

· 基础研究 ·

冲击波对人 T 淋巴细胞增殖及分泌白细胞介素 2 的作用

于铁成 郑学清 刘一 赵松 徐莘香

【摘要】目的 研究低能冲击波是否能促进 T 淋巴细胞增殖及分泌白细胞介素 2 (IL-2)。**方法** 先将人外周血单个核细胞 (PBMC), 用 $(0.180 \pm 0.015) \text{ mJ/mm}^2$ 的低能冲击波作用, 之后立即给予植物血凝素 (PHA) 的亚刺激量作用, 同时设阴性对照组。继续培养 24 h 后, 用生物活性分析法检测低能冲击波对 T 淋巴细胞分泌 IL-2 的影响; 或培养 48 h, 用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测低能冲击波对 T 淋巴细胞增殖的影响。**结果** 低能冲击波单独不能引起 PBMC 的 T 淋巴细胞增殖和分泌 IL-2; 然而, 结合 PHA 抗体的刺激, 低能冲击波能大大促进 T 淋巴细胞增殖和分泌 IL-2。**结论** 低能冲击波能促进激活的 T 淋巴细胞增殖和分泌 IL-2。这将为治疗免疫力低下合并感染的患者提供一种新的治疗手段。

【关键词】 低能冲击波; T 淋巴细胞增殖; 白细胞介素-2

Effects of low intensity shockwave on the proliferation of T-lymph cell and IL-2 expression YU Tie-cheng*, ZHENG Xue-qing, LIU Yi, ZHAO Song, XU Xin-xiang. * Department of Orthopaedics, The First Teaching Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China

【Abstract】Objective To explore the promotive effects of low-intensity shockwave (LISW) on the proliferation of T-lymph cells and the expression of IL-2. **Methods** After the treatment of low-intensity shockwave at $(0.180 \pm 0.015) \text{ mJ/mm}^2$, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated by phytohemagglutinin (PHA) with a suboptimal stimulating dose. The effects LISW on the production of IL-2 were measured by using bioactivation analysis 24 h after incubation, while the effects of LISW on T-lymph cells proliferation were measured with $1 \mu\text{Ci/well}$ [methyl- ^3H] thymidine 48 h after incubation. **Results** The proliferation of T-lymph cells and the expression of IL-2 were not enhanced significantly by LISWs, however, improved by LISWs combined with PHA. **Conclusion** The proliferation of T-lymph cells and the expression of IL-2 might be enhanced by LISW, which could provide a new approach to patients with hyp immunity and concurrent infectious disease.

【Key words】 Low-intensity shockwave; T-cell proliferation; Interleukin-2

近年来,人们发现低能冲击波对骨折愈合有促进作用,并对慢性肌腱炎有很好的治疗作用^[1,2]。而慢性肌腱炎的病变组织中含有大量的淋巴细胞^[3],既然低能冲击波对慢性肌腱炎有治疗作用,那么低能冲击波可能对淋巴细胞也有作用。早在 1986 年 Haupt 就发现,低能冲击波可促进小猪创口 (约 1 cm^2 大小, $0.3 \sim 0.5 \text{ mm}$ 深) 的愈合,而加大冲击波的强度则会抑制创口的愈合^[4];形态学上的观察显示:低能冲击波会使小猪创口内的毛细血管、新形成的上皮细胞和血管外周的巨噬细胞的数量明显增加,是对照组的 2 倍^[4]。那么低能冲击波能否促进 T 淋巴细胞增殖及分泌 IL-2? 关于这方面的研究,国内外鲜见报道。我们用外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 来研究低能冲击波对 T 淋巴细胞增殖及

分泌白细胞介素 2 (interlukin-2, IL-2) 的影响,以进一步揭示低能冲击波生物学效应的产生机制,同时也为治疗免疫力低下合并感染的患者提供一种新的治疗手段。

