

人胚胎干细胞不同冷冻保存方法的比较

欧阳琦^{1,2}, 林 戈^{1,2}, 卢光琇^{1,2}

(1 中南大学 生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078; 2 人类干细胞国家工程研究中心, 湖南 长沙 410078)

【摘要】 【目的】比较人胚胎干细胞不同冷冻保存方法的复苏率, 建立高效的冷冻保存方法。【方法】利用慢速冷冻、开放式和密闭式玻璃化冷冻 3 种方法保存人胚胎干细胞克隆, 比较这 3 种方法的复苏效率, 并通过免疫组化染色检测复苏后细胞的 OCT-4 表达。【结果】开放式快速冷冻方法的克隆复苏率为 $(97.5 \pm 5.0)\%$, 密闭式快速冷冻方法的克隆复苏率为 $(96.7 \pm 5.8)\%$, 均极显著高于慢速冻存方法 $(25.7 \pm 4.1)\%$ 。解冻后的胚胎干细胞克隆仍然保持胚胎干细胞的特性。【结论】开放式和密闭式玻璃化冻存方法能够高效保存人胚胎干细胞。

【关键词】 人胚胎干细胞; 冷冻保存; 玻璃化

【中图分类号】 Q813

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)05-0017-05

Comparison of different cryopreservation methods of human embryonic stem cells

OUYANG Qi^{1,2}, LIN Ge^{1,2}, LU Guang-xiu^{1,2}

(1 Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China;

2 National Engineering Research Center of Human Stem Cells, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: 【Objective】The study compared the recovery rate of human embryonic stem (hES) cells after cryopreservation using various protocols and established an effective method for hES cells cryopreservation according to the clinic standards. 【Method】hES cells were frozen with slow-cooling protocols, vitrification protocols with open pulled straws (OPS) and vitrification protocols with closed sealed straws (CS). The recovery rates of the three methods were compared, and Immunocytochemistry was used to observe the expression of OCT-4 on hES cells after cryopreservation. 【Result】The recovery rate was $(97.5 \pm 5.0)\%$ by vitrification with OPS and $(96.7 \pm 5.8)\%$ by vitrification with CS, which was much higher than the rate of slow-cooling, $(25.7 \pm 4.1)\%$. Positive expression of OCT-4 in the most cultured cells was detected by immunocytochemistry. 【Conclusion】Vitrification by OPS and CS methods are reliable and effective for the cryopreservation of human embryonic stem cells.

Key words: human embryonic stem cell; cryopreservation; vitrification

自从 1998 年 Thomson 等^[1]首次成功分离得到人胚胎干细胞 (Human embryonic stem cells, hESCs) 系以来, hESCs 在再生医学、发育生物学以及药理学、毒理学等研究领域被寄予众望。hESCs 的广泛应用意味着细胞资源需要在不同的实验室之

间运输和传递, 以促进科学合作。此外, 提供具有不同组织相容性抗原分型的细胞用于移植治疗, 以及在不同阶段保存细胞以保证细胞系的稳定和细胞材料能被永久使用, 这些目标的实现都需要建立高效的冷冻方式来保存 hESCs。

* [收稿日期] 2010-01-16

[基金项目] 国家“863”重大专项(2006AA02A102)

[作者简介] 欧阳琦(1980—), 女, 湖南益阳人, 在读博士, 主要从事人胚胎干细胞生物学研究。

[通信作者] 卢光琇(1939—), 女, 湖北天门人, 教授, 博士生导师, 主要从事干细胞工程及生殖与不孕研究。

目前, hESCs 冷冻保存的方法有 2 种, 一种是慢速冷冻, 一种是玻璃化冷冻。慢速冷冻方式对于小鼠胚胎干细胞的冻存复苏非常有效, 超过 90% 的克隆经过冷冻—复苏过程能够存活并且保持不分化, 但是应用于 hESCs, 复苏率很低, 仅为 5% ~ 16%^[2]。玻璃化冷冻最早用于胚胎的冷冻, Reubinoff 等^[3]首次将该法应用于 hESCs 的冷冻, 冻存效率高于慢速冷冻, 但是由于采用开放式麦管(OPS), 其中的 hESCs 与液氮直接接触, 存在污染风险, 不符合临床应用要求。本研究利用慢速冷冻、开放式和封闭式玻璃化冷冻 3 种方法保存人胚胎干细胞克隆, 比较这 3 种方法的复苏效率, 并通过免疫组化染色检测复苏后细胞的 OCT-4 表达, 探讨建立无动物源性成分的快速冷冻方法, 以期在细胞系在不同培养条件下选用不同冷冻方式提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细 胞 人类胚胎干细胞系 chHES-20, 由人类干细胞国家工程研究中心胚胎干细胞库提供。

