

专题——针灸现代化研究

艾灸对胃荷瘤大鼠外周血中 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞的影响

谭 静 林亚平 赵 欢 彭卓隽 欧阳里知 陈欲攀 石俊林

(湖南中医药大学针灸推拿学院,长沙,410208)

摘要 目的:观察艾灸对胃荷瘤大鼠外周血中 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞亚群的影响。方法:将 50 只健康 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,随机分为空白组、假手术组、模型组、艾灸组和红外组 5 组,每组 10 只。利用 Walker-256 细胞来源的实体瘤组织移植胃部制备模型。模型成功后,艾灸组予以悬灸中脘、胃俞等穴位;红外组予以短波红外线照射腹部胃脘及背部胃脘投影区;其余组捆绑束缚。干预 20 min/次,1 次/d,持续 21 d。干预结束后,眼眶采血,流式细胞技术测定外周血中 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴比例。处死动物,测算胸腺指数及肿瘤体积生长抑制率。结果:与空白组比较,模型组动物生存状态变差,胸腺指数增加,外周血中 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞比例显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,艾灸组动物生存状态改善,胸腺指数进一步增加,瘤体内坏死灶较多,血管较少,外周血中 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例显著增加($P < 0.01$), $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞比例减少($P < 0.01$);与红外组比较,艾灸组瘤体内坏死灶更多,血管较少,外周血中 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例增加($P < 0.01$)。结论:艾灸可一定程度改善荷瘤动物生存状态,减少肿瘤细胞转移、促进肿瘤细胞坏死,减少血管增生。这种影响可能与增加 $CD4^+$ T 淋巴细胞,减少 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞有关。

关键词 艾灸;胃癌;胸腺指数; $CD4^+$; $CD4^+CD25^+$;大鼠

Effects of Moxibustion on $CD4^+$ and $CD4^+CD25^+$ T Lymphocytes in Peripheral Blood of Rats with Gastric Tumor

Tan Jing, Lin Yaping, Zhao Huan, Peng Zhuojun, Ouyang Lizhi, Chen Yupan, Shi Junlin

(School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract Objective: To observe the effects of moxibustion on $CD4^+$ and $CD4^+CD25^+$ T lymphocytes in peripheral blood of rats with gastric cancer. **Methods:** A total of 50 healthy SPF SD rats (half male and half female) were randomly divided into 5 groups: the blank group, the sham operation group, the model group, the moxibustion group and the infrared group, with 10 rats in each group. Solid tumor tissue derived from Walker-256 cells was transplanted into the stomach to prepare the tumor model. After modeling, moxibustion group and infrared group were treated 20 mins per day for 21 days. After the intervention, the blood from the orbits was collected. And the ratio of $CD4^+$ and $CD4^+CD25^+$ T lymphocytes in peripheral blood was tested by flow cytometry. After killing the rats, the thymus index and the growth inhibition rate of the tumor volume were measured. **Results:** Compared with the blank group, the survival status of the model group was worse, the thymus index increased, and the proportion of $CD4^+CD25^+$ T lymphocytes in peripheral blood significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the survival status of the moxibustion group was improved, the thymus index was further increased, more necrosis and less blood vessels were found in the tumors, and the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes was increased significantly ($P < 0.01$), while that of $CD4^+CD25^+$ T lymphocyte was decreased ($P < 0.01$). Compared with the infrared group, more necrosis and few blood vessels were found in the tumors, and the proportion of $CD4^+$ T lymphocytes was increased in the moxibustion group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Moxibustion can improve the survival status of the rat with gastric tumor, inhibit tumor metastasis, promote tumor necrosis as well as prevent vessels hyperplasia. These changes may be related to the increasing $CD4^+$ T lymphocytes and the decreasing $CD4^+CD25^+$ T lymphocytes.

