

利用流動細胞分析儀偵測植生蟲草抗腫瘤多醣體(PN-2)對小白鼠巨噬細胞吞噬能力及輔助 T 淋巴細胞活性之影響

李玲玟 王正怡 蘇慶華

摘 要

雙節棍孢子植生蟲草(*Phytocordyceps ninchukispora* Su et Wang)是1985年於台灣發現的新屬植生蟲草(*Phytocordyceps*)之單一種，由液態振盪培養液離心，取其上清液，經超微過濾器、分子篩及離子交換法可純化出水溶性多醣體(PN-2)。

由過去之研究中得知 PN-2 具有頗似香菇多醣體(Lentinan)之抗腫瘤及免疫調節作用，除了能使植入小白鼠肺臟腫瘤的轉移受到阻礙，也能降低小白鼠皮下腫瘤惡化程度外，同時也具有免疫調節作用，可使小白鼠體內 T 淋巴細胞總數、輔助 T 淋巴細胞(Helper-T, Th)及巨噬細胞(macrophage)之數目增加。

本實驗乃欲進一步探討 PN-2 除了增加上述細胞之數目外，是否也能促進其功能，故以 T-依賴性抗原，即綿羊紅血球，注射到已投與 PN-2 的老鼠腹腔內，數日後採老鼠眼眶血，以微量紅血球凝集法(Microhemagglutination)測定其抗綿羊紅血球抗體之力價，結果發現實驗組與對照組小白鼠之抗體力價沒有差異，顯示 PN-2 對抗體之產生沒有影響。利用流動細胞分析儀(Flow cytometer)分析巨噬細胞對已被螢光標示的白色念珠菌(*Candida albicans*)之吞噬能力，來測定 PN-2 對巨噬細胞吞噬能力之影響，結果發現 PN-2 可使巨噬細胞吞噬能力顯著增加，投與 PN-2 後其常在巨噬細胞(Resident macrophage)及硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞(Thioglycollate elicited macrophage)與白色念珠菌結合之能力分別為 $41.11 \pm 1.65\%$ 與 $61.55 \pm 2.70\%$ ，對照組為 $29.88 \pm 1.99\%$ 與 $41.28 \pm 1.86\%$ ，扣除吸附於經疊氮化鈉(Sodium azide, NaN_3)處理過的巨噬細胞外之白色念珠菌，得知投與 PN-2 後小白鼠常在巨噬細胞及硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞吞噬白色念珠菌之能力分別為 $10.72 \pm 0.53\%$ 與 $23.31 \pm 0.39\%$ ，對照組為 $4.62 \pm 0.92\%$ 與 $7.54 \pm 0.92\%$ ，顯示 PN-2 能增加小白鼠常在巨噬細胞及硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞之吞噬能力。

由以上之結果，吾人推測 PN-2 可選擇性的作用於 Th 1，而非作用於 Th 2，促進其產生 Interleukin-2 (IL-2)、Interferon- γ (IFN γ)，進而活化巨噬細胞。

關鍵詞：植生蟲草水溶性多醣體 (PN-2)，免疫細胞活性，流動細胞分析儀。

植生蟲草 (*Phytocordyceps ninchukispora* Su et Wang) 是 1985 年於台灣中部發現之新真菌屬⁽¹⁾，分類上屬於核菌綱 (Pyrenomycetes)，球殼菌目 (Sphaerules)，麥角菌科 (Clavicipitaceae)，寄生於瓊楠 (*Beilschmiedia erythrophloia*) 之種子⁽²⁾。

有關植生蟲草之研究發現，在人工培養的子實體中所分離出之雙帖類 (diterpenoid) 成份具有抗細菌及酵母菌之作用⁽⁵⁾，亦可在子實體丙酮萃取物中發現具有化學肝障礙排除之成份⁽³⁾，此外由菌絲之液態振盪培養液中，可純化出具有抗腫瘤轉移之成份，經研究現已知其為以 β -1,4-鍵結為主鏈之聚乙醯葡萄糖氨 (Poly-N-Acetyl-Glucosamine) 之水溶性多醣體，PN-2⁽⁷⁾；此水溶性多醣體也具有多項免疫調節之效應，能使 T 淋巴細胞總數、輔助 T (Helper T, T_h) 淋巴細胞及巨噬細胞 (macrophage) 增加，因而提高輔助 T 與抑制 T 淋巴細胞之比率，而且無細胞毒性，也無基因毒性^(4,6)。