1.1.2 主要试剂 1 mol/L 蔗糖、1 mol/L Hepes、二甲槲枫(DMSO)、Ethylene Glycol(EG)购自 Sigma 公司; HSA、特级胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; TRA-1-60 和 TRA-1-81 抗体购自 chemicon 公司; OCT-4 和 SSEA-3 抗体购自 santa cruz 公司; SSEA-4 抗体购自 R&D 公司; 秋水仙碱购自 Sigma 公司。

1.1.3 耗 材 4 孔板购自 Nunc 公司, 1.5 mL 冷冻管购自 Corning 公司, 开放式麦管(OPS)、封闭式麦管(CS)购自 Mini Tub 公司。

1.1.4 仪 器 程序冷冻仪 Kryo-1.6(Planer 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 慢速冷冻方法 冷冻液为体积分数 90% FBS + 体积分数 10% DMSO。冷冻过程: 将机械切割下来的 ES 团块置于 4 ℃ 预冷的冷冻液中, 程序冷冻仪上以 1 ℃/min 的速率从 4 ℃ 降至 -80 ℃, 浸入液氮保存。解冻过程: 37 ℃ 水浴快速解冻, 用 hESCs 培养基清洗 2 遍, 500 g/min 离心 4 min, 弃上清, 收集解冻的细胞团块。用 hESCs 培养基重悬, 并转移到新鲜人胚成纤维细胞饲养层上培养。

1.2.2 采用 OPS 的玻璃化冻存—解冻方法 1) 冻存过程。使用的液体包括 Holding medium (体积分数 20% FBS); 体积分数 80% KO-DMEM + 体

积分数 20% FBS + 1 mol/L Hepes; 玻璃化溶液 1 (VS1): 体积分数 10% DMSO + 体积分数 10% EG + Holding medium; 玻璃化溶液 2 (VS2): 0.3 mol/L 蔗糖 + 体积分数 20% DMSO + 体积分数 20% EG + Holding medium。冷冻步骤: (1) 在 4 孔板的 4 个孔中依次加入 1 mL Holding medium、1 mL Holding medium、1 mL VS1、1 mL VS2, 37 ℃ 预热; (2) 转移 6~8 个 hESCs 团块到 Holding medium 孔中, 使之平衡数分钟; (3) 从 VS2 孔中吸取 20 μL VS2 至 4 孔板地板上备用; (4) 将细胞团块转移至 VS1 孔, 放置 1 min, 再转移至 VS2 孔中, 放置 25 s; (5) 将细胞团块以最少的液体量转移至准备好的 20 μL VS2 液滴中, 彻底混匀; (6) 将 OPS 吸管的狭窄端浸入液滴, 通过毛细作用将细胞团块吸入管中; (7) 将吸管的狭窄端以接近水平位置放入液氮中, 再转移至液氮罐中。

2) 玻璃化复苏过程。使用的液体包括解冻溶液 1 (WS1): 0.2 mol/L 蔗糖 + Holding medium; 解冻溶液 2 (WS2): 0.1 mol/L 蔗糖 + Holding medium。解冻步骤: (1) 在 4 孔板的 4 个孔中依次加入 1 mL WS1、1 mL WS2、1 mL Holding medium、1 mL Holding medium, 37 ℃ 预热; (2) 从液氮中取出吸管, 在空气中加热 1~3 s 后, 将吸管的狭窄端浸没在 WS1 孔中, 用手指封住吸管顶端, 使细胞团块从吸管中流出; (3) 1 min 后, 将细胞转移至 WS2 孔; 5 min 后, 再转移至 Holding medium 孔; 5 min 后, 转移至第 2 个 Holding medium 孔; 5 min 后, 将细胞种植到饲养层细胞上培养。

