

艾灸與紫杉醇合併治療實驗性腫瘤 及其療效機制之探討

Studies on combined effects of moxibustion and taxol on experimental tumor and mechanism of their therapeutic effects

郝道猛

國立清華大學

摘要

本研究之目的在評估艾灸 (MT) 及紫杉醇 (Tx)，單獨及合併治療實驗性腫瘤，求得 MT 與 Tx 的最佳治癌療效，以供臨床治療癌症的參考。另外觀察腫瘤內供血量及病理組織的改變，並分析腫瘤內細胞在細胞週期內各期的比例，以探討 MT 及 Tx 單獨及合併治療腫瘤療效的機制。以充實灸法治癌的實驗性理論，期望對我國傳統醫學的學術水準提升有所貢獻。

本研究先將 S-180 肉瘤細胞接種在 ICR 小鼠的皮下。將此長有皮下腫瘤的小鼠予以分組，分別用 MT 及 Tx 單獨及合併處理。MT 分為 1、2、3 及 4 次，而 Tx 所用的劑量為 20、60 及 100 mg/kg 體重。合併的處理則以 3 次 MT 與 60 mg/kg 的 taxol 相合併。並在施灸時測量腫瘤內溫度分佈。處理後 120 天內，測定各組的平均存活時間，死亡率，腫瘤控制率及延長壽命的比率等項，以評估其療效。另外測量腫瘤內病理組織的改變；並用流量細胞分析儀測量腫瘤內各階段的細胞比例。另用放射性同位素 ^{86}Rb 為追蹤劑，測定腫瘤內血量的供應情形，藉以闡明艾灸及紫杉醇治療實驗性腫瘤產生療效的作用機制。

本研究結果顯示：腫瘤對照組在觀察 120 天內的平均存活時間 (MST_{120}) 為 60.2 天，其存活率 (SR_{120}) 為 33%；最佳療效的 MT 出現在三次 MT，其 MST_{120} 為 87.8 天，其 SR_{120} 為 56%。單獨 Tx 處理，以 60 mg/kg 體重之療效為最佳，其 MST_{120} 為 78.3 天，其 SR_{120} 為 16%。MT 與 Tx 合併處理的療效最佳，其 SR_{120} 為 50%，其 MST_{120} 為 88.9 天。但與 MT 相比，其 MST_{120} 僅增長 1.1 天。但其存活率卻降低 6%。由病理切片顯示：艾灸次數多者對腫瘤的破壞較 MT 少者為大。而經 Tx 處理者會產生許多多核

細胞 (polynucleated cells)。亦產生較多的 G₂/M 期細胞。經用 ⁸⁶Rb 為追蹤劑測得腫瘤內的血供量，以接受 MT 處理者，均顯著降低。

關鍵詞：艾灸，紫杉醇，腫瘤，療效，機制。

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the therapeutic effects of some methods on the experimental tumor. Sarcoma 180 cells (1×10^7) were transplanted into the subcutaneous tissue in breast area of female ICR mice. Mice bearing tumor were grouped and treated with taxol or/and moxibustion (MT) respectively. The total dose of taxol used were 20, 60 and 100 mg/kg body weight. MT was used for 1, 2, 3 and 4 times respectively. The longest mean survival time within 120 days (MST₁₂₀) in the following conditions treated with taxol or/and MT appeared in the groups of 60 mg/kg taxol, MT for 3 times respectively. Combination for taxol and MT of the other modalities were also studied. The longest MST₁₂₀ appeared in the group treated with the combination of 60 mg/kg taxol and MT₃ (MR₁₂₀ = 50% ; TCR₁₂₀ = 55% ; MST₁₂₀ = 88.9 ± 37.8 days ; ILS₁₂₀ = 47.7). Pathological observations revealed that taxol, MT alone or combinedly destroyed tumor cells. The results also showed that the uptake of ⁸⁶Rb in tumor treated with MT were significant lesser than that in tumor control. The results of analysis with flow cytometry showed that taxol could increase the cell population in G₂/M phase of the cell cycle. The therapeutic effects in the present results may be used as references for clinical therapy. The results in mechanism of this study may be contribute to the academic progress in our traditional medicine.

壹、前言

自民國 71 年以來，在我國台灣地區，癌症已成為十大死亡原因的首位 (1)，治療癌症的方法，以外科手術、化學療法及放射線療法為主。然而療效並不理想，因此國內外有很多研究在改進舊法及開發新方法。高溫療法 (Hyperthermia) 是一種在開發中新的治癌方法，包括全身性及局部性的高溫療法，在國外研究高溫療法中，以微波及射頻為主 (2, 3)，在國內的研究則有熱針及艾灸的報告 (4, 5)。艾灸是一種簡而易行的局部性高溫療法。

其實，艾灸是我國傳統醫學的療法。遠在二千多年前，在孟子離婁篇中記載：“七年之病，求三年之艾”（6）。亦用艾灸治癌腫瘤的記載，如在瘍醫大全中，曾有“凡治癰疽病毒泡注及一切無名腫毒，用陳艾桂灸之”（7）。在國內亦有多篇關於艾灸治癌的報告（8-10），然而單獨用灸治癌的療效有限，若將之與其他方法合併治療可能提高其療效，值得加以研究。

