀察，在培養第三天時就可以看到的樹突狀 (dendritic) 的偽足出現，隨著培養天數增加，樹突狀的形態越明顯 (圖八)。在樹突狀細胞培養第六天，利用血液學染色，可清楚的看到樹突狀的偽足 (圖九)，其為樹突狀細胞特有的細胞形態。

根據文獻指出，脂多醣會促使未成熟的樹突狀細胞轉為成熟的樹突狀細胞，而樹突狀細胞可藉由細胞表面標記的表現來判定其成熟度與功能性的表現<sup>(40)</sup>。本實驗用來評估樹突狀細胞所使用的細胞表面標記有 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205、MHC-II 等。在樹突狀細胞培養第六天時，分別給予或不給予脂多醣 1 µg/mL 刺激兩天，對樹突狀細胞的細胞表面標記進行比較。在給予脂多醣的刺激下，樹突狀細胞在 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205、MHC-II 等細胞表面標記的表現皆呈現增強 (圖十)，表示脂多醣促使未成熟的樹突狀細胞趨於成熟。

### 二、冬蟲夏草樣本的品種鑑定

18S rRNA 基因具有高複製數目以及在物種演化過程中具高保留性。因此，18S rRNA 基因常被用來做為物種鑑定分析。本計畫協同主持人許瑞祥教授已完成定序不同冬蟲夏草品種的 18S rRNA 基因中 NS3-NS6 區間的核酸序列，並已將核酸序列資料登錄於基因資料庫 (EMBL)<sup>(44)</sup>。本實驗所購置的冬蟲夏草樣本也採用 18S rRNA 基因定序的方法來鑑定我們手邊所有樣品的菌種。我們萃取冬蟲夏草的 DNA，利用聚合酶連鎖反應將 18S rRNA 基因中 NS3-NS6 區間的核酸序列放大，進行 18S rRNA 基因 PCR 產物之限制酶 (*Cfo-I*) 水解



多型性圖譜分析（圖十一），並將產物萃出 DNA，進行基因序列定序。最後結果與中國被毛孢的基因序列比對（圖十二）。結果顯示本實驗所購置的冬蟲夏草樣本與中國被毛孢的基因序列有相同性，證實本實驗所購置的冬蟲夏草樣本是中國被毛孢。

### 三、冬蟲夏草樣本的萃取

根據文獻記載，冬蟲夏草的服用方式，一般而言有下列數種：（一）磨成粉末吞食；（二）水煎服食；（三）浸酒飲用；（四）與雞鴨魚肉燉食。由此可初步瞭解，在臨床上無論是使用極性或是非極性溶液去萃取都有使用的例子<sup>(47)</sup>。此外，期刊論文上對於研究冬蟲夏草時所採取的萃取方式包括了以極性溶液、非極性溶液、或是兩者都採用。我們採用了高溫水萃的方式來提取冬蟲夏草的成份是基於以下的原因：1.冬蟲夏草對人類免疫力的提昇效用，是目前十分受重視的研究課題。而且我們所使用的樹突狀細胞是最有效力的抗原呈現細胞，其不僅為先天性免疫的一員，而且對於啟始專一性的後天性免疫有著舉足輕重的影響力，可以針對冬蟲夏草對免疫調節的功能做深入的探討。2.多醣類化合物常被認為與提昇免疫力有相關，我們希望提取出來的成份是以多醣類化合物為主。高溫水萃是常被用來提取多醣類化合物的萃取方式，且在多篇期刊論文上也用此方式來提取冬蟲夏草的成份。因此，我們採用高溫水萃的方式萃取冬蟲夏草樣本。

我們使用品種鑑定後無誤的冬蟲夏草，先將冬蟲夏草磨成粉末，然後取冬蟲夏草樣本粉末與去離子水以 1：20 的比例，置於 90°C 水浴中高溫萃取 2 小時。待樣品冷卻後，離心取出上清液，使用 0.45 $\mu\text{m}$  的濾膜過濾後再使用 0.22 $\mu\text{m}$  的濾膜過濾。把過濾後的冬蟲夏草水萃液，冰凍於零下 20°C 的冰箱內保存，以供之後的實驗使用。

### 四、冬蟲夏草樣本的成份分析與批次鑑定

中草藥的品管控制十分重要，本實驗的目的是要建立一套冬蟲夏草樣本有機/無機化合物標準圖譜，希望可以藉此作為日後冬蟲夏草樣本及冬蟲夏草水萃液的品管控制的標準。

我們分別使用感應偶合電漿質譜儀進行冬蟲夏草樣本的微量元素分析；利用分光光譜儀進行冬蟲夏草水萃液的吸收光譜分析；利用高效液相層析儀進行冬蟲夏草水萃液的吸收光譜分析。下面就各個結果分別介紹：

（一）我們將冬蟲夏草樣本經過磨粉以及密閉式微波消化技術的前處

理之後，使用感應耦合電漿質譜儀來偵測其中所含的微量金屬元素含量。我們將本計畫所購置的冬蟲夏草樣本，隨機選取五份，量測微量元素 Al、Mg、Zn、As、Co、Cr、Ni、Pb、Sr、Mn、Cu、Cd、Na、Ca、Fe 等十五種。結果顯示，本計畫所購置的冬蟲夏草樣本，隨機選取幾份其微量金屬元素含量間並無顯著差異（表一）。

(二) 為了對不同萃取批次得到的水萃液之相對濃度進行初步且簡單的檢測，我們使用分光光譜儀的這種線性關係的特性來偵測不同批次萃取的冬蟲夏草水萃液間的相對濃度差異。分光光譜儀的吸收光譜並無法對複雜的化合物組成做精確的定性分析。然而在相同及固定溶液距離的前提下，在適當的濃度範圍內其吸光度與溶液濃度呈線性關係。

譜儀的吸收光譜分析，並將萃取過的冬蟲夏草粉末再進行第二次萃取做為控制組。結果得知，三份冬蟲夏草樣本其分光光譜儀的吸收光譜是一致的。上述結果顯示本實驗所使用的萃取方法，對於不同萃取批次所造成的濃度差異是可以忽略的。此外，由萃取第二次的結果可以看出，吸收光譜在波長 190nm-500nm 的主要有機成份，大多已經在第一次萃取時即萃出（圖十三）。

(三) 高效液相層析法因具有分離完全、樣品用量少、靈敏度高、再現性好、分析時間短及操作簡單等優點。因此為達到有效監控冬蟲夏草水萃液品質與來源的穩定性，本計畫利用高效液相層析法配合 UV/Vis 測定技術，進行冬蟲夏草水萃液內各種主要有機成份吸收圖譜分析，針對冬蟲夏草樣本其來源的穩定性與一致性，及冬蟲夏草水萃液的品質穩定性，更進一步的確認。

本實驗將購置的冬蟲夏草樣本隨機選取三份分次萃取，利用高效液相層析法配合 UV/Vis 測定技術，進行冬蟲夏草水萃液內各種主要有機成份吸收圖譜分析，並將萃取過的冬蟲夏草粉末再進行第二次萃取做為控制組。結果得知，三份冬蟲夏草樣本其高效液相層析儀的吸收光譜是一致的，再次證實本次購置的冬蟲夏草樣本其來源的穩定性與一致性，及冬蟲夏草水萃液的品質穩定性。由萃取第二次的結果可以看出，高效液相層析儀的吸收光譜，在波長 230nm 的主要有機成份，大多已經在第一次萃取時即萃出（圖十四）。

## 五、冬蟲夏草水萃液與脂多醣的劑量選擇

本計畫使用的樹突狀細胞，其來源是由人體血液中的單核球細胞分化衍生而來，其與一般細胞株不同，屬於正常的免疫細胞，所以在冬蟲夏草水萃液與脂多醣的劑量選擇是一個很重要的環節。因為樹突狀細胞屬於正常的免疫細胞，故冬蟲夏草水萃液與脂多醣的劑量必須要以不影響樹突狀細胞的存活率與活性為基準。我們利用細胞毒性試驗—MTT assay，針對不同的冬蟲夏草水萃液劑量進行篩選。結果顯示，冬蟲夏草水萃液在 5、10、15、20 $\mu$ L/mL 的濃度下，不影響樹突狀細胞的存活率 (>90%)；脂多醣在 1 $\mu$ g/mL 的濃度下，不影響樹突狀細胞的存活率 (>90%)；脂多醣 1 $\mu$ g/mL 及不同濃度的冬蟲夏草水萃液 5、10、15、20 $\mu$ L/mL 的濃度下，也不影響樹突狀細胞的存活率 (>90%) (圖十五)。

## 六、冬蟲夏草水萃液對於樹突狀細胞分化成熟之影響

在樹突狀細胞分化的過程中，大致上可以分成三階段，樹突狀細胞的先驅細胞、未成熟的樹突狀細胞以及成熟的樹突狀細胞。在不同的階段中，除了細胞外觀上的差異外，在表面的 MHC-I、II、costimulatory factor 等表面分子的表現、抗原吞噬能力與細胞移動有關的接受器及分泌細胞激素的情形等也會不同<sup>(40)</sup>。本實驗的單核球經過細胞激素 IL-4 和 GM-CSF 培養六天之後，即被誘導分化為未成熟樹突狀細胞，未成熟的樹突狀細胞其吞噬抗原的能力較高。根據文獻記載，脂多醣會使未成熟的樹突狀細胞成熟，而轉型為成熟的樹突狀細胞，成熟的樹突狀細胞其與細胞活化及抗原呈現能力有關的 MHC 及 costimulatory 分子的表現較未成熟的樹突狀細胞高。所以一般對樹突狀細胞的鑑定是以抗體作細胞表面分子的染色，以流式細胞儀分析。其中常用來鑑定樹突細胞的細胞表面分子，例如：與細胞黏附及活化功能有關的 CD11c、CD80 及 CD86；與抗原呈現的活性有關的 MHC-II，及接受 T 細胞活化訊號的 CD40<sup>(40, 41)</sup>。本實驗的目的在探討冬蟲夏草水萃液對於樹突狀細胞分化成熟之影響，我們分別給予或不給予脂多醣及不同劑量的冬蟲夏草水萃液，利用流式細胞儀分析與細胞黏附及活化功能有關的 CD11c、CD80 及 CD86；與抗原呈現的活性有關的 MHC-II；與接受 T 細胞活化訊號的 CD40 及樹突狀細胞專一的細胞表面分子 CD205，分別評估冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞的影響及對樹突狀細胞分化成熟的影響。

在冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞的影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu$ L/mL，刺激兩天後，以流式細胞儀分析樹突狀細胞的細胞表面分子，CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II。結果顯示，冬蟲夏草水萃液會抑制 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II 等樹突狀細胞表面分子的表現，不論是表現的百分比 (%Gate) 及表現的平均螢光強度 (Mean)，隨著濃度增加其抑制細胞表面分子的表現越顯著 (表二)。表現的百分比 (%Gate) 代表被螢光抗體染上的細胞比例，而表現的平均螢光強度 (Mean) 則代表被螢光抗體染上的細胞其表現的平均螢光強度。因為樹突狀細胞其細胞表面分子的量會因活性而有所改變，所以我們利用 %Gate X Mean 算出其總螢光強度，並將不同劑量冬蟲夏草水萃液處理的細胞與未處理的細胞做比較，計算其總螢光強度 (%Gate X Mean) 的比值。我們可由總螢光強度 (%Gate X Mean) 的比值清楚的看到冬蟲夏草水萃液會抑制 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II 等樹突狀細胞表面分子的表現 (表二)。

在冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟的影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予脂多醣 1 $\mu$ g/mL 及不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu$ L/mL，刺激兩天後，以流式細胞儀分析樹突狀細胞的細胞表面分子，CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II。結果顯示，冬蟲夏草水萃液會抑制 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II 等樹突狀細胞表面分子的表現，不論是表現的百分比 (%Gate) 及表現的平均螢光強度 (Mean)，隨著濃度增加其抑制細胞表面分子的表現越顯著 (表三)。由總螢光強度 (%Gate X Mean) 的比值清楚的看到冬蟲夏草水萃液會抑制 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II 等樹突狀細胞表面分子的表現 (表三)。

## 七、人類基因晶片的製備與測試 (Mock) 實驗

我們取培養八天的樹突狀細胞，抽取 total RNA 經過純化後，將 total RNA 利用非直接標記 (Indirect labeling) 的方法進行螢光標定，標定上不同的螢光分子 (一份以 Cy3 標記；另一份以 Cy5 標記)，並加入製備好的基因晶片進行雜合反應。將反應完成的玻片，經過清洗除去未參與雜合反應的標的物。最後經影像掃描、圈點、去除壞點及歸一化分析之結果來判斷晶片之系統可信度。

由於是使用相同的 RNA 來進行雜合反應，因此我們預期其基因表現量會相等而呈現黃色亮點較多的情形，其由初步的影像掃描結果可得，另外明顯的紅、綠色亮點為我們加入已知紅綠螢光比值的外加指示控制基因（圖十六）。接著以 GenePix Pro 5.0 軟體以訊號值大於背景值加 3 倍標準差（+3 SD）的標準圈出點，接著再以訊號大於紅光與綠光背景值 5 倍、每一個點之各像素（Pixels）訊號強度之變異係數（CV%）小於 100%及點的直徑大於  $75\mu\text{m}$  為篩選標準而定義出有表現之點。散點圖（Scatter Plot）常用來表示晶片的雙色螢光比例訊息。從 Mock 實驗的 M-A 圖（圖十七）可以很明白的看出不同螢光比例點之分佈情形。M-A 圖中之縱軸代表基因表現差異（log ratio）；橫軸代表基因表現高低。在進行歸一化處理之後，幾乎所有的基因其表現差異皆小於 2 倍（log ratio 小於 1），這些數據顯示本系統誤差甚小。

## 肆、討論

### 一、建立人類樹突狀細胞體外培養系統

樹突狀細胞為最有效率的抗原呈現細胞，其能有效的刺激 B 細胞及 T 細胞反應，對於引發專一性免疫反應有著舉足輕重的影響力<sup>(40)</sup>。所以利用樹突狀細胞作為研究冬蟲夏草的免疫調節機制十分恰當，其不僅可以評估先天性免疫的調節功效，對於引發專一性的後天性免疫反應的調節功效也可以評估。但是樹突狀細胞與一般細胞株不同，在培養上有著許多限制與困難，原因如下：（一）細胞數量上的限制。一般樹突狀細胞的研究，大多採用老鼠骨髓衍生之樹突狀細胞與人類單核球衍生之樹突狀細胞兩種。在老鼠骨髓衍生之樹突狀細胞培養方面，不會有細胞數量上的問題，因為同品系的骨髓細胞可以相互培養在一起。但是在人類單核球衍生之樹突狀細胞培養方面，來源是人的全血，因為個體間的差異，血型與白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA)的不同，所以無法將不同人的細胞相互培養在一起。以目前可以得到的全血最大量為 500 毫升，其中單核球約佔 4-8%<sup>(48)</sup>，數目極少，相對的樹突狀細胞的量自然也就不多。（二）繁瑣的培養過程。人類單核球衍生之樹突狀細胞的培養，首先要從全血中分離白血球，再利用磁珠抗體分離純化人類單核球，單核球經過細胞激素 IL-4 和 GM-CSF 培養六天之後，才能得到未成熟的樹突狀細胞。與一般細胞株的培養方式相較，人類單核球衍生之樹突狀細胞的培養不僅花費高、費時外，其繁瑣的培養過程也會影響最後得到的細胞數量與品質的穩定度。為了克服以上的困難，我們與國內在培養人類單核球衍生之樹突狀細胞很有經驗的中央研究院生農所所長楊寧蓀教授實驗室，相互交換實驗上的經驗，並與國外數個實驗室討論樹突狀細胞培養的實驗的步驟與經驗的交流。最終，本實驗室經過多次的修正，並結合國內外學者專家的經驗，目前本實驗室已經可以在樹突狀培養上，維持一個穩定的細胞數量與品質，這對日後進一步實驗的準確性與穩定度是很重要的關鍵。

### 二、天然冬蟲夏草樣本的品質管制

在本計畫中所使用的天然冬蟲夏草樣本是購自台北市迪化街的中藥房，為了確認這些樣本的基原以及品質的均一性，我們進行了以下數種分析，包括：（一）天然冬蟲夏草樣本的基原鑑定。（二）以

分光光譜儀、高效液相層析儀和感應耦合電漿質譜儀來分析樣品的有機以及無機化合物圖譜。

### (一) 天然冬蟲夏草樣本的基原鑑定

中草藥的基原鑑定是最基本也是最重要的品質管制步驟。本計畫中所使用的天然冬蟲夏草樣本，已經由中國醫藥大學中國藥學研究所張永勳所長的生藥鑑定，認為是真確的冬蟲夏草樣本無誤。為了確定其菌種，我們請合作實驗室台灣大學生物科技系許瑞祥教授進行 18S rRNA 基因的序列比對，確認樣品的菌種為中國被毛孢。由中草藥生藥學專家以及菌種序列鑑定的結果，我們可以確認本計畫中所使用的天然冬蟲夏草樣本是真品。

### (二) 冬蟲夏草樣本有機以及無機化合物圖譜

為了有效管制樣本的品質以及瞭解不同萃取批次間的均一性，我們對冬蟲夏草樣本微量金屬元素含量及所含的化合物圖譜進行分析。結果顯示冬蟲夏草冬蟲夏草水萃液的品質穩定性。希望可以藉此作為日後冬蟲夏草樣本及冬蟲夏草水萃液的品質管控制的標準。其中在微量金屬元素的結果方面，根據本計畫審查委員的意見指出本實驗所使用的冬蟲夏草樣本，其砷含量中高於 4  $\mu\text{g/g}$ 。砷在自然界中分佈很廣，其地殼豐度為 1.8mg/kg，在世界土壤中一般為 0.1mg/kg-58mg/kg，中國土壤背景值為 9.6mg/kg<sup>(49)</sup>。根據文獻中指出，中醫藥的微量元素含量會因為產地、部位、氣候環境等因素有很顯著的差異<sup>(50)</sup>。根據本實驗所使用的冬蟲夏草樣本的結果，其砷含量為 4 $\mu\text{g/g}$ （表一），此濃度與其他中草藥相較並不算高<sup>(50)</sup>。成年人對砷的日常攝入量為 0.04mg-1.4 mg，砷中毒劑量為 5mg/day-50mg/day<sup>(49)</sup>。以此劑量做為參考，冬蟲夏草的食用若不是極大劑量的使用，對於人體應無砷中毒的疑慮。

## 三、冬蟲夏草水萃液對於樹突狀細胞分化成熟的影響

未成熟的樹突狀細胞在人體內扮演警衛的角色，四處巡邏，當外來病原入侵時，未成熟的樹突狀細胞會將外來的病原吞噬，而轉移（migration）到淋巴器官進行抗原呈現，促使淋巴細胞增生，對抗入侵的病原。在轉移到淋巴器官進行抗原呈現的同時，未成熟的樹突狀細胞會轉型為成熟的樹突狀細胞。未成熟的樹突狀細胞以及成熟的樹突狀細胞。除了細胞外觀上的差異外，在表面的 MHC-I、II、

costimulatory factor 等表面分子的表現、抗原吞噬能力與細胞移動有關的接受器及分泌細胞激素的情形等也會不同<sup>(40)</sup>。

本計畫所使用的樹突狀細胞是由單核球經過細胞激素 IL-4 和 GM-CSF 被誘導分化而得，其為未成熟樹突狀細胞<sup>(42)</sup>。根據文獻記載，脂多醣會使未成熟的樹突狀細胞成熟，轉型為成熟的樹突狀細胞。我們分別給予或不給予脂多醣及不同劑量的冬蟲夏草水萃液，評估冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞的影響及對樹突狀細胞分化成熟的影響。最後利用以流式細胞儀分析樹突細胞 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II 等表面分子的表現。根據結果顯示，冬蟲夏草水萃液會抑制未成熟的樹突狀細胞及成熟過程的樹突狀細胞，其 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II 等表面分子的表現，隨著濃度增加其抑制細胞表面分子的表現越顯著。

CD11c、CD80 及 CD86 與細胞黏附及活化功能相關；CD80、CD86 及 MHC-II 與抗原呈現的活性相關；CD40 與接受 T 細胞活化訊號相關；CD205 則為樹突狀細胞專一的細胞表面分子。藉由此結果可以初步得知：（一）由細胞表面分子 CD205、CD11c 的結果可以確定本實驗所培養的樹突狀細胞純度很高。（二）冬蟲夏草水萃液會抑制未成熟的樹突狀細胞及成熟過程的樹突狀細胞其細胞活性及抗原呈現的能力。但是這些結果仍需進一步實驗驗證，在第二年的計畫中，我們將利用其他的免疫實驗進一步確認結果並找出其相關機制。

#### 四、基因晶片的製備與測試（Mock）實驗

我們利用樹突狀細胞進行基因晶片的測試實驗，利用非直接標記的方法進行螢光標定，將相同的 total RNA 標定上不同的螢光分子，與製備好的基因晶片進行雜合反應。結果顯示本實驗系統之可信度足以進行日後之正式實驗。

本計畫全程為三年計畫，本年度我們已經依預期進度，順利的完成預定工作項目。我們驗證了本次購置的冬蟲夏草樣本其來源的穩定性與一致性，以及冬蟲夏草水萃液的品質穩定性，並且完成了人類基因晶片的製備與樹突狀細胞的測試（Mock）實驗。根據我們以流式細胞儀分析樹突細胞的細胞表面分子的初步結果，發現冬蟲夏草水萃液對於樹突狀細胞 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205 及 MHC-II 等細胞表面分子有明顯抑制的現象。但是我們仍須更進一步的探討冬蟲夏草對於樹突狀細胞免疫調控的影響。未來在第二年的計畫中，我



們將利用基因晶片針對該劑量進行測試，找出微陣列實驗挑選出了最佳的實驗劑量，並以統計學的方法來設計基因晶片的實驗。統計學上最佳的實驗設計方法可以減少基因晶片使用的數目及增加實驗準確性。並且我們將加入一些免疫實驗，如酵素結合免疫吸附分析法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）分析冬蟲夏草對於未成熟及成熟樹突狀細胞分泌細胞激素的量；利用混合淋巴球反應（mixed lymphocyte reaction, MLR）分析冬蟲夏草對於樹突狀細胞抗原呈現功能的影響等，進一步由細胞生理學的層面來探討樹突狀細胞的免疫調控機制。