1.2.3 采用 CS 的玻璃化冻存—解冻方法 将 OPS 冻存液中的 FBS 换成 HSA, 而冻存液中各种成分的配制比例仍与 OPS 冻存方法相同, 所有操作在室温下完成, 操作过程中细胞不与液氮接触。冷冻步骤: (1) 在 4 孔板的 4 个孔中依次加入 1 mL Holding medium、1 mL VS1、1 mL VS2、1 mL WS1; (2)~(5) 步骤同 OPS 玻璃化; (6) 用橡皮圈将 CS 套在 1 mL 注射器上, 先吸取 1 cm VS2 液, 再吸取 0.5 cm 空气柱, 然后吸取细胞悬液, 再吸取 0.5 cm 空气柱, 最后吸取 2 cm WS1 液, 用配套的塞子将冻存管封闭; (7) 步骤同 OPS 玻璃化。解冻步骤: (1) 在 4 孔板的 4 个孔中依次加入 1 mL WS1、1 mL WS2、1 mL Holding medium、1 mL Holding medium; (2) 将 CS 从液氮中取出, 室温水浴 5 s, 迅速用酒精消毒外表面, 用剪刀剪去 CS 中细胞悬液柱的两端, 将管口浸没在 WS1 中, 使 ES 团块流出; (3) 步骤同 OPS

玻璃化。

1.2.4 免疫组化染色 多能性标记包括 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、OCT-4。采用间接免疫荧光法检测解冻后培养 4 d 的 ES 克隆:用 4%的多聚甲醛固定 20 min;0.1% Triton-X-100 透膜 10 min (此步骤针对核内抗原 OCT-4,其余为膜表面抗原不需要);体积分数 4% 山羊血清室温封闭 30 min;相应的一抗 4 ℃ 孵育过夜;加入 FITC 二抗,室温避光孵育 1 h;荧光显微镜下观察检测结果,并照相。

1.2.5 G 显带核型分析 取培养 5~6 d 的 hESCs,在培养基中加入秋水仙碱至终质量浓度为 0.1 μg/mL,37 ℃ 处理 2.5 h。用 0.05% 胰蛋白酶-0.53 mmol/L EDTA 于 37 ℃ 下消化收集细胞。按常规方法制备好染色体涂片,Giemsa 溶液染色,树脂封片后在油镜下观察,共分析 20 个中期分裂相。

1.2.6 统计学分析 各种冻存方法之间复苏率和未分化率的比较试验均重复 3 次,结果以“平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)”表示,两组样本率的比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为有统计学显著性差异。数据分析采用 SPSS13.0 统计软件。

2 结果与分析

2.1 不同冻存方式冷冻复苏效果的比较

由表 1 可见,慢速冻存的复苏率为(25.7±4.1)%,与国际上的慢速复苏率相当,但是基本没有分化克隆,这一点优于国际上的报道。玻璃化冻存的复苏率,OPS 组和 CS 组均达 95% 以上,而且分化程度很低,优于国际上的报道。慢速冻存效率低于快速冻存,具有统计学上的极显著差异。符合临床应用要求的 CS 快速冻存后复苏率为(96.7±5.8)%,与 OPS 组无统计学差异。

表 1 3 种冻存方式之间复苏率与未分化率的比较

Table 1 Comparison of the recover rate and undifferentiation rate among the three cryopreservation methods %

冻存方式 Cryopreservation method	复苏率 Recover rate	未分化率 Undifferentiaton rate
慢速冻存 Slow-cooling group	25.7±4.1*	91.3±7.2
OPS 冻存 Vitrification with OPS group	97.5±5.0	92.7±4.9
CS 冻存 Vitrification with CS group	96.7±5.8	96.7±5.8

注:*表示慢速冻存组与 OPS 组、CS 组差异极显著($P<0.01$)。

Note:* means that the recovery rate of slow-cooling group is significantly different with the other two vitrification groups ($P<0.01$).