材料和方法

一、材料

1. 主要仪器和设备

液体闪烁计数仪 (BACKMAN LS-6500, 美国)、体外液电冲击波碎石机 (MODEL KDE-2001, 北京)、二氧化碳孵箱 (RKI, 日本)、超净工作台 (SW-CT-IFD, 苏州)、倒置显微镜 (Hund D-6330 Wetzlar 21, 德国)、550 型酶标仪 (BIO-RAD, 美国)。

2. 溶液和试剂

IMDM 培养基 (美国 GIBCO 公司); 用时加入 10% 的加热灭活的无菌胎牛血清 (美国 GIBCO 公司)。闪烁液: 先将 1,4-双-[5-苯基 唑基-2] 苯 (POPOP, 美国 GIBCO 公司) 0.5 g 加入二甲苯 1 000 ml, 再加 2,5-二

作者单位: 130021 长春市, 吉林大学第一医院骨科 (于铁成、刘一、赵松、徐莘香), 碎石中心 (郑学清)

通讯作者: 刘一

苯基 唑(PPO, 美国 GIBCO 公司) 5 g, 在 50 ~ 60℃ 水浴溶解, 避光保存。使用数次后, 测每分钟液体闪烁计数仪记录的电脑冲数值(count per minute, cpm), 如超过 200 cpm/ml, 即应作废。另外有:³H-甲基-脱氧胸腺嘧啶核苷[(methyl-³H) thymidine, ³H-TdR, 中国原子能研究所提供]、49 型玻璃纤维滤纸(美国 GIBCO 公司)、植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA; 美国 Sigma 公司)和 IL-2 标准品(美国 Sigma 公司)。

3. 细胞

CTLL-2 细胞: 从中国科学院上海细胞生物学研究所购得, CTLL-2 细胞维持在含有 20 U/ml 的重组 IL-2 的完全 RPMI1640 培养液(含 10% 小牛血清 FCS、100 U/ml 庆大霉素)中, 细胞密度为 0.5×10^5 个/ml。

PBMC: 取健康人的静脉血 20 ml, 加肝素(每毫升血加 12 U 肝素)抗凝, 用 pH7.2 的 D' Hanks 液(1:1)稀释抗凝血。先将淋巴细胞分离液加入试管, 再将稀释抗凝血缓缓加入, 分离液和血液之比为(1~1.5):2, 注意不要打破界面。用水平离心机 1 700 rpm 离心 20 min, 然后小心用吸管将分离出的人外周血单个核细胞吸出, 加到另一试管, 加入 10 ml 的 pH7.2 的 D' Hanks 液, 用 1 000 rpm 的速度离心 8 min。弃上清, 反复洗涤 3 次, 最后用 IMDM 培养液(含 10% 小牛血清 FCS、100 U/ml 庆大霉素)将细胞悬起。于实验中用 PHA 亚刺激量 1 μg/ml 作用 PBMC(1×10^6 个/ml), 然后观察冲击波对 T 淋巴细胞增殖和分泌 IL-2 的影响。

二、方法

1. 低能冲击波作用细胞

用 MODEL KDE-2001 体外液电冲击波碎石机(北京产)在工作电压 7 kV, 电容 0.3 μF 时, 通过水下两电极放电, 于半椭圆形的第一焦点产生的冲击波, 经过光滑的半椭圆形的刚体表面汇聚到第二焦点, 形成能量密度为 (0.18 ± 0.015) mJ/mm² 的低能冲击波(经过压力针式传感器测定)。将目标细胞装入容量为 1.5 ml 的聚丙烯小塑料瓶中, 然后通过 X 射线 C 型臂透视装置将小塑料瓶定位在半椭圆形的第二焦点处, 同时将其固定。尽量使小瓶的液体无气泡, 同时尽量使第一焦点产生的冲击波, 通过一个液体的无气泡的媒介传到第二焦点处的细胞, 这样能最大限度地减少冲击波的能量损失。经过低能冲击波作用后, 通过 0.4% 台盼蓝染色分析细胞活性(冲击波作用后的活细胞数/未受冲击波作用的活细胞数的百分比值), 同时用血细胞计数器记录细胞的数量。