近年來醫藥界致力於開發能抑制腫瘤生長並具有增強免疫能力的作用，且無害於生物體之藥物，而真菌多醣體兼具這些性質^(12,15,23)。本實驗之目的乃探討此抗腫瘤多醣體 PN-2 除了增加輔助 T 淋巴細胞、巨噬細胞之數目以及 Th/Ts (Helper T/Suppressor T) 之比例外，是否也能增加其功能。小白鼠經投與 PN-2 後，再注射綿羊紅血球，然後抽血測抗綿羊紅血球抗體力價，或小白鼠經投與 PN-2 後測量巨噬細胞對白色念珠菌之吞噬能力，藉以偵測免疫細胞之活性是否受到影響，以便探討其抗腫瘤機轉，本實驗是利用流動細胞分析儀，依據不同細胞之大小、顆粒性、利用紅色及綠色

螢光之標定⁽⁸⁾，分析巨噬細胞對白色念珠菌之吞噬能力，取代傳統螢光顯微鏡之人工計數法。

材料及方法

一、動物

6-8 週齡之 BALB/C 雄性小白鼠，體重約 22 克，購自台大動物中心。

二、材料

PN-2 之純化依照已建立之方法⁽⁴⁾，描述如下：

將植生蟲草之孢子接種於含 1% Yeast extract (Difco)、0.5% Peptone (極東製藥)、及 3% Glucose 之液態培養基內，25°C 下振盪培養 18 天後，將培養液在 4°C 下離心 15,000 rpm, 10 min (CR 20 B 2, rotor: RPR 20-2 Hitachi)，除去菌絲體及孢子，上清液以超微過濾器 (Minitan Ultrafiltration System, Millipore) 分離，分離膜可分離物質之分子量為 3×10^5 ，收集分子量 3×10^5 以上之部份，以等量之蒸餾水平衡除去分子量 3×10^5 以下之物質，再冷凍乾燥 (FD-5 N, Eyela) 保存，以此冷凍乾燥物再進行更進一步的純化，以蒸餾水溶解，再離心 18,000 rpm, 10 min 取得水溶性部份，再以超微過濾器其分離膜之分子量為 3×10^5 濃縮後，再利用 Gel-filtration 方法，以 Fractogel TSKHW-65 (s) 裝填之層析管 (Superformance 60 \times 1.6 Φ cm, Merck) 以 HPLC 系統 (LC-4 A, Shimadzu) 進行純化，收集主要吸收峰沖提液，再以超微

過濾器其分離膜之分子量為 3×10^5 濃縮後，進行冷凍乾燥備用。

三、方法

將小白鼠分為八組，分別進行巨噬細胞吞噬能力及抗體產生能力之試驗，實驗組靜脈注射投與 PN-2 (1 mg/day/mouse)，對照組靜脈注射投與 PBS，其方法如(圖一)所示，並以下列方法測定小白鼠之抗體力價及吞噬能力。