紫杉醇（Taxol）是由太平洋紫杉醇的樹皮及業內提煉出來的一種抗癌藥（11），且有很好的抗癌效果（12-18），最近美國食品藥物管理局（FDA）已批准用此藥治療癌症。若將之與艾灸合併治療，可能會增加其治癌療效，值得加以研究。以往曾有人用艾灸單獨或與輻射合併治癌（8-10, 13），有時用病理切片研究其療效之機制。本研究除了用病理切片探討其療效之機制，另外用放射性同位素 ^{86}Rb 為追蹤劑，用 γ -計數系統測定腫瘤內供血量，是否會因艾灸及紫杉醇的處理而有所改變。並且另用流式細胞分析儀，在艾灸及紫杉醇處理後，分析腫瘤細胞在細胞週期內各階段的比例（20），藉以探討艾灸及紫杉醇單獨及合併治癌產生療效的作用機制，以充實灸法治癌的實驗性理論，及發揚我國傳統的針灸醫學。

貳、材料與方法

一、腫瘤接種：

將長有腹水癌細胞的鰐鼠，以頸椎脫臼方式犧牲，取出腹水。經均勻震盪後，與 0.4% trypan blue 等量稀釋並染色，以血球計數器計數，用顯微鏡檢視，測定每毫升所含腹水癌活細胞數目。再以 1×10^7 個活腹水癌細胞，接種於鰐鼠胸部左側第二乳頭旁的皮下，待 7-10 天，俟其腫瘤體積大小長至 0.31~0.36 cm 時，將荷有腫瘤的鰐鼠予以隨機分組，進行處理。

二、分組及處理：

所有實驗動物，除了腫瘤對照組外，其餘諸組為實驗組，分別接受單獨的艾條灸及紫杉醇和合併處理。

（一）艾灸（MT）的處理

將已荷負腫瘤之鼠固定在網架上，腹面朝上，在腫瘤上插入五 5 隻測溫探針（YSI Co.），其分配位置如圖 1。治療時每隔 2 分鐘記錄溫度一次。共記錄 16 分鐘，其溫度分佈如圖 2。接受 MT 治療者共分為四組，其治療過程如圖 3。以雀啄法方式移動艾條，以距離調節溫度，以使 TC_7 處之溫度維持 43 至 45°C，每次艾灸治療時間為 10 分鐘。

（二）紫杉醇（Tx）處理

本研究所用的 Tx，乃購自 Sigma (U.S.A.)。先將 Tx 溶於 50% (V/V) 的

蓖麻油 (cremophor EL, Sigma) 與 50% (V/V) 的無水酒精，用超音波振盪 30 min。配成 30 mg/ml 的濃度為保存液，貯於冷凍庫中備用。

將保存液解凍，用生理鹽水稀釋至所需之濃度。於分組後之第 1, 2 及 3 天每隻鼠分別注射 (i.p.) Tx 的稀釋液，使每隻鼠之總劑量分別為 20, 60 及 100 mg/kg 體重。

三、測定項目：

1. 腫瘤大小：

在 120 天的觀察中，每 10 天記錄老數的腫瘤體積，利用游標尺測得。腫瘤體積計算，乃根據 Oda 公式 $V(\text{cm}^3) = a \times b \times c \times \pi / 6$ ；a, b, c 分別表腫瘤的長軸，短軸及厚度 (10)。

2. 療效評估：

經由 120 天的觀察，每天記錄老鼠的死亡情形。計算各組老鼠的平均存活時間，存活率，死亡率及腫瘤控制率，以檢視艾灸與 Tx 單獨及合併的治療效果。

3. 腫瘤內 ^{86}Rb 的放射活性：

測量腫瘤內 ^{86}Rb 的放射活性，以推測腫瘤內供血量的大小。本研究取 25 mg RbCl

(Sigma)，以垂直管位置放入清華大學開放式反應器 (THOR, open reactor, 1 MW)，其中子通率為 $10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{S}^{-1}$ ，經 24 小時，此時 ^{86}Rb 的比活性為 0.25 mCi/mg。照射後之 RbCl 經冷卻一週後，溶於 20 ml 的生理食鹽水 (注射用) 以備用。

當皮下腫瘤經用最後一次的艾灸或 Tx 的處理後，在一小時內，自白鼠之尾靜脈徐徐注入 0.2 ml 之 $^{86}\text{RbCl}$ (內含 $43.8 \mu\text{Ci}$)，然後分別經過 1, 5 及 24 小時，用斷頸椎骨法犧牲動物，切下腫瘤及尾部裝入康氏管，直接用自動 γ 計數系統 (Auto- γ Counting System, Model 5002, Packard)，計數 ^{86}Rb 在組織中的活性 (cpm) (20)。然後將所測過之組織放入烘箱 ($90-100^\circ\text{C}$) 過夜，使之烘乾。稱此乾重，算出每克 (乾重) 組織的放射活性，並除以原來注入 0.2 ml 之 ^{86}Rb 活性，即為該組織中單位重量所含 ^{86}Rb 活性的百分數 (%/g 乾重)。

4. 細胞週期

本研究採用流式細胞術 (21) 測定細胞週期內各階段細胞的百分比。為了方便探討 CET 與 LET 對於腫瘤細胞的影響，我們採用腹水癌模式。將 1×10^7 個腫瘤-180 細胞接種到小鼠的腹腔，四天後再以 CET

