

冬蟲夏草人工培養菌絲體對人體嗜中性白血球及T淋巴球免疫反應之影響

徐佳吟¹、陳俊良^{1,2}、楊賢鴻^{1,2,*}

¹林口長庚紀念醫院中醫部，桃園，台灣

²長庚大學中醫學系，桃園，台灣

(100年02月24日受理，100年07月05日接受刊載)

冬蟲夏草是著名的強壯滋補中藥，主要作用為「保肺氣、實腠理」，「益腎，補精髓」，可補虛損，益精氣，止咳化痰，一般民眾常使用冬蟲夏草在慢性腎炎、慢性氣管炎等發炎反應性疾病。為瞭解人工培養之冬蟲夏草的抗發炎作用，本實驗針對人工培養之冬蟲夏草對於健康人體嗜中性白血球及淋巴球的影響進行研究。實驗徵求健康受試者以隨機雙盲方式分成實驗組及對照組，並給予人工培養之冬蟲夏草膠囊（實驗組）及安慰劑（對照組）。實驗組冬蟲夏草劑量為1.5公克，一天兩次，一日服用總劑量為3公克，服用三個月，於服用前、服用一個月、兩個月及三個月各抽血檢驗嗜中性白血球吞噬率、prostaglandin E₂ (PGE₂)、leukotriene C₄ (LTC₄)以及CD4(+)與CD8(+)T淋巴球比例。結果顯示嗜中性白血球吞噬作用在實驗組有下降並有統計上差異 (P<0.05)。嗜中性白血球經由100 µg/ml lipopolysaccharide 刺激後所產生prostaglandin E₂數值在實驗組有下降並有統計上差異 (P<0.05)。單核淋巴球實驗前及實驗後CD4(+)與CD8(+)T淋巴球的比值有偏向CD4(+)T淋巴球的趨勢並且有統計上的意義 (P<0.05)。顯示人工培養之冬蟲夏草菌絲體可經由抑制嗜中性白血球吞噬作用及抑制cyclooxygenase pathway，並調控CD4(+)及CD8(+)淋巴球細胞數的比例，以達到抗發炎的作用。

關鍵字：冬蟲夏草、嗜中性白血球、前列腺素、單核淋巴球

前言

冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*) 又名蟲草，是麥角科蟲草真菌 *Cordyceps sinensis* 寄生在蝙蝠蛾科昆蟲蝙蝠蛾 *Hepialus armoricanus* 幼蟲的子座和幼蟲屍體的蟲菌複合物¹⁻⁴。冬蟲夏草 (*Cordyceps Sinensis*) 是著名的強壯滋補中藥，其名始於清朝吳儀洛《本草從新》(1757年)和趙學敏

《本草綱目拾遺》(1765年)。《本草綱目拾遺》⁵中記載，夏草冬蟲味甘，性溫；主要作用為「保肺氣、實腠理」，「益腎，補精髓」，可補虛損，益精氣，止咳化痰。《中藥大辭典》²中提到，其味甘酸、性平、氣香、入肺腎二經，可強壯、益肺腎、補虛損、益精氣、解毒、止血化痰。現代藥理研究顯示，冬蟲夏草提取物內含十多種胺基酸、微量元素及多醣體⁶⁻¹²，在體外與活體動物實

*聯絡人：楊賢鴻，桃園長庚紀念醫院中醫部，桃園縣龜山鄉頂湖路123號，電話：03-3196200 分機2611，傳真：03-3298995，電子郵件信箱：dryang@adm.cgmh.org.tw

驗發現具有降血糖作用^{13,14}、抗腫瘤作用¹⁵⁻²³、降血脂作用^{24,25}、並有抗自由基及抗氧化作用^{26,27}。特別是在免疫功能方面的研究顯示，冬蟲夏草多醣體對於巨噬細胞（macrophage）功能^{28,29}、自然殺手細胞^{19,30,31}、樹突狀細胞³²⁻³⁵、及淋巴球所分泌的細胞激素³⁶⁻³⁸造成影響。近代藥理學研究證實冬蟲夏草多醣提取物對於實驗大鼠無急性毒性，且體內蓄積量少，對於大鼠血液、生化、體重、肝臟及腎臟組織切片均無影響³⁹，顯示冬蟲夏草的安全性高，並對於機體各項免疫反應可能具有調節作用。

免疫反應可以分成先天性免疫力（innate immunity）與後天性免疫力（adaptive immunity）反應。先天性免疫主要的反應細胞包括嗜中性白血球（neutrophil，又稱polymorphonuclear leukocytes即PMN）、嗜伊紅性白血球（eosinophil）以及巨噬細胞。其中嗜中性白血球具有吞噬作用（phagocytosis），可經由吞噬作用將外來的病菌或引起發炎的物質吞噬，並可釋放出細胞激素以引發一連串的發炎反應。在慢性發炎疾病，有許多小分子媒介發炎反應的路徑，將發炎反應的訊號擴大引起更強烈的發炎反應，花生四烯酸（arachadonic acid）的連鎖反應就是其中重要的免疫反應之一，透過cyclooxygenase與lipooxygenase代謝途徑⁴⁰，最後會分別產生兩種最終產物：前列腺素（prostaglandin; PG）如PGE₂和白三烯素（leukotriene; LT）如LTC₄。此兩種物質皆會促進發炎反應的進行，是發炎的前驅物質，同時前列腺素及白三烯素兩者協同作用會吸引更多的嗜中性白血球到局部發炎部位並促進吞噬作用，可以分辨、吞沒及摧毀引起發炎的病原，不過也會造成更多的局部發炎與破壞，其中PGE₂扮演了相當重要的角色，PGE₂藉由結合動靜脈血管網上平滑肌細胞的受體，促進血管的擴張，改變血管的通透性，使嗜中性白血球穿透微血管進入組織中，進而引起一連串後續的免疫反應⁴⁰⁻⁴²。後天性免