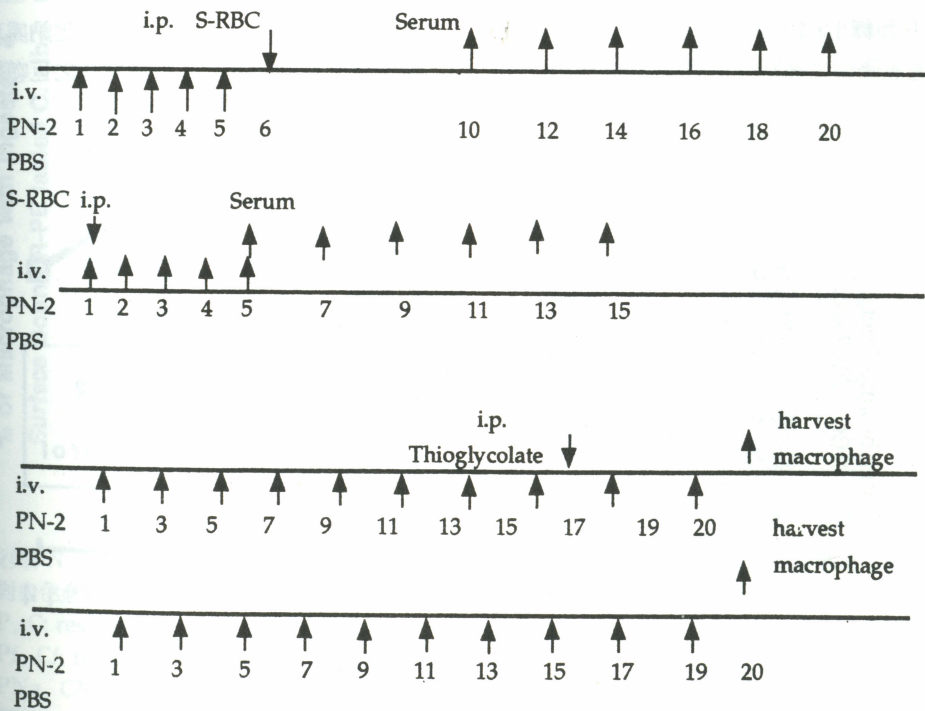
1. 抗體產生能力之測定：

小白鼠分為四組，每組 5 隻，其中兩組分別於接受抗原注射之前或同時投與 PN-2，另外兩組為對照組投與 PBS。以 1×10^8 綿羊紅血球細胞注射於小白鼠腹腔，4、6、8、10、12、14 天後分別由眼窩採血，收集血清貯藏於 -70°C ，利用紅血球微量凝集法 (Microhemagglutination)⁽¹³⁾ 測定抗體力價。

2. 巨噬細胞吞噬能力之測定：

小白鼠分為對照組及實驗組，採取腹腔巨

噬細胞，兩組所採取之腹腔巨噬細胞都有兩種，一為常在巨噬細胞 (Resident macrophage)，即未經刺激之巨噬細胞，另一為硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞 (Thioglycollate elicited macrophage)，即取集巨噬細胞四天前，小白鼠接受 1 ml 4.05% Thioglycollate broth (Difco) 腹腔注射。以含 Sodium citrate (Wako) 之 HBSS (Hanks' balance salt solution) 沖洗老鼠腹腔液分別採收 Resident macrophage 及 Thioglycollate-elicited macrophage，再進行吞噬作用之測定^(9,10,11)。常在巨噬細胞是將六隻小白鼠的腹腔滲出液聚放在一起而獲得，而硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞是將三隻小白鼠的腹腔滲出液聚放在一起而獲得。白色念珠菌為標的細胞之備製，先將 24 小時培養之白色念珠菌與 Rabbit anti-Candida albicans-Ab (Serotec) 4°C 作用 30 分鐘，再與 Goat anti-rabbit Ab-Rphycoerythrin (Caltag) 4°C 作用 30 分鐘，並將細胞調為 $5 \times$



圖一、PN 2 與 PBS 之投與，眼窩血之採集，巨噬細胞之集取流程。

10^9 cells/ml 備用。將巨噬細胞與已標定之白色念珠菌置於 37°C 60 分鐘，加上含有 6% Bovine serum albumin (Sigma) 之 PBS 離心並去上清液再加入含 1% BSA 及 0.2% Sodium azide，再與 Rat monoclonal Ab to macrophage-FITC (Serotec) 4°C 作用 30 分鐘。以上所使用之抗體均經事先滴定，選出與抗原反應之最適當濃度，爲了將僅附著在巨噬細胞的白色念珠菌扣除，故每組巨噬細胞均分爲事先經疊氮化鈉(Sodium azide, NaN_3) 及未經處理兩種情況，再進行流動細胞分析，所有的實驗均做三份(Triplicated)。