或 LET 處理，處理之後，將 2 ml 之 PBS 注入小鼠腹腔，再以頸椎脫臼法將動物犧牲，取出腹水癌細胞。將 2×10^6 個細胞置於試管中，並加入 3 ml PBS 清洗二次 (2000 rpm, 5 min)，然後以 4°C 之 70% 酒精固定液固定至少 24 小時，固定的細胞經離心沉澱 (2000 rpm, 5 min) 再加入 1 ml RNase 酵素液 (1 mg/ml)，在 37°C 的水浴 30 分鐘，細胞懸浮液再經離心沉澱 (2000 rpm, 5 min) 後，在 4°C 黑暗中以 1 ml propidium iodide ($10 \mu\text{g/ml}$) 染色 30 分鐘。 1×10^4 個細胞之個別 DNA 含量信號，經由 FACScan 流式細胞儀 (Becton-Dickson) 的 CellQuest™ 軟體收集，並以 Modfit for Mac 程式分析，求出各組細胞在細胞週期內各期 (G_1 , S 及 G_2/M) 的百分比。

5. 組織病理切片

於艾灸或及紫杉醇最後一次處理的次日，取下腫瘤，經過固定、包埋及切片後，將黏妥在載玻片上之切片，用 H&E 方法染色後，用顯微鏡觀察及照相。

四、統計分析

本研究採用 Student 氏 t-test，測定實驗組與實驗對照組之間數據差異的顯著性。用*： $P < 0.05$ ；**： $P < 0.01$ ，分別表示其間差異顯著性的程度為顯著及很顯著。

參、結果

一、療效評估

(一) 單獨的艾灸處理：

在艾灸處理後，腫瘤的表面結痂，不易測出腫瘤的實際大小，經過 20 幾天後痂脫掉。分別在灸後 40, 60, 80, 100 及 120 天，測量每組腫瘤之大小，求得平均值及標準機差，製成表 1。另外在觀察 120 天內記錄每組動物的死亡隻數，求出存活率 (SR_{120}) 製成圖 4，以表示各組的存活曲線。另外根據各組動物的腫瘤控制數及死亡時間，求出腫瘤控制率 (TCR_{120})，平均存活時間 (MST_{120}) 及延長壽命的百分比 (ILS_{120})。分別列於表 2。結果顯示：腫瘤對照組 MR_{120} 為 96.7%； TCR_{120} 為 3.3； MST 為 60.2 天。在治療組中以 MT 三次的療效最佳，其 MR_{120} 為 44%； TCR_{120} 為 56%； MST_{120} 為 87.8，其 ILS_{120} 為 45.8%。

(二) 單獨的紫杉醇處理：

在經過紫杉醇 (Tx) 治療後的 120 天內，仿上法將各組的腫瘤體積的平均值及其標準差製成表 3。並求出各組的 SR_{120} 製成圖 5，並用表 4 以表示各組的療效。結果顯示：以 60 mg/kg 的 Tx 治療的效果最佳，其 MR_{120} 為 84%； TCR_{120} 為 20%； MST_{120} 為 78.3 天；其 ILS_{120} 為 30.1%。

(三) 艾灸與紫杉醇合併處理：

經過 MT₃ 與 Tx 合併處理後，仿上法製成表 5 以表示各組腫瘤的平均體積的變化。以圖 6 示各組的存活曲線，以表 6 顯示各實驗組的療效。結果顯示：MT₃ 與 Tx 合併治療的效果最佳，其 MR₁₂₀ 為 50%；TCR₁₂₀ 為 55%；MST₁₂₀ 為 88.9 天；其 ILS₁₂₀ 為 47.7%。

二、機制探討

(一) 腫瘤內 ⁸⁶Rb 的放射活性：

先將所測量之各組腫瘤內 ⁸⁶Rb 的放射活性 (cpm) 的平均值及標準差列於表 7，並將各組腫瘤的乾重列於表 7。然後求出各組腫瘤組織內單位乾重所含 ⁸⁶Rb 放射性的百分數 (%/g 乾重) 亦列於表 7。本研究結果顯示：經用艾條灸 2, 3 及 4 次處理後，經過 5 及 24 小時，在腫瘤內所含 ⁸⁶Rb 之放射活性，均較腫瘤對照組者顯著降低 (表 7)。另將有關 MT 與 Tx 合併處理的數據仿上法製成表 8。顯示：單獨的 Tx 不能降低 ⁸⁶Rb 的放射活性，但與 MT₃ 合併者則能顯著降低其活性。

(二) 細胞週期：

經用流體細胞術分析所得之結果，獲知僅用 MT 處理對腫瘤內細胞週期影響不大 (表 9)。但經用 Tx 處理者。就會產生較多 G₂/M 期的細胞 (表 10)。

(三) 組織病理切片：

經用 Tx 處理之動物，其腫瘤內之細胞會出現一些微核，其數目乃隨 Tx 的濃度而增多。用 MT 單獨或與 Tx 合併處理者卻無微核出現，但卻引起壞死，其壞死的程度，卻隨著 MT 次數增加而加大 (圖 7)，亦隨著與 Tx 的合併，而增加其壞死程度 (圖 8)。

