

冬虫夏草对白血病NK细胞影响的体外研究

上海医科大学华山医院血液研究室 (上海 200040)

刘 超 卢 珊 姬美蓉 谢 毅

内容提要 为探讨冬虫夏草(以下简称虫草)对白血病的作用及抑癌机制,观察了虫草水提液对正常人及白血病患者外周血NK细胞的影响,发现虫草可提高正常人及白血病NK细胞活性,在所使用的剂量范围内(1.56~25mg/ml)呈剂量-效应依赖性($r=0.984, P<0.01$; $r=0.988, P<0.01$)。同时发现虫草可促进淋巴细胞表面CD16抗原的表达,提高与K₅₆₂细胞的结合率。毒性试验表明对血细胞无毒性作用。认为虫草作为生物反应调节剂用于急性白血病治疗以提高NK细胞活性,值得进一步研究、开发与利用。

关键词 急性白血病 冬虫夏草 NK细胞

冬虫夏草(Cordyceps Sinensis, CS)为传统名贵滋补品。近20年来的研究证明,冬虫夏草具有免疫调节^{〔1,2〕}、抑制肿瘤细胞生长^{〔3〕}等作用。临床上曾有用虫草治疗肝炎^{〔4〕}、恶性肿瘤^{〔5〕}的报告。至于其对白血病的作用及抑癌机制尚未见详尽报告。已知NK细胞作为机体免疫监视的第一道防线与白血病的发生、发展有重要关系,提高白血病NK细胞活性可能对改善白血病的缓解率、延长生存期有重要意义。本文采用单克隆抗体及效靶细胞结合试验观察冬虫夏草对人白血病外周血NK细胞的影响,为临床使用冬虫夏草提供理论依据。

资料与方法

一、研究对象:经细胞形态学及细胞化学染色确诊的本院住院急性白血病患者10例,本院健康自愿者5名。

二、试剂与仪器

1. 单克隆抗体Leu-11b(Becton Dickinson USA)。

2. 冬虫夏草水提液:取西藏产冬虫夏草复合体,先用乙醚和95%乙醇浸泡处理,再用水提取得到上清液,每毫升含生药500mg。

三、冬虫夏草对NK细胞的刺激作用:常规分离外周血单个核细胞(PBMC),台盼蓝测定细胞活力>95%,加不同浓度的虫草液,37℃

5%CO₂培养箱孵育18~20h, RPMI-1640液洗2次,调细胞浓度 2×10^5 /ml、 1×10^6 /ml。

四、按改良微量细胞毒方法检测CD16⁺细胞,方法见文献^{〔6〕}。

五、采用LDH释放试验检测NK细胞活性。参见文献^{〔7〕}略改良,效应细胞浓度 1×10^6 /ml,靶细胞(K₅₆₂)浓度 1×10^5 /ml,效靶细胞共育3h,采用490nm波长检测OD值。

六、效应细胞-靶细胞结合试验:将效应细胞(PBMC)与K₅₆₂细胞按10:1混合,共孵育3h后离心1000r/min×5min,使效靶细胞充分结合,弃去部分上清液,用吸管轻轻抽吸5次使细胞重悬,制片,高倍镜下计数200个淋巴细胞,计算与靶细胞结合的淋巴细胞百分数。

七、结果统计:采用相关分析及t检验,文中数据均为 $\bar{x} \pm S$ 。

结 果

一、冬虫夏草对正常人及白血病外周血NK细胞活性的影响:将虫草水提液500mg/ml用PBS液依次作1:1、1:2、1:4、1:8、1:16稀释,然后每孔10μl分别加入0.2ml 1×10^6 /ml的细胞悬液中。同时设立以RPMI-1640液代替虫草的对照组,孵育后检测NK细胞活性。结果:正常人及白血病NK细胞活性的升高均与虫草浓度呈剂量依赖性($r=0.984, P<0.01$; $r=0.988$

表1 虫草对NK细胞活性影响的剂量-效应关系 ($\%, \bar{x} \pm S$)

组 别	例 数	NK细胞活性(500mg/ml)					P 值
		1/16	1/8	1/4	1/2	1	
正 常 人	4	18.1 $\pm$ 5.7	21.6 $\pm$ 7.9	32.0 $\pm$ 13.3	35.8 $\pm$ 10.3	47.2 $\pm$ 11.3	<0.01 [*]
白血病患者	6	8.7 $\pm$ 9.5	18.1 $\pm$ 9.9	32.1 $\pm$ 16.4	37.7 $\pm$ 15.0	45.0 $\pm$ 20.6	<0.01 ^{**}

