

DOI: 10.13703/j.0255-2936.2015.11.020

中图分类号: R 244.3 文献标志码: A

机制探讨

针灸对 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 含量的影响*

路 玫¹ 王延超² 于冬冬² 曹大明² 滕迎春² 李强伟³

(河南中医药大学 1. 国际教育学院, 2. 针灸推拿学院, 3. 第一附属医院, 郑州 450008)

[摘 要] 目的: 探讨针灸改善荷瘤小鼠化疗所致免疫功能损伤的分子生物学机制。方法: 将 72 只荷瘤模型建立成功小鼠, 采用随机分层分组法, 3 天批, 5 天批各 36 只, 均随机分为空白组、模型组、针刺组、艾灸组, 每组 9 只。除空白组外, 余组小鼠一次性腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX) 溶液(150 mg/kg), 制备 CTX 荷瘤小鼠模型; 空白组腹腔注射同等剂量的 0.9% NaCl 溶液。4 h 后针刺组、艾灸组分别予以针刺、艾灸治疗。穴取“大椎”“膈俞”“胃俞”“足三里”, 每天 1 次, 空白组、模型组每日同一时间抓取固定, 不治疗。分别于治疗 3 天、5 天后的第 2 天取材, 采用 ELISA 法检测各组小鼠脾脏组织中白介素-12(IL-12) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量。结果: 治疗 3 天、5 天后, 与空白组比较, 模型组荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12、TNF- α 含量均降低(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 针刺组、艾灸组小鼠脾脏组织中 IL-12、TNF- α 含量均升高(均 $P < 0.05$); 针刺组与艾灸组脾脏组织中 IL-12、TNF- α 含量比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论: 针刺和艾灸可以有效提高 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 的含量, 减轻化疗所致的免疫功能损伤, 提高机体免疫功能。

[关键词] CTX 化疗; 针灸; IL-12; TNF- α ; 荷瘤小鼠

Effects of acupuncture-moxibustion on contents of IL-12 and TNF- α in spleen of cyclophosphamide-induced cancer-bearing mice

LI Mei¹, WANG Yanchao², YU Dongdong², CAO Daming², TENG Yingchun², LI Jiaozuo³ (Henan University of TCM, 1. College of International Education, 2. College of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, 3. The First Affiliated Hospital, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT **Objective** To explore the molecular biology mechanisms of acupuncture on improving immune function damage induced by chemotherapy in cancer-bearing mice. **Methods** Seventy-two mice (36 mice in 3-day treatment and 3-day treatment, respectively) which were successfully made into cancer-bearing model were divided into a blank group, a model group, an acupuncture group and a moxibustion group by stratified randomization method, 9 mice in each one. Except for the mice in the blank group, the remaining mice were treated with intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX, 150 mg/kg), to establish the cancer-bearing mice of CTX. The mice in the blank group were treated with intraperitoneal injection of 0.9% NaCl (identical dose as other groups). After 4 h, the mice in the acupuncture group and moxibustion group were treated with acupuncture and moxibustion at "Dazhui" (GV 14), "Geshu" (BL 12), "Shenshu" (BL 23), "Zusanli" (ST 36), once a day. The mice in the blank group and model group were treated with immobilization and fixation during the same time. On the next day of the end of 3-day and 5-day treatment, the sample was collected. The ELISA method was applied to measure the contents of IL-12 and TNF- α in spleen of all the mice. **Results** After 3-day and 5-day treatment, compared with the blank group, the contents of IL-12 and TNF- α in spleen in the model group were reduced (all $P < 0.05$); compared with the model group, the contents of IL-12 and TNF- α in spleen in the acupuncture group and moxibustion group were increased (all $P < 0.05$), but the content of IL-12 and TNF- α in the acupuncture group was not different from that in the moxibustion group (both $P > 0.05$). **Conclusion** Acupuncture and moxibustion could effectively increase the contents of IL-12 and TNF- α in spleen of CTX cancer-bearing mice, which could relieve chem-

* 国家自然科学基金重大项目, 80799025。

第一作者: 路玫(1958-), 女, 教授, 研究方向: 针灸防治化疗毒副作用。E-mail: lumei0712@163.com

therapy-induced immune function damage to improve immune function.