Key Words Moxibustion; Gastric cancer; Thymus index; $CD4^+$; $CD4^+CD25^+$; Rat

中图分类号:R245.8 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.03.001

胃癌(Gastric Carcinoma)是消化道最常见的恶性肿瘤,常以上腹部不适、疼痛、呕吐等为主要症

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81574077);湖南省大学生研究性学习及创新性实验项目(2017-1034)

作者简介:谭静(1985.07—),女,博士,讲师,研究方向:针灸治病机理及针灸教学研究,Tel:(0731)88458187,E-mail:hugotan0101@163.com,

通信作者:林亚平(1956.10—),女,硕士,教授,研究方向:针灸治病机理研究,Tel:(0731)88458187,E-mail:421192639@qq.com

状^[1]。受地域环境及饮食习惯的影响,我国胃癌的发病率、死亡率远高于全球平均水平^[2]。胃癌的防治一直是我国医学研究的重点。近年来,研究者抓住“肿瘤细胞更不耐高温”的特点,利用红外线、微波等的辐射能对肿瘤局部或全身加温,从调节免疫功能出发探索热疗抗肿瘤的作用机制,取得了一定进展^[3-4]。目前,热疗已成为临床第五大抗癌疗法。传统中医学中不乏利用“热”来防治疾病的方法,如艾灸、火针等。现代医学认为,艾灸主要通过燃烧时释放的各种光线的热刺激,激活穴位、经络产生复杂的反馈应答,实现对机体的“温补”与“温通”。我们的前期发现,艾灸可对抗多种刺激下的胃黏膜损伤^[5-7],能明显激活胃荷瘤大鼠外周血中自然杀伤细胞(NK)、自然杀伤性T细胞(NKT),但对肿瘤生长、转移及其他T细胞亚群的影响未作进一步研究^[8]。本实验再次以胃荷瘤大鼠为实验对象,观察艾灸对肿瘤生长、转移,肿瘤组织形态学及外周血中CD4⁺、CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞的影响,探索艾灸对抗胃癌的疗效及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 160~180 g SPF级SD大鼠6只,雄性,用于瘤组织制备;200~240 g SPF级SD大鼠50只,雌雄各半,用于分组实验。上述动物由中国食品药品检定研究院动物中心提供,生产许可证号:SCXK(京)2014-0013,使用许可证号:SYXK(京)2014-0003。实验在中国医学科学院肿瘤医院动物实验中心完成。饲养环境:室温(25 ± 1)℃,相对湿度50%~70%,12 h昼夜节律交替。实验前先适应性饲养1周。实验过程符合有关伦理学规定。

1.1.2 试剂与仪器 Walker-256细胞(中国医学科学院肿瘤医院馈赠)、戊巴比妥钠(Biotobbed)、淋巴细胞分离液(华美生物)、FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit(B&D)、大鼠CD3-APC(eBioscience)、CD4-PE(eBioscience)、CD25-PerCP-eFluor™ 710(eBioscience)、单抗(Sigma);流式细胞仪(LSR II型,Becton Dickinson)、低速离心机(LD5-10B型,北京京立)、红外线治疗仪(6002B型,徐州天飞)、数显表面测温仪(浙江波仕欧)、直径0.7 cm艾条(长沙艾医生物)、自制小动物艾灸架。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 分组方法:实验分为空白组、假手术组、模型组、艾灸组、红外组5组。随机数字表法对动物编号。通过下述方法制备动物模型,

成模后,随机分入模型组、艾灸组及红外组。手术模拟皮下实体瘤组织胃壁移植过程,成功后,随机分入假手术组。每组动物10只,雌雄各半,共计50只动物。

参考文献^[9],按照以下3步制备动物模型。1)腹水瘤制备:160~180 g大鼠分别腹腔注射0.3 mL Walker-256细胞的悬液(2×10^7 个/mL,3只)。2)皮下实体瘤制备:待形成明显腹水(腹腔注射7 d)后处死动物,收集腹水中的瘤细胞,调整至 0.5×10^7 个/mL,皮下注射于160~180 g的大鼠右前、右后肢(0.2 mL/部位,3只)。3)手术移植:待皮下注射处形成橄榄核大小的实体瘤后,处死动物,无菌条件下切开瘤体,取大小0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm新鲜鱼肉样瘤组织手术缝合于待移植大鼠胃大弯皮、腺区交界的胃壁上,荷瘤大鼠体质量200~240 g。7 d后剖腹探查判断造模是否成功。模型成功标准:移植处瘤体已附生在胃壁上,直径0.5 cm以上,边界清晰,表面光滑,无粘连及脏器侵犯,组织学证实与皮下实体瘤同源。见图1。