注: *正常人组虫草浓度与NK活性的相关性检验; **白血病患者虫草组浓度与NK活性相关性检验

$P < 0.01$), 见表1。

5名健康人, 10例急性白血病患者, 其中急性淋巴细胞白血病与急性非淋巴细胞白血病各5例, 发作期与缓解期各5例。实验组以12.5mg/ml浓度刺激, 结果较1640液对照组NK细胞活性明显升高, 见表2。

表2 虫草对NK细胞活性的增强作用 ($\%, \bar{x} \pm S$)

组 别	例 数	NK 细胞活性	
		对照	实验(12.5mg/ml)
正 常 人	5	19.3 $\pm$ 1.9	33.5 $\pm$ 10.3 [*]
白血病患者	10	7.6 $\pm$ 4.7	32.2 $\pm$ 13.2 ^{**}

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

二、冬虫夏草对淋巴细胞表面抗原表达的作用: 将正常人2名、白血病患者3例的外周血单个核细胞 1×10^6 /ml, 分设25mg/ml的虫草组与1640液对照组, 孵育18~20h后1640液洗涤, 调细胞浓度 2×10^6 /ml, 采用leu-11b单克隆抗体检测 CD_{16}^+ 细胞数。结果加虫草组 CD_{16}^+ 细胞29.2 $\pm$ 10.3%, 对照组17.6 $\pm$ 8.8%, 两组相比差别有显著意义($P < 0.01$)。

三、冬虫夏草对效-靶细胞结合率的影响: 将虫草25mg/ml与1640液各10 μ l分别加入 1×10^6 /ml的效应细胞0.2ml中, 孵育后与 1×10^5 /ml的 K_{562} 细胞0.2ml混匀, 共孵育3h计算效-靶细胞结合率。结果虫草组结合率17.7 $\pm$ 1.9%, 对照组12.2 $\pm$ 1.0%, 两组相比有显著性差异($n = 5$, $P < 0.01$)。

四、冬虫夏草对血细胞的毒性作用: 将虫草水提液25mg/ml与PBMC共育, 同时设不加虫草的对照组, 孵育后台盼蓝染色计算细胞活力。虫草组96.1 $\pm$ 1.6%, 对照组96.9 $\pm$ 1.4%。

两组间差异无显著性($P > 0.05$)。

讨 论

本实验结果显示, 冬虫夏草对正常人及白血病NK细胞活性具有明显的增强作用, 而且在所使用的剂量范围1.56~25mg/ml内呈剂量-效应依赖性。国内徐氏经对小鼠、正常人及受免疫抑制NK细胞的研究也得到了类似的结论⁽⁸⁾。结果还显示, 虫草可诱导淋巴细胞表面 CD_{16} 抗原的表达, 有可能促使急性白血病时血液中存在的前NK细胞或不成熟的、功能有缺陷的NK细胞进一步发育成熟为具有功能的NK细胞, 如促使NK细胞毒性因子(NKCF)的合成, 增强NK细胞的再循环能力等。此与干扰素的作用相类似。至于虫草是否通过诱导干扰素、白细胞介素等生物介质而增强NK活性, 有待进一步研究。

生物反应调节疗法是通过提高机体的免疫力杀伤异常增殖及化疗后残留的白血病细胞。它正作为白血病治疗的重要手段而日益受到重视。已证明某些淋巴因子如IFN、IL-2等可增强白血病NK活性^(9,10), 采用IFN、IL-2及由IL-2激活的LAK细胞治疗肿瘤已有成功报告, 但因药源困难、价格昂贵及或多或少的副作用使应用受到限制。本研究结果初步显示, 冬虫夏草作为免疫增强剂对白血病NK细胞的影响, 在临床上的进一步应用有待更深入研究。

参 考 文 献

1. 刘耕陶. 冬虫夏草的免疫药理作用. 中西医结合杂志 1985; 5(10):622.
2. 匡彦德, 等. 冬虫夏草免疫增强作用机理的研究. 上海免疫学杂志 1989; (1):6.
3. 张淑兰, 等. 冬虫夏草及人工虫草菌丝体抗小鼠lewis肺