3. 流動細胞分析儀

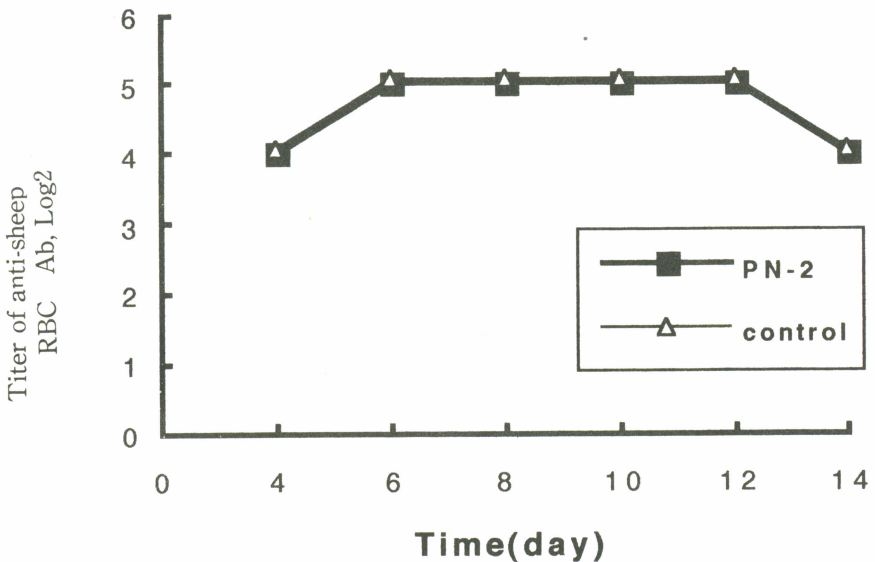
本研究使用之流動細胞分析儀爲 FACS-can (Becton-Dickinson U. S. A.)，可依據不同細胞之大小、顆粒性、紅色及綠色螢光之標定進行實驗結果之分析⁽⁶⁾。經以上標定於 480 nm 雷射激光照射後巨噬細胞呈綠色螢光 (FITC)，白色念珠菌呈紅色螢光 (R-PE)。先以螢光顯微鏡觀察染色情況後，再以流動細胞儀分析計算 1×10^4 細胞同等對綠色螢光及紅色螢光呈陽性之細胞判定爲巨噬細胞與白色念

珠菌結合者，扣除附著在巨噬細胞的白色念珠菌，即可計算出巨噬細胞之吞噬能力，以百分比表示之，本研究流動細胞分析軟體爲 Consort-30。

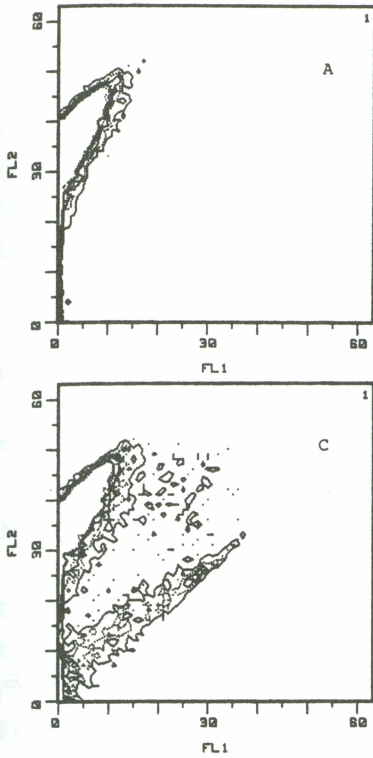
結 果

投與 PN-2 對抗體產生之影響如(圖二)，以靜脈注射投與 PN-2 1 mg/mouse/day 無論在抗原刺激前或同時投與，結果發現抗綿羊紅血球抗體之產生情形，不論時間之早晚、力價的高低、或抗體持續之天數，都與對照組相同，可由圖二實驗組與對照組抗體反應曲線互相重疊而得知。

隔日靜脈注射投與 PN-2 十次後，常在巨噬細胞 (Resident macrophage)，及硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞 (Thioglycollate elicited macrophage)，對白色念珠菌之吞噬能力，經流動細胞分析儀偵測如(圖三)所示，顯示實驗組小白鼠巨噬細胞對白色念珠菌之吞噬能力都比對照組強(圖四)，若以經疊氮化鈉處理過之常在巨噬細胞與硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞作