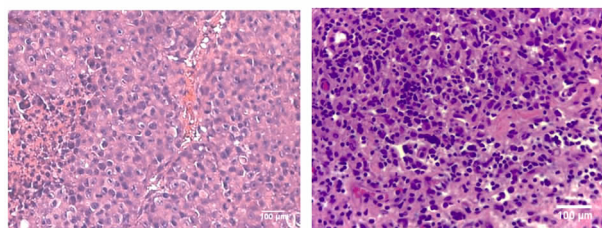


图1 皮下实体瘤(左)、胃部瘤体(右)
(HE染色,×400)

1.2.2 给药方法 造模成功的第2天,艾灸组《针灸基础与临床》^[10]中大鼠穴位定位方法,仰卧位固定施灸中脘、关元、足三里(双),隔日俯卧位固定施灸脾俞(双)、胃俞(双)。施灸时,将直径7 mm艾条通过自制艾灸架在穴位垂直上方固定并点燃施灸。利用表面测温仪监测表皮温度,适时去除艾灰、调整施灸高度,确保温度持续在(42 ± 1)℃之间。每次施灸20 min,1次/d,连续21 d。红外组于造模成功后第2天,使用波长0.4~3 μm的短波红外线照射,强度1档,输出功率10 W、光斑直径3 cm,隔日交替照射胃脘部及背部T11至T13区域,治疗时温度控制、治疗时间、频次、疗程等与艾灸组相同。空白、假手术、模型组动物在同一时间段,隔日仰卧、俯卧交替捆绑束缚。

1.2.3 检测指标与方法 1)生存状态积分评定:自开始干预起,每隔5 d对各组动物的生存状态进行评定。见表1。

表 1 生存状态积分评定

分值	表现
5 分	饮食正常,活动自如,毛色光亮
4 分	呼吸平稳,反应较敏锐,能站立行走,但步态较缓慢,毛色较光亮
3 分	意识清醒,但不能四肢站立行走,可自主爬行,部分鼠毛脱落,毛质较粗糙、发黄
2 分	嗜睡,反应迟钝、呼吸较急促、浅快,呼吸度动可,较多鼠毛脱落,毛质较粗糙、背毛耸立明显
1 分	昏迷、静卧不动,只有微弱的腹式呼吸运动(浅慢),或明显节律紊乱,对外界刺激无明显反应,或极度迟钝、背毛耸立
0 分	死亡

2)外周血 CD4⁺、CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞检测: 干预结束后的第 2 天,禁食不禁水 12 h 后,眼眶采血 2 mL,24 h 内采用流式细胞仪检测。检测时,取 100 μ L 血样,分别加入适量的 CD3-APC、CD4 PE、CD25-PerCP-eFluor™ 710 荧光标记抗体,室温避光孵育 20 min 后加入 2 mL 红细胞裂解液,室温反应 10 min;300 g 离心 5 min,弃上清,加入 2 mL PBS 混匀,300 g 离心 5 min,弃上清;加入 500 μ L PBS 混匀上流式细胞仪,通过 FACS Diva6.0 分析软件获取分析。

3)胸腺指数测量:采血后,处死动物,无菌环境下剖开胸,摘取胸腺,PBS 冲洗后,无菌纱布吸干水分后,用电子精密天平测量重量,按照胸腺重量(mg)/小鼠体质量(g)计算胸腺指数。

4)肿瘤生长抑制率:动物处死后,无菌环境下剖开腹腔,手术线结扎大鼠幽门部和贲门部,在两结扎线之间剪下全胃,PBS 溶液轻柔冲洗,无菌纱布吸干多余水分后将胃平摊于定型滤纸,暴露肿瘤部位,用电子游标卡尺测量胃部瘤体的最长径(a),最小径(b),根据公式 $V = (\pi/6) \times [(a + b)/2]^3$,计算出肿瘤的体积。按照(模型组肿瘤体积均值-实验组肿瘤体积均值)/模型组肿瘤体积均值 $\times 100\%$ 计算肿瘤生长抑制率。