疫反應主要的反應細胞為淋巴球（lymphocyte），分成T lymphocyte和B lymphocyte，其中T淋巴球主要扮演細胞免疫（cellular immunity）的重要角色，CD8(+) T淋巴球具有細胞毒殺免疫能力，而CD4(+) T淋巴球則分成幫助型T細胞及調節性T細胞，分別引起免疫反應或是抑制免疫反應。

近年來，許多民眾常常自行購買冬蟲夏草服用希望能調節免疫力，由於典籍記載冬蟲夏草具有益腎補精及止咳化痰等作用，一般民眾常使用冬蟲夏草在慢性腎炎、慢性支氣管炎、慢性鼻炎等發炎反應性疾病，但是冬蟲夏草對於人體的免疫反應及確實療效仍有未明之處，我們之前的前驅研究發現⁴³，服用冬蟲夏草一個月可能具有抑制嗜中性白血球趨化反應（chemotaxis）所需的可溶性細胞間黏附分子（soluble intercellular adhesion molecule-1）以及吞噬作用。有鑑於此，我們針對冬蟲夏草對於人體嗜中性白血球及T細胞淋巴球的免疫反應進一步進行研究。本研究以人工培養蟲草菌絲體對人類嗜中性白血球及T細胞淋巴球的免疫反應進行研究，用具發炎反應指標作用的嗜中性白血球吞噬作用、兩大發炎反應路徑的產物PGE₂和LTC₄，CD4(+)與CD8(+)T淋巴球比值作為測量指標，以了解冬蟲夏草對人類嗜中性白血球及T淋巴球所造成的發炎反應的影響。

材料和方法

I、人工培養冬蟲夏草菌絲體膠囊

天然冬蟲夏草因生長條件的限制，不但產量稀少且價錢昂貴，再加上無法有效管控每批藥材的品質，因而較不適宜運用於藥理機轉的研究或新藥的開發。此外，近年來微生物學家已經利用分子生物技術確認中華被毛孢（*Hirsutella sinensis*）為冬蟲夏草的無性世代菌種^{10,44}，因此本研究選擇使用菌種純正且品質穩定的人工培植冬蟲夏草菌絲體為實驗藥物；本研究的實驗藥物

為長庚生物科技公司以純正冬蟲夏草無性世代菌種中華被毛孢所生產的冬蟲夏草菌絲體，經研磨再以膠囊包裹，商品編號為2J01D07，內含成分為 uracil 0.634 mg/g，guanine 0.235 mg/g，uridine 1.531 mg/g，guanosine 1.949 mg/g，adenosine 2.975 mg/g，產品內含成分中腺苷（adenosine）的含量須大於2.0 mg/g為品質控管指標。實驗組參加者服用冬蟲夏草菌絲體製成的膠囊，其劑量為1.5 gm，一天兩次，一日服用總劑量為3 gm菌絲體。對照組則以澱粉為安慰劑，其外觀及服用方法與冬蟲夏草組完全相同。

II、受試者

選取54名15-40歲健康自願受試者，由林口長庚醫院中醫部內科醫師進行問診及檢驗，篩選實驗受試者。需確定每名受試者沒有心血管、肺部、胃腸道、肝、膽、胰、腎、內分泌等疾病，並且在過去三個月內沒有長期服藥史，經與受試者解釋藥物可能作用之後，填寫人體臨床實驗同意書，同意遵守實驗內容、且在實驗過程中不亂服用其他藥物、不食用具抗氧化作用的食物或飲料及不熬夜等，並以隨機雙盲將受試者分成實驗組和對照組。試驗過程中觀察受試者出現不適症狀，必要時可以選擇退出試驗。

III、抽血時間點

參加試驗的健康自願受試者於開始服藥之前、服藥後第一個月、第二個月、第三個月進行抽血檢測嗜中性白血球吞噬功能、發炎性物質PGE₂及LTC₄濃度。服藥開始之前及第三個月並加上測定CD4(+)及CD8(+)T淋巴球比例。

IV、嗜中性白血球和淋巴球的分離

抽取健康自願者靜脈血液與抗凝劑Heparin (10 U/ml) 混合均勻後，加入1/4體積量的2% Dextran (500KDa) 置於室溫30分鐘，吸取上

層富含白血球之懸浮液，並與等體積的Hank's balanced salt solution (HBSS) 混合後，輕輕加入含有等體積Ficoll-Hypaque (specific gravity of 1.077) 的離心管中離心 (300 x g) 25分鐘，吸取介於二層之間的單核球層細胞，以及沉澱於底層的嗜中性白血球，加入0.83% chilled ammonium chloride溶液10分鐘以溶解污染的紅血球，並以含有1% bovine serum的RPMI-1640溶液稀釋成 2×10^6 cells/ml。為進一步分離T淋巴球，將單核球層細胞置於培養皿於37°C、5% CO₂的培養箱裏靜置一小時後，吸取懸浮的淋巴球並使其通過nylon-wool column以移除B淋巴球，同時以含有1% bovine serum的RPMI-1640溶液稀釋成 2×10^6 cells/ml備用。