## 伍、結論與建議

本計畫第一年，我們完成了以下幾項目標：一、建立人類樹突狀細胞的體外培養系統。二、完成冬蟲夏草的水萃液之製備、品種鑑定。三、完成冬蟲夏草的成份分析，建立有機/無機化合物的標準化品管控制。四、完成評估冬蟲夏草對於樹突狀細胞分化成熟之影響。五、執行人類基因晶片的製備，並完成系統與技術的測試實驗。在此成果報告中，我們已將上述的結果一一呈現。

本計畫全程為三年計畫，其總目標為是要利用現代化的尖端生物科技—基因晶片技術和目前相當受重視的免疫系統調節細胞—樹突狀細胞，為實驗架構，來分析中草藥珍品—冬蟲夏草對細胞免疫功能的影響。希望藉著觀察冬蟲夏草對樹突狀細胞基因表現圖譜的影響，進一步有效且可靠的了解，冬蟲夏草對調節樹突狀細胞免疫功能之可能機制，針對冬蟲夏草於樹突狀細胞之免疫調節功效做全盤性的評估。第一年我們完成了建立冬蟲夏草對於樹突狀細胞之影響評估平台，並初步完成了cDNA微陣列系統的穩定性測試。第二年我們將利用進一步的免疫實驗技術從細胞生理學的層面來探討樹突狀細胞的免疫調控機制，並以統計學的方法來設計基因晶片的實驗。統計學上最佳的實驗設計方法可以減少基因晶片使用的數目及增加實驗準確性。希望能在接下來第三年的計畫中，順利以基因晶片技術針對冬蟲夏草於樹突狀細胞之免疫調節功效做全盤性的評估。

本計畫核定執行經費遠低於實際所需經費，對於基因晶片的實驗及人類樹突狀細胞的培養都屬於昂貴的實驗，雖然目前的經費狀況並不是很充裕，我們仍然以其他經費來支援，盡力完成既定之研究內容。特此報告說明，再次感謝貴委員會支助。

## 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-051 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. 許瑞祥。人工培養冬蟲夏草屬之性質及代謝之探討。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。1984。
2. Manabe N, Sugimoto M, Azuma Y, et al. Effects of the mycelial extract of cultured *Cordyceps sinensis* on *in vivo* hepatic energy metabolism in the mouse. *Jpn J Pharmacol* 1996; 70: 85-88.
3. Liu P, Zhu J, Huang Y, et al. Influence of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. and rat serum containing same medicine on IL-1, IFN and TNF produced by rat Kupffer cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1996; 21: 367-369.
4. Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, et al. Activation of *in vivo* Kupffer cell function by oral administration of *Cordyceps sinensis* in rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 505-508.
5. Zhou L, Yang W, Xu Y, et al. Short-term curative effect of cultured *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. Mycelia in chronic hepatitis B. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1990; 15: 53-55.
6. Li LS, Zheng F, Liu ZH. Experimental study on effect of *Cordyceps sinensis* in ameliorating aminoglycoside induced nephrotoxicity. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1996; 16: 733-737.
7. Zhen F, Tian J, Li LS. Mechanisms and therapeutic effect of *Cordyceps sinensis* (CS) on aminoglycoside induced acute renal failure (ARF) in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1992; 12: 288-291.
8. 李立仁。冬蟲夏草菌萃液對大白鼠腎上腺皮質細胞皮質酮分泌功能及脂肪滴形態的影響。國立台灣大學解剖學研究所碩士論文。1996。
9. Wang SM, Lee LJ, Lin WW, et al. Effects of a water-soluble extract of *Cordyceps sinensis* on steroidogenesis and capsular morphology of lipid droplets in cultured rat adrenocortical cells. *J Cell Biochem* 1998; 69: 483-489.
10. Xu F, Huang JB, Jiang L, et al. Amelioration of cyclosporin nephrotoxicity by *Cordyceps sinensis* in kidney-transplanted recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 142-143.
11. Cheng Q. Effect of *Cordyceps sinensis* on cellular immunity in rats with chronic renal insufficiency. *Chung-Hua I Hsueh Tsa Chin (Chinese Medical*

- Journal) 1992; 72: 27-29.
12. Ikumoto T, Sasaki S, Namba H, et al. Physiologically active compounds in the extracts from tochukaso and cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria*. *Yakugaku Zasshi* 1991; 111: 504-509.
  13. Zhao Y. Inhibitory effects of alcoholic extract of *Cordyceps sinensis* on abdominal aortic thrombus formation in rabbits. *Chung-Hua I Hsueh Tsa Chin (Chinese Medical Journal)* 1991; 71: 612-615.
  14. 張佩靖。人工培養冬蟲夏草菌絲對大白鼠血管作用之探討。國立陽明大學藥理學研究所碩士論文。1996。
  15. Chiou WF, Chang PC, Chou CJ, et al. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of *Cordyceps sinensis*. *Life Sci* 2000; 66: 1369-1376.
  16. Mei QB, Tao JY, Gao SB, et al. Antiarrhythmic effects of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1989; 14: 616-618.
  17. Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, et al. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci* 1997; 60: 2349-2359.
  18. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, et al. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest* 1994; 12: 611-615.
  19. Bok JW, Lerner L, Chilton J, et al. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 1999; 51: 891-898.
  20. Yoshida J, Takamura S, Yamaguchi N, et al. Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines. *Jpn J Exp Med* 1989; 59: 157-161.
  21. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, et al. Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin Med J* 1992; 105: 97-101.
  22. Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, et al. Activation of *in vivo* Kupffer cell function by oral administration of *Cordyceps sinensis* in rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 505-508.

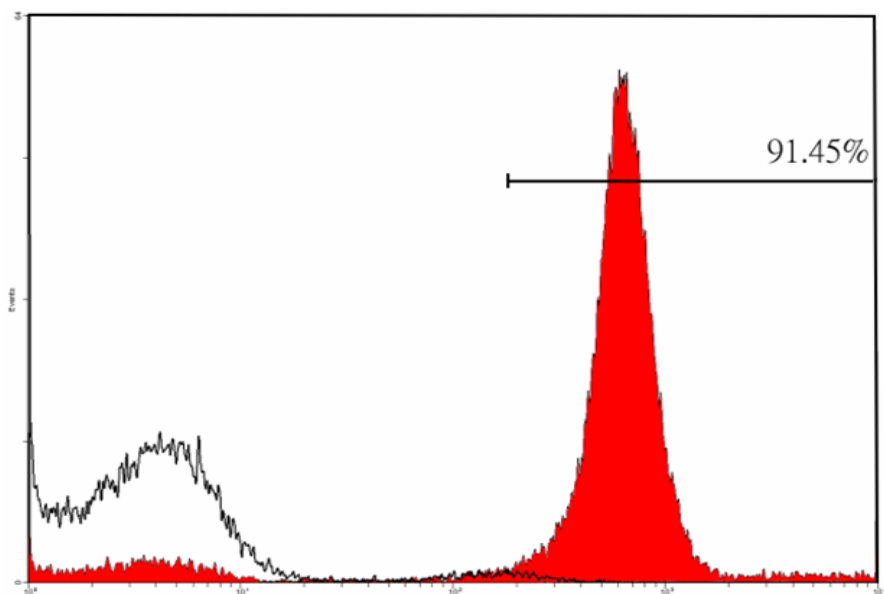
23. Chiu JH, Ju CH, Wu LH, et al. *Cordyceps sinensis* increases the expression of major histocompatibility complex class II antigens on human hepatoma cell line HA22T/VGH cells. *Am J Chin Med* 1998; 26: 159-170.
24. Chen GZ, Chen GL, Sun T, et al. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin Med J* 1991; 104: 4-8.
25. Zhu XY, Yu HY. Immunosuppressive effect of cultured *Cordyceps sinensis* on cellular immune response. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1990; 10: 485-487.
26. Liu C, Lu S, Ji MR. Effects of *Cordyceps sinensis* on *in vitro* natural killer cells. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1992; 12: 267-269.
27. Chen JR, Yen JH, Lin CC, et al. The effects of Chinese herbs on improving survival and inhibiting anti-ds DNA antibody production in lupus mice. *Am J Chin Med* 1993; 21: 257-262.
28. 楊令瑤。研究臺灣兒童狼瘡性腎炎及以冬蟲夏草單純天然物 H1-A 治療之可行性及機制。國立陽明大學臨床醫學研究所碩士論文。1999。
29. Kuo YC, Tsai WJ, Wang JY, et al. Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. *Life Sci* 2001; 68: 1067-1082.
30. 許毓芬。篩選可抑制血小板活化因子以治療氣喘之冬蟲夏草天然物。國立陽明大學傳統醫藥學研究所碩士論文。1994。
31. 錢震莊。以棕色挪威鼠為模式探討冬蟲夏草天然物對卵白蛋白誘發氣喘後期氣管收縮與脂多醣體誘發急性肺傷害之療效。輔仁大學生物學系碩士論文。1995。
32. Shin KH, Lim SS, Lee SH, et al. Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp. *Ann NY Acad Sci* 2001; 928: 261-273.
33. Kiho T, Yamane A, Hui J, et al. Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 294-296.
34. Kneifel H, Konig WA, Loeffler W, et al. Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. *Arch Microbiol* 1977; 113: 121-130.

35. Huang BM, Hsu CC, Tsai SJ, et al. Effects of *Cordyceps sinensis* on testosterone production in normal mouse Leydig cells. *Life Sci* 2001; 69: 2593-2602.
36. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-1162.
37. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974; 139: 380-397.
38. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176: 1693-1702.
39. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996; 184: 1413 - 1424.
40. Baumann J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
41. Hartgers FC, Figdor CG, Adema GJ. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol Today* 2000; 21: 542-545.
42. Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196(2): 137-151.
- 43 Koh JH, Yu KW, Suh HJ, et al. Activation of macrophages and the intestinal immune system by an orally administered decoction from cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2002; 66:407-411.
44. 陳志昇、許瑞祥。利用 18S 核糖體基因限制酶水解多型性圖譜鑑別冬蟲夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 標本之研究。中國農業化學會誌。1999。37(4); 533-545。
45. Joo HG. Altered maturation of dendritic cells by taxol, an anticancer drug. *J Vet Sci* 2003; 4(3): 229-234.
46. Takei M, Tachikawa E, Hasegawa H, Lee JJ. Dendritic cells maturation promoted by M1 and M4, end products of steroidal ginseng saponins

metabolized in digestive tracts, drive a potent Th1 polarization. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(3): 441-452.