5)肿瘤组织形态学观察:取肿瘤组织,4% 低聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片。苏木精-伊红(HE)染色,普通光镜下观察肿瘤组织坏死,血管等情况。

1.3 统计学方法 所有数据使用 SPSS 20.0 软件进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据资料进行正态性检验和方差齐性检验。满足正态性时,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐时用 LSD 法检验,不齐时用 Dunnett T3 法检验。不满足正态性时,采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 定义差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生存状态积分 在观察时间内,各组均未见动物死亡。与空白组比较,模型组成模后第 5 日起生存状态积分持续降低($P < 0.01$)。干预 15 d 后,与模型组比较,艾灸组、红外组动物生存状态改善,积分值增加($P < 0.01, P < 0.05$),且艾灸组明显优于红外组($P < 0.05$);干预 20 d 后,艾灸组积分与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

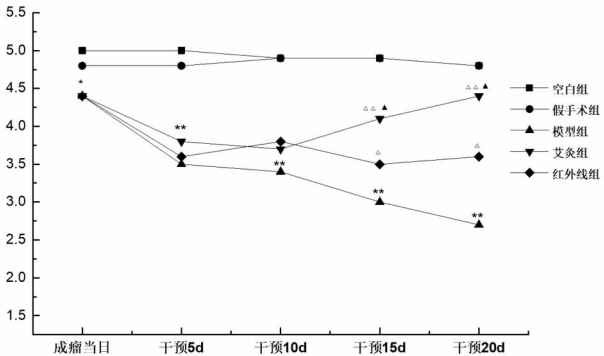


图 2 各组大鼠生存状态积分比较($\bar{x} \pm s$)

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$;与红外组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

2.2 肿瘤增长抑制率 干预期间内无动物死亡。干预结束后,处死动物开腹探查后发现模型组、艾灸组、红外组均有瘤体破溃消失,其中模型组 1 只,艾灸组 6 只、红外组 3 只。各组均有肿瘤细胞转移,其中以红外治疗、腹水转移最常见。见表 2。如图 3 所示,与模型组比较,艾灸组、红外组胃部所荷瘤体积明显减小($P < 0.05$)。经计算,体积生长抑制率分别为 41.89%、28.09%。

表 2 各组大鼠肿瘤细胞转移情况

组别	转移部位(例)			
	腹水	肝	肠	脾
模型组($n = 10$)	1	1	1	1
艾灸组($n = 10$)	1	0	0	0
红外组($n = 10$)	3	0	0	3

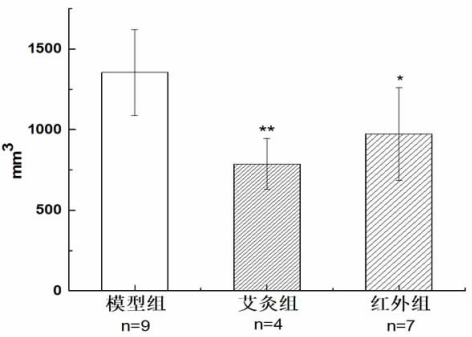


图 3 各组大鼠胃瘤体积比较($\bar{x} \pm s$)

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,* $P < 0.01$

2.3 瘤体形态学观察 模型组瘤体内出现大量增生的血管,较少有坏死灶;艾灸组瘤体内出现大量坏死灶,血管较少;红外组瘤体内尽管出现了一定量坏死灶,但也有一定量血管增生。见图4。