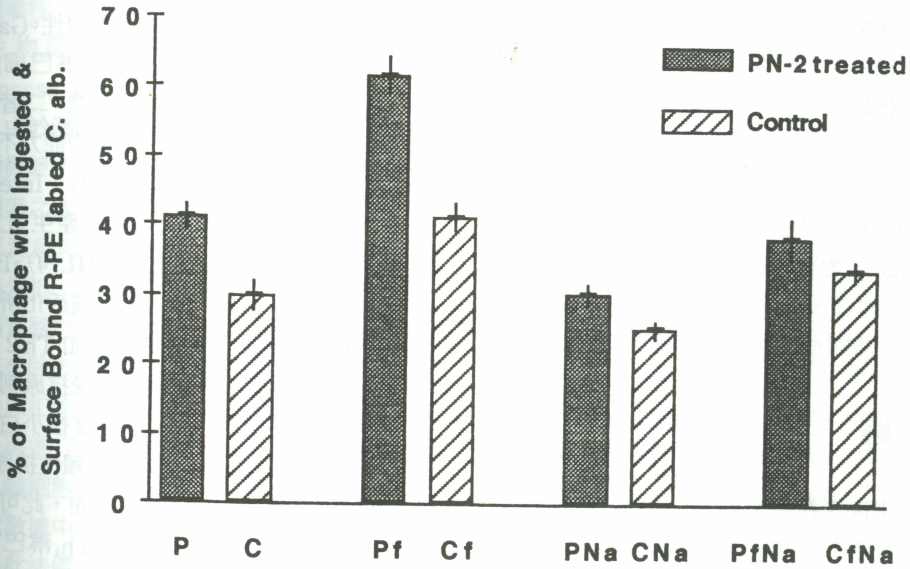


圖二、投與PN 2 與小白鼠抗綿羊紅血球抗體力價隻影響。投與PN 2 後每隔一段時間眼窩採血，血清經二倍稀釋後以微量紅血球凝集法測定抗體力價



圖三、流動細胞儀分析圖

- A. 紅色螢光 (R-PE) 標定之白色念珠菌
- B. 綠色螢光 (FITC) 標定之巨噬細胞
- C. 巨噬細胞及白色念珠菌混合後進行吞嚥作用，同時具有 R-PE 及 FITC 陽性之區或為計數範圍。



圖四、投與 PN-2 後對小白鼠腹腔巨噬細胞吞嚥能力之影響 (—) 小鼠投與 PN-2 後以流動細胞儀測定巨噬細胞對白色念珠之吞嚥能力 (含攝入細胞內及附在巨噬細胞表面上之白色念珠菌)