47. 雷載權、張廷模等。中華臨床中藥學下卷。人民衛生出版社。1998。1694-1697。
48. 何敏夫。血液學。合記圖書出版社。1999。87-90。
49. 王將克等。生物地球化學。淑馨出版社。2000。303-14。
50. 曹治權等。微量元素與中醫藥。中國中醫藥出版社。1993。122-213。

## 柒、圖表

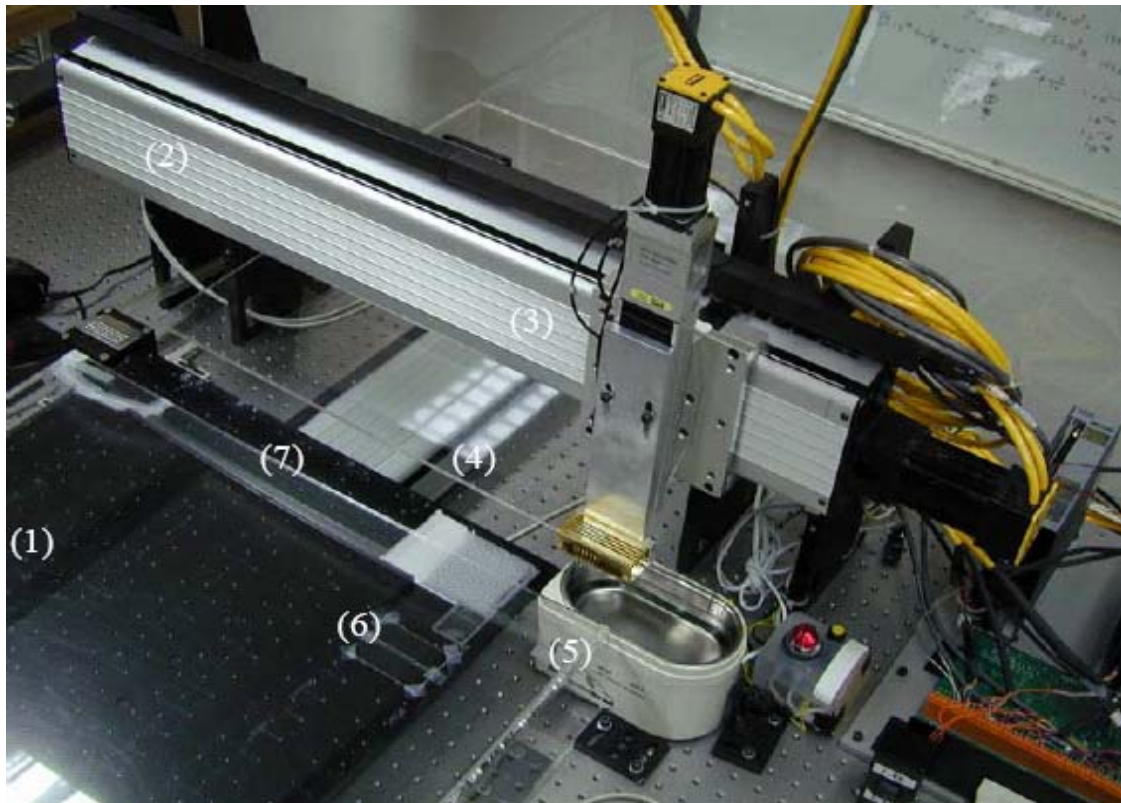


圖一 利用流式細胞儀分析經由磁珠分離系統純化後，人類血液單核球的純度。紅色的部分為單核球 (CD14<sup>+</sup>)，白色的部份為 isotype control。利用磁珠分離系統純化後，可以得到超過 90% 以上純度的單核球。

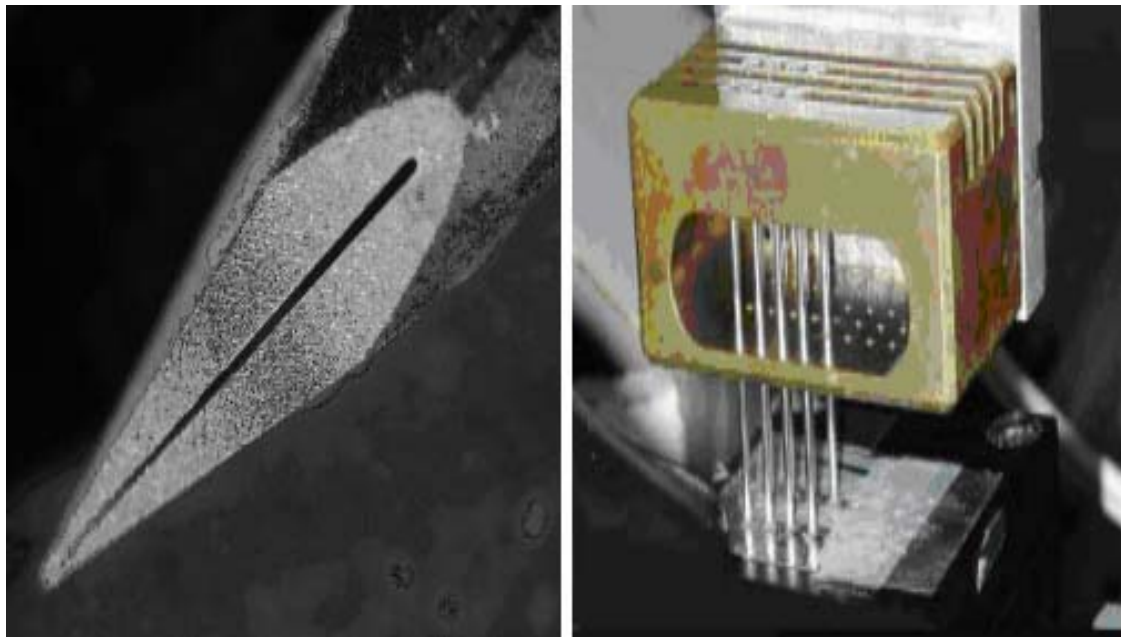


圖二 本計畫所使用的天然冬蟲夏草是購自台北市迪化街的中藥舖。

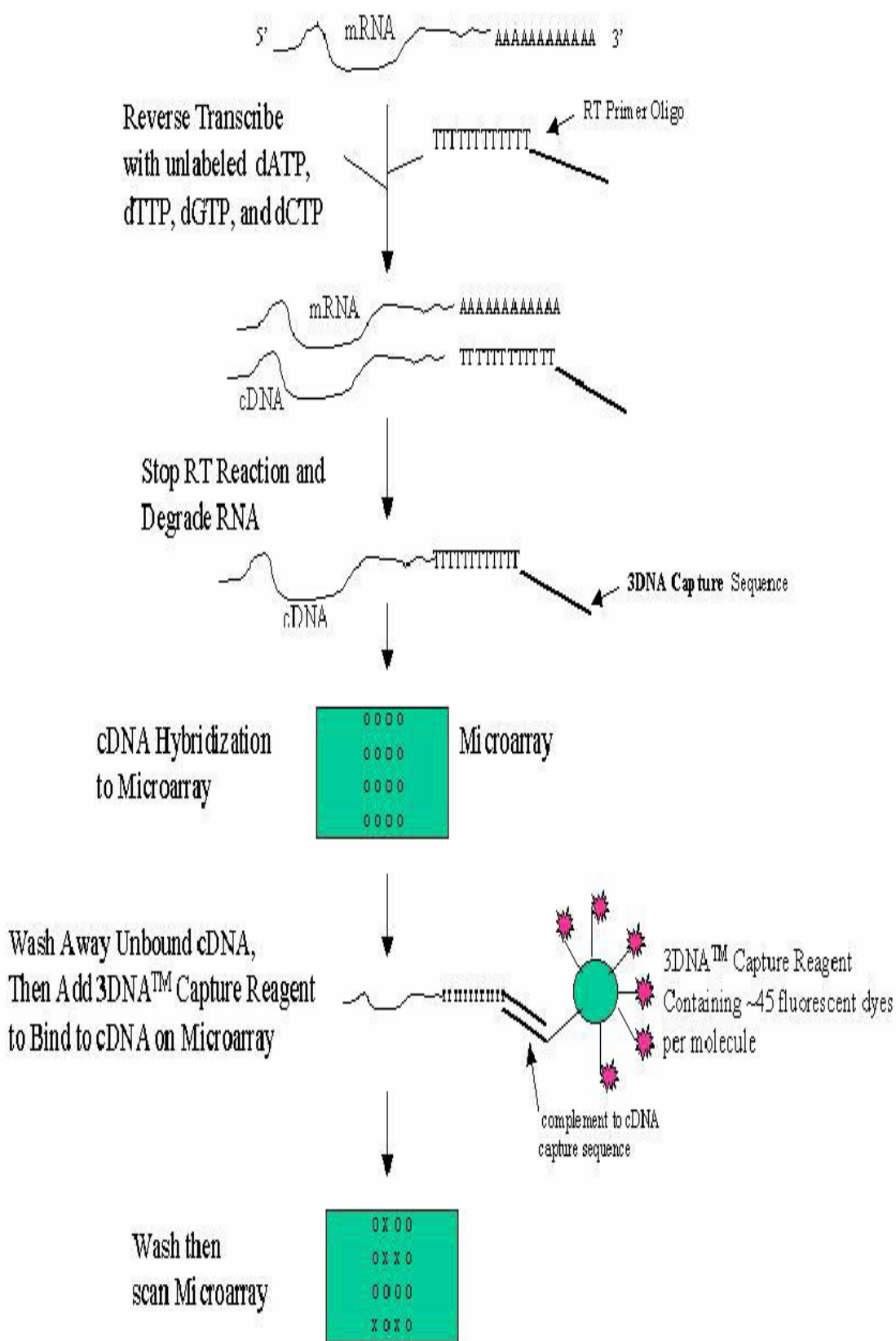




圖三 Brown 型基因晶片系統，以目前的技術可以在一片 22mm×75mm 大小的玻片上點印超過三萬點的探針。(1)X 軸平面(2)Y 軸(3)Z 軸(4)針座(5)超音波震盪器(6)玻片(7)384 孔盤。



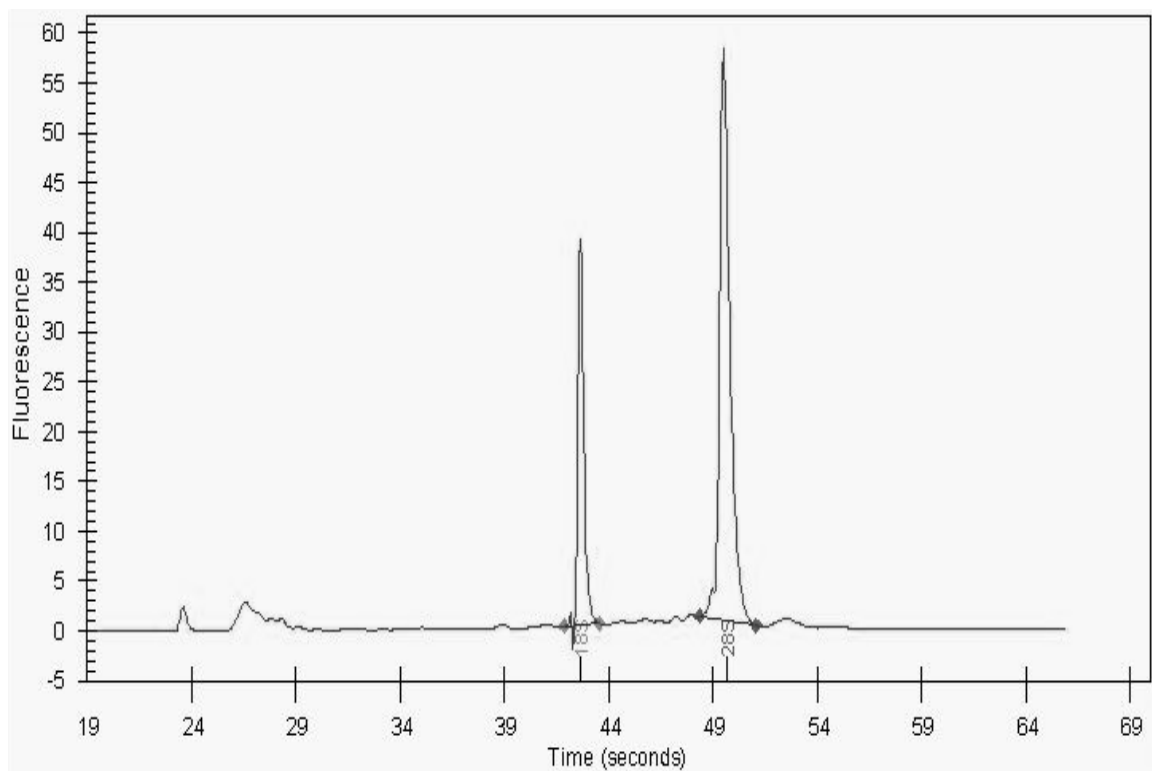
圖四 左圖為點印用之狹縫針。右圖為微陣列點印系統之針座，本實驗室一次可以同時使用 48 根針進行點印工作。