KEY WORDS cyclophosphamide chemotherapy; acupuncture-moxibustion; IL-12; TNF- α ; cancer-bearing mice

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)是临床上常用的细胞毒性化疗药物,其在杀伤肿瘤细胞的同时,可损伤机体的免疫器官。研究^[1-2]表明,在细胞受到严重损伤时,细胞趋向凋亡,CTX 导致骨髓造血细胞大量凋亡的时间主要集中在 24 h 之内。骨髓造血细胞大量凋亡能导致 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞和巨噬细胞等免疫细胞减少,抑制机体的体液免疫和细胞免疫反应,造成机体免疫功能损伤。笔者前期研究^[3]证实针灸具有保护化疗机体造血干细胞,减轻骨髓抑制,提升白细胞数量的良好效应,并且针刺升高白细胞的同时还能够增强机体的免疫功能。白介素 12(IL-12)是目前发现的免疫激活性细胞诱导和调节作用最强、范围最广的细胞因子,具有强大的抗病毒和抗肿瘤效应,被誉为免疫系统抗病毒、抗肿瘤的核心理论因子及机体天然免疫系统的关键蛋白^[4]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是机体免疫反应中能够引起肿瘤细胞出血和坏死的细胞因子^[5]。TNF- α 与肿瘤细胞膜上的 TNF- α 受体结合,特异性地杀伤肿瘤细胞,对机体的正常细胞无害,可致肿瘤细胞坏死^[6]。本课题通过观察针灸对 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 含量的影响,探讨针灸改善荷瘤小鼠化疗所致免疫功能损伤的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

80 只 SPF 级雌性昆明(KM)小鼠购自河南省实验动物中心[合格证号:SCAK(豫)2010-0002],7 周龄,体重(18 $\pm$ 2)g。于河南中医药大学动物实验中心自由饮食饲养 3 天后进行植瘤。选取荷瘤模型建立成功(右腋下可触及 0.8 cm 大小肉瘤)的荷瘤小鼠 72 只,采用随机分层分组法,3 天洗、5 天洗各 36 只,均分为空白组、模型组、针刺组、艾灸组,每组 9 只。用苦味酸和品红溶液对每组荷瘤小鼠染色编号。实验过程中对动物的处置符合 2005 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要仪器

美容毫针(0.19 mm $\times$ 10 mm);美容艾条(0.4 cm $\times$ 25 cm);电子天平(FA2204B,上海精密科学仪器有限公司);电子秤(永康市玖衡仪器有限公司);小鼠固定木板(自制);-80℃冰箱。

1.3 模型制备

小鼠自由饮食饲养 3 天,待小鼠饮食及生活状态稳定后进行植瘤。

(1)S180 瘤细胞的传代

在无菌操作台中,取 S180 肉瘤种鼠腹水,经 0.9% NaCl 溶液 3 倍稀释,取 0.3 mL 细胞稀释液接种于消毒后的正常小鼠左下腹腹腔,每 7 天传代 1 次。

(2)S180 肉瘤移植模型建立

选取生长良好 S180 肉瘤移植小鼠,局部消毒,剪取正常瘤组织,掺入无菌 0.9%NaCl 溶液匀浆稀释,按照每只 5×10^5 瘤细胞/0.2 mL 分别注射接种于小鼠右腋下(由河南省医药科学研究所协助完成)。除空白组外,余组小鼠接种 7 天后,采血查白细胞(WBC)总数,挑选体重(21 $\pm$ 1)g,瘤体直径 0.8 cm 左右,接近基础 WBC 的小鼠,一次性腹腔注射环磷酰胺 150 mg/kg,停药后 4 h 模型即成^[7]。空白组小鼠按照 0.02 mL/g 用药量腹腔注入 0.9% NaCl 溶液。

