

艾灸神阙穴对移植瘤小鼠血清白细胞介素 12 及 NK 细胞活性的影响

邱幸生¹ 陈 凯¹ 佟 丽² 舒孝良¹ 吕新志¹ 温汉平¹ 邓春华¹

摘要 目的:观察艾灸对 H-22 荷瘤小鼠血清白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 12(IL-12)水平、NK 细胞活性及腹水瘤细胞活性的影响,探讨艾灸抗肿瘤的机制。方法:采用双抗体夹心 ELISA 法,测定小鼠血清 IL-12、IL-2 水平;采用 MTT 法测定小鼠 NK 细胞活性。结果:艾灸能提高荷瘤小鼠血清 IL-12、IL-2 水平,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);艾灸能提高荷瘤小鼠 NK 细胞杀伤率,与移植瘤对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。结论:艾灸有抑制肿瘤生长的作用,此作用与其提高血清 IL-2、IL-12 水平,增强 NK 细胞杀伤活性有关。

主题词 肿瘤细胞,培养的/针灸效应 杀伤细胞,天然/针灸效应

针灸在临床抗肿瘤治疗中配合放疗、化疗,在减少患者副作用,增加疗效,提高生存质量方面,已有较多报道。本实验通过艾灸移植瘤小鼠神阙穴,检测小鼠血清白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 12(IL-12)水平及 NK 细胞活性,探讨艾灸神阙穴抗肿瘤的细胞免疫机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:健康昆明小鼠,6~8 周龄,体重 18~22g,由第一军医大学实验动物中心提供,在动物房饲养,自由摄食、饮水,动物房通风。YAC-1、H-22 腹水瘤细胞株由中山医科大学实验动物中心提供。小鼠 IL-2、IL-12 ELISA 检测盒,购自北京邦定生物技术有限公司。H-22 腹水瘤细胞接种,取体内保种传代的 H-22 腹水瘤小鼠腹水,计数肿瘤细胞,调节细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$,取 0.1ml 接种于小鼠右腋下。

1.2 动物分组:昆明小鼠 80 只,随机分为正常对照组、移植瘤小鼠组、移植瘤小鼠艾灸神阙穴治疗组(TB+M)、移植瘤小鼠化疗组(TB+C)、移植瘤小鼠化疗结合艾灸神阙穴治疗组(TB+M+C),每组 16 只,化疗组用环磷酰胺按 100mg/kg 于第 7 天腹腔内注射,艾灸神阙穴用精制艾绒制成的小艾柱(1.5mg/壮),按类比原理,取小鼠胸腹正中,胸骨柄上缘至外生殖器连线上 3/4 与下 1/4 交界点,隔日 1 次,连续治疗 6 次。

治疗结束后眼球采血,剥取瘤块,无菌取脾。

1.3 血清 IL-2 检测:按试剂盒说明步骤操作,配制标准 mIL-2 溶液,使其浓度分别为 1 000、500、250、125、62.5、31.25pg/ml,取抗 mIL-2 单抗预包被板条,除空白孔外,在反应孔中分别加 100 μl 标准品溶液或待测血清,室温下 120min,洗板 3 次,滤纸印干,每孔加稀释生物素化抗体 100 μl ,室温下 60min,洗板 3 次,每孔加稀释如酶结合物 100 μl ,30min,洗板 3 次,每孔加底物 A、B 各 50 μl ,避光,室温下 10min,每孔加终止液 1 滴,混匀,即刻在 450nm 处读数。

1.4 血清 IL-12 检测:按试剂盒说明步骤操作,配制标准 mIL-12 溶液,使其浓度分别为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、16.0pg/ml,取抗 mIL-12 单抗预包被板条,除空白孔外,在反应孔中分别加 100 μl 标准品溶液或待测血清,37℃下 120min,洗板 6 次,滤纸印干,每孔加入第一抗体工作液 50 μl ,37℃下 60min,洗板 6 次,每孔加酶标抗体工作液 100 μl ,37℃下 60min,洗板 6 次,每孔加底物各 100 μl ,置 37℃暗处反应 10min,每孔加终止液 1 滴,混匀,即刻在 492nm 处测。