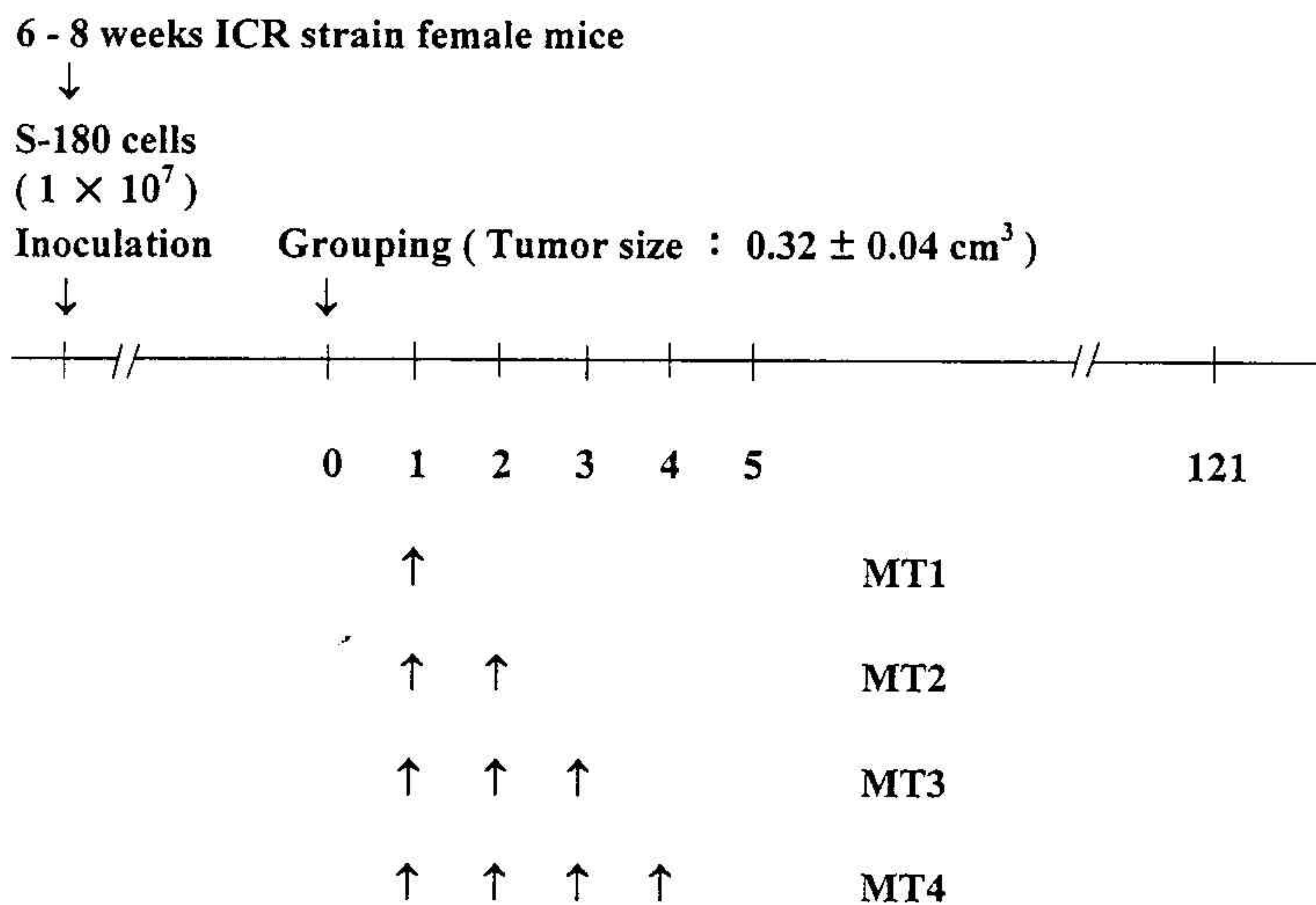


Fig. 1. Grouping and treatment of moxibustion (MT).