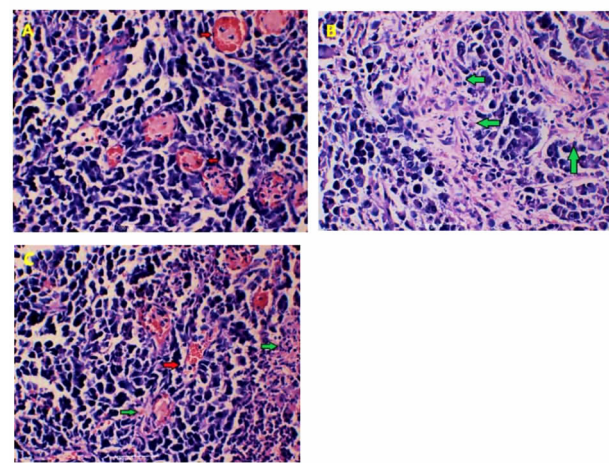


图4 各组大鼠肿瘤组织形态学(HE染色,×400)
注:A模型组、B艾灸组、C红外组,红色箭头所示为血管,绿色箭头所示为坏死灶

2.4 胸腺指数 与空白组比较,模型组胸腺指数增高($P<0.05$);与模型组比较,艾灸组胸腺指数显著增高($P<0.01$);与红外组比较,艾灸组胸腺指数增加明显($P<0.05$)。见图5。

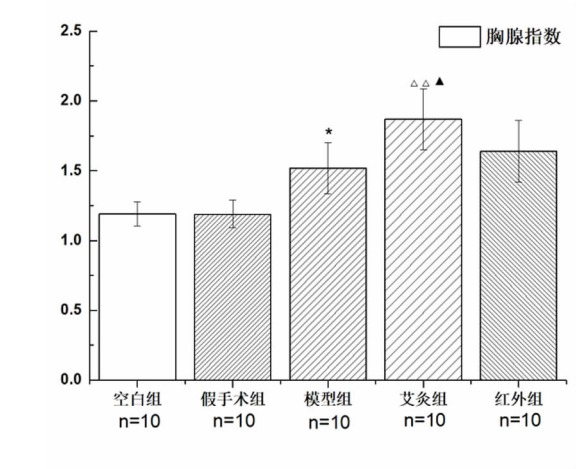


图5 各组大鼠胸腺指数比较($\bar{x} \pm s$)
注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与红外组比较, $\Delta P<0.05$

2.4 外周血中 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞比例 与空白组比较,模型组外周血中 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞比例显著增加($P<0.05$)。与模型组比较,艾灸组外周血中 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例显著增加($P<0.01$), $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞比例减少。与红外组比较,艾灸组外周血中 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例增加更明显($P<0.01$)。见图6、图7。