V、測定Neutrophil的吞噬功能

使用Fluoresbrite™ Carboxylate Microspheres (Polysciences, Inc., U.S.A.) 及流式細胞儀分析嗜中性白血球的吞噬功能。先將0.75 μm螢光小乳膠粒 (Fluoresbrite™ Carboxylate Microspheres; Polysciences) 與正常人類新鮮血清混合在37°C作用45分鐘，每ml溶液含有 1×10^6 cells/ml嗜中性白血球與經血清調理過的螢光小乳膠粒 (1×10^8 particles/ml) 以1:100比例相混合於37°C，5% CO₂培養箱反應60分鐘後，以2% paraformaldehyde固定以停止嗜中性白血球的吞噬作用，以流式細胞分析儀 (FACS Scan Flow Cytometer) 波長488 nm的雷射激光激發後，測量吞噬螢光小乳膠粒的嗜中性白血球百分率 (%) 作為吞噬功能指標。

VI、測定PGE₂及LTC₄

使用酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay) 測定嗜中性白血球的Prostaglandin E₂ (PGE₂)及Leukotriene C₄ (LTC₄)。將先前製備的嗜中性白血球以100 μg/ml lipopolysac-

charide刺激後培養在於37°C，5% CO₂培養箱三天後，收集上清液，置於-20°C下備用。購買分別為測定PGE₂及LTC₄的ELISA kits (Quantikine, R&D System, Minneapolis, MN, USA) 以酵素免疫分析法測定PGE₂及LTC₄的濃度，藉由此種ELISA方式，最低可測得PGE₂及LTC₄各為0.1 pg/ml及0.04 pg/ml。

VII、測定淋巴球的CD4/CD8比例

使用流式細胞儀利用免疫螢光染色法進行測定CD4(+)及CD8(+)淋巴球比例。將先前製備的T淋巴球懸浮液1 ml (2×10^6 cells/ml) 分別以anti-human CD4 FITC及anti-human CD8 PE染色，避光靜置30分鐘後，以PBS清洗後離心，用流式細胞分析儀(FACS Scan Flow Cytometer)測量分別為CD4 FITC及CD8 PE染色的淋巴球比率，兩者比率相除為CD4/CD8比例。

VIII、分析統計實驗數據

測量嗜中性白血球的吞噬功能、PGE₂及LTC₄，使用Student's *t* test作統計分析，而CD4/CD8比例則使用two-way ANOVA with repeated observation方法做統計分析，結果以平均數(mean) ± 標準偏差(standard deviation, 即SD)表示並繪出圖表。p值小於0.05顯示有統計上的差異。

結果

本實驗我們將54位自願者隨機分為二組，一組服用人工培養蟲草菌絲體稱為蟲草組，另一組服用安慰劑稱為對照組。蟲草組計有男18人女9人平均年齡28 ± 6.2歲，對照組計有男14人女13人平均年齡26 ± 5.8歲。接受試驗者未發現特殊不適症狀、合併症或副作用。

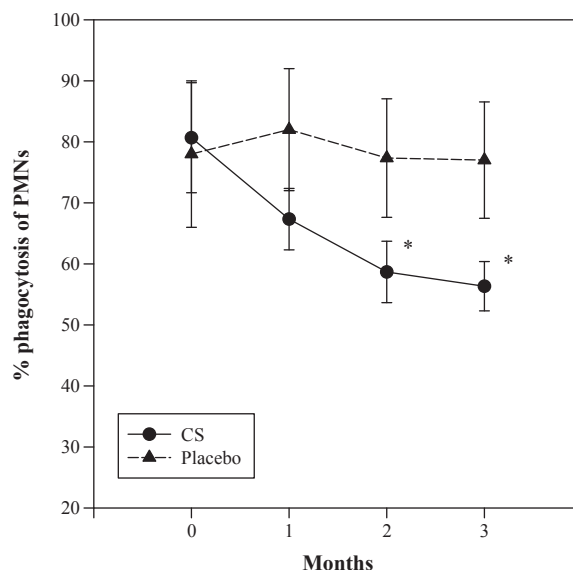
I、冬蟲夏草可以抑制嗜中性白血球吞噬作用

從本研究中我們發現自願者服用藥物三個月後，對受試者嗜中性白血球影響如下：

嗜中性白血球吞噬作用於蟲草組在第一個月開始有明顯下降的趨勢，同時在第二及第三個月開始達到具有統計學上的顯著差異 ($p < 0.05$)，抑制程度達30.1%，但此情況則不見於對照組(圖一)。

II、冬蟲夏草可以抑制嗜中性白血球產生的PGE₂而非LTC₄

嗜中性白血球以100 µg/ml lipopolysaccharide



圖一 人工培養冬蟲夏草膠囊對於嗜中性白血球吞噬作用的影響

受試者服用冬蟲夏草膠囊前以及服用後第一、二、三個月分別抽血，使用Fluoresbrite™ Carboxylate Microspheres和嗜中性白血球共同培養後，以流式細胞儀分析嗜中性白血球的吞噬功能。結果顯示蟲草組於服用後第一個月開始有明顯下降的趨勢且於第二、及三個月與對照組達到具有統計上的差異 (“*” 為 $p < 0.05$)，抑制程度達30.1%。(圖中CS代表蟲草組；Placebo代表對照組)

刺激後所產生PGE₂於蟲草組在第一個月開始有明顯下降的趨勢，同時在第二及第三個月開始達到具有統計學上的顯著差異（ $p<0.05$ ），抑制程度達32.1%，但此情況則不見於對照組（圖二）。嗜中性白血球所產生LTC₄不論是在蟲草組或是對照組，於服藥前後都沒有統計上的差異（圖三）。