1.4 干预方法

小鼠穴位定位参考《中国兽医针灸学》^[8],并模拟人鼠穴位定位法。“人推”位于第 7 颈椎与第 1 胸椎间,背脊正中;“膻俞”位于第 7 胸椎下两分,左右各 1 穴;“胃俞”位于第 2 腰椎下两分间,左右各 1 穴;“足三里”位于小鼠后肢膝关节后外侧,腓骨小头下约 5 mm 处,左右各 1 穴。

针刺组,用美容毫针,选取“人推”“膻俞”“胃俞”“足三里”,采用管式进针法直刺,进针深度为 3 mm,行捻转补法 5 次,留针 10 min,每日 1 次。艾灸组,将美容艾条点燃后,选取“人推”“膻俞”“胃俞”“足三里”,在距离穴位皮肤 2 cm 处固定悬灸 3 min,每日 1 次。空白组、模型组、每日同针刺组、艾灸组抓取固定,不予任何治疗。3 天脱组连续治疗 3 天,5 天脱组连续治疗 5 天。

1.5 组织取材

治疗 3 天和 5 天后的第 2 天,分别采用脱颈椎法颈椎染色编号依次处死各组小鼠,取出脾脏,剔除周围的结缔组织,用滤纸吸干水分,放入 5 mL 预冷的平皿(置于干冰上)中,纱布研磨,300 目尼龙网过滤去除组织纤维成份,将脾细胞悬液转移到 10 mL 管中,根据小鼠染色编号标记试管,然后以 1 500 r/min 转速离心 5 min,弃上清。

1.6 ELISA 法检测脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 的含量

①从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条,滴余板条用自封袋密封放回 4℃;②设置标准

品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL ;③样本孔先加待测样本 10 μL ,再加样本稀释液 40 μL ,空白孔不加;④除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入酶联过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100 μL ,用封板膜封住反应孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或恒温箱温育 60 min;⑤弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板 5 次(也可用瓶装洗板液);⑥每孔加入底物 A、B 各 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min;⑦每孔加入终止液 50 μL ,15 min 内在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度(OD)值;⑧根据测定的标准孔 OD 值及标准品浓度绘制标准曲线,并将待测标本的 IL-12 和 TNF- α 含量自动转化为浓度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分折。计量资料所有数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,检验水准取 $\alpha=0.05$ 。各组间比较首先确定样本是否符合正态分布,若符合正态分布,采用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,若方差齐,两两比较采用 LSD 法,若方差不齐,两两比较采用 Tamhane 法;若不符合正态分布则采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠脾脏组织中 IL-12 含量比较(见表 1)

组别	鼠数 (只)	治疗 3 天后 ($n=9$)	治疗 5 天后 ($n=9$)
空白组	9	3.23 $\pm$ 0.25	3.39 $\pm$ 0.29
模型组	9	1.32 $\pm$ 0.36 ¹⁾	2.45 $\pm$ 0.24 ²⁾
针刺组	9	1.98 $\pm$ 0.29 ¹²⁾	3.16 $\pm$ 0.25 ¹²⁾
艾灸组	9	1.82 $\pm$ 0.31 ¹²⁾	2.89 $\pm$ 0.22 ¹²⁾

由,与空白组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

表 1 示,治疗 3 天后,与空白组比较,其余各组脾脏组织中 IL-12 含量均降低,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$);治疗 5 天后,与空白组比较,其余各组脾脏组织中 IL-12 含量均降低,但仅模型组差异有统计学意义($P<0.05$),说明 CTX 可以降低脾脏组织中 IL-12 含量,导致机体的免疫功能损伤。治疗 3 天、5 天后,针刺组、艾灸组脾脏组织中 IL-12 含量均高于模型组(均 $P<0.05$),说明针刺和艾灸能提高化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 含量,减轻化疗所致免疫功能损伤,对抗 CTX 的毒副作用;针刺组的脾脏组织中 IL-12 含量虽高于艾灸组,但差异无统计学意义(均 $P>0.05$),说明针刺与艾灸对提升脾脏组织中 IL-12 含量的效用差异不显著,或

有待进一步研究。

2.2 各组小鼠脾脏组织中 TNF- α 含量比较(见表 2)