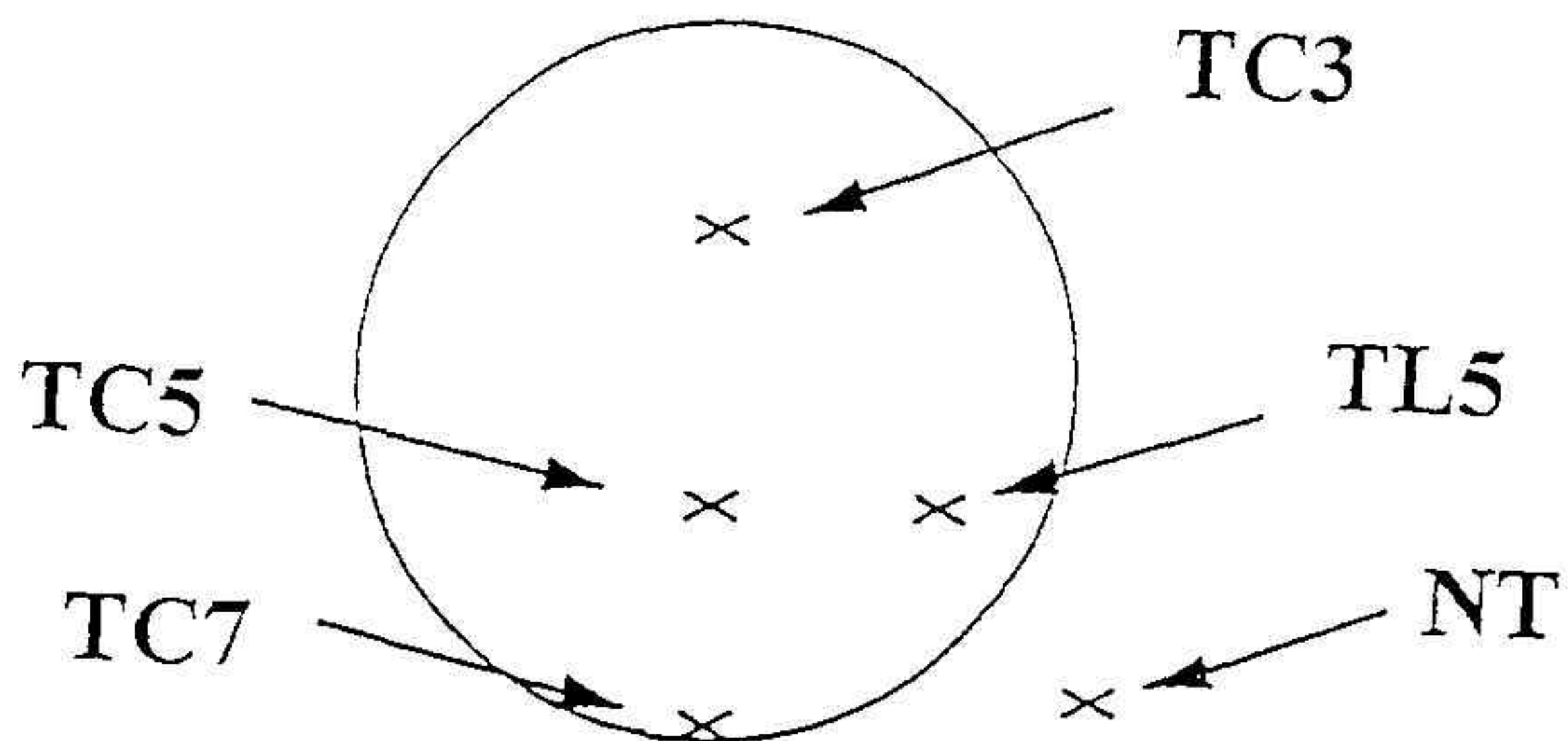


Fig. 2. The position of the thermometer probes in tumor. TC3, TC5 and TC7 were at the central depths of 3, 5 and 7 mm in the tumor, respectively. TL5 was at a depth of 5 mm in the lateral part of the tumor. NT was in the normal tissue.