III、冬蟲夏草增加CD4(+)T淋巴球對CD8(+)毒殺性T淋巴球的比例

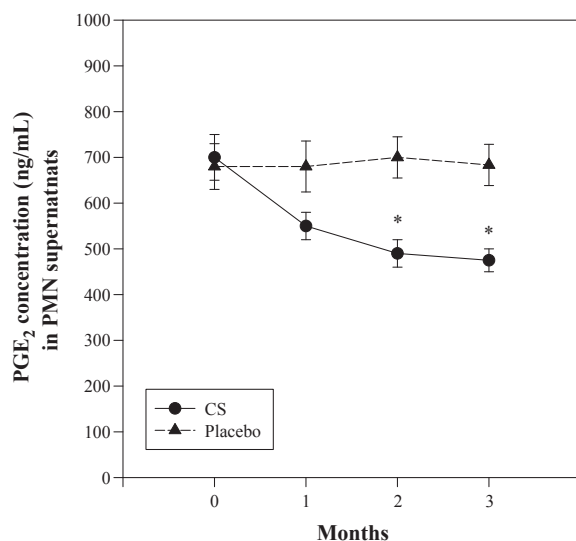
從本研究中我們發現自願者服用藥物三個月後，對受試者淋巴球影響如下：

我們比較兩組在實驗前及實驗後3個月CD4(+)及CD8(+)的T淋巴球比值，我們發現蟲草

組CD4(+) T細胞對毒殺性CD8(+) T細胞之比值增加並且有統計學上的顯著差異（ $p<0.05$ ），但是對照組則沒有上述情形（圖四）。

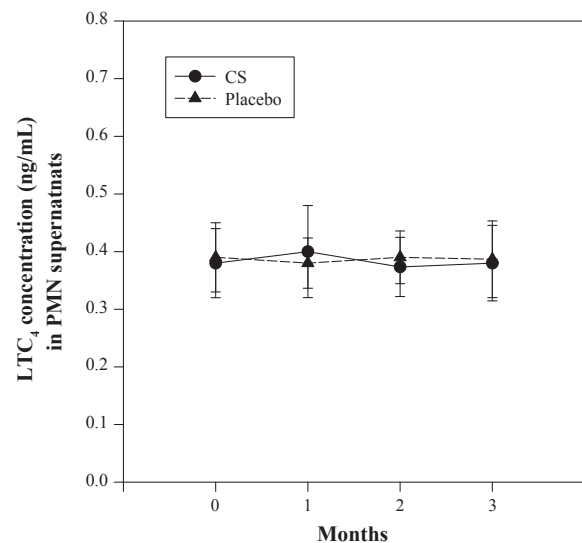
討 論

發炎反應在人體中佔有相當的重要性，可能與細胞破壞或慢性纖維化有關。而發炎反應是保護人體不受外界微生物的感染，嗜中性白血球在微生物侵入人體的24小時內開啓免疫反應的一連串機制，造成局部的發炎並具有吞噬作用以清除病原。然而如果發炎反應機制不正常時，常導致慢性炎症反應，臨床上許多疾病與慢性發炎有密



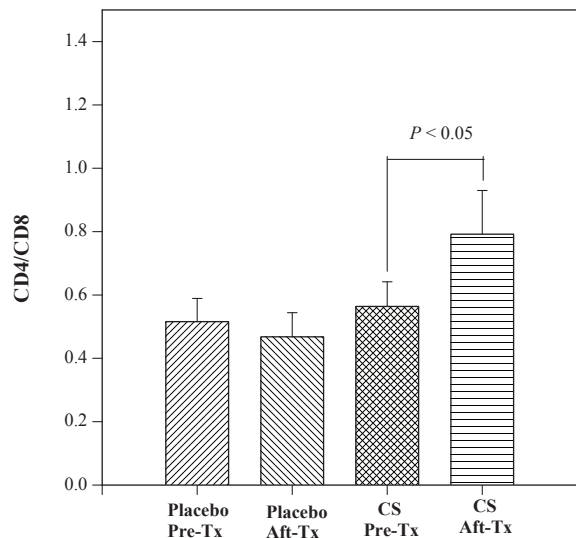
圖二 嗜中性白血球受lipopolysaccharide刺激後產生的PGE₂數值

受試者服用冬蟲夏草膠囊前以及服用後第一、二、三個月分別抽血，嗜中性白血球以lipopolysaccharide刺激後，取上清液以酵素免疫分析法檢測PGE₂的含量，結果顯示蟲草組的嗜中性白血球所產生PEG₂的量於服用後第一個月開始有明顯下降的趨勢且於第二、及三個月與對照組達到具有統計上的差異（“*”為 $p<0.05$ ），抑制程度達32.1%。（圖中CS代表蟲草組；Placebo代表對照組）



圖三 嗜中性白血球受lipopolysaccharide刺激後產生的LTC₄數值

受試者服用冬蟲夏草膠囊前以及服用後第一、二、三個月分別抽血，嗜中性白血球以lipopolysaccharide刺激後，取上清液以酵素免疫分析法檢測LTC₄的含量，結果顯示受試者的嗜中性白血球所產生LTC₄不論是在蟲草組或是對照組，於實驗前後都沒有統計上的差異。（圖中CS代表蟲草組；Placebo代表對照組）