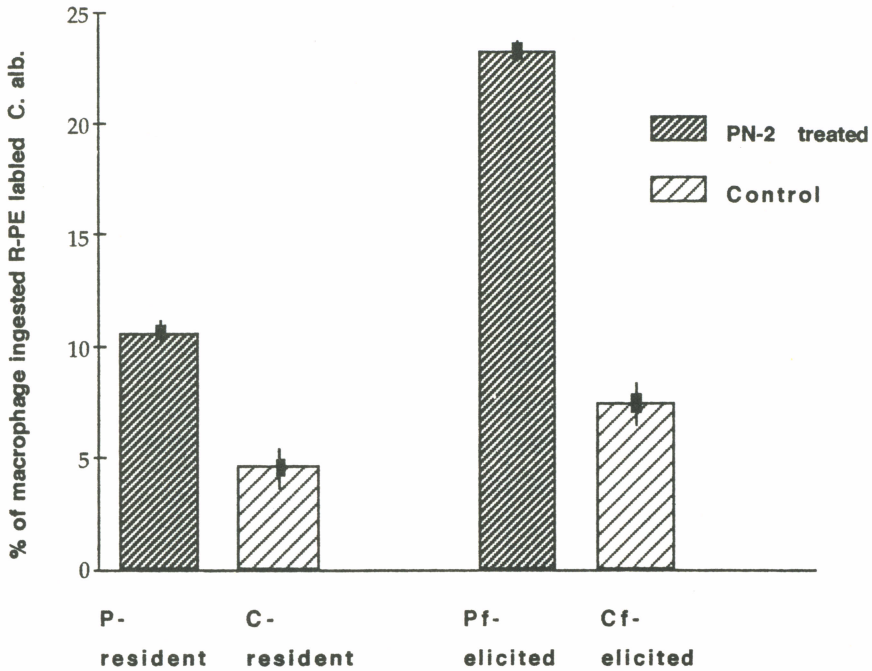
P, C: resident macrophage

Pf, Cf: thioglycollate elicited macrophage

PNa, CNa: resident macrophage with NaN₃ treated

PfNa, CfNa: thioglycollate elicited macrophage with NaN₃ treated

P值 < 0.005



圖五、投與PN 2 後對小白鼠腹腔巨噬細胞吞噬能力之影響(○)鼠投與PN 2 後,以流動細胞儀測定巨噬細胞對已標定的白色念珠菌之吞噬能力(只含攝入之白色念珠菌)。P值<0.005

為白色念珠菌吸附在細胞表面之對照,則扣除吸附在細胞表面上之白色念珠菌,實驗組之常在巨噬細胞與硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞所完全吞入之白色念珠菌比對照組多(圖五),其結果分別為 $10.72 \pm 0.53\%$ VS $4.62 \pm 0.92\%$ ($p < 0.005$), $23.31 \pm 0.39\%$ VS $7.54 \pm 0.92\%$ ($P < 0.005$), 實驗組為對照組的 2.32 與 3.09 倍,由此可知,PN-2 不但可使小白鼠巨噬細胞數目增加,也可使巨噬細胞吞噬之能力提升。

討 論

接受 PN-2 投與之小白鼠對綿羊紅血球產生抗體反應的能力,無論就遲滯期的長短、抗體的凝集力價、抗體的持續的時間而言,與對照組相比較,均無差異(圖三),顯示 PN-2 不能促進 B 淋巴細胞之功能,但吾人以前的研究結果發現投與 PN-2 可增加小白鼠 Th 淋巴細胞數目,而本實驗卻發現 PN-2 並不能促進對 T-依賴性抗原的抗體反應,此結果顯示 PN

-2 對淋巴細胞的作用可能具有選擇性。Gajewski, T F 等人⁽¹⁸⁾發現小白鼠 Th 淋巴細胞可進一步分為 Th 1 與 Th 2 兩個亞群,二者的差別在於產生細胞激素(Cytokine)的能力不同, Th 1 可產生 Interleukin-2 (IL-2)、Interferon- γ (IFN γ),而 Th 2 則不能產生 IL-2、IFN γ ,但能產生 Interleukin-4 (IL-4)、Interleukin-10 (IL-10)。Th 1 一旦被活化所產生 IFN γ 可進一步活化巨噬細胞,如 Th 2 被活化產生 IL-4、IL-10,則可協助已受抗原刺激的 B 淋巴細胞分泌抗體。投與 PN-2 後小白鼠的 T 淋巴細胞總數增加,但對 T-依賴性抗原,綿羊紅血球的抗體反應能力並未增加,此可能是由於 PN-2 有選擇性的作用於 Th₁ 淋巴細胞之故,由圖四、圖五之結果顯示小白鼠接受 PN-2 投與後,巨噬細胞對白色念珠菌吞噬的能力增加,不論是常在巨噬細胞或硫代乙醇鈉激發之巨噬細胞的吞噬能力與對照組比較均明顯增加。由以上結果,吾人推測 PN-2 對 T 淋巴細胞的作用具有選擇性,能選擇性的活化 Th 1,

Th 1 活化後所產生的 IL-2、IFN γ 再活化巨噬細胞，但對 B 淋巴細胞抗體的產生無協助作用，有關此項推論尚須進一步研究探討。

本實驗及以往的研究結果顯示 PN-2 所具有之活性與香菇、靈芝、冬蟲夏草等真菌產生之多醣體相似，均具有良好之抗腫瘤及抑制人工腫瘤移轉之效應^(12,15,23)，及調節免疫反應^(14,20,21,24)之效應，這些效應主要是經由 Th 淋巴細胞及巨噬細胞而產生^(16,17,21,24)，巨噬細胞活化後分泌 IL-1、TNF (tumor necrosis factor)，TNF 可使腫瘤細胞壞死，Th 1 淋巴細胞被活化後會分泌 IL-2、IFN γ 進而活化巨噬細胞，並誘導及活化自然殺手細胞 (Natural Killer, NK cell)，而產生抗腫瘤及調節免疫的功效。