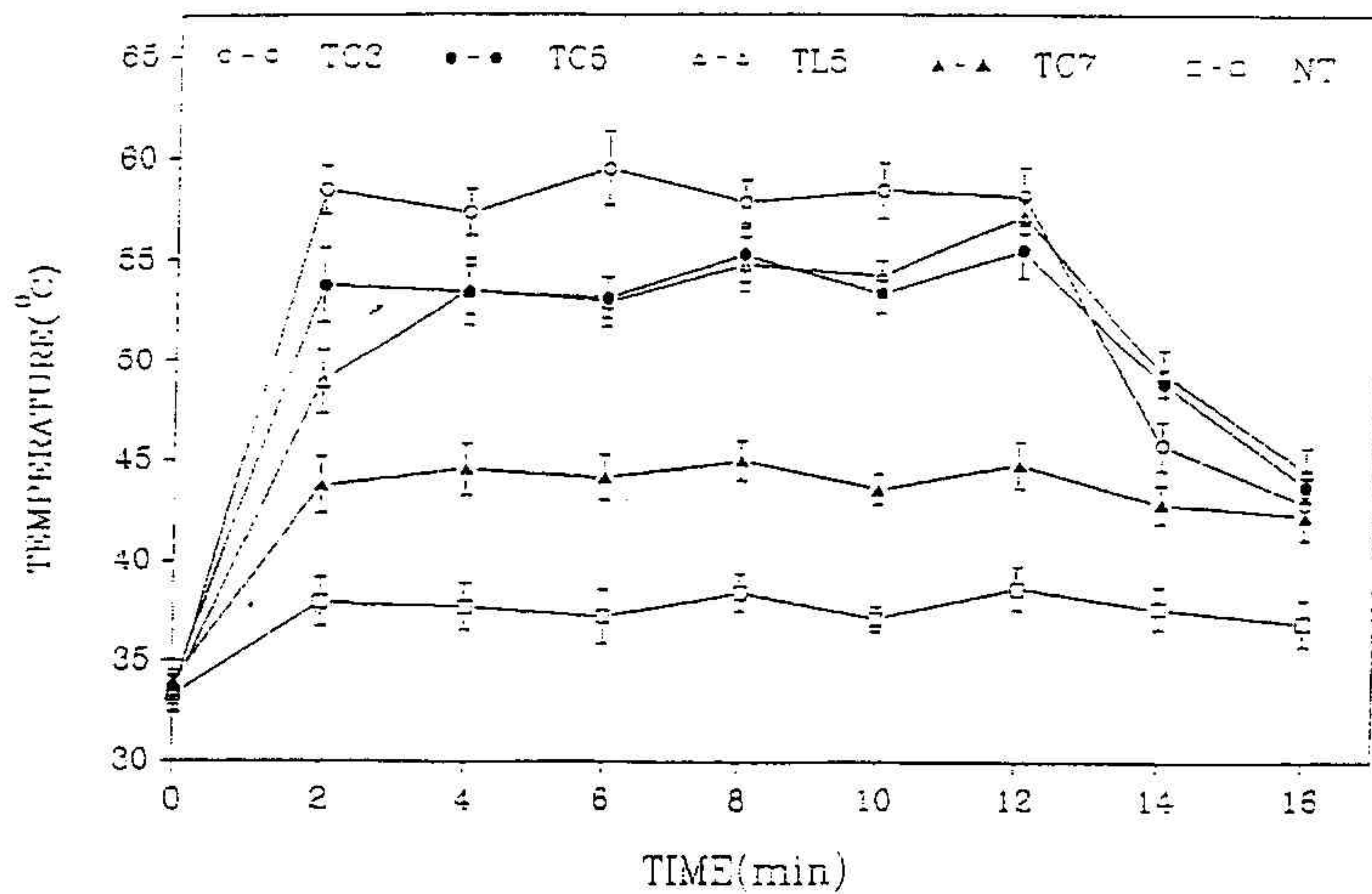


Fig. 3. Changes of temperature in experimental tumor during treatment of stick moxibustion. Abbreviations and designations are the same as those in Fig. 2.

Table 1. Changes in tumor volume (cm³) of mice after treatments of moxibustion (MT).

Treated condition		Days after beginning of treatment							
Mode	Fraction	0	10	20	40	60	80	100	120
TC		0.32 ±0.09 (30)	0.44 ±0.18 (30)	0.72 ±0.29 (29)	1.53 ±0.47 (24)	1.93 ±0.65 (16)	1.88 ±0.63 (8)	(ND) (1)	(ND) (1)
MT	1	0.31 ±0.12 (25)	---- ---- (24)	---- ---- (24)	0.83** ±0.39 (20)	0.87** ±0.39 (11)	0.43** ±0.38 (8)	(ND) (6)	(ND) (6)
MT	2	0.34 ±0.13 (25)	---- ---- (23)	---- ---- (23)	0.27** ±0.11 (21)	0.25** ±0.23 (13)	0.91** ±0.10 (12)	(ND) (8)	(ND) (8)
MT	3	0.29 ±0.10 (25)	---- ---- (22)	---- ---- (21)	0.28** ±0.13 (20)	0.42** ±0.15 (17)	0.28** ±0.12 (16)	0.17 ±0.07 (15)	(ND) (14)
MT	4	0.32 ±0.14 (25)	---- ---- (20)	---- ---- (20)	0.27** ±0.11 (19)	0.14** ±0.13 (18)	(ND) (16)	(ND) (16)	(ND) (16)

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ (Student's t-test, compared with TC)