2. T 淋巴细胞增殖的检测

取一个人的 PBMC(2×10^6 个/ml) 装入 8 个聚丙烯小塑料瓶中, 每瓶 1 ml。留一瓶细胞作为对照, 将其余 7 瓶分别用不同剂量的冲击波作用。然后立即将各

瓶中的细胞以每孔 100 μl 加入 96 孔板中, 每瓶加 6 个孔, 再立即在其中的 3 个孔中加入 PHA 的亚刺激量。这样就成功地设置了无 PHA 的阴性对照组、有冲击波作用而无 PHA 作用的对照、无冲击波作用的 PHA 亚刺激量的阴性对照, 每组各 3 个复孔。细胞的终浓度为 1×10^6 个/ml; PHA 亚刺激量的终浓度 1 μg/ml, 每复孔的终液量为 200 μl。将各孔细胞混匀后, 在 37℃, 5% CO₂ 孵箱内培养 48 h, 倒置显微镜下观察细胞形态, 如见淋巴细胞体积增大, 核膜清晰, 核染色质疏松, 核内见明显核仁 2~4 个, 胞浆丰富, 有伪足样突起, 这表示细胞转化为母细胞。这时每孔加入 18.5 kBp(0.5 μCi) ³H-TdR, 继续培养 6~8 h, 用 ³H-TdR 掺入法通过 β-液闪计数器测定每个样品的 cpm 值^[5]。用 3 个不同人的 PBMC 重复上述试验 3 次。

3. T 淋巴细胞分泌 IL-2 的检测^[8]

取一个人的 PBMC(2×10^6 个/ml) 装入 8 个聚丙烯小塑料瓶中, 每瓶 1 ml。留一瓶细胞作为对照, 将其余 7 瓶分别用不同剂量的冲击波作用。然后立即将各瓶中的细胞以每孔 500 μl 加入 24 孔板中, 每瓶加 2 个孔, 再立即在其中的 1 个孔中加入 PHA 的亚刺激量。这样就成功地设置了无 PHA 的阴性对照组、有冲击波作用而无 PHA 作用的对照、无冲击波作用的 PHA 亚刺激量的阴性对照, 每组各 1 复孔。细胞的终浓度为 1×10^6 个/ml; PHA 亚刺激量的终浓度 1 μg/ml, 每复孔的终液量为 1 ml。将各孔细胞混匀后, 于 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h, 取上清液作为待测样品。最后根据参考文献[6]提供的方法检测待测样品的 IL-2 浓度。用 3 个不同人的 PBMC, 于不同的时间重复试验 3 次, 求得待测样品 IL-2 的均值。

三、统计学分析

实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。同时将各组数据用 SPSS 12.0 统计学软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、冲击波对细胞数量和活性的影响

用台盼蓝染色检测发现, 冲击波于工作电压 7 kV, 电容 0.3 μF, 正相压强 23 MPa, 能量密度 (0.18 ± 0.015) mJ/mm² 时, 作用 PBMC(2×10^6 个/ml) 10, 150, 200, 250, 300, 360 或 400 次, 对细胞的活性没有影响($P > 0.05$), 而当冲击波的作用超过 500 次, 细胞的活性为 $(83 \pm 5)\%$, 明显低于对照组($P < 0.05$), 差异有统计学意义。明显受到影响($P < 0.05$)。

二、低能冲击波促进 T 淋巴细胞增殖

当用工作电压 7 kV, 电容 0.3 μF, 正相压强 23 MPa, 能量密度 (0.180 ± 0.015) mJ/mm² 的冲击波

作用 PHA 激活的 PBMC 100 ~ 360 次,能显著增强 T 淋巴细胞的³H-TdR 掺入量(经 *t* 检验, $P < 0.001$)。而 320 次时几乎能双增加 PHA 激活的 PBMC 中的 T 淋巴细胞的³H-TdR 掺入量。但是如果没用 PHA 的激活作用,单纯的冲击波作用不能增加 T 淋巴细胞的³H-TdR 掺入量。