- 癌的研究。中药通报 1987; (2):53。
4. 武勇泉, 等。人工虫草菌丝治疗慢性活动型肝炎。河北卫生防疫(汇编) 1989:29。
 5. 张进川, 等。至灵胶囊辅助治疗恶性肿瘤30例小结。上海中医杂志 1986; (10):25。
 6. 陈一平, 等。改良微量细胞毒试验检测外周血 T、B 细胞总数及 T 细胞亚群。免疫学杂志 1988; 4(3):163。
 7. 陈丙莺, 等。简易自然杀伤试验-LDH 释放改良法。上海免疫学杂志 1989; 9(4):218。
 8. 徐仁和, 等。冬虫夏草对天然杀伤细胞活性及肿瘤克隆形成的影响。湖南医学院学报 1988; (2):107。
 9. Sorakaar D, et al. Increased natural killer cell activity and numbers of leu-7 and leu-11b (CD16) positive cells in bone marrow of children in remission from acute lymphoblastic leukemia. Scand J Immunol 1989; 29(1):65。
 10. Gabrilovac J, et al. Defects of natural killer cell activity in children with untreated acute lymphocyte leukemia. Klin Wochenschr 1988; 66(8):354。

• 病例报告 •

电针治疗胃肠神经官能症、癔症性瘫痪和坐骨神经痛各 1 例

中国医学科学院肿瘤医院(北京 100021) 周家丽 刘韵源

近 3 年来, 我们用自制广谱防癌保健仪, 在防癌普查的同时, 为群众治疗各类常见和多发性疾病, 获得良好效果。不仅有效地提高了普查受检率, 而且对神经性和功能性疾患, 以及各种疼痛与软组织损伤, 均可取得意想不到的效果。报告如下。

一、广谱防癌保健仪的治疗原理

广谱防癌保健仪具备耳穴探诊和电磁同步治疗功能。前者借助人体对外加信号的平均功耗指标, 在耳部探测与疾病相关的反应点区; 后者则是采用音乐调制的噪声信号, 经功率放大, 并升压至峰-峰值为 800~1200V 交流信号, 平均电流 0.05~0.5mA, 用以控制一个电磁按摩器, 或直接引出作电针治疗。电磁按摩器能够自动寻穴, 凡疾病反应点区, 其阻抗下降, 功耗上升, 患者会有明显刺激感。此种“高能寻的”治疗, 优于通常针灸疗法, 往往能收到立竿见影之效果。

二、胃肠神经官能症 1 例

患者女性, 70 岁, 长期患有腹胀、发烧、失眠、周身疼痛等多种病症, 经 X 线、B 超和 CT 等检查, 未见器质性病变。1989 年 10 月, 因生气导致停食, 进食、进水呕吐不止, 已 1 月有余, 静脉输液维持。经探诊, 在耳部找到敏感反应点: 胃肠、三焦、内分泌、皮质下、脑点、神门和交感神经丛, 用电针治疗 0.5h 留针巩固, 并在头皮胃区通电后埋入头皮针。次日患者可起床进食。第二次治疗同前穴位通电 0.5h。5 天

后去耳针及头皮针, 病愈出院。至今未再复发, 其他症状也随之消失。

三、坐骨神经痛 1 例

患者女性, 56 岁, 农民, 患坐骨神经痛 1 年有余, 加重 1 个月。1990 年 9 月用电针治疗。耳部探诊发现坐骨神经、膀胱、腰、髋关节等敏感反应点, 施以电针, 5 min 后患者不再呻吟; 用电磁按摩器在腰、臀和腿部反应点区按摩 0.5h 后, 患者能起床行走, 爬楼梯和跑步自如, 不再有任何不适感觉。观察 1 日后, 未见反复, 安然出院。

四、癔症性瘫痪

患者男性, 70 余岁, 原长春大学教授, 因不慎跌倒后, 开始卧床不起, 至今已 3 年余, 双腿肌肉已萎缩。经多家医院诊治不愈, 也未见器质性病变。患者悲观消极。1990 年 8 月, 耳部探诊发现双膝、腰腿、神门、心、皮质下、脑干、内分泌等穴位呈强阳性反应, 电针治疗 15min, 并用电磁按摩器按摩双膝 15min, 耳穴留针巩固。之后, 嘱患者站立, 弃拐练习行走成功之后, 开始练习快步走, 又取得成功, 自己行走回家。次日电针和按摩治疗(穴位同前) 0.5h, 5 日后去针, 已行动自如。嘱患者每日爬楼梯, 以恢复肌力。