() : Number of mice alive ; ND : Not detectable ; ---- : Scar

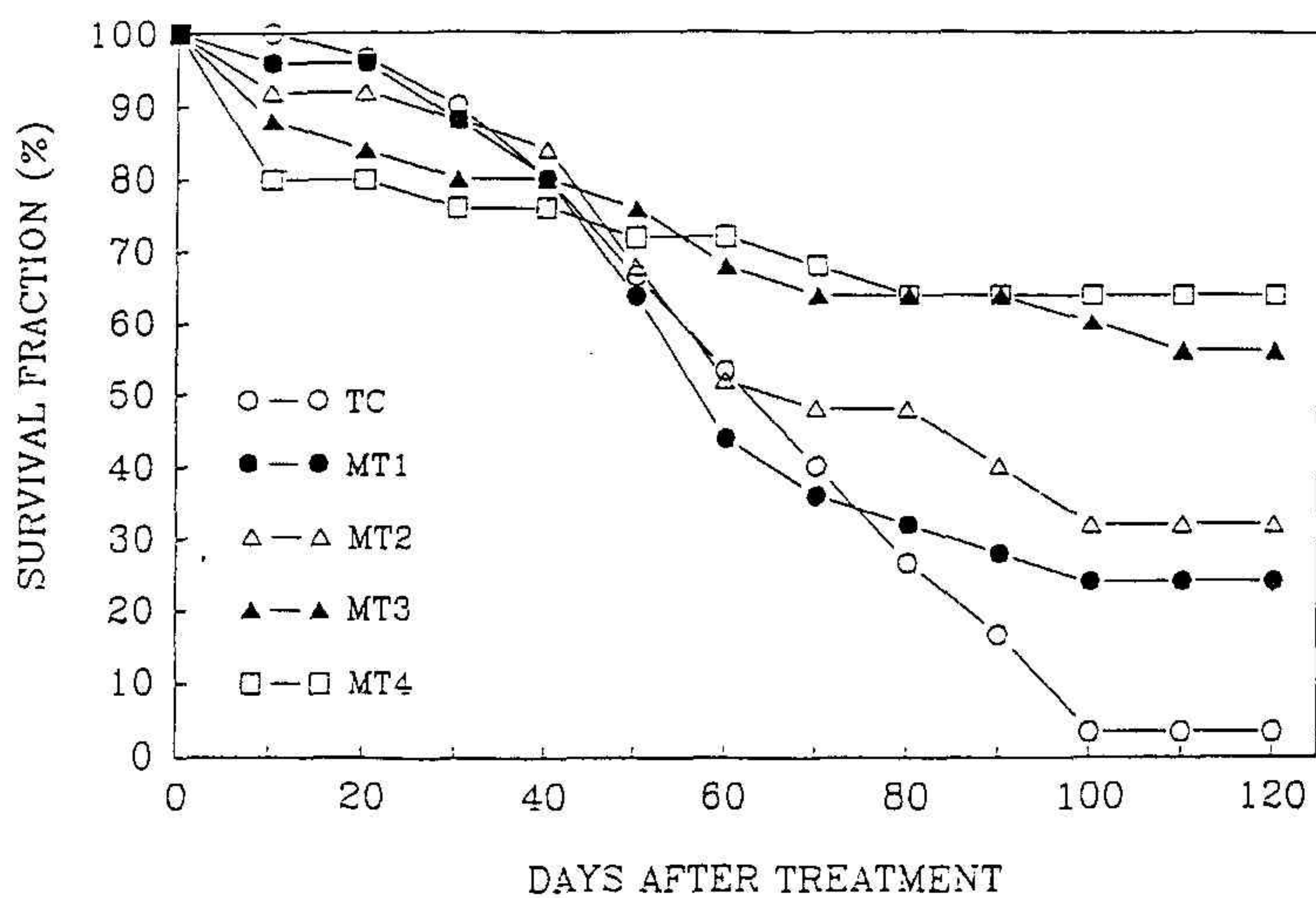


Fig. 4. Survival fraction of mice bearing experimental tumor after treatments of moxibustion (MT).

Table 2. Therapeutic effects of moxibustion on mice bearing experimental tumor.

Treated condition	No. of mice	MR ₁₂₀ (%)	TCR ₁₂₀ (%)	MST ₁₂₀ days	ILS ₁₂₀ (%)
Mode Fraction					
TC	30	96.7	3.3	60.2±23.9	0
MT 1	25	76.0	24.0	67.1±33.8	11.5
MT 2	25	68.0	32.0	72.3±36.8	20.1
MT 3	25	44.0	56.0	87.8±43.1**	45.8
MT 4	25	36.0	68.0	84.7±41.7*	40.7

* : P < 0.05 ; ** : P < 0.01 (Student's t-test, compared with TC)

MR₁₂₀ : Mortality rate within 120 days after treatment.

TCR₁₂₀ : Tumor control rate within 120 days after treatment.

MST₁₂₀ : Mean survival time within 120 days after treatment.

ILS₁₂₀ : Increasing lifespan within 120 days after treatment.

Table 3. Changes in tumor volume (cm³) of mice after treatments of taxol.

Treated condition		Days after beginning of treatment							
Mode	Fraction	0	10	20	40	60	80	100	120
TC		0.32 ±0.09 (30)	0.44 ±0.18 (30)	0.72 ±0.29 (29)	1.53 ±0.47 (24)	1.93 ±0.65 (16)	1.88 ±0.63 (8)	(ND) (1)	(ND) (1)
20 mg taxol	3	0.36 ±0.11 (25)	0.47 ±0.15 (25)	0.81 ±0.24 (24)	1.62 ±0.53 (21)	1.98 ±0.71 (17)	1.95 ±0.75 (7)	(0)	(0)
60 mg taxol	3	0.34 ±0.13 (25)	0.35 ±0.17 (23)	0.48** ±0.22 (22)	0.97** ±0.34 (21)	1.64 ±0.78 (19)	1.66 ±0.64 (14)	1.01 ±0.72 (8)	(ND) (4)
100 mg taxol	3	0.31 ±0.12 (25)	0.33* ±0.11 (21)	0.41** ±0.20 (19)	0.89** ±0.31 (18)	1.49 ±0.71 (17)	1.66 ±1.01 (13)	0.54 ±0.49 (8)	(ND) (6)

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ (Student's t-test, compared with TC)

() : Number of mice alive ; ND : Not detectable ; TC : Tumor control.