圖四 人工培養冬蟲夏草膠囊對於CD4及CD8單核淋巴球百分率的影響

受試者服用冬蟲夏草膠囊前以及服用後抽血，以流式細胞儀檢測受試者血液中的CD4及CD8單核淋巴球百分率(%)，計算實驗前及實驗後3個月CD4及CD8的比值，結果發現蟲草組CD4及CD8的比值上升並且有統計上的意義($p < 0.05$)。(圖中CS代表蟲草組，Placebo代表對照組；Pre-Tx代表治療前，Aft-Tx代表治療後)

切關係，諸如過敏性疾病的上呼吸道慢性炎症反應，或是慢性肝炎，慢性腎炎等均是如此。由於冬蟲夏草善於調養體質，從過去的臨床經驗發現冬蟲夏草對慢性炎症疾病似乎有一定的幫助，因此確認冬蟲夏草的抗發炎反應在臨床上有極重要的意義。由上述實驗結果我們發現，我們在試驗中所用的人工培養蟲草菌絲體，在使用第二個月及三個月可以觀察到對正常人類嗜中性白血球的吞噬作用有明顯抑制情形，顯示冬蟲夏草具可以抑制嗜中性白血球的活化，進而降低免疫反應的破壞行為。發炎反應中重要的路徑為花生四烯酸的連鎖反應，其中cyclooxygenase pathway與lipooxygenase pathway對於發炎反應最有相關。過去在國立中國醫藥研究所的研究發現³⁰，冬蟲夏草子實體的甲醇抽取物可以抑制人類單核球細胞

產生TNF- α 的能力。最近一篇以大腦缺血再灌流大鼠動物模型觀察發炎反應的研究也發現¹⁵，使用冬蟲夏草治療可以大幅度減少cyclooxygenase 2的表現及多型核細胞的浸潤。而實驗中冬蟲夏草對實驗組受試者PGE₂有明顯抑制作用及對LTC₄無顯著改變，表示人工培養蟲草菌絲抑制發炎的作用可能與cyclooxygenase pathway的抑制有關，而非經由lipooxygenase pathway的抑制。事實上，花生四烯酸經由cyclooxygenase途徑產生的代謝產物PGE₂主要的作用之一即是經由動靜脈血管網上平滑肌細胞的調節，使血管擴張，微血管通透性增加，間接促使嗜中性白血球的浸潤⁴⁰⁻⁴²。雖然在本實驗中沒有針對這個cyclooxygenase pathway進行進一步的探究，未來也可以分子生物學的研究方法找出人工培養蟲草菌絲體作用在cyclooxygenase pathway的哪一個步驟，且是單純抑制或是雙向調節。綜合以上結果，我們推論冬蟲夏草降低嗜中性白血球的吞噬作用及抑制cyclooxygenase pathway均朝著抑制發炎反應的趨勢進行。

在淋巴球的比例上，實驗組的數據可以看出，似乎服用中藥冬蟲夏草後對於淋巴球表現的分布傾向於CD4，CD4細胞在身體中除了有少數的調節性T細胞以外，最主要可以分為幫助型的Th1、Th2、Th17細胞，幫助型的Th2細胞扮演活化B細胞的作用而Th1則為扮演調控CD8細胞的效果⁴⁵；CD8為代表細胞免疫的主要細胞，代表一連串免疫反應的啟動，許多免疫方面的疾病和CD8細胞過度活化有關，例如腎臟移植腎病變⁴⁶、紅斑性狼瘡腎炎⁴⁷、第一型糖尿病⁴⁸、自體免疫肝炎⁴⁹、膽道炎⁵⁰、多發性硬化症⁵¹、異位性皮膚炎⁵²、接觸性皮膚炎⁵³、肥胖病患的脂肪細胞發炎⁴⁸等。過去實驗證實罹患第一型糖尿病大鼠，體內CD8淋巴球細胞缺乏對抑制性傳導物質的敏感性⁵⁴，若CD8細胞過度活化，一連串免疫反應已被啟動，CD8細胞本身並會釋放出IFN- γ

引起發炎反應更加嚴重，其中還牽涉許多細胞激素如IL-8, MCP-1,和MIP-1 α ，引起過度的發炎連鎖反應，進而造成標的器官過度的破壞而引起慢性發炎造成疾病⁵⁵。本實驗的蟲草組受試者服用冬蟲夏草後，淋巴球分佈傾向於CD4(+)細胞，CD8(+)細胞相對呈現抑制狀態，代表冬蟲夏草菌絲體可能有抑制CD8細胞及其相關發炎反應的作用，所以從實驗結果我們推論人工培養蟲草菌絲體不僅在先天性免疫可以減少嗜中性白血球的吞噬作用與PGE₂引起的發炎反應，同時也可以減少後天性免疫中毒殺性CD8(+)細胞的發炎反應，具有適度的抗炎及免疫調節的作用。但是實驗結果顯示冬蟲夏草菌絲體CD4/CD8比例改變，可能是CD4數目增加或是CD8數目減少，在我們這個研究裏因為沒有絕對計數，所以無法得知究竟是CD4數目增加或是CD8數目減少，如果是CD4T淋巴球的數目增加，固然可以增強幫助型T淋巴球的免疫反應，但是T淋巴球還有幾種不同的分型，是否針對否一些分型的淋巴球數目增加還需要進一步的表面CD抗體染色分析，同時CD8淋巴球的減少，是否在功能上的毒殺反應確實受到影響也需要進一步的功能實驗分析，我們在後續的人體研究時，將持續進行相關研究以釐清冬蟲夏草在細胞免疫上的影響。