本實驗所用之植生蟲草為冬蟲夏草之近緣種，兩者形態十分相似，但前者為珍貴之中藥材，雖具有廣泛之療效^(22,23)，然價格昂貴，而後者可於實驗室中大量培養，經純化後可得到無細胞毒性、無基因毒性之多醣體，故具有開發為生物反應調節劑⁽¹⁹⁾ (BRM, Biological Response Modifier) 之潛力。

由於測定巨噬細胞吞噬能力的傳統方法是在顯微鏡下觀察計數，既費力又費時，且有主觀因素之影響，故本實驗採用螢光抗體標示，並以流動細胞儀 (Flow cytometer) 進行實驗結果分析，可於數秒內分析 1×10^4 細胞，應可提高實驗之準確性及再現性，而且以往是用洗滌法來除去附著在巨噬細胞表面之顆粒，本實驗是以扣除法，即先將巨噬細胞以疊氮化鈉處理，再進行吞噬作用，而測知表面有顆粒附著之巨噬細胞，由未經疊氮化鈉處理之巨噬細胞吞噬數據中扣除，即可得含攝入顆粒之巨噬細胞，此法優於傳統的洗滌法。

誌謝

本實驗為 NSC-82-0412-B-038-008 計劃之部份成果，感謝國科會在經費上之支持，及

蔡瑞根、郭俊成、楊依珍同學之協助，使本實驗得以順利完成，在此一併致謝。

參考文獻

1. Su CH, Wang HH: *Phytocordyceps*, a new genus of the Clavicipitaceae. *Mycotaxon* 26: 334-344, 1986.
2. 蘇慶華：新屬植生蟲草之型態遺傳學及生化研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。1985。
3. Su CH, et al.: Physiological activity of the new genus, *Phytocordyceps*. *Mushroom Science* XII; 485-491, 1989.
4. 鄭興明：植生蟲草水溶性多醣體之成分及生理活性。私立台北醫學院天然物醫學研究所碩士論文。1992。
5. 朱玉玲：植生蟲草雙帖類抗生活性物質之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。1986。
6. 郭俊成：植生蟲草多醣體抗腫瘤代謝物 (PN-2) 之甲基化分析及利用流動細胞儀探討免疫機能之研究。私立台北醫學院天然物醫學研究所碩士論文。1993。
7. 蘇慶華：植生蟲草代謝產物-抗腫瘤多醣體之研究。NSC77-0412-B038-15.
8. Mansour I, Bourin P, Rouger P, et al: A rapid technique for lymphocyte preparation prior to two-color immunofluorescence analysis of lymphocyte subsets using flow cytometry. *J Immunol methods* 127; 61-70, 1990.
9. Abel G, Szollosi J, Fachel J, et al.: Effect of lentinan and mannan on phagocytosis of fluorescent latex microbeads by mouse peritoneal macrophages: A flow cytometric study. *Int J Immunopharmacol* 11 (6); 615-621, 1989.
10. Michael FW, Festing R, Legg T, et al.:

