

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

中藥對誘導樹突狀細胞分化及功能的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-034-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學中西醫結合研究所

計畫主持人：陳光偉

計畫參與人員：王煌輝 謝雲忠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 2 月 11 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
期中進度報告

(計畫名稱)

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫

計畫編號：NSC - 91 - 2320 - B - 039 - 034

執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳光偉

共同主持人：林昭庚

計畫參與人員：王煌輝、謝雲忠

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告          完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學中國醫學研究所

中 華 民 國                      年                      月                      日

## 中文摘要

樹突狀細胞(Dendritic cell, DC)是來源於骨髓的專職抗原呈現細胞，具有 T 細胞介導的免疫反應功能，因其表面有很多樹突狀突起而得名。DC 於 1973 年由 Steinman 和 Cohn 首先發現，近年來的研究發現 DC 與免疫功能有著密切相關，更有學者利用 DC 做為腫瘤的免疫治療疫苗。但 DC 在體內含量較少，體外大量擴增及純化是一個研究的關鍵。骨髓或臍血 CD34<sup>+</sup>細胞及外周血單核白血球均可做為 DC 的來源。現代醫學利用細胞激素 GM-CSF、TNF $\alpha$ 、IL4 等均可誘導 DC 的分化及數量的擴增。本研究是想探討中藥的補氣或補血藥的粗萃取物加入人類周邊白血球所培養出來的樹突狀細胞，再比較樹突狀細胞的增殖及其分化能力而判別不同中藥對 DC 的免疫能力所扮演的角色。本研究是對中藥與免疫機能探討的一種方法。

## 英文摘要

Dendritic cell (DC) is divided from bone marrow and special in antigen presenting character, also inducted T cell immune function, on account of multiple dendritic protruding on cell surface then named Dendritic cell. DC was founded in 1973 by Steinman and Cohn. At recently years DC was studied in immune function, also treated in tumor immunity and tumor vaccine, but DC was rare in human body, so amount proliferation and special differentiation are point in recently researchs. Bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood monocyte all may be DC sources, with GM-CSF、TNF $\alpha$ 、IL4 can differentiation and proliferation DC. Our study was point to proliferation and differentiation DC by peripheral monocyte with Herb Drugs. It may be a new method in study China medicine.

## 研究目的

目前，關於 DC 定向誘導分化及數量的增殖，分化有被提出，但以中藥來探討則未曾被提出。本研究主旨是以中藥對 DC 的誘導，來說明補益類中藥對人體 DC 免疫的影響。我們將探討補益類中藥對人體周邊白血球在體外培養時能被誘導形成 DC 的數量，及不同種類中藥在對 DC 的分化誘導不同的影響。因為在前言時我們已報告，人體周邊血的 DC 數量是極少的，而且在人體的白血球誘導及增殖，除了依靠細胞激素 GM-CSF 和 IL4 外，目前沒有很少的方法，但在個人曾經的試驗裡發現，若干的中藥粗萃取物能大量誘導 DC 的增殖在體外培養時，及不同程度的分化表現，所以我們想更大規模、更數據化的研究補益類中藥對 DC 的影響。

## 文獻探討

1. Swensson, H., Johannisson, A., Nikkila, T., Alm, G.V & Cederblad, B. The cell surface phenotype of human interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry, *Scand. J. Immunol.* 44, 164-172, 1996.
2. Ochsenbein, A.F. *et al.* Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2233-2238, 1999.
3. Ronchetti, A. *et al.* Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J. Immunol.* 163:130-136, 1999.
4. Bartocioni, E. *et al.* MHC class I, MHC class II and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in inflammatory myopathies. *Clin. Exp. Immunol.* 95:166-172, 1994.
5. Mackay, C., Marston, W.L. & Dudler, L. Naïve and memory T cells show distinct pathways of

- lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171:801-817, 1990.
6. Ip, T. et al. Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75:753-763, 1993.
  7. Lemaitre, B., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14614-14619, 1997.
  8. Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588, 1998.
  9. Land, W. *et al.* The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation* 57, 1994.
  10. Devitt, A. *et al.* Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392:505-509, 1998.
  11. Yang, R. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 395:284-288, 1998.
  12. Aliprantis, A. *et al.* Cell Activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739, 1999.
  13. Cohen, O., Kinter, A. & Fauci, A.S. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol. Rev.* 159:31-48, 1997.
  14. Vincenzo Cerundolo, Ian F Hermans & Mariolina Salio. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nature Immunology* 5(1): 7-10, 2004.

## 研究方法

### 樹突狀細胞的分離與培養

參照 Gluckman 等人的方法進行，基本步驟如下：新鮮成人外周血經淋巴細胞分離液(=1.077, Sigma)分離後，取交界層細胞，以  $5 \times 10^6$  細胞/ml 的濃度置於 35mm 的培養皿中用 RPMI-1640 完全培養基(Gibco)培養 2 小時，輕輕晃動培養皿，棄去懸浮的細胞，在含 rhGM-CSF (800 U/ml, Sigma) 和 rhIL-4 (500 U/ml, Sigma)的 RPMI-1640 完全培養基中繼續培養 5 天，棄去緊密的貼壁細胞，收集懸浮細胞繼續培養 1-2 天，即為樹突狀細胞，流式細胞儀檢測 CD1a<sup>+</sup>細胞佔 90% 以上，將此樹突狀細胞在含有 KLH(50  $\mu$ g/ml, Sigma)的培養基中繼續培養 24 小時，再加入中藥，做為再研究分化之用。