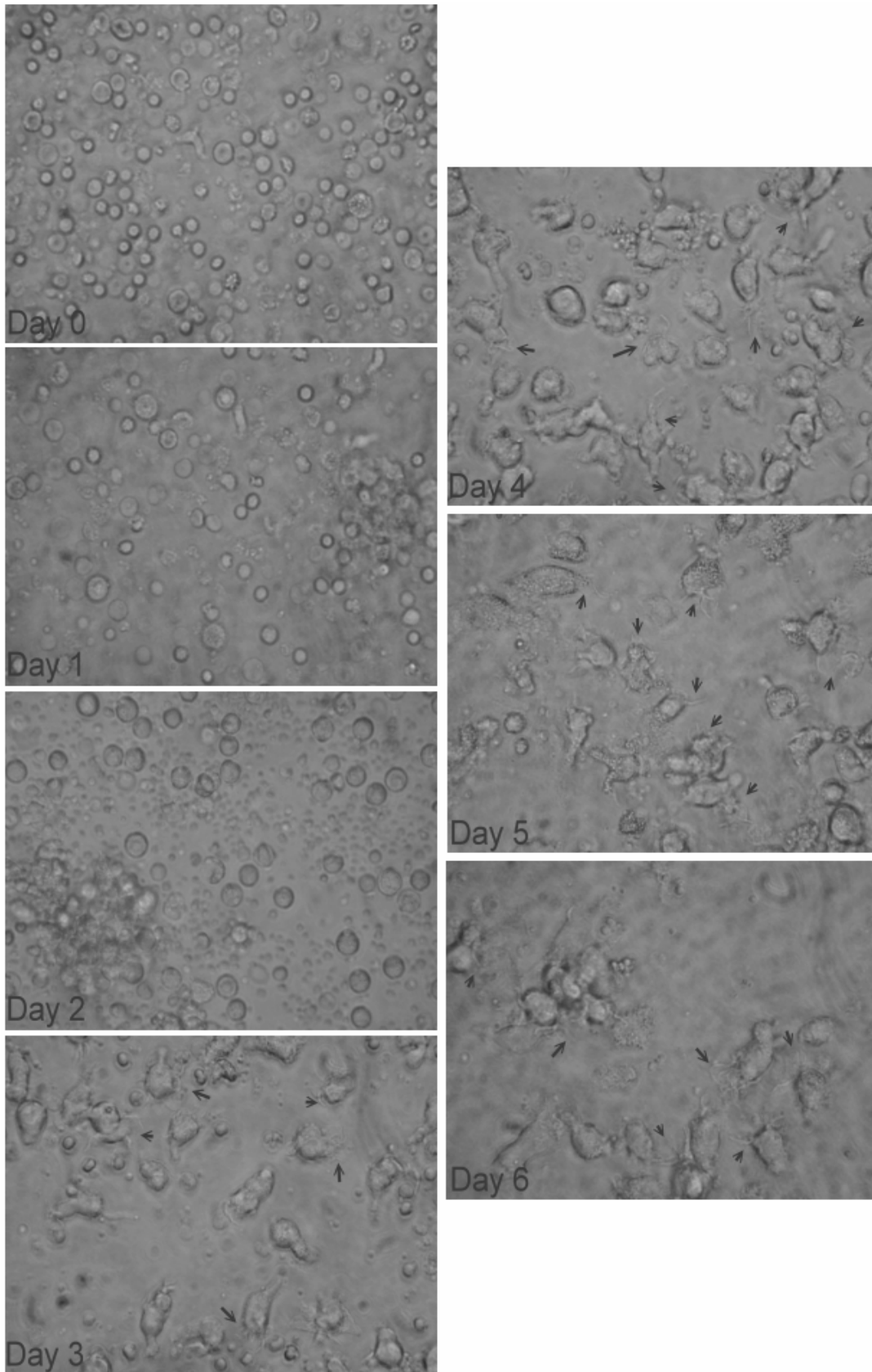
圖五 非直接標記法原理，以寡腺苷鏈進行第一次雜合反應，再以 3DNA 擷取序列的互補序列進行第二次雜合反應。