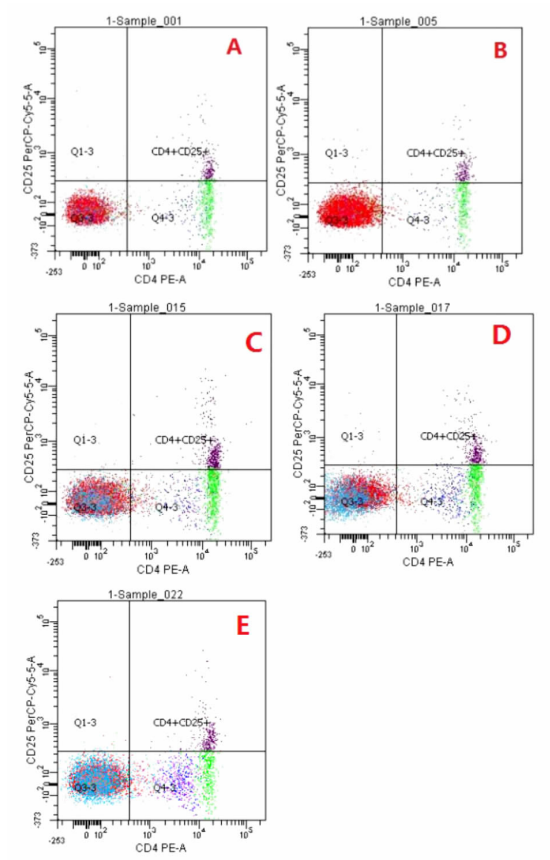


图6 各组大鼠外周血中 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞流式分布图

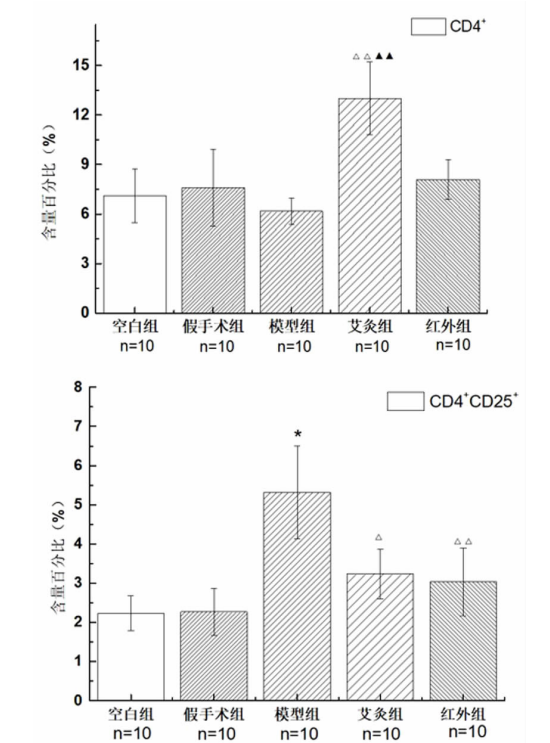


图7 各组大鼠外周血中 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞比例($\bar{x} \pm s$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与红外组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

3 讨论

恶性肿瘤是威胁人类健康的重要疾病,已经给社会带来沉重的负担。预计到 2020 年中国每年的恶性肿瘤死亡总数将达 300 万,患病总数将达 660 万^[11]。目前,恶性肿瘤的治疗方法主要仍为手术根治及放化疗。但其治疗范围的局限性及较普遍、明显的不良反应,促使抗癌的新技术、新方法不断被探索。近年来,研究者抓住肿瘤细胞较正常细胞更不耐高温的特点,利用红外线、微波等对实体瘤局部表皮进行照射。发现,通过将肿瘤内温度升高至 42 ℃ 后,肿瘤内的温度较正常组织高 1 ~ 2 ℃,这样既不会伤害正常组织,又能杀死肿瘤细胞^[12]。在这种高温环境下,一方面,肿瘤细胞细胞膜的流动性、通透性增加,细胞内酶失活、DNA 合成受阻、代谢抑制,肿瘤细胞将程序化死亡^[13];另一方面,热刺激可诱导大量抗癌因子如热休克蛋白等的表达、释放,使抗体、抗原结合更容易、更紧密,增强机体对肿瘤细胞的特异性杀伤^[14]。由于肿瘤内血管丰富,血液中水分、血红蛋白能吸收大量光线而升温并使血液循环加快,对血管壁的压力增加,进而引起实体瘤组织的坏死、破溃^[13,15]。因此,热疗已成为临床第五大抗癌疗法。

近年来,随着国家对中医药发展的日益重视,艾灸作为中医学的重要组成已积极应用于恶性肿瘤的对症治疗中,如减轻术后腹胀、呕吐,改善放化疗后的骨髓抑制,增强免疫功能等^[15-16],但对艾灸直接的肿瘤抑制作用观察较少。与现有热疗技术比较,艾灸具有多种潜在优势。一方面,艾灸辐射的是以短波红外线为主的综合光线,各种光线的比例可随着燃烧时间不断变化,因此效应广、作用深、难耐受^[17]。另一方面,艾灸时释放的艾烟具有空气消毒、抑菌杀菌、抗感染、清除自由基等作用^[18]。本研究中,艾灸控制表皮温度在 42 ℃ 时,动物没有明显的挣扎、嘶叫等应激反应,经艾灸治疗 21 d 后,肿瘤体积、转移例数明显小于(少于)模型组,同时瘤体内血管较少、坏死灶较多,提示艾灸具有一定的肿瘤抑制作用。然而,艾灸通过什么方式起效?