组别	鼠数	治疗 3 天后 ($n=9$)	治疗 5 天后 ($n=9$)
空白组	9	254.64 $\pm$ 22.87	267.48 $\pm$ 16.01
模型组	9	148.43 $\pm$ 22.66 ¹⁾	168.11 $\pm$ 15.33 ²⁾
针刺组	9	198.91 $\pm$ 29.72 ¹²⁾	250.23 $\pm$ 16.73 ¹²⁾
艾灸组	9	192.67 $\pm$ 25.56 ¹²⁾	230.77 $\pm$ 12.96 ¹²⁾

注:与空白组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

表 2 示,针灸治疗 3 天、5 天后,与空白组比较,其余各组脾脏组织中 TNF- α 含量均降低(均 $P<0.05$),说明 CTX 可以降低脾脏组织中 TNF- α 含量,能引起机体的免疫功能损伤;针刺组、艾灸组治疗 3 天、5 天后脾脏组织中 TNF- α 含量均高于模型组(均 $P<0.05$),说明针刺和艾灸能提高化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 TNF- α 含量,减轻化疗所致免疫功能损伤,对抗 CTX 毒副作用;艾灸组的脾脏组织中 TNF- α 含量虽高于针刺组,但差异无统计学意义(均 $P>0.05$),说明针刺与艾灸对提升脾脏组织中 TNF- α 含量的效用差异不显著。

3 讨论

环磷酰胺(CTX)是临床常用的治疗恶性肿瘤的化疗药物,为烷化剂代表药,具有广谱抗癌和细胞毒性作用,能杀死进行有丝分裂和进入循环周期的细胞,具有较强的免疫抑制作用^[1]。所以在免疫学研究中,常以 CTX 作为细胞免疫、体液免疫中的免疫抑制模型的制备药物^[11]。前期临床与实验研究^[12-14]证实,针灸具有减轻骨髓抑制、提升白细胞、增强机体免疫功能的作用。化疗后机体免疫功能损伤归属于中医“虚劳”范畴,治疗原则以培补先后天之本,健脾益气、补肾填精、调补气血^[15]为法。大抵为清阳之会,具有振奋阳气,扶助正气,与邪抗争,通而不滞之功;血会膈俞,养血调血,可以使血脉充盈而通利,与足阳明胃经是三里相配,可健脾胃,补气血;肾俞,是三里两穴培补先后天之本,使气血生化有源。四穴合用,不仅能够补先后天之本,而且能起到健脾和胃、补益气血、温补脾胃、扶正固本的作用。

脾脏是 T、B 淋巴细胞定居的场所,也是发生免疫应答的重要场所,还具有合成某些生物活性物质如补体、肌酸激酶(CK)、肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子的作用。细胞因子是指免疫系统中各种免疫细胞均能合成和分泌小分子的多肽类因子,它们调

节机体免疫功能,参与免疫细胞的增殖、分化和行使功能。它们在免疫系统中起着很重要的作用,某些情况下可产生免疫病理反应^[30]。

IL-12 又称自然杀伤细胞刺激因子(NKSF)和细胞毒淋巴细胞成熟因子(CTMF)^[31]。IL-12 通过调节 Th1 和 Th2 细胞亚群,在动物细胞介导的免疫中起重要作用^[32],IL-12 能促进 Th0 细胞向 Th1 细胞的分化,促进自然杀伤细胞(NK 细胞)成熟^[33],从而形成免疫增强的放大效应。它作为一种功能桥梁,联接早期的非特异性先天性免疫与后期抗原特异性的适应性免疫,在感染、肿瘤、自体免疫性疾病中起重要作用^[34]。本研究结果显示针灸能够提高 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 含量,提示其具有提升骨髓造血干细胞及其所分化的免疫细胞,且促进免疫细胞产生细胞因子,改善化疗机体免疫损伤的作用。