1.5 NK 细胞毒活性测定:无菌取脾脏,剪碎,用注射器针芯轻轻研磨挤压通过 200 目滤网,hanks 液洗 2 遍,以含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮细胞,台盼蓝染色,调细胞密度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$;培养 YAC-1 细胞至对数生长期,收集细胞,台盼蓝染色,调节细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$,用 96 孔培养板,实验孔加效、靶细胞各 100 μl ,效应细胞对照组孔加效应细胞、培养液各 100 μl ,靶细胞对照组孔加靶细胞、培养液各 100 μl ,每个样本重复 3 个孔,置 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 4h 后,各孔加 5mg/ml MTT 液 10 μl 继续孵育 4h,然后每孔加酸化异丙醇 100 μl ,充分溶解后置酶标仪 570nm 波长测吸光(OD)值。求出平行孔的平均值,按下式计算效应细胞的细胞毒活性:

$$\text{NK 细胞杀伤率}(\%) = \frac{(1 - \frac{\text{实验孔 OD 值} - \text{效应细胞对照组孔 OD 值}}{\text{靶细胞对照组孔 OD}}) \times 100\%}{1}$$

2 结果

各组小鼠血清 IL-2、IL-12 水平及 NK 细胞杀伤率比较:由表 1 可见,移植瘤小鼠组血清 IL-2、IL-12

1 中国人民解放军第一五七医院肿瘤科,广州市同和(510510)

2 广州第一军医大学中医系

收稿日期:2001-12-07

表 1 各组小鼠血清 IL-2、IL-12 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-2(ng/ml)	IL-12(pg/ml)
正常对照组	16	13.22±2.65	16.57±4.21
移植瘤小鼠组	16	9.80±2.08 [△]	11.31±5.46 [△]
TB+M	16	17.44±3.16* [▲]	54.72±13.85* [▲]
TB+C	16	6.23±3.43	12.35±5.32
TB+M+C	16	12.56±1.97* [▲]	32.12±11.79* [▲]

* 与移植瘤小鼠组比较, $P < 0.05$; [▲] 与 TB+C 组比较, $P < 0.01$; [△] 与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。表 2 同

表 2 各组小鼠 NK 细胞杀伤率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NK 细胞杀伤率(%)	生存时间(天)
正常对照组	16	38.52±8.45	—
移植瘤小鼠组	16	15.74±5.36 [△]	13.87±2.42
TB+M	16	28.37±7.17* [▲]	15.23±2.76
TB+C	16	11.43±4.95	26.47±4.51
TB+M+C	16	20.57±6.73* [▲]	30.21±6.79* [▲]

水平较正常对照组低($P < 0.05$), TB+M 组、TB+M+C 组血清 IL-2、IL-12 水平较移植瘤小鼠组高($P < 0.05$), TB+M 组、TB+M+C 组血清 IL-2、IL-12 较单纯 TB+C 组高($P < 0.01$)。由表 2 可见, TB+M+C 组较 TB+C 生存时间延长($P < 0.01$), 移植瘤小鼠组血清 NK 细胞杀伤率较正常对照组低($P < 0.05$), TB+M 组、TB+M+C 组 NK 细胞杀伤率较移植瘤小鼠组高($P < 0.01$), TB+M 组、TB+M+C 组血清 NK 细胞杀伤率较 TB+C 组高($P < 0.01$)。

3 讨论

艾灸能提升白细胞, 增强巨噬细胞吞噬力, 增进 NK 细胞活性^[1], 配合放、化疗起抑制肿瘤作用, 减轻放、化疗毒副作用。神阙穴具有温通元阳、苏厥固脱、运肠胃气机、化寒湿积滞的功能。本实验结果表明, 艾灸神阙穴可提高小鼠血清 IL-2、IL-12 水平及提高 NK