研究表明,肿瘤的发生发展与机体免疫,特别是淋巴细胞的状态密切相关。淋巴细胞(Lymphocyte)是体积最小的白细胞,可分为 T 淋巴细胞(T 细胞)、B 淋巴细胞(B 细胞)和自然杀伤细胞(NK 细胞)。T 细胞和 B 细胞都是抗原特异性淋巴细胞,分别参与细胞免疫及体液免疫,其中 T 细胞的影响更大^[19]。T 淋巴细胞来源于骨髓的多功能干细胞,在

胸腺中分化成熟后布到全身各处。T 细胞表达多种重要的膜分子,它们参与 T 细胞识别抗原、活化、增殖。其中,CD4⁺ T 细胞能在抗原提呈细胞的协助下,可识别肿瘤细胞分泌的可溶性抗原,继而释放多种细胞因子(IL-2、IFN- γ 、IL-4 等),促进 B 细胞、巨噬细胞、NK 细胞的激活,帮助其杀伤肿瘤细胞。CD4⁺ T 细胞具有多种亚群,其中,CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg 细胞)于 20 世纪 90 年代被发现,因具有强大的免疫调节作用,一直是研究的热点。研究表明^[20],Treg 细胞可通过分泌细胞因子、细胞接触抑制 2 种方式调节肿瘤免疫,帮助肿瘤细胞实现免疫逃逸。一方面,Treg 细胞通过分泌 TGF- β 、IL-10 等多种细胞因子发挥免疫抑制效应。如 TGF- β 可抑制由 NK 细胞激活受体介导的细胞毒性作用,减少 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤^[21-22];通过分泌颗粒酶(Granzyme),诱导靶细胞坏死^[23];通过竞争性结合 IL-2 后促进自身增殖、分化,增强对效应 T 细胞的免疫^[24];通过调节核因子(NF- κ B)受体活化因子及其配体受体信号的途径对肿瘤的转移起促进作用^[25]。另一方面,Treg 细胞可通过 T 细胞上的跨膜受体 CTLA-4 介导的细胞接触抑制抗癌发挥效应^[26]。临床研究表明^[27-28],胃癌等多种类型肿瘤患者的外周血和肿瘤组织内 Treg 细胞均呈高表达,其细胞数量与肿瘤患者的预后呈负相关。手术及放化疗治疗后,外周血中 Treg 细胞数目减少,其可能作用方式是通过抑制癌灶微环境中血管的生成,加速凋亡进程有关^[29-30]。我们的前期研究表明,艾灸能明显组成荷瘤大鼠外周血中 NK、NKT 细胞的激活^[8]。本次研究表明艾灸具有一定的肿瘤生长及转移的抑制作用,瘤体中的血管明显减少,上述发生或许与减少外周血中 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞有关。然而,艾灸后外周血中 CD4⁺ T 淋巴细胞比例明显增加,提示艾灸或对其他 T 细胞亚群也有作用。同时,CD4⁺ CD25⁺ T 细胞的激活途径及后续影响等均有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨庭松. 胃癌治疗进展研究[M]. 上海: 同济大学出版社, 2017: 2.
- [2] Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. The Lancet, 2017, 390(10100): 1084-1150.
- [3] 中日医学科技交流协会热疗专业委员会. 中国肿瘤热疗临床应用指南(2017. V1. 1) [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2017, 26(4): 369-375.
- [4] Isomoto H, Ohtsuru A, Braidon V, et al. Heat-directed suicide gene