- Mouse strain differences in resident peritoneal cells: a flow cytometric analysis. *Laboratory Animals* 24: 53-62, 1990.
11. Abel G, Szollosi J, Chihara G, et al.: Phagocytosis of fluorescent latex microbeads by peritoneal macrophages in different strains of mice: A flow cytometric study. *European J immunogenetics* 18; 239-245, 1991.
 12. Chihara G, Hamuro J, Sasaki T, et al.: Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunodulator: An Overview. *Cancer Detection and Prevention Supplement* 1; 423-443, 1987.
 13. Weir DM: *Handbook of experimental immunology*. Black well Scientific Publication. 3rd ed, 1978.
 14. Suga T, Maeda YY, Uchida H, et al.: Macrophage-mediated acute-phase transport protein production induced by lentinan. *Int J Immunopharmacol.* 8; 691-699, 1986.
 15. Chen HH, Tung YC, Tung TC: The antitumor effect of cultivated *Ganoderma lucidum* extract by oral administration on Sarcoma-180 tumor growth in mice. *J Chinese Oncol Soc* 1 (3); 12-16, 1985.
 16. Karnovsky M L, Lazdins J K: Biochemical criteria for activated macrophages. *J Immunol* 121; 809, 1978.
 17. North R. J: The concept of the activated macrophage. *J Immunol* 121; 806, 1978.
 18. Gajewski TF, et al.: Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathway by Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 144; 4110-20, 1990.
 19. Mamoru Tamai, Yoshiro Ono, Miki Kataoka, et al.: Immunoprophylactic effects of OK0-432 and Ge-132 on methylcholanthrene-induced mouse Sarcoma. *Biotherapy* 3 (1): 365-368, 1989.
 20. Sone Y, Okuda R, Wada N, et al.: Structure and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric Biol Chem* 49; 2641-2653, 1985.
 21. Zhang SL: Activation of murine peritoneal macrophages by natural *Cordyceps sinensis* and its cultured mycelia. *Chinese J Integrated Traditional & Western Medicine* 5 (1); 45-7, 1985.
 22. Chen DM: The effect of natural *Cordyceps sinensis* and its cultured mycelia on murine immuno-organs and function of the mononuclear macrophage system. *Chinese J Integrated Traditional & Western medicine* 5 (1); 42-45, 1985.
 23. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, et al.: Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chinese Medical J Peking* 105 (2); 97-101, 1992.
 24. Chen GZ, Chen GL, et al.: Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chinese Medical J Peking* 104 (1); 4-8, 1991.

Influence of Antitumor Polysaccharide Isolated from *Phytocordyceps ninchukispora* Su et Wang on Phagocytosis of macrophage and Activity of Helper T Lymphocyte

Ling-Wen Lee, Cheng-Yi Wang and Ching-Hua Su.

ABSTRACT

Phytocordyceps ninchukispora Su et Wang is a new species of the Genus *Phytocordyceps*, discovered in Taiwan in 1985. Through the application of biochemical techniques, involving ultracentrifugation, gel filtration and ion-exchange chromatography, PN-2 was purified from the culture supernatant of *Phytocordyceps ninchukispora* Su et Wang. In the previous studies it has been found that PN-2 exhibits anti-tumor and immunomodulating activities. PN-2 inhibits lung metastasis of transplanted S-180 tumor and prevents further neoplastic change of cutaneous implanted S-180 tumor in mice. PN-2 increase the number of total T lymphocyte, Th lymphocyte and monocyte/macrophage. All the above mentioned properties are shared by lentinan.

In the present study we attempt to determine the possible influences of PN-2 on the function of Th lymphocyte and macrophage. Sheep red blood cell, an T-dependent antigen, was injected intraperitoneal into mice which has been administrated with PN-2, the blood was removed sequentially from orbital plexus, and the serum hemagglutinin titer was measured by microhemagglutination. There was no difference in hemagglutinin titer in both experimental and control groups. These results indicate that PN-2 has no influence on antibody production against sheep red blood cell. The phagocytic activity of macrophage was determined by an in vitro method using flow cytometer to analyze the capacity of peritoneal macrophage to ingest florochrome (R-phycoerythrin)-labeled *Candida albicans*. There is an obvious increase in the phagocytic activity of macrophage from PN-2 treated mice. The percentage of PN-2 treated resident and thioglycollate elicited macrophage bound/ingested *Candida albicans* were 41.11 ± 1.65 and 61.55 ± 2.70 , and the control group were 29.88 ± 1.99 and 41.28 ± 1.86 , respectively. The results were further corrected by deducting the amount of *Candida albicans* adhered on sodium azid treated cells from the original value. The net results of PN-2 treated resident and thioglycollate elicited macrophage to ingest *Candida albicans* were $10.72 \pm 0.53\%$ and $23.31 \pm 0.39\%$, and the control group were $4.62 \pm 0.92\%$ and $7.54 \pm 0.92\%$, respectively. The result indicates that PN-2 enhances the phagocytosis of mouse resident and thioglycollate elicited macrophage.

Based on these results we propose that PN-2 seems to act selectively, it acts on Th1, but not on Th2, secreting IL-2 and IFN γ , which in turn activate macrophage.