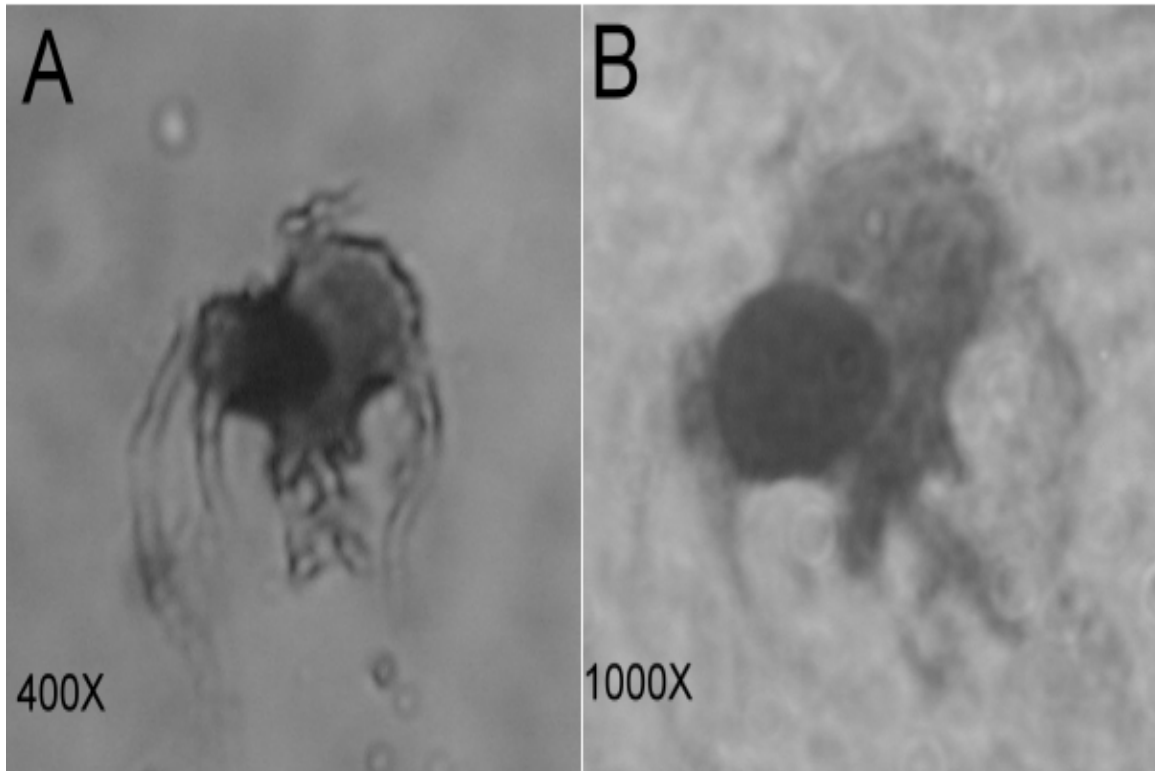
圖六 Axon 4100 掃描系統



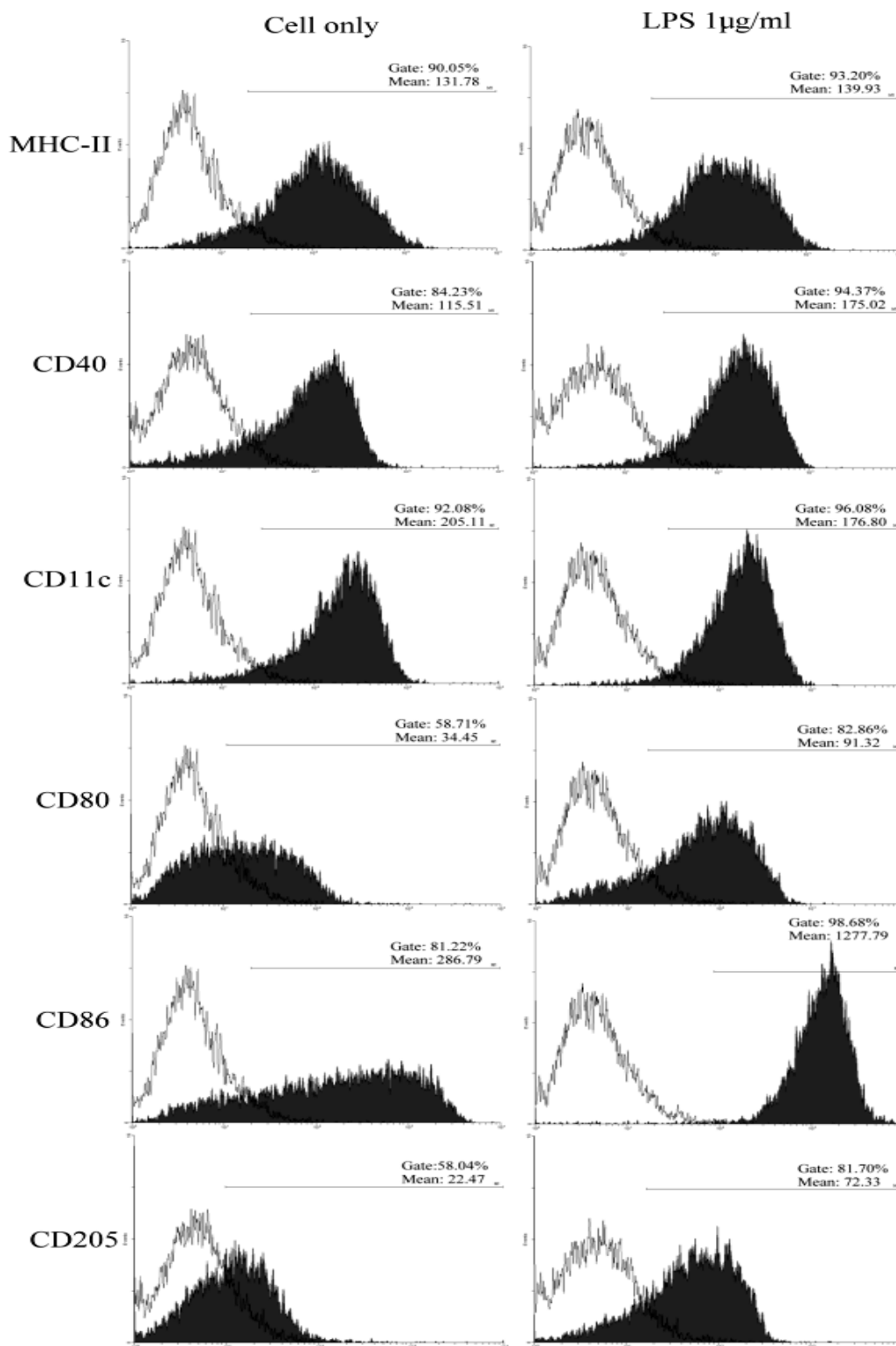
圖七 樹突狀細胞培養第八天，抽取 RNA 經純化後之 RNA 電泳圖。



圖八 利用相位差顯微鏡觀察樹突狀細胞細胞形態的改變。紅色箭頭為樹突狀的偽足，其為樹突狀細胞特有的細胞形態（Nikon 400X）。

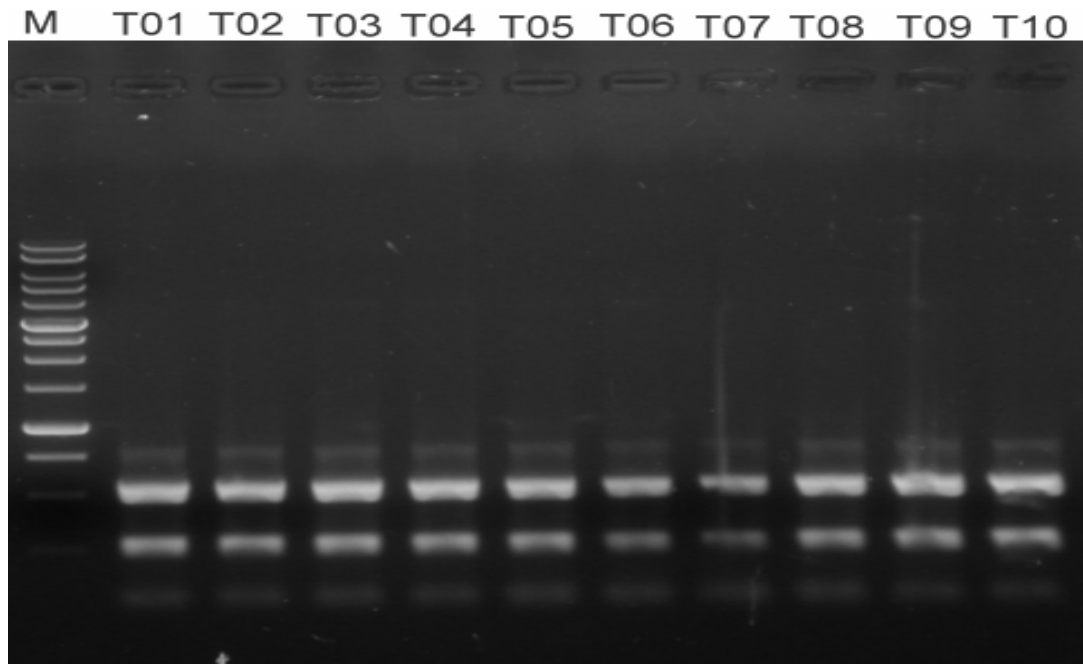


圖九 樹突狀細胞培養第六天，利用劉氏染色後，使用顯微鏡觀察樹突狀細胞的細胞形態。圖 A 為 400X；圖 B 為 1000X 油鏡 (Zeiss)。

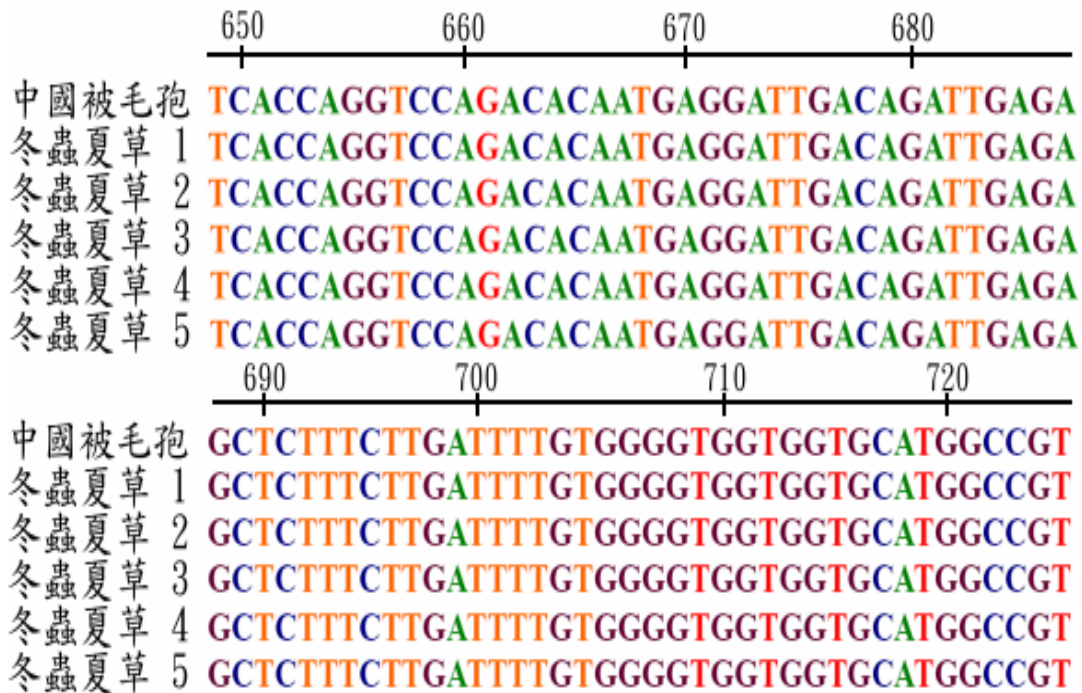


圖十 樹突狀細胞培養第六天，分別給予或不給予脂多醣 1µg/mL 刺激兩天，利用流式細胞儀分析 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205、MHC-II 等細胞表面標記的結果。紅色的部分為樹突狀細胞，白色的部份為未染色的 isotype control。

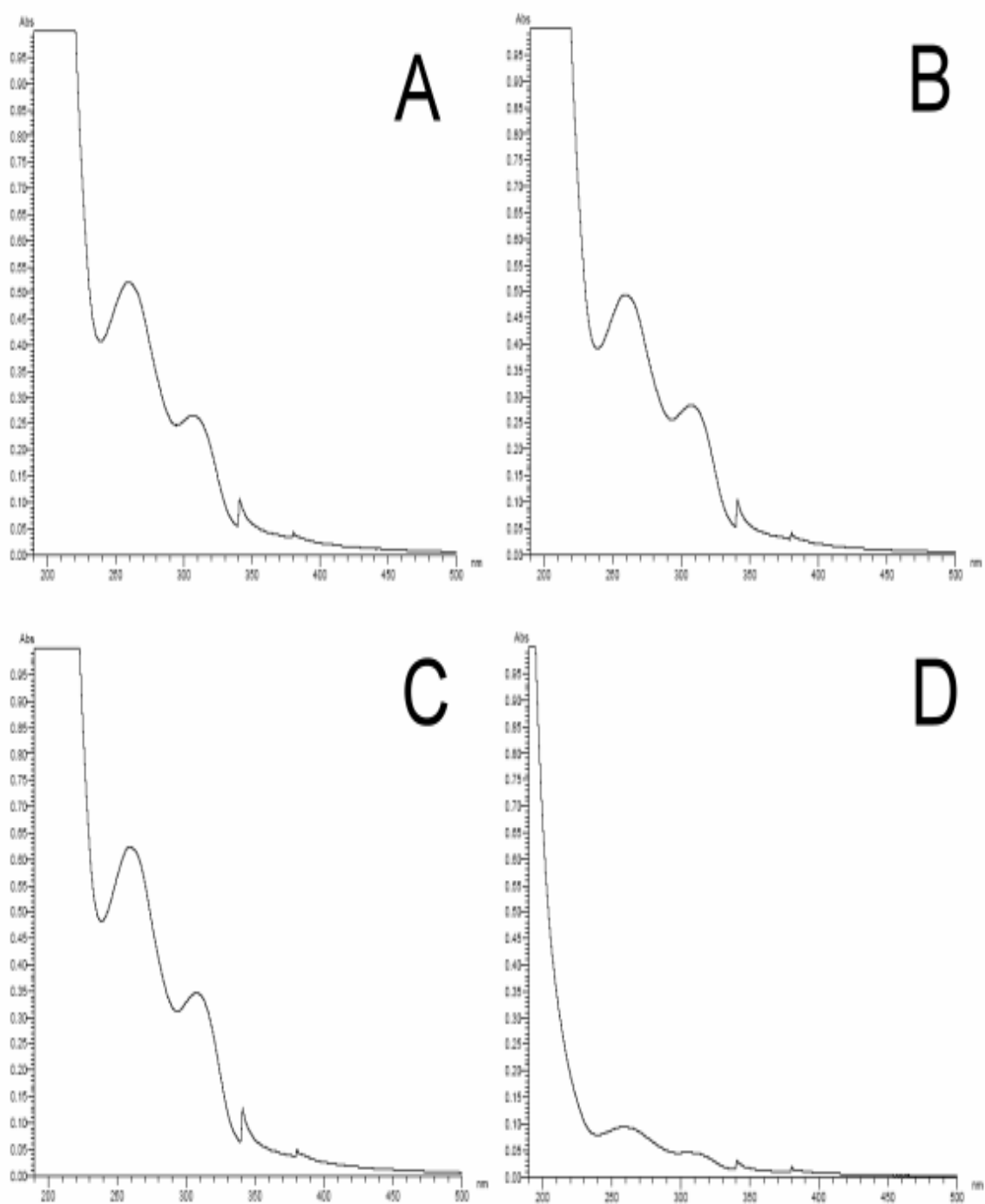




圖十一 18S rRNA 基因 PCR 產物之限制酶 (*Cfo-I*) 水解多型性圖譜分析 (NS3-NS6 區段)。左起為 DNA marker，依序為冬蟲夏草樣本隨機取樣的結果，共十個。