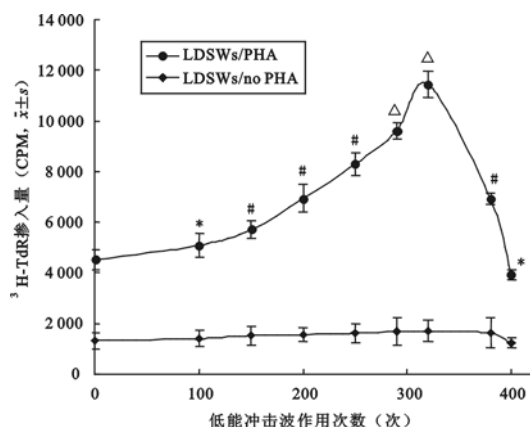


图1 低能冲击波对人 T 淋巴细胞增殖的促进作用

注:与 0 时刻上清的 CPM 值比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, Δ $P < 0.001$

三、低能冲击波促进 IL-2 分泌

我们设想冲击波促进 T 淋巴细胞增值是由于冲击波增强了 T 淋巴细胞分泌 IL-2。为了证明我们的想法,我们用能量密度为 $(0.180 \pm 0.015) \text{ mJ/mm}^2$ 的冲击波作用于 PHA 激活的 T 淋巴细胞,24 h 后通过 CTL-2 细胞检测其上清液中 IL-2 的分泌量。我们发现,150 ~ 400 次该低能冲击波作用,能显著增强 PBMC 的 IL-2 的分泌,作用 320 次时几乎能 2.5 倍地增强 T 淋巴细胞分泌 IL-2。

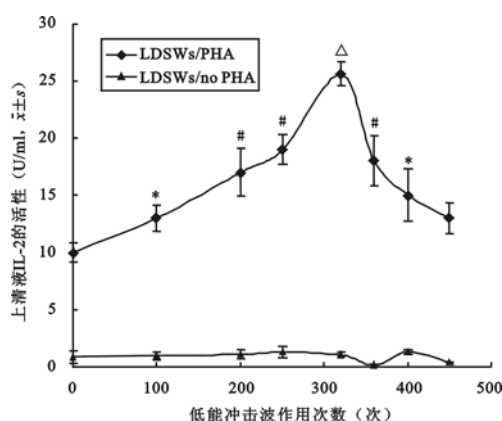


图2 低能冲击波对 T 淋巴细胞分泌 IL-2 的促进作用

注:与 0 时刻上清的 IL-2 值比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, Δ $P < 0.001$

讨 论

我们首次发现单纯 $(0.180 \pm 0.015) \text{ mJ/mm}^2$ 的低能冲击波作用,不能刺激 T 淋巴细胞的增殖及分泌 IL-

2;但是该低能冲击波能促进 PHA 激活的 T 淋巴细胞增殖及分泌 IL-2。

Steinbach 等^[7]用冲击波作用人前列腺癌细胞系 (the human prostate carcinoma cell line, PCA) 的细胞悬浮液发现,能量密度为 0.12 mJ/mm^2 的冲击波可使细胞膜出现损害; 0.22 mJ/mm^2 可使细胞骨架中的波形蛋白损伤; 0.33 mJ/mm^2 可使线粒体发生损害; 0.5 mJ/mm^2 能使细胞核损伤^[7]。我们实验中所用冲击波的能量密度为 $(0.180 \pm 0.015) \text{ mJ/mm}^2$, 介于 $0.12 \sim 0.22 \text{ mJ/mm}^2$ 之间。由此可知,该低能冲击波可损伤细胞膜而不损伤细胞器。

我们由此可以推测,可使细胞膜损伤又不使细胞器损伤的低能冲击波可促进 PHA 激活的 PBMC 的 T 淋巴细胞增殖及分泌 IL-2。

那么冲击波为什么会增强 T 淋巴细胞的活性及分泌 IL-2 呢? 有丝分裂原激活蛋白激酶 p38 (p38 MAPK) 结构上和酵母菌渗透压敏感基因表达的蛋白 HOG-1 相似^[8]。在受到高渗透压作用时,酵母菌细胞通过 HOG-1 调节基因表达。高渗透压作为一种机械刺激,使细胞膜发生机械变形,激活人 T 淋巴细胞的 p38 MAPK,促进 T 淋巴细胞分泌 IL-2^[9]。冲击波作为一种机械物理刺激^[10],会引起细胞膜发生机械变形,并可能通过激活人 T 淋巴细胞的 p38 MAPK 促进 T 淋巴细胞分泌 IL-2。