許多慢性炎症均因不正常的發炎反應造成，如慢性腎炎、腎衰竭、氣喘、動脈硬化、風濕性關節炎、退化性關節炎、腦神經病變、慢性阻塞性肺病…等。臨床上中藥冬蟲夏草常被用於改善體質，針對上述疾病，是否冬蟲夏草可因抑制嗜中性白血球的活性而減緩慢性炎症疾病？慢性腎衰竭疾病過程中牽涉腎臟細胞的受損及修復，當腎臟細胞受到毒素、感染或缺氧等因素造成受損，會引發免疫細胞試圖進行修復，並引起一連串的發炎反應，後續引發的發炎反應若為適當反應，則細胞得以修復，但若後續反應過於強烈則會傷害原本正常的細胞而造成更大的傷害⁵⁶。氣

喘疾病亦與慢性發炎有關，氣喘為慢性肺部疾病以呼吸道發炎及過度敏感反應為特徵，其中牽涉花生四烯酸相關發炎反應，包括cyclooxygenase pathway和lipooxygenase pathway均牽涉在內，當機體處於免疫調控異常狀態，cyclooxygenase pathway和lipooxygenase pathway均會被過度活化並在呼吸道對細胞產生毒害作用⁵⁷。本篇研究暗示，冬蟲夏草的抗炎反應、免疫調控作用可能對於腎臟細胞及呼吸道的慢性發炎有保護作用。過去研究顯示冬蟲夏草對於慢性腎衰竭病患改善血脂異常狀態、腎功能指數、電解質不平衡情形⁵⁸，並對早期糖尿病腎病變患者有降低尿微量白蛋白排泄率功能⁵⁹。而氣喘控制也有研究顯示冬蟲夏草對大鼠支氣管哮喘模型有調節免疫細胞，減少嗜伊紅性細胞等炎症細胞滲出，抑制哮喘的慢性氣道炎症，並與糖皮質激素具有協同作用⁶⁰。此種結果與我們過去臨床上常將冬蟲夏草應用於慢性腎炎及氣喘病患的治療方向是一致的。雖然我們進行的研究是在健康成年自願受試者，我們認為我們所用的人工培養蟲草菌絲體值得進一步研究及評估其對慢性發炎疾病患者的臨床療效。

本實驗對健康成年自願受試者進行三個月的研究，發現冬蟲夏草對於人體發炎反應的抑制作用，未來仍需進行進一步研究以了解這種抑制作用是單純抑制或是雙向調節。此外，正常人是否會因長期服用冬蟲夏草導致免疫反應過度抑制影響則仍需進一步研究。

結 論

由本研究實驗結果，我們發現人工培養蟲草菌絲體對健康受試者的正常人類嗜中性白血球的作用明顯有抑制其活化情形，此種作用可能與cyclooxygenase pathway的抑制有關，此外從單核淋巴球CD4/CD8的比率改變似乎也是朝著降低細

胞媒介免疫反應的調控行為，所以我們認為人工培養蟲草菌絲體有抗發炎及免疫調節作用。

參考文獻

1. 行政院衛生署中華藥典編修委員會中藥集小組，中華中藥典，行政院衛生署，台北，pp. 45-46，2004。
2. 江蘇新醫學院，中藥大辭典，上海人民出版社，上海，p. 949，1977。
3. Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis*: part II. *J. Altern. Complement. Med.*, 4:429-457, 1998.
4. Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. *J. Altern. Complement. Med.*, 4:289-303, 1998.
5. (清)趙學敏，本草綱目拾遺，人民衛生出版社，北京，pp. 130-131，1954（1765年版複印本）。
6. Chen Y, Zhang YP, Yang Y, Yang D. Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps sinensis* as revealed by RAPD markers. *Biochem. Genet.*, 37:201-213, 1999.
7. Chen YQ, Wang N, Qu L, Li T, Zhang W. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29:597-607, 2001.
8. Li SP, Li P, Dong TT, Tsim KW. Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22:144-150, 2001.
9. Yang FQ, Li S, Li P, Wang YT. Optimization of CEC for simultaneous determination of eleven nucleosides and nucleobases in *Cordyceps* using central composite design. *Electrophoresis*, 28:1681-1688, 2007.
10. Chen YQ, Hu B, Xu F, Zhang W, Zhou H, Qu LH. Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 230:153-158, 2004.
11. Cheng KT, Su CH, Chang HC, Huang JY. Differentiation of genuines and counterfeits of *Cordyceps* species using random amplified polymorphic DNA. *Planta Med.*, 64:451-453, 1998.
12. Yue-Qin C, Ning W, Hui Z, Liang-Hu Q. Differentiation of medicinal *Cordyceps* species by rDNA ITS sequence analysis. *Planta Med.*, 68:635-639, 2002.
13. Lo HC, Hsu TH, Tu ST, Lin KC. Anti-hyperglycemic activity of natural and fermented *Cordyceps sinensis* in rats with diabetes induced by nicotinamide and streptozotocin. *Am. J. Chin. Med.*, 34:819-832, 2006.
14. Lo HC, Tu ST, Lin KC, Lin SC. The anti-hyperglycemic activity of the fruiting body of *Cordyceps* in diabetic rats induced by nicotinamide and streptozotocin. *Life Sci.*, 74:2897-2908, 2004.
15. Liu Z, Li P, Zhao D, Tang H, Guo J. Anti-inflammation effects of *Cordyceps sinensis* mycelium in focal cerebral ischemic injury rats. *Inflammation*, 10.1007/s10753-010-9273-5.
16. Chiu JH, Ju CH, Wu LH, Lui WY, Wu CW, Shiao MS, Hong CY. *Cordyceps sinensis* increases the expression of major histocompatibility complex class II antigens on human hepatoma cell line HA22T/VGH cells. *Am. J. Chin. Med.*, 26:159-170, 1998.
17. Huang BM, Chuang YM, Chen CF, Leu SF.