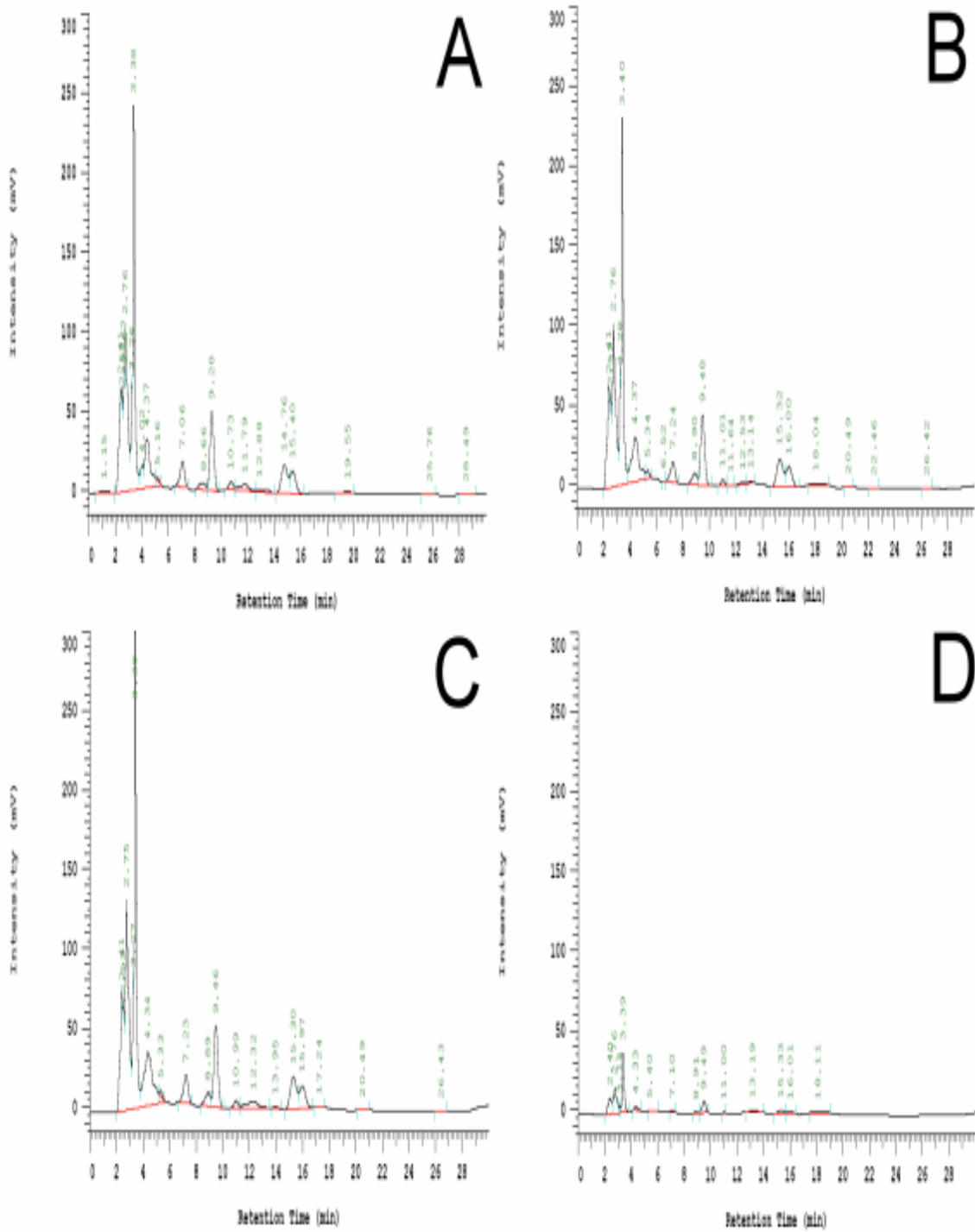


圖十二 冬蟲夏草樣本隨機取樣其 18S rRNA 基因 PCR 產物之 NS3-NS6 區段基因序列分析結果，並與中國被毛孢序列比對。

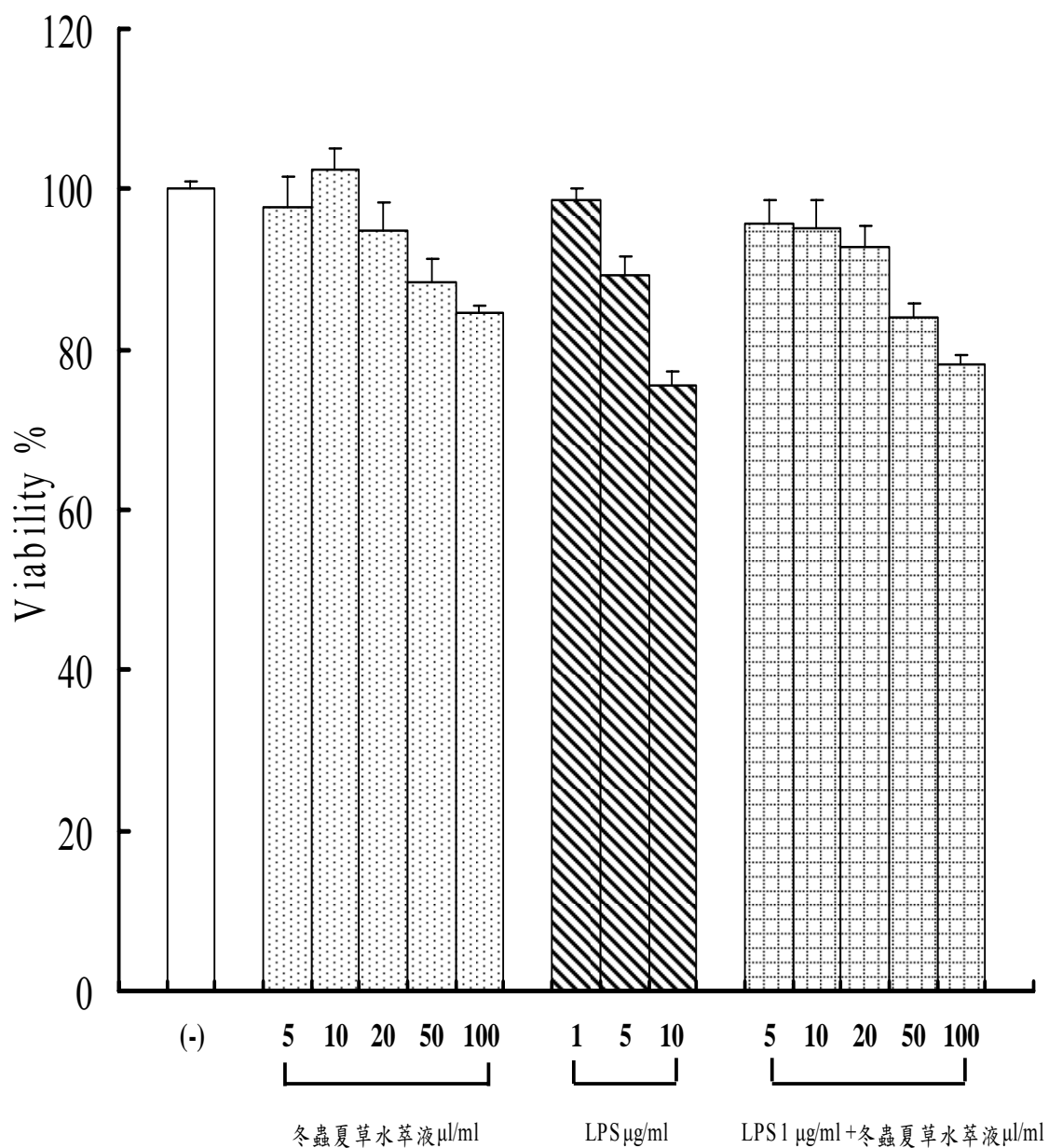


圖十三 利用分光光譜儀進行冬蟲夏草水萃液的吸收光譜分析，圖 A、B、C 為隨機選取三份冬蟲夏草樣本分次萃取的結果。圖 D 為萃取後的冬蟲夏草粉末進行第二次萃取的結果。(波段為 190nm-500nm)