细胞杀伤活性。

IL-12 又名 NK 细胞刺激因子和 CTL 成熟因子, 是最有效的 CTL 和 NK 细胞活性刺激因子, 主要由抗原提呈细胞和 B 细胞产生, 能促进 NK 细胞和 T 细胞的增殖; 增强 NK 细胞、T 细胞以及巨噬细胞等溶细胞活性, 与共刺激分子协同作用, 调节 TH0 细胞向 TH1 细胞的发育, 促进 TH1 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2, 介导细胞免疫应答; 诱导 NK 细胞产生 IFN- γ , 具有良好的抗肿瘤作用^[2]。IL-2 促进淋巴细胞增殖及活化, 与 IL-12 具有很强的协同效应。NK 细胞是抗肿瘤细胞免疫的重要成分, 发挥非特异杀伤效应。本实验表明, 荷瘤小鼠血清 IL-2、IL-12 水平较正常小鼠低, 可能与肿瘤的免疫抑制作用有关, 艾灸神阙穴后小鼠血清 IL-2、IL-12 水平提高, NK 细胞活性增强, 此外, 艾灸神阙穴并能提高化疗后小鼠血清 IL-2、IL-12 水平及 NK 细胞杀伤率, 表明艾灸神阙穴具有增强抗肿瘤细胞免疫的作用。艾灸能延长生存时间, 与其增强抗肿瘤细胞免疫有关。

有实验报道艾灸神阙穴有抗癌细胞淋巴道转移的作用^[3], 我们临床观察发现隔盐灸神阙穴具有抗鼻咽癌放疗损伤的作用^[4], 艾灸神阙穴作为辅助治疗手段, 对增强抗肿瘤细胞免疫, 提高化疗效果可能是有益的。

参考文献

- 1 刘自力, 曹培康. 灸法抗肿瘤临床及机理研究进展. 云南中医学院学报, 1994, 17(3): 39.
- 2 谭文军, 吴金生, 赖大年. 白介素 12 在细胞免疫中的作用. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(2): 181.
- 3 叶向荣, 张素芬, 张丹, 等. 艾灸神阙穴抗癌的实验研究. 山东中医药大学学报, 2000, 24(3): 229—230.
- 4 陈凯, 姜翼, 温汉平, 等. 艾灸神阙穴辅助放疗治疗鼻咽癌的临床研究. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(10): 733.

(上接第 181 页)

重。症见: 轻度贫血貌, 神疲乏力, 解尿涩痛, 每于凌晨 3 时许解出肉眼血尿, 多时达 150ml, 苔薄、舌尖红赤伴瘀斑, 脉细数涩。证属阴虚火旺, 热伤血络, 血热妄行。治宜滋阴凉血, 益气化瘀。处方: 生地黄 20g, 木通、蒲黄各 6g, 小蓟、地榆炭、白及、太子参各 15g, 藕节炭、旱莲草、白茅根、花蕊石各 30g, 焦栀子 10g, 琥珀 6g (研细, 鸡蛋清调, 分 2 次吞服)。服药 1 剂, 当晚血尿已减; 3 剂服完, 肉眼血尿消失, 诸症亦缓; 再服 5 剂, 尿检阴性, 原方去木通, 续服 5 剂, 随访 1 年未见复发。

4 体会

本系列疾病均有不同程度“瘀”的病证, 但临床表

现为标实本虚, 或虚实夹杂, 因此, 必须掌握疾病因果关系, 以化瘀为主导, 标本兼治, 或先治标, 后治本, 孰先孰后, 细细斟酌, 以达脏腑各司其职, 才能屡投不爽。如俞案以“心经”为先导, 投清心滋肾化瘀, 标本兼治, 药证相符, 效如桴鼓。曾治疗多例患者, 经治后复查前列腺增生虽不同程度存在, 但尿潴留却很少复发。如费案抓住“浊瘀”症结, 初诊导浊化瘀治标, 稍佐行气, 浊瘀渐化; 后以柔肝养肝, 佐以行气化瘀以达标本兼治, 顽症可愈。如吕案每于凌晨 3 时许血尿而作, 是时阴衰阳兴之际, 阴阳失恋, 相火内炽而迫血妄行, 故重用滋阴凉血治本, 兼益气化瘀止血, 使阴平阳秘, 炎症消而血尿止。