近年来,人们将研究的焦点放在冲击波对骨不连和骨延迟愈合的治疗作用上^[10]。本研究第一次阐述了能量密度为 $(0.180 \pm 0.015) \text{ mJ/mm}^2$ 的低能冲击波能够协同增强人 T 淋巴细胞的功能。这为研究冲击波生物学效应的产生机制提供了一个新的视角,同时也为治疗免疫力低下合并感染的患者提供了一种新的治疗手段,为以后的相关研究开辟了新的道路。

参 考 文 献

- Schleberger R, Senge T. Non-invasive treatment of long-bone pseudarthrosis by shock wave (ESWL). Arch Orthop Trauma Surg, 1992, 111: 224-232.
- Ogden JA, Alvarez R, Levitt R, et al. Shock wave therapy for chronic proximal plantar fasciitis. Clin Orthop, 2001, 387: 47-59.
- Yu JS. Pathological and postoperative conditions of the plantar fascia: A review of MR imaging appearances. Skeletal Radiol, 2000, 29: 491-501.
- Haupt G, Chvapil M. Effect of shock waves on the healing of partial-thickness wounds in piglets. J Surg Res, 1990, 49: 45-48.
- 鞠桂芝, 刘树铮, 齐进. 低剂量率低水平辐射对机体某些免疫功能的影响. 中华放射医学与防护杂志, 1989, 9: 8-11.
- 高美华, 王海燕, 邱世翠, 等. 氦-氖激光照射胃癌移植小鼠脾区对 IL-2 的活性的影响. 中华理疗杂志, 1995, 18: 10-12.

- 7 Steinbach P, Hofstadter F, Nicolai H, et al. In vitro investigations on cellular damage induced by high energy shock waves. *Ultrasound Med Biol*, 1992, 18: 691-699.
- 8 Kültz D, Burg M. Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J Exp Biol*, 1998, 201: 3015-3021.
- 9 Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S, et al. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and

MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J Biol Chem*, 1998, 273: 12378-12382.

- 10 于铁成, 郑学清, 徐莘香. 冲击波原理和生物学作用. *中华创伤骨科杂志*, 2003, 5: 247-250.

(修回日期: 2005-04-05)

(本文编辑: 熊芝兰)

· 短篇论著 ·

腰椎间盘突出症的综合康复

孙乐蓉 覃东 黄德兰 汪道明 倪小琦 李伟 张艾英

从 2001 至 2003 年, 我科对 76 例腰椎间盘突出症住院患者进行综合康复治疗, 同时给予相关健康教育, 收到明显效果, 现报道如下。

一、资料与方法

76 例腰椎间盘突出症住院患者随机分为治疗组和对照组。治疗组 40 例, 其中, 男 22 例, 女 18 例; 年龄 23 ~ 60 岁, 平均 39 岁; 病程 3 d ~ 4 年。全部病例经临床和 CT 确诊为腰椎间盘突出症。突出部位: L_{3-4} 突出 6 例; L_{4-5} 突出 14 例; $L_5 \sim S_1$ 突出 20 例。其中 2 个间歇突出者 16 例, 3 个间歇突出者 8 例。对照组 36 例, 其中, 男 21 例, 女 15 例; 年龄 23 ~ 67 岁, 平均 38.9 岁; 病程 1 周 ~ 6 年, 平均 4.3 年, 均经临床和 CT 确诊为腰椎间盘突出症。突出部位: L_{3-4} 突出 5 例; L_{4-5} 突出 12 例; $L_5 \sim S_1$ 突出 19 例。其中 2 个间歇突出者 12 例。