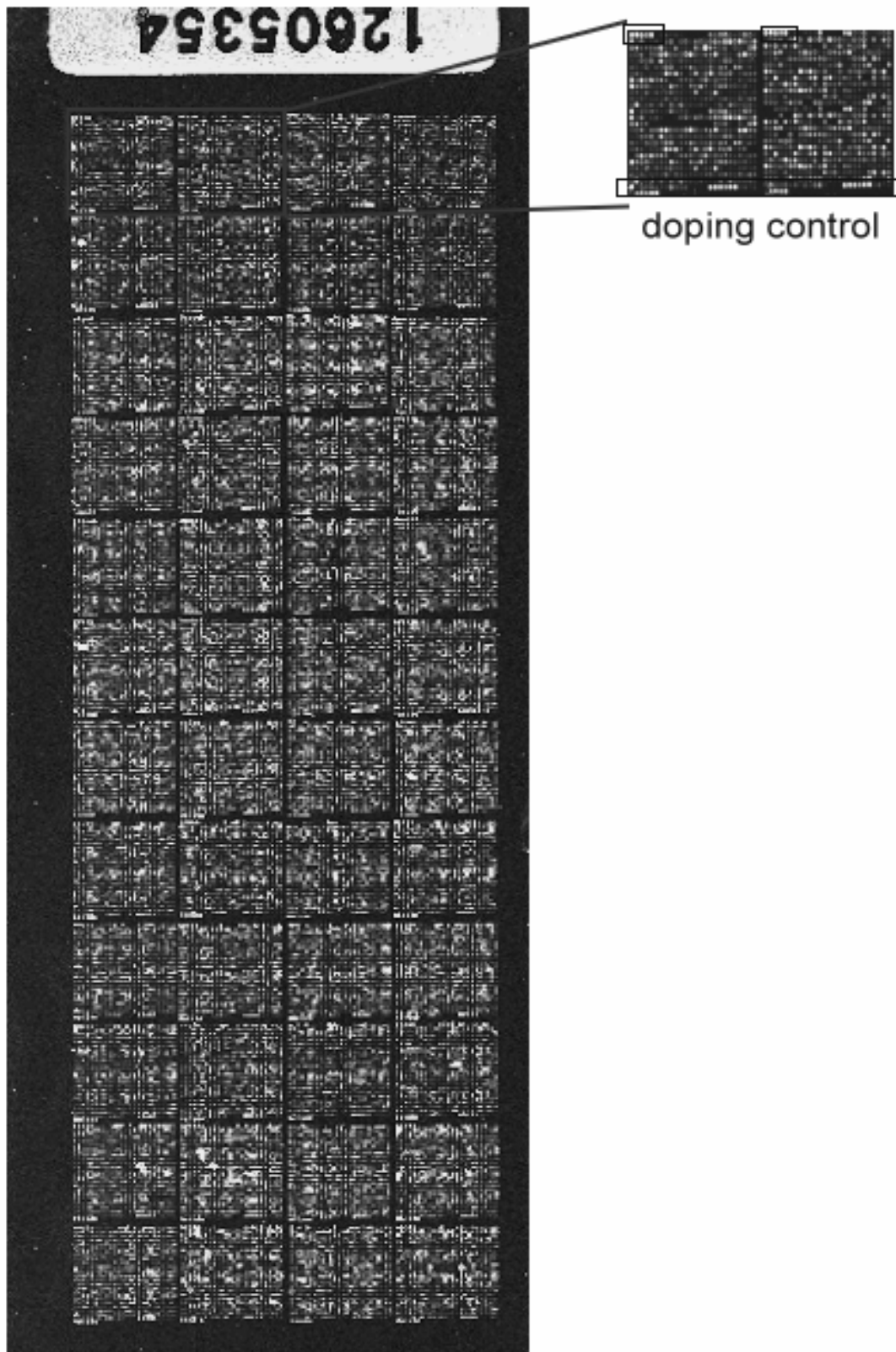




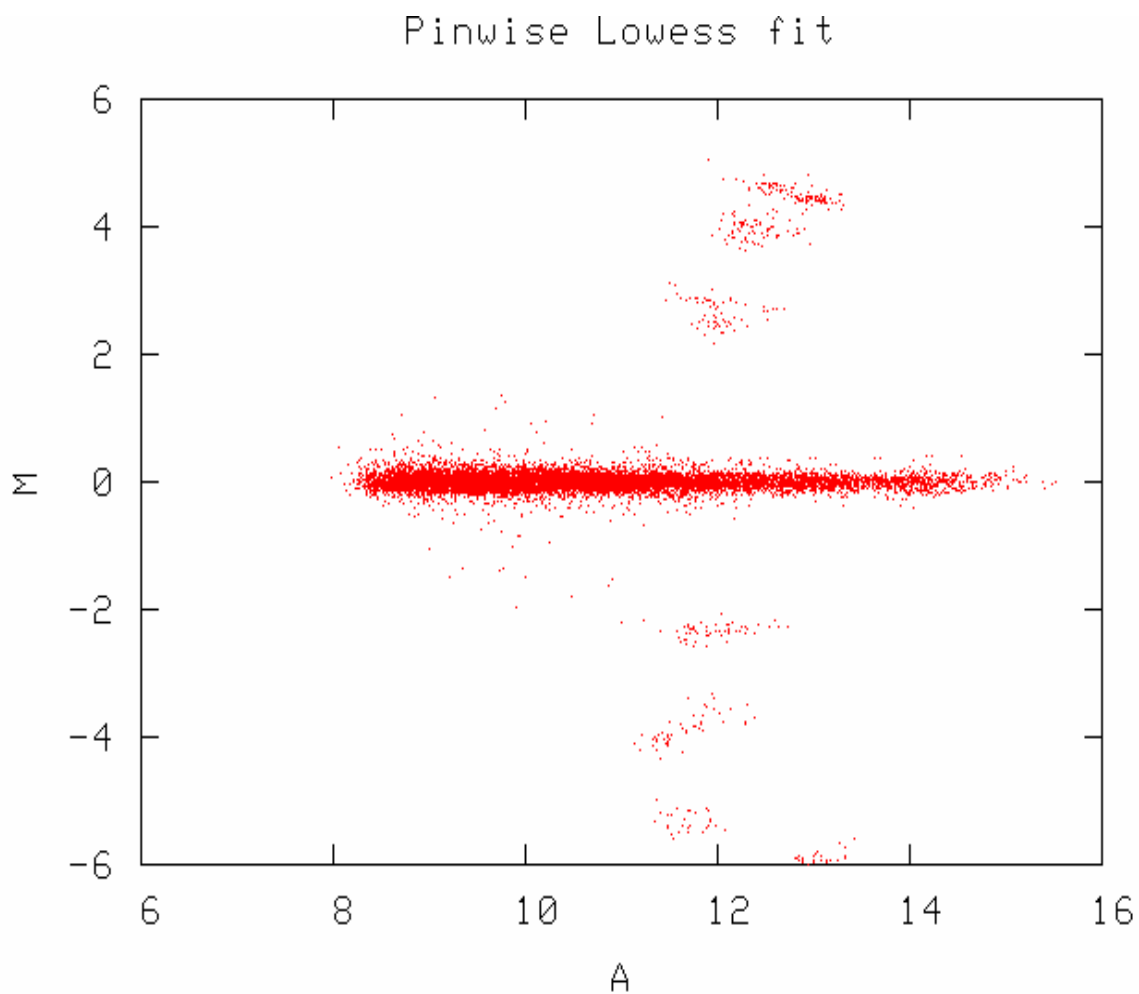
圖十四 利用高效液相層析儀進行冬蟲夏草水萃液的吸收光譜分析，圖 A、B、C 為隨機選取三份冬蟲夏草樣本分次萃取的結果。圖 D 為萃取後的冬蟲夏草粉末進行第二次萃取的結果。(波長為 230nm)



圖十五 利用細胞毒性試驗，針對不同的冬蟲夏草水萃液劑量與不同的脂多醣劑量進行篩選。(n=3)



圖十六 基因晶片之原始影像，目前我們的基因晶片共有 32,448 點的探針，內有已知紅綠螢光比值的外加指示控制基因（doping control）作為品管控制。



圖十七 數據分析後之 M-A 圖。A 值小於 2，表示系統誤差甚小、靈敏度高。已知紅綠螢光比值的外加指示控制基因 doping control 近似預期分佈於外。

表一 利用感應耦合電漿質譜儀來偵測冬蟲夏草樣本中所含的微量金屬元素含量。隨機選取五份冬蟲夏草樣本 CS1、CS2、CS3、CS4、CS5，量測微量元素 Al、Mg、Zn、As、Co、Cr、Ni、Pb、Sr、Mn、Cu、Cd、Na、Ca、Fe 等十五種。(μg/g)

element	CS 1	CS 2	CS 3	CS 4	CS 5	MEAN	SD	CV (%)
<b>Al</b>	996.41	1125.73	1287.77	964.66	1351.28	1145.17	171.69	14.99
<b>Mg</b>	1790.40	1751.30	1918.69	1821.69	1952.30	1846.88	85.48	4.63
<b>Zn</b>	141.60	120.52	139.86	112.30	113.98	125.65	14.12	11.24
<b>As</b>	4.93	4.89	4.79	4.40	4.39	4.68	0.27	5.71
<b>Co</b>	0.30	0.41	0.40	0.38	0.34	0.37	0.05	12.50
<b>Cr</b>	3.17	2.71	3.26	2.63	3.19	2.99	0.30	9.93
<b>Ni</b>	1.11	0.91	0.82	0.79	0.89	0.90	0.12	13.59
<b>Pb</b>	0.32	0.29	0.29	0.52	0.28	0.34	0.10	29.22
<b>Sr</b>	3.81	4.22	3.63	4.13	3.47	3.85	0.32	8.31
<b>Mn</b>	51.41	55.27	41.32	49.61	48.12	49.15	5.13	10.43
<b>Cu</b>	10.41	10.83	10.52	11.51	11.75	11.01	0.60	5.42
<b>Cd</b>	0.09	0.07	0.06	0.06	0.07	0.07	0.01	17.13
<b>Na</b>	819.00	653.27	762.65	711.74	616.96	712.72	81.38	11.42
<b>Ca</b>	729.17	643.42	683.20	660.05	683.42	679.85	32.31	4.75
<b>Fe</b>	768.46	623.77	773.87	776.89	523.69	693.34	114.82	16.56

表二 樹突狀細胞培養第六天，分別給予不同劑量的冬蟲夏草水萃液刺激兩天，利用流式細胞儀分析 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205、MHC-II 等細胞表面標記的結果。上表分別為% Gate 及 Mean；上表為總螢光強度比值。(n=3) (總螢光強度=% Gate×Mean)

%Gate / Mean	MHC-II	CD11c	CD40	CD80	CD86	CD205
CS 0 µl/ml	86 ± 5 / 110 ± 19	85 ± 7 / 175 ± 28	76 ± 10 / 125 ± 28	54 ± 7 / 34 ± 13	75 ± 7 / 251 ± 33	67 ± 8 / 46 ± 23
CS 5 µl/ml	85 ± 4 / 99 ± 9	84 ± 5 / 166 ± 22	76 ± 8 / 116 ± 14	50 ± 7 / 33 ± 8	75 ± 8 / 240 ± 14	67 ± 7 / 40 ± 17
CS 10 µl/ml	85 ± 5 / 95 ± 15	85 ± 5 / 152 ± 42	75 ± 9 / 106 ± 13	50 ± 5 / 29 ± 11	71 ± 8 / 229 ± 10	63 ± 6 / 41 ± 16
CS 15 µl/ml	79 ± 5 / 95 ± 15	79 ± 6* / 141 ± 29	70 ± 12 / 102 ± 9	47 ± 5 / 29 ± 4	70 ± 9 / 223 ± 13	62 ± 10 / 32 ± 16
CS 20 µl/ml	78 ± 4* / 83 ± 17*	78 ± 5* / 124 ± 24	71 ± 9* / 90 ± 6	45 ± 5* / 26 ± 2	67 ± 9* / 219 ± 14	61 ± 7** / 34 ± 11
%Gate X Mean ratio	MHC-II	CD11c	CD40	CD80	CD86	CD205
CS 0 µl/ml	100	100	100	100	100	100
CS 5 µl/ml	89±12	93±18	94±19	91±31	89±7	91±43
CS 10 µl/ml	85±18	88±29*	84±20	81±34	72±6	85±35
CS 15 µl/ml	80±17	75±21*	76±19	75±17	64±11	76±38
CS 20 µl/ml	69±18*	66±17*	67±11	64±13	51±7	70±27

(\*表示 p<0.05；\*\*表示 p<0.01)

表三 樹突狀細胞培養第六天，分別給予脂多醣及不同劑量的冬蟲夏草水萃液刺激兩天，利用流式細胞儀分析 CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205、MHC-II 等細胞表面標記總螢光強度的結果。上表分別為% Gate 及 Mean；上表為總螢光強度比值。(n=3) (總螢光強度=% Gate×Mean)

%Gate / Mean	MHC-II	CD11c	CD40	CD80	CD86	CD205
LPS 1 µg/ml + CS 0 µl/ml	90 ± 3 / 145 ± 31	90 ± 5 / 188 ± 11	93 ± 4 / 174 ± 23	79 ± 4 / 89 ± 18	93 ± 5 / 962 ± 284	81 ± 3 / 92 ± 18
LPS 1 µg/ml + CS 5 µl/ml	90 ± 4 / 140 ± 38	89 ± 5 / 184 ± 15	92 ± 5 / 165 ± 25	77 ± 4 / 86 ± 13	90 ± 5** / 848 ± 212	80 ± 2 / 90 ± 15
LPS 1 µg/ml + CS 10 µl/ml	88 ± 5 / 143 ± 34	85 ± 4** / 179 ± 13	90 ± 2 / 159 ± 20	72 ± 2* / 82 ± 11	88 ± 5** / 792 ± 218	77 ± 2 / 81 ± 16
LPS 1 µg/ml + CS 15 µl/ml	87 ± 4* / 129 ± 40	84 ± 7* / 171 ± 11	88 ± 2* / 152 ± 19*	72 ± 3* / 72 ± 15*	88 ± 5** / 770 ± 105	78 ± 2 / 75 ± 8
LPS 1 µg/ml + CS 20 µl/ml	83 ± 2 / 121 ± 39*	83 ± 6 / 143 ± 21	85 ± 3** / 140 ± 18**	72 ± 4** / 72 ± 13	88 ± 4* / 753 ± 65	76 ± 3* / 68 ± 13*
%Gate X Mean ratio	MHC-II	CD11c	CD40	CD80	CD86	CD205
LPS 1 µg/ml + CS 0 µl/ml	100	100	100	100	100	100
LPS 1 µg/ml + CS 5 µl/ml	98±29	96±7	95±18	95±18	86±27	96±15
LPS 1 µg/ml + CS 10 µl/ml	97±27	90±4*	89±13*	85±13	78±16	83±15
LPS 1 µg/ml + CS 15 µl/ml	86±28*	85±3	84±13*	75±16*	77±15	78±6
LPS 1 µg/ml + CS 20 µl/ml	76±23*	70±15	74±12*	74±17	74±10	68±14*

(\*表示 p<0.05；\*\*表示 p<0.01)