- Effects of extracted *Cordyceps sinensis* on steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 23:1532-1535, 2000.
18. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF, Shiao MS. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest.*, 12:611-615, 1994.
19. Xu RH, Peng XE, Chen GZ and Chen GL. Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 105:97-101, 1992.
20. Cheung JK, Li J, Cheung AW, Zhu Y, Zheng KY, Bi CW, Duan R, Choi RC, Lau DT, Dong TT, Lau BW, Tsim KW. Cordysinocan, a polysaccharide isolated from cultured *Cordyceps*, activates immune responses in cultured T-lymphocytes and macrophages: signaling cascade and induction of cytokines. *J. Ethnopharmacol.*, 124:61-68, 2009.
21. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 114:78-85, 2007.
22. Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, Wang SY. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci.*, 60:2349-2359, 1997.
23. Bok JW, Lerner L, Chilton J, Klingeman HG, Towers GH. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51:891-898, 1999.
24. Wang SM, Lee LJ, Lin WW, Chang CM. 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.*, 69:483-489, 1998.
25. Yamaguchi Y, Kagota S, Nakamura K, Shinozuka K, Kunitomo M. Inhibitory effects of water extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis* on raised serum lipid peroxide levels and aortic cholesterol deposition in atherosclerotic mice. *Phytother. Res.*, 14:650-652, 2000.
26. Cho J, Kang JS, Long PH, Jing J, Back Y, Chung KS. Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. *Arch. Pharm. Res.*, 26:821-825, 2003.
27. Wang BJ, Won SJ, Yu ZR, Su CL. Free radical scavenging and apoptotic effects of *Cordyceps sinensis* fractionated by supercritical carbon dioxide. *Food Chem. Toxicol.*, 43:543-552, 2005.
28. Chen W, Zhang W, Shen W, Wang K. Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophages *in vitro*. *Cell. Immunol.*, 262:69-74, 2010.
29. Byeon SE, Lee J, Yoo BC, Sung GH, Kim TW, Park HJ, Cho JY. P38-targeted inhibition of interleukin-12 expression by ethanol extract from *Cordyceps bassiana* in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 33:90-96, 2010.
30. Kuo YC, Tsai WJ, Shiao MS, Chen CF, Lin CY. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent. *Am. J. Chin. Med.*, 24:111-125, 1996.
31. Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, Suh HJ. Innate immune stimulation of exo-polymers prepared from *Cordyceps sinensis* by submerged culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80:1087-1093, 2008.

32. 魏麒容、郭敏玲、楊榮季、張雪玲、謝佳蓉，冬蟲夏草提取液促進人類單核球轉化之樹突狀細胞的成熟與功能，中醫藥雜誌，16:47-55，2005。
33. Tang J, Tian D, Liu G. Immunosuppressive effect of *Cordyceps* CS-4 on human monocyte-derived dendritic cells *in vitro*. *Am. J. Chin. Med.*, 38:961-972, 2010.
34. Xiao G, Miyazato A, Abe Y, Zhang T, Nakamura K, Inden K, Tanaka M, Tanno D, Miyasaka T, Ishii K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Yamamoto N, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K. Activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Cordyceps sinensis* via a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *Cell. Immunol.*, 263:241-250, 2010.
35. Li CY, Chiang CS, Tsai ML, Hseu RS, Shu WY, Chuang CY, Sun YC, Chang YS, Lin JG, Chen CS, Huang CL, Hsu IC. Two-sided effect of *Cordyceps sinensis* on dendritic cells in different physiological stages. *J. Leukoc. Biol.*, 85:987-995, 2009.
36. Chen GZ, Chen GL, Sun T, Hsieh GC, Henshall JM. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 104:4-8, 1991.
37. Kawanishi T, Ikeda-Dantsuji Y, Nagayama A. Effects of two *Basidiomycete* species on interleukin 1 and interleukin 2 production by macrophage and T cell lines. *Immunobiology*, 215:516-520, 2010.
38. Shi B, Wang Z, Jin H, Chen YW, Wang Q, Qian Y. Immunoregulatory *Cordyceps sinensis* increases regulatory T cells to Th17 cell ratio and delays diabetes in NOD mice. *Int. Immunopharmacol.*, 9:582-586, 2009.
39. 聶木海、張全新、諸茂盛，蟲草多糖口服液的急性及亞慢性毒性實驗研究，現代預防醫學，32:1062-1063，2005。
40. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294:1871-1875, 2001.
41. Bastien L, Sawyer N, Grygorczyk R, Metters KM, Adam M. Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. *J. Biol. Chem.*, 269: 11873-11877, 1994.
42. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41:661-690, 2001.
43. 林胤谷、陳俊良、吳宜鴻、陳以平、楊賢鴻，冬蟲夏草對人類嗜中性白血球活化影響研究，上海中醫藥雜誌，37:49-51，2003。
44. Yang JL, Xiao W, He HX, Zhu HX, Wang SF, Cheng KD, Zhu P. Molecular phylogenetic analysis of *Paecilomyces hepiali* and *Cordyceps sinensis*. *Yao Xue Xue Bao*, 43:421-426, 2008.
45. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, pp. 323-378, 2008.
46. Sementilli A, Franco M. Renal acute cellular rejection: correlation between the immunophenotype and cytokine expression of the inflammatory cells in acute glomerulitis, arterial intimitis, and tubulointerstitial nephritis. *Transplant. Proc.*, 42:1671-1676, 2010.
47. Dölff S, Abdulahad WH, Van Dijk MC, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Urinary T cells in active lupus nephritis show an effector memory