TNF- α 具有多种生物学效应,主要是介导抗肿瘤及调节机体的免疫功能,并且也参与炎症病变的多面病理变化。TNF- α 与肿瘤细胞膜上的 TNF- α 受体结合,特异性地杀伤肿瘤细胞,对机体的正常细胞无害,可致肿瘤细胞坏死^[35]。因此 TNF- α 对恶性肿瘤的作用尤为突出,其含量升高能够促使肿瘤细胞出血而坏死,进而能够抑制肿瘤生长,改善化疗所致机体免疫功能损伤^[36]。

本实验中,与空白组相比,荷瘤小鼠经过腹腔注射 CTX 后,脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 含量明显降低,表明细胞因子 IL-12 和 TNF- α 的不足是引起机体免疫功能损伤的重要因素之一;与模型组比较,针刺组、艾灸组的脾脏组织中 IL-12 含量明显增高,表明针刺和艾灸可以有效升高 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 的含量;由针灸治疗 3 天与 5 天实验结果比较显示针刺组和艾灸组在治疗第 4、5 天仍然可以持续提高化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 的含量,表明针灸改善化疗后免疫损伤的作用可随着治疗次数的增加持续加大,其最佳治疗次数有待进一步研究。本课题研究结果表明提高 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏组织中 IL-12 和 TNF- α 含量可能是针灸改善化疗所致机体免疫功能损伤的分子生物学机制之一。

参考文献

[1] 徐宝霞,方建超,黄亚良,等.环磷酰胺对小鼠骨髓造血干细胞作用及机制研究[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2007,12(3):106-110.
[2] 马增春,谭洪玲,肖成荣,等.环磷酰胺损伤小鼠骨髓造血机制[J].毒理学杂志,2007,21(4):232.

[3] 路政,曹大明,赵磊新,等.针灸对 CTX 荷瘤小鼠骨髓细胞 DNA 修复基因 MGMTmRNA POLB mRNA 表达的调控研究[J].辽宁中医杂志,2010,37(10):1901-1903.
[4] Hwang KS, Cho WK, Yoo J, et al. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene transfer combined with cytosine deaminase followed by 5-fluorocytosine treatment exerts potent antitumor activity in Renca tumor-bearing mice[J]. BMC Cancer, 2005, 5(1):51.
[5] 孙卫民,王慧琴.细胞因子研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1999:584-618.
[6] 纪昕.环磷酰胺对免疫抑制小鼠免疫器官造血功能影响的实验研究[D].石家庄:河北医科大学.
[7] 中华人民共和国卫生部药政司.新药(西药)临床研究指导原则汇编[S].北京:人民卫生出版社,1993:103.
[8] 于娟.中国药典针灸学[M].北京:农业出版社出版,1984:239.
[9] 王太平.组织胺生物碱对小鼠免疫功能的影响[D].银川:宁夏医科大学.
[10] 李业鹏,计魁,韩春升,等.建立小鼠免疫抑制低下模型的初步研究[J].中国食品卫生杂志,2001,13(6):7-10.
[11] 路政,曹大明,赵磊新,等.针灸对 CTX 小鼠骨髓细胞 DNA 损伤修复相关蛋白的调节研究[J].中国针灸,2009,29(10):821-824.
[12] 路政.针灸治疗肿瘤患者化疗白细胞减少症疗效及机制研究[J].中国针灸,1997,17(10):583-585.
[13] 路政,曹大明,赵磊新,等.针灸对环磷酰胺所致骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期调节蛋白 Cyclin D1 表达及增殖周期的动态影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(2):238-243.
[14] 韩向东.浅析《何氏心传》之虚劳观[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(7):548-549.
[15] 朱顺英.人 MIG 重组蛋白的制备及其防治化疗骨髓毒副作用的研究[D].上海:上海交通大学,2008.
[16] Nakamura M, Lwakoshi M, Nakamura M, et al. Intensification of antitumor effect by T helper 1-dominant adoptive immunogenic therapy for advanced orthotopic colon cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(5):2357-2365.
[17] Romani L, Mencacci A, Tonnetti L, et al. Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(4):909-915.
[18] Yamashita YI, Shimada M, Hasegawa H, et al. Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model[J]. Cancer Res, 2001, 61(21):7905-7912.

(收稿日期:2014-11-29,编辑:朱琦)