2.2 不同冻存方式解冻后 hESCs 克隆的生长形态和特性鉴定

慢速冻存的 hESCs 解冻后第 1 天,克隆大部分发黑瓦解,细胞死亡,部分团块悬浮不贴壁,贴壁克隆少,且较小;培养 3~4 d,克隆开始平铺,并恢复增殖,但速度比传代克隆慢;培养 8~9 d,克隆达到平时传代克隆大小(传代周期为 7 d)。快速冻存的 hESCs 解冻后第 1 天,基本上所有团块都贴壁,很少出现克隆瓦解的情况,但有单细胞,偶尔有小细胞团死亡,悬浮于培养基中;培养 2~3 d,克隆完全平展,并且开始扩增,扩增速度快于慢速冻存,与传代克隆基本持平;培养 7 d 后,2 种冻存方式的克隆都表现为 hESCs 典型的未分化形态:克隆为梭形、弯月形或多边形,将饲养层细胞完全推开,与饲养层细胞分界清晰。克隆内细胞紧密,单个细胞轮廓清晰,核质比大,很少出现分化现象,多能性标记 SSEA4、SSEA3、OCT-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 染色均为阳性。hESCs 复苏后第 5 代检测核型,分析的 20 个中期分裂相均维持正常, $n=46,XY$ (图 1)。

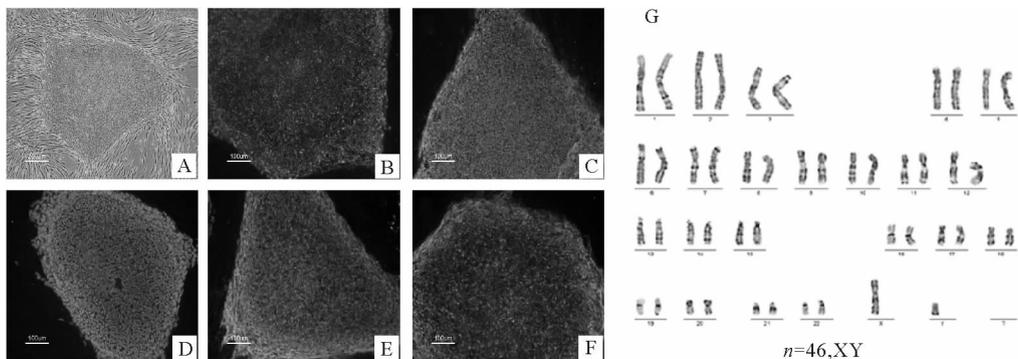


图 1 hESCs 复苏 4 d 后的特征鉴定

A. 光镜下可见典型的未分化形态(40×);B~F. 分别为 SSEA3、SSEA4、OCT-4、TRA-1-60 和

TRA-1-81 多能性标记染色结果(100×);G 核型

Fig. 1 Characterization of hESCs after thawing for 4 days

A. Typical undifferentiated hESCs(40×); B-F. Molecular markers specific for hESCs;SSEA3,SSEA4, OCT-4, TRA-1-60 and TRA-1-81(100×);G. The karyotype maintained normally after thawing

3 讨 论

建立稳定有效的 hESCs 冷冻保存技术,对于不断发展和在更广范围应用 hESCs 具有重要价值。目前,在 hESCs 的冷冻保存方面还存在一定的技术障碍,慢速冻存的效率较低,可能的原因是:hESCs 的单克隆形成率很低,在体外培养时要存活并且维持不分化状态,很大程度上依赖于细胞间的紧密接触以及周围细胞提供的旁分泌因子^[2]。有研究显示,hES 细胞之间存在大量的紧密连接和缝隙连接^[4],从其转录谱可以看到有缝隙连接相关分子以及粘附分子的高表达,如果将 hES 细胞消化或者机械的打成单细胞状态,会造成大量细胞死亡^[5]。因此,必须采用细胞团块的方式进行慢速冻存,但团块形式又减少了内部细胞与冻存液的接触,造成细胞的大量死亡。目前,国际上采用慢速冷冻保存 hES 细胞团块的结果并不令人满意。Reubinoff 等^[3]报道复苏率为 16%,并且解冻后会出现大量细胞分化。Zhou 等^[6]对慢速冻存方法改进后,复苏率稍有提高,也仅为 22.8%。本研究中慢速冻存的复苏率平均为(25.7±4.1)% ,与细胞的状态密切相关,如果克隆完全未分化,细胞连接紧密,且克隆较厚实,冻存效率就会明显提高。此外,慢速冻存过程中会有大量冰晶形成,冰晶破坏了 hES 细胞之间的物理连接,导致细胞死亡。有研究证明,使用程序冷冻仪能够减少冰晶的形成,从而提高冻存效率^[7-8]。2007 年,Watanabe 等^[9]发现,Rocker inhibitor 能够降低 hESCs 消化成单细胞后的凋亡率;Martín 等^[10]将 Rocke inhibitor 运用在慢速冻存过程和复苏过程中,发现其可以明显提高 hESCs 的复苏效率,并且降低细胞的分化率。另外,冷冻保护液中的 DMSO 存在细胞毒性,细胞与冷冻保护液接触时间较长也是慢速冻存易造成细胞死亡的一个重要原因。Nishigaki 等^[11]尝试在冷冻保护液中仅添加 40% 的 EG 和 10% 的聚乙二醇(PEG),去除 DMSO,也能够达到 22% 的复苏效率。由于慢速冻存操作简单,对于大量细胞保存而言目前仍然是最为常用的方法。