近 3 年来, 在防癌普查中, 我们已累积义务为群众治疗各类常见和多发性疾病 5000 余人次, 均取得较好疗效。中西医结合, 在肿瘤预防中大有作为, 值得深入探讨和推广。

Abstracts of Original Articles

Analysis of the Correlations between Immunological Changes and Syndrome Groups of Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP)

Yang Yu-fei (杨宇飞), et al

Dept. of Hematology, Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)

To study the relationship between the immunological changes and syndrome (Zheng, 证) groups by TCM of ITP, the T-lymphocyte subsets, B-lymphocyte, NK cell, platelet-associated IgG (PAIgG, PAIgA, PAIgM) and antiplatelet-autoantibodies (GPIIb, GPIIIa, GPIb) of 66 patients with ITP were assayed using APAAP and ELISA method separately. It was found that the T-lymphocyte subsets, PAIg and syndrome groups of ITP were closely related. From the group of blood-heat (Xuerewangxing, 血热妄行) to the group of deficiency of both Qi and blood (气血两虚), the group of asthenia of both Spleen and Kidney (脾肾两虚), the group of deficiency of Liver-yin and Kidney-yin (肝肾阴虚), and the group of deficiency Yin and Yang (阴阳两虚) T lymphocyte successfully increased (from $29.0 \pm 8.0\%$ to $47.2 \pm 10.0\%$), Th/Ts ratio declined (from 1.35 ± 0.60 to 0.69 ± 0.10), PAIg increased gradually except for PAIgM, PAIgG of the group of deficiency Yin and Yang (阴阳两虚). Only the Th of the group of asthenia of both Spleen and Kidney among 5 syndrome groups was decreased significantly and contrary to the group of deficiency of Liver-Yin and Kidney-Yin. These results indicated that every syndrome group has specific characteristics, and immunological changes of ITP could have prognostic value.

Key Words immune thrombocytopenic purpura, Syndrome (Zheng, 证) group, T-subsets, PAIg, anti-GPAb, NK cell, B-lymphocytes

(Original article on page 263)

Study on Effects of Cordyceps Sinensis (CS) on in Vitro NK Cells

Liu Chao (刘超), Lu Shan (卢珊), Ji Mei-rong (姬美蓉), et al

*Research Unit of Haematology, Huashan Hospital,
Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

The effect of Cordyceps sinensis (CS) on peripheral NK cells from healthy persons and leukemia patients were studied. The results showed that CS could augment the NK cell activity, meanwhile, the dose-dependent effect was found within the range of dosage adopted ($r=0.984$, $P<0.01$; $r=0.988$, $P<0.01$). Furthermore, CS could also improve the CD16 marker expression on lymphocytes and the binding capacity to K562 cells. Cytotoxicity could not present when the PBNCs were co-incubated with CS. These results suggested that CS could be exploited and utilized as an approach of biological responsive modifier therapy (BRMT) in the treatment of leukemia.

Key Words acute leukemia, Cordyceps sinensis, NK cell

(original article on page 267)

The Preliminary Observation of Treatment for Diabetic Retinopathy Utilizing with Nourishing Yin, Tonifying Kidney and Blood Activating Herbs

Deng Ya-ping (邓亚平), Xie Xue-jun (谢学军)

Dept. of Ophthalmology, The Hospital of Chengdu TCM College, Chengdu (610072)

23 cases including 45 eyes of diabetic retinopathy treated with nourishing Yin, tonifying Kidney and blood-activating herbs were presented. The results showed that the serum viscosity and cholesterol were markedly decreased ($P<0.01$), and the implicit times of a-wave and b-wave in flash electroretinogram (F-ERG) were significantly advanced than those of themselves before treatment ($P<0.01$ and $P<0.05$ respectively). The visual acuity in most cases was improved and the effective rate was 64.44%. The therapeutical mechanism for diabetic retinopathy used by nourishing Yin, tonifying Kidney and blood-activating herbs were discussed. The authors suggested that the Chinese