- therapy mediated by heat shock protein promoter for gastric cancer [J]. *Oncology Reports*, 2006, 15(3):629-35.
- [5] 彭艳, 易受乡, 封迎帅, 等. 艾灸对幽门螺杆菌胃炎大鼠血清免疫学作用研究[J]. *中国针灸*, 2014, 34(8):783-790.
- [6] 易受乡, 彭艳, 常小荣, 等. 艾灸对应激性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡的影响及其与热休克蛋白表达关系的研究[J]. *针刺研究*, 2006, 31(5):259-263 + 271 + 256.
- [7] 易受乡, 郁洁, 常小荣, 等. 艾灸及槲皮素预处理对胃黏膜细胞凋亡及 HSP70 表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(11):2245-2248.
- [8] 欧阳里知, 谭静, 赵欢, 等. 艾灸对荷瘤胃癌大鼠外周血中 CD3-CD161 + NK 与 CD3 + CD161 + NKT 含量的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(5):541-545.
- [9] 隋英忠, 夏玉军, 王晓静, 等. 构建 SD 大鼠移植性胃癌模型及不同方法诱癌率的比较[J]. *中国临床研究*, 2014, 27(2):135-137.
- [10] 严洁, 朱兵. 针灸的基础与临床[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 2010:549-647.
- [11] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China[J]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2010, 40(4):281-285.
- [11] George M. Hahn. Hyperthermia and Cancer[M]. New York: New York Plenum Press, 1982:2-3.
- [12] 李鼎九. 肿瘤热力学[M]. 2 版. 郑州: 郑州大学出版社, 2003:1-2.
- [13] Benjamin Frey, Eva-Maria Weiss, ect. Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system[J]. 2012, 28(6):528-542.
- [14] 张贺龙, 刘文超. 临床肿瘤学[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2016:156-160.
- [15] 黄金昶. 发挥针灸治疗肿瘤优势促进中西医结合发展[J]. *中国针灸*, 2018, 38(10):1123-1124.
- [16] 侯新芳, 倪光夏. 艾灸治疗恶性肿瘤研究进展[J]. *世界中西医结合杂志*, 2014, 9(1):101-104.
- [17] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016:127-130.
- [18] 惠鑫, 黄畅, 王昊, 等. 艾烟在艾灸中的作用机制及安全性[J]. *世界中医药*, 2017, 12(9):2246-2251.
- [19] 朱彤波. 医学免疫学[M]. 2 版. 四川: 四川大学出版社, 2017:275.
- [20] 张雅丽, 侯安丽, 王杏茶, 等. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞在子宫内膜癌患者外周血中的表达及意义[J]. *现代免疫学*, 2015, 35(5):410-414.
- [21] Barao I, Hanash A M, Hallett W, et al. Suppression of Natural Killer Cell-Mediated Bone Marrow Cell Rejection by CD4⁺CD25⁺Regulatory T Cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(14):5460-5465.
- [22] Chen X, Du Y, Lin X Q, et al. CD4⁺CD25⁺regulatory T cells in tumor immunity[J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 34(2):244-249.
- [23] 徐林, 徐薇, 蒋正刚, 等. CD4⁺CD25⁺CCR6⁺ 调节性 T 细胞在小鼠乳腺癌模型中对 CD8⁺T 细胞的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(5):431-435.
- [24] Gao Y L, Chai Y F, Qi A L, et al. Neuropilin-1highCD4⁺CD25⁺Regulatory T Cells Exhibit Primary Negative Immunoregulation in Sepsis[J]. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2016(9):1-11.
- [25] Wang L Y, Zeng Y, Pan Z Z, et al. Detection of intracellular and extracellular cytokines of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells in gastric cancer patients[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2007, 26(3):270.
- [26] Chen C, Chen D, Zhang Y, et al. Changes of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ and CD8⁺CD28⁺regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery[J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 18(2):255-261.
- [27] 马金环. 急性胃出血患者早期血液 CD4⁺CD25⁺T 细胞及其细胞因子的变化[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(7):1170-1172.
- [28] 龚单春, 张海东, 于振坤, 等. CD4⁺~ + CD25⁺~ + T regs 与 CCL17 和 CCL22 在头颈鳞状细胞癌发病机制中的初步研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(20):1557-1560.
- [29] 施怡, 李晓斌, 章岳山, 等. 结肠癌患者化疗/热化疗前后 CD4⁺CD25⁺T 细胞和 CTL 变化[J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(8):626-629.
- [30] Hou P F, Zhu L J, Chen X Y, et al. Age-related changes in CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺regulatory T cells and their relationship with lung cancer:[J]. *Plos One*, 2017, 12(3):e0173048.

(2019-02-01 收稿 责任编辑:徐颖)