快速冻存的复苏率很高,对于早期少量细胞保种是一种较好的方法。因为玻璃化冷冻过程采用急速降温,理论上降温速度 $> -1\ 500\ ^\circ\text{C}/\text{min}$,该方法一方面最大限度地避免了冰晶形成,另一方面减少

了细胞在正常物理温度下接触低温的时间,降低了冷冻保护液对细胞的毒性。目前,国际上有报道称,经过玻璃化冷冻, hESCs 克隆的存活率大于 75%^[12]。但是玻璃化冷冻也有缺陷:首先,劳动强度大,操作繁琐,并且要求操作者具有较好的手眼协调能力和技术培训;其次,玻璃化冻存管每次只能冻存 6~10 个克隆,显然不利于大量细胞的冷冻冻存。本研究中快速冻存的复苏率都在 90% 以上,但冷冻保护液中含有 FBS,不符合临床应用的标准。笔者在保证冻存效率的前提下,尝试采用 HSA 取代 FBS 作为细胞保护剂,改用具有塞子的封闭式麦管以避免与液氮的接触,结果表明,改进后 hESCs 的复苏率不受影响。

本研究 3 种冻存方式的细胞解冻后都不会出现明显的分化,推断应该是使用 hEFs 作为饲养层的原因。Richards 等^[13]在 2002 年首次报道建立了 hESCs 的人源性培养体系,并发现在人源性饲养细胞上培养时,hESCs 克隆的分化率较在鼠胚饲养层上低,说明饲养细胞对胚胎干细胞的支持作用可能具有种系特异性优势。笔者研究 hEFs 对于解冻后细胞的支持作用,发现利用人源性的饲养细胞培养解冻后的 hESCs,细胞的未分化生长状态维持良好。有研究指出,人饲养层细胞分泌许多生长因子,更能支持 hESCs 细胞的生长^[14]。所以,在人源性体系下,细胞的分化程度很低,这也是本研究中 hESCs 细胞复苏后未分化率明显高于国际报道的一个原因。

在胚胎干细胞的应用过程中,需要对早期分离的细胞保种,也需要对大量扩增应用的细胞进行冷冻保存,因此目前这 3 种方法都有应用价值。

[参考文献]

- [1] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282: 1145-1147.
- [2] Udy G B, Evans M J. Microplate DNA preparation, PCR screening and cell freezing for gene targeting in embryonic stem cells [J]. *Bio-techniques*, 1994, 17(5): 887-894.
- [3] Reubinoff B E, Pera M F, Vajta G, et al. Effective cytopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16: 2187-2194.
- [4] Sathananthan H, Pera M, Trounson A. The fine structure of human embryonic stem cells [J]. *Reprod Biomed Online*, 2002,