治疗组由接受康复医学专业学习的医师给予以下治疗。
(1) 综合康复: ①严格卧板床 1 周。②抗炎消水肿, 用 20% 甘露醇 200 ml 加地塞米松 5 mg 静脉滴注, 每分钟 100 滴输入, 每天 1 次, 连用 3 d, 随后改为七叶皂甙钠 20 mg, 每天 1 次, 连用 7 ~ 10 d。③骨盆牵引, 采用日本产电脑控制牵引治疗床, 患者取仰卧位, 胸部牵引带固定在肋下, 骨盆牵引带固定在髂嵴上方, 牵引力线与水平线成 20°。采用间歇式牵引处方, 牵引 30 s, 间歇 15 s, 残余力为牵引重量的 1/2, 牵引重量为体重的 30% ~ 50%。牵引时间为 30 min, 每天治疗 2 次, 10 d 为 1 个疗程。④腰部超短波治疗, 对置法, 间歇 2 cm, 温热量, 每次治疗 20 min, 每天 1 次, 10 d 为 1 个疗程。⑤温热式低周波治疗, 治疗频率为 250 ~ 500 Hz, 正电极放置在 $L_4 \sim S_1$ 区, 负电极放置于环跳穴、阳陵泉, 电流强度以患者耐受为宜, 治疗时间 20 min, 每天 1 次, 10 d 为 1 个疗程。
(2) 相关健康教育: ①发病 1 周内, 嘱患者严格卧硬板床, 体位以自感舒适为准, 每天适当给予 2 ~ 3 次的俯卧位, 每次 10 min; ②让患者观看腰椎间盘突出症的电视教育片, 以了解腰椎间盘突出症的发病机制、发展过程、正确与错误的姿势和体位; ③从第 2 周开始指导患者进行床上腰背肌主动训练(飞燕展翅、腰部运动操等), 每天 2 ~ 3 次。所有训练均在 PT 的指导下进行。14 d 为 1 个疗程。对照组不进行健康教育, 其余方法同治疗组。

自拟疗效评定标准: 显效——症状消失, 脊柱侧弯矫正, 直腿抬高同健侧, 恢复或基本恢复原工作; 有效——症状改善, 脊柱侧弯减轻, 直腿抬高较前进步, 可参加一般工作; 无效——症状和体征无明显进步。

二、结果

经过 2 周的治疗, 2 组取得满意疗效(表 1)。

表 1 治疗组与对照组疗效比较

分 组	例数	显效 (例, %)	有效 (例, %)	无效 (例, %)	总有效率 (%)
治疗组	40	30 (75.0) *	8 (20.0)	2 (5.0)	95
对照组	36	16 (44.5)	17 (47.2)	3 (8.3)	91

注: 经 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验, 与对照组比较, * $P < 0.05$

三、讨论

牵引可拉开椎间盘, 减轻机械压迫, 使椎间孔扩大并产生负压吸引作用^[1]。患者卧床 2 ~ 3 周, 有利于解除局部淤血及静脉回流受阻, 增加氧供, 促进康复。脱水药物及改善血液循环药物的应用, 可以改善由于椎间盘突出挤压的椎管内组织及神经根水肿, 使膨胀的水肿间盘组织内压降低, 神经根水肿消退, 解除或缓解了相互挤压的程度。腰部超短波和温热式低周波的选用可改善血液循环, 促进水肿吸收, 调整神经的兴奋和抑制过程, 促进新陈代谢, 解除肌痉挛。床上腰背肌主动训练可以增强腰背肌力量, 改善腰背肌协调性和柔韧性, 控制退变所致的腰椎失稳, 是预防复发的重要措施。

本研究结果显示, 综合康复治疗组显效率高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在本研究中我们强调整个健康教育过程都必须在 PT 的指导和监督下进行, 直到患者能熟练自如地进行, 并深刻领会其训练的重要意义, 同时重视预防。

参 考 文 献

- 1 潘之清, 主编. 实用脊柱病学. 济南: 山东科学技术出版社, 1998. 497.

(修回日期: 2004-12-26)

(本文编辑: 熊芝兰)