當 DC 以 GM-CSF 及 IL-4 成功的培養出來以後，在第二步驟，我們還是以上 15 種中藥的流浸膏再加入一起培養，24 小時後，再檢測其 DC 的分化方向，因為不同分化程度的 DC 有不同的免疫呈現功能。

## 結果

表一、肺癌病人的樹突狀細胞對 15 種中藥的反應

	CD40		CD86		DR		CD11c	
	L	H	L	H	L	H	L	H
16	33.6	*	17.9	*	6.1	*	17.1	*
1	37.1	47.3	5.4	6.8	4.4	5.0	9.6	6.3
2	33.7	33.2	8.9	7.2	1.3	2.6	8.6	5.8
3	36.6	36.6	7.1	7.0	3.5	3.7	12.7	10.0
4	39.2	78.7	5.5	6.8	5.8	11.4	13.9	19.1
5	33.3	38.3	6.6	9.5	3.0	6.3	10.8	6.4
6	29.8	?	12.3	?	3.8	?	10.0	?
7	30.9	32.3	6.7	8.4	3.2	4.1	9.9	11.7
8	31.7	60.2	15.8	10.0	4.3	21.0	11.9	15.0
9	29.7	35.5	7.5	4.8	3.5	1.8	9.4	5.1
10	30.0	28.3	10.7	13.9	3.7	2.1	11.9	10.7
11	34.9	32.7	5.1	11.7	1.8	3.2	9.3	9.8
12	31.8	32.8	5.2	12.4	1.8	1.3	8.4	8.1
13	49.3	66.2	3.7	1.5	2.2	19.5	4.7	0.2
14	32.9	42.9	13.2	3.8	4.9	0.7	8.7	2.2
15	39.4	42.2	15.0	15.7	2.3	1.2	11.2	9.5

% of total

15 種中藥為：1.人參 2.胡耆 3.大棗 4.白朮 5.黨參 6.靈芝 7.枸杞 8.當歸 9.白芍 10.何首烏  
11.熟地黃 12.丹參 13.紫草 14.茜草 15.LTB

表二、正常人的樹突狀細胞對 15 種中藥的反應

	CD40		CD86		DR		CD11c	
	L	H	L	H	L	H	L	H
16	65.6	*	33.4	*	41.2	*	29.1	*
1	64.6	70.8	32.3	30.8	36	38.1	25.1	26.5
2	48.4	71.6	32.2	31.6	37.4	31.6	25.7	24.5

3	69.9	70.1	33.5	30.3	39.2	34.4	27.2	23.7
4	65.9	68.6	27	24.7	33.2	33	21.8	21.8
5	69.2	69.8	30.9	28.2	37.4	30.9	25.7	20
6	63.8	63.7	30.8	29.8	37	37.7	24.7	25.5
7	64.6	67.9	30.5	28.5	33.9	37	23.2	26.3
8	61.7	69.5	32.9	29.2	38.7	38.6	28.5	27.1
9	58.2	46.6	31.6	31.1	37.2	36	24.8	24.6
10	65.8	66.8	30.8	26.7	34.4	35.4	23.7	22.5
11	66.9	74.4	29	27.3	35.7	33.1	23.8	23.5
12	64.5	61.7	29.4	26	32.2	28	21	21.7
13	50.7	47.8	22.3	21.3	28.7	28.3	20	18.8
14	59.9	65.5	27.7	26.3	33.9	33.7	23.7	22.9
15	60.3	71.8	31.8	34.2	36.7	39.6	26.2	29.3

\* control

\* inhibition

15 種中藥為：1.人參 2.胡耆 3.大棗 4.白朮 5.黨參 6.靈芝 7.枸杞 8.當歸 9.白芍 10.何首烏  
11.熟地黃 12.丹參 13.紫草 14.茜草 15. LTB

## 結論

1. 腫瘤患者的 DC 量少，不論是在周邊血或腫瘤組織內，且 DC 易 Apoptosis，DC 扁表面的 B7cd86、MHC II 的表達有缺陷，無法刺激 CTL 的產生。本研究也發現在癌症組患者的 DC 其數量與功能都比正常人的 DC 低。
2. 中藥濃度愈高對 DC 刺激不一定愈強，但在 CD40 表現，中藥濃度愈高對 DC 的 CD40 刺激愈強。
3. CD40：激活 DC 使 DC 活化與增殖。  
 補氣藥：人參、黃耆、白朮、紅棗，低濃度就有效果（促進），高濃度效果更明顯（促進）。  
 補血藥：當歸、熟地，高濃度效果更明顯（促進）。  
 涼血藥：紫草（抑制）  
 補血藥：白芍（抑制）  
 止血藥：茜草（抑制）
4. CD86：調節作用，使 DC 作用加強與促進成熟，使其抗原呈現動能加強。  
 補氣藥：白朮、人參（促進）  
 補血藥：當歸（促進）

安神補益藥：靈芝（促進）

涼血藥：紫草（抑制）

止血藥：茜草（抑制）

5. HLA-DR：mature DC marker

補氣藥：白朮（促進）

補血藥：當歸（促進）

涼血藥：紫草（促進）

止血藥：茜草（抑制）

6. CD11c：調理 DC，使刺激 TH0 為 TH1。

補氣藥：白朮（促進）

補血藥：當歸（促進）

涼血藥：紫草（抑制）

止血藥：茜草（抑制）