- 4;56-61.
- [5] Richards M, Tan S P, Tan J H, et al. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE [J]. *Stem Cells*, 2004, 22; 51-64.
- [6] Zhou C Q, Mai Q Y, Li T, et al. Vitri-fied cytopreservation of human embryonic stem cells [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117; 1050-1055.
- [7] Kopstad G, Elgsaeter A. Theoretical analysis of specimen cooling rate during impact freezing and liquid-jet freezing of freeze-etch specimens [J]. *Biophys J*, 1982, 40(2); 155-161.
- [8] Bald W B. On crystal size and cooling rate [J]. *J Microsc*, 1986, 143(Pt1); 89-102.
- [9] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotech*, 2007, 25(6); 681-686.
- [10] Martín-Ibáñez R, Unger C, Strömberg A, et al. Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23; 2744-2754.
- [11] Nishigaki T, Teramura Y, Suemori H, et al. Cryopreservation of primate embryonic stem cells with chemically-defined solution without Me(2)SO [J]. *Cryobiology*, 2010, 60(2); 159-164.
- [12] Richards M, Fong C Y, Tan S, et al. An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(5); 779-789.
- [13] Richards M, Fong C Y, Chan W K, et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells [J]. *Nat Biotech*, 2002, 20; 933-936.
- [14] Richards M, Tan S P, Tan J H, et al. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(5); 546-556.

(上接第 16 页)

- [4] 赵晓薇, 巴彩凤. 附红细胞体病的研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(10); 1047-1058.
Zhao X W, Ba C F. The research progress in Eperythrozoonosis [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2007, 23(10); 1047-1058. (in Chinese)
- [5] 马海利, 韩惠瑛, 王 胜, 等. 附红细胞体自然感染对猪红细胞的影响 [J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(4); 265-267.
Ma H L, Han H Y, Wang S, et al. Effect of natural infection of Eperythrozoonosis on porcine red blood cells [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 25(4); 265-267. (in Chinese)
- [6] 柴方红, 张守发, 贾立军, 等. 附红细胞体自然感染对仔猪免疫水平的影响 [J]. *畜牧与兽医*, 2007, 39(12); 38-40.
Chai F H, Zhang S F, Jia L J, et al. Effect of natural infection of Eperythrozoonosis on immunity level of piglets [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, 39(12); 38-40. (in Chinese)
- [7] Shao B M, Xu W, Dai H, et al. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004(320); 1103-1111.
- [8] Lee Y S, Han O K, Park C W, et al. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted *Astragali radix* in Raw 264.7 macrophage cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005(100); 289-294.
- [9] Li H Q, Lloyd R J, Wang J D. Effect of *Astragalus polysaccharides* on erythrocyte immune adherence of chickens inoculated with infectious bursal disease virus [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(11); 1402-1408.
- [10] Chen L Y, Lin Y L, Chang B L. Levamisole enhances immune response by affecting the activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells [J]. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 2007, 151; 174-181.
- [11] Jin H, Li Y, Zheng H M, et al. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination [J]. *Vaccine*, 2004, 22; 2925-2935.
- [12] 李 莉, 周 男, 张 丽, 等. 防风多糖增强巨噬细胞抗肿瘤作用的试验研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 1999, 22(3); 38-40.
Li L, Zhou N, Zhang L, et al. Effect of polysaccharide of *radix sileris* on enhancing macrophocyte's antineoplastic function [J]. *Journal of Beijing University of TCM*, 1999, 22(3); 38-40. (in Chinese)
- [13] 张述禹, 亚 利, 李莉茜. 防风对免疫功能的影响 [J]. *中草药*, 1987, 18(9); 9.
Zhang S Y, Ya L, Li L Q. Effect of polysaccharide of *radix sileris* on immunity [J]. *Triditional Chinese Medicine*, 1987, 18(9); 9. (in Chinese)
- [14] Zachary J F, Smith A R. Experimental porcine Eperythrozoonosis; T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses [J]. *Am F Vet Res*, 1985, 46(4); 821-830.
- [15] Yang Y Z, Jin P Y, Guo Q, et al. Effect of *Astragalus membranaceus* on natural killer cell activity and induction of alpha and gamma-interferon in patients with Coxsackie B viral myocarditis [J]. *Chin Med J*, 1990, 103(4); 304-307.
- [16] 赵克胜, 丁丽轩, 孔海燕, 等. 黄芪多糖增强人外周血单个核细胞产生肿瘤坏死因子的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1993, 13(5); 263-265.
Zhao K S, Ding L X, Kong H Y, et al. Effect of Astragalin on secretion of tumor necrosis factors in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicin*, 1993, 13(5); 263-265.