- phenotype. *Ann. Rheum. Dis.*, 69:2034-2041, 2010.
48. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.*, 15:914-920, 2009.
 49. Oo YH, Hubscher SG, Adams DH. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatol. Int.*, 4:475-493, 2010.
 50. Yang GX, Lian ZX, Chuang YH, Moritoki Y, Lan RY, Wakabayashi K, Ansari AA, Flavell RA, Ridgway WM, Coppel RL, Tsuneyama K, Mackay IR, Gershwin ME. Adoptive transfer of CD8⁺ T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis into Rag1^{-/-} mice. *Hepatology*, 47:1974-1982, 2008.
 51. Annibaldi V, Ristori G, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, Romano S, Paolillo A, Abderrahim H, Diamantini A, Borsellino G, Aloisi F, Battistini L, Salvetti M. CD161^{high}CD8⁺T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain*, 134:542-554.
 52. Hennino A, Jean-Decoster C, Giordano-Labadie F, Debeer S, Vanbervliet B, Rozieres A, Schmitt AM, Nicolas JF. CD8⁺ T cells are recruited early to allergen exposure sites in atopy patch test reactions in human atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 127:1064-1067, 2011.
 53. Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, 64:1699-1714, 2009.
 54. Al-Jahdari WS, Sakurai H, Yoshida Y, Mobaraki A, Suzuki Y, Nakano T. MK615, a prospective anti-proliferative agent, enhances CD4/CD8 ratio after exposure to irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 87:81-90, 2011.
 55. Mendu SK, Akesson L, Jin Z, Edlund A, Cilio C, Lernmark A, Birnir B. Increased GABA_A channel subunits expression in CD8⁺ but not in CD4⁺ T cells in BB rats developing diabetes compared to their congenic littermates. *Mol. Immunol.*, 48:399-407, 2011.
 56. Schnaper HW, Hubchak SC, Runyan CE, Browne JA, Finer G, Liu X, Hayashida T. A conceptual framework for the molecular pathogenesis of progressive kidney disease. *Pediatr. Nephrol.*, 25:2223-2230, 2010.
 57. Sow FB, Gallup JM, Olivier A, Krishnan S, Patera AC, Suzich J, Ackermann MR. Respiratory syncytial virus is associated with an inflammatory response in lungs and architectural remodeling of lung-draining lymph nodes of newborn lambs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 300:L12-24, 2011.
 58. 全毅紅、徐力，蟲草製劑治療慢性腎功能衰竭的臨床研究，湖北中醫雜誌，26:11-12，2004。
 59. 江岸林、曹愛萍、褚小燕，發酵蟲草菌粉（CS-4）聯合厄貝沙坦治療早期2型糖尿病腎病臨床觀察，中國中西醫結合腎病雜誌，11:994-995，2010。
 60. 張旻、周新、李群，不同劑量蟲草活力素對大鼠支氣管哮喘模型慢性氣道炎症的作用機制研究，中華哮喘雜誌，4:191-196，2010。

EFFECT OF CULTURED MYCELIA *CORDYCEPS SINENSIS* ON NEUTROPHIL- AND T-CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE IN HUMANS

Chia-Ying Hsu¹, Jiun-Liang Chen^{1,2}, Sien-Hung Yang^{1,2,*}

¹Center for Traditional Chinese Medicine, Linkou Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan

²School of Traditional Chinese Medicine, Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan

(Received 24th February 2011, accepted 05th July 2011)

Cordyceps sinensis is known as a medicinal herb that can be used to enhance chi and kidney function in Traditional Chinese medicine that was commonly used by folks in treating inflammatory diseases such as chronic nephritis and bronchitis. The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of cultured *Cordyceps sinensis* on neutrophil- and T lymphocyte- mediated immune responses. In the present study, we recruited healthy volunteers to randomly take either 1.5 gm of mycelium of cultured *Cordyceps sinensis* or placebo twice daily for three months. Blood samples were collected from volunteers to define their phagocytotic function of neutrophils, PGE₂ level and LTC₄ level produced by neutrophils as well as CD4/CD8 ratio of T lymphocytes before the study, and monthly, until the third month when the study completed. In the experimental group treated with cultured *Cordyceps sinensis*, neutrophil phagocytosis decreased significantly (P<0.05). After 100 µg/ml lipopolysaccharide incubation, the amount of PGE₂ produced by neutrophils also decreased significantly (P<0.05). Three months treatment with cultured *Cordyceps sinensis* significantly increased CD4/CD8 ratios. In summary, cultured *Cordyceps sinensis* significantly decreased the phagocytotic function of neutrophils, inhibited cyclooxygenase pathway and increased CD4/CD8 ratios. We concluded that the mycelium of cultured *Cordyceps sinensis* has a moderate anti-inflammatory effect.

Key words: *Cordyceps sinensis*, neutrophil, prostaglandin, lymphocyte

*Correspondence to: Sien-Hung Yang, Division of Chinese Internal Medicine, Center for Traditional Chinese Medicine, Chang Gung Memorial Hospital, No.123, Dinghu Rd., Guishan Township, Taoyuan County 33378, Taiwan, Tel: +886-3-3196200 ext. 2611, Fax: +886-3-3298995, E-mail: dryang@adm.cgmh.org.tw