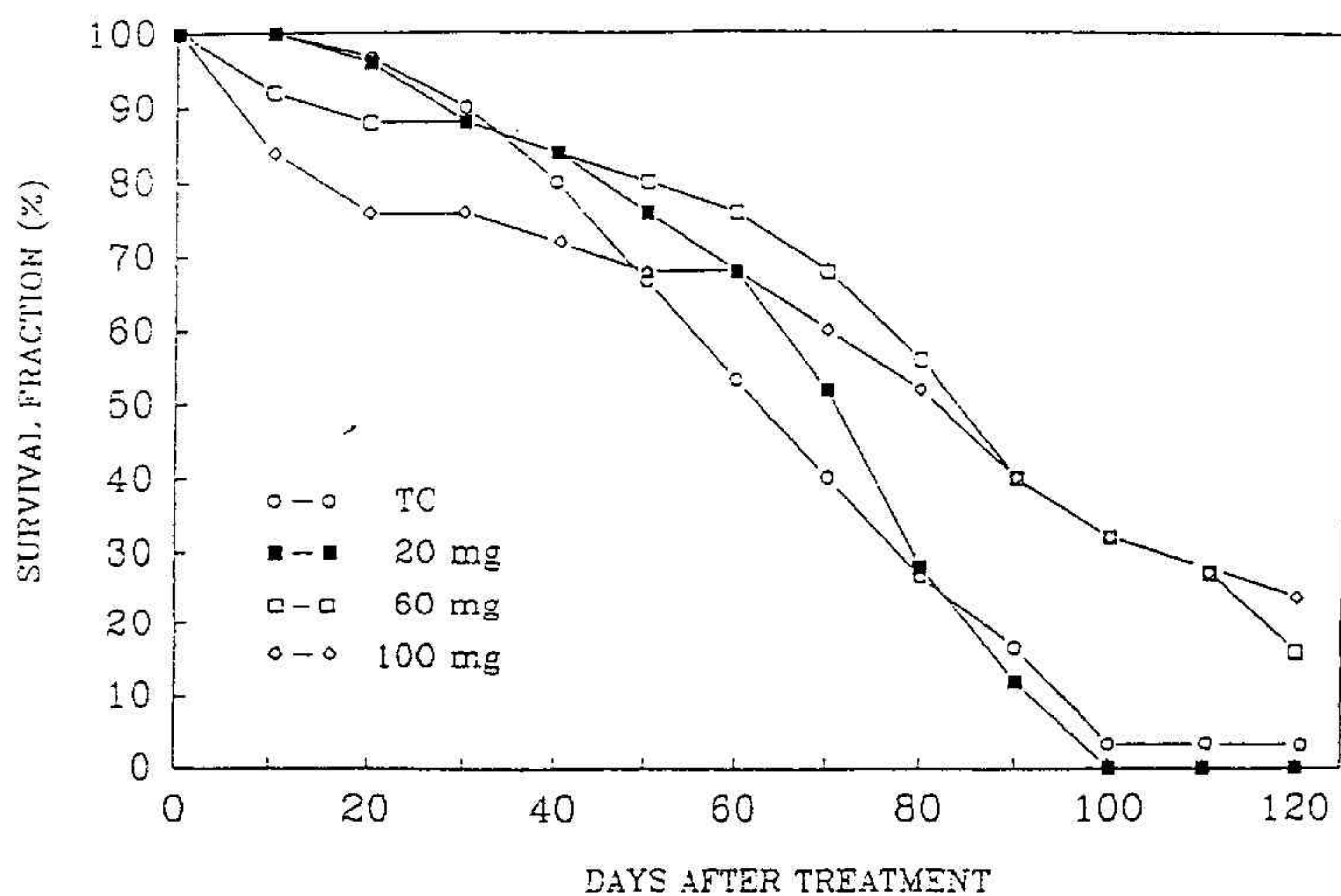


Fig. 5. Survival fraction of mice bearing experimental tumor after treatments of taxol.

Table 4. Therapeutic effects of taxol on mice bearing experimental tumor.

Treated condition	No. of	MR ₁₂₀	TCR ₁₂₀	MST ₁₂₀	ILS ₁₂₀
Mode Fraction	mice	(%)	(%)	days	(%)
TC	30	96.7	3.3	60.2±23.9	0
20 mg taxol 3	25	100.0	0.0	56.1±18.3	-6.8
60 mg taxol 3	25	84.0	20.0	78.3±29.8*	30.1
100 mg taxol 3	25	76.0	24.0	73.6±30.2	22.3

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ (Student's t-test, compared with TC)

MR₁₂₀ : Mortality rate within 120 days after treatment.

TCR₁₂₀ : Tumor control rate within 120 days after treatment.

MST₁₂₀ : Mean survival time within 120 days after treatment.

ILS₁₂₀ : Increasing lifespan within 120 days after treatment.

Table 5. Changes in tumor volume (cm³) of mice after treatments of 60 mg/kg taxol in combination with MT3.

Treated condition		Days after beginning of treatment							
Mode	Fraction	0	10	20	40	60	80	100	120
TC		0.32 ±0.09 (30)	0.44 ±0.18 (30)	0.72 ±0.29 (29)	1.53 ±0.47 (24)	1.93 ±0.65 (16)	1.88 ±0.63 (8)	(ND) (1)	(ND) (1)
60 mg Taxol	3	0.34 ±0.13 (25)	0.35 ±0.17 (23)	0.48** ±0.22 (22)	0.97** ±0.34 (21)	1.64 ±0.78 (19)	1.66 ±0.64 (14)	1.01 ±0.72 (8)	(ND) (4)
MT	3	0.29 ±0.10 (25)	---- ---- (22)	---- ---- (21)	0.28** ±0.13 (20)	0.42** ±0.15 (17)	0.28** ±0.12 (16)	0.17 ±0.07 (15)	(ND) (14)
60 mg Taxol +	3	0.33 ±0.12 (20)	---- ---- (19)	---- ---- (18)	0.31** ±0.15 (16)	0.39** ±0.17 (15)	0.13** ±0.10 (12)	0.08 ±0.17 (11)	(ND) (10)
MT	3								

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ (Student's t-test, compared with TC)

() : Number of mice alive ; ND : Not detectable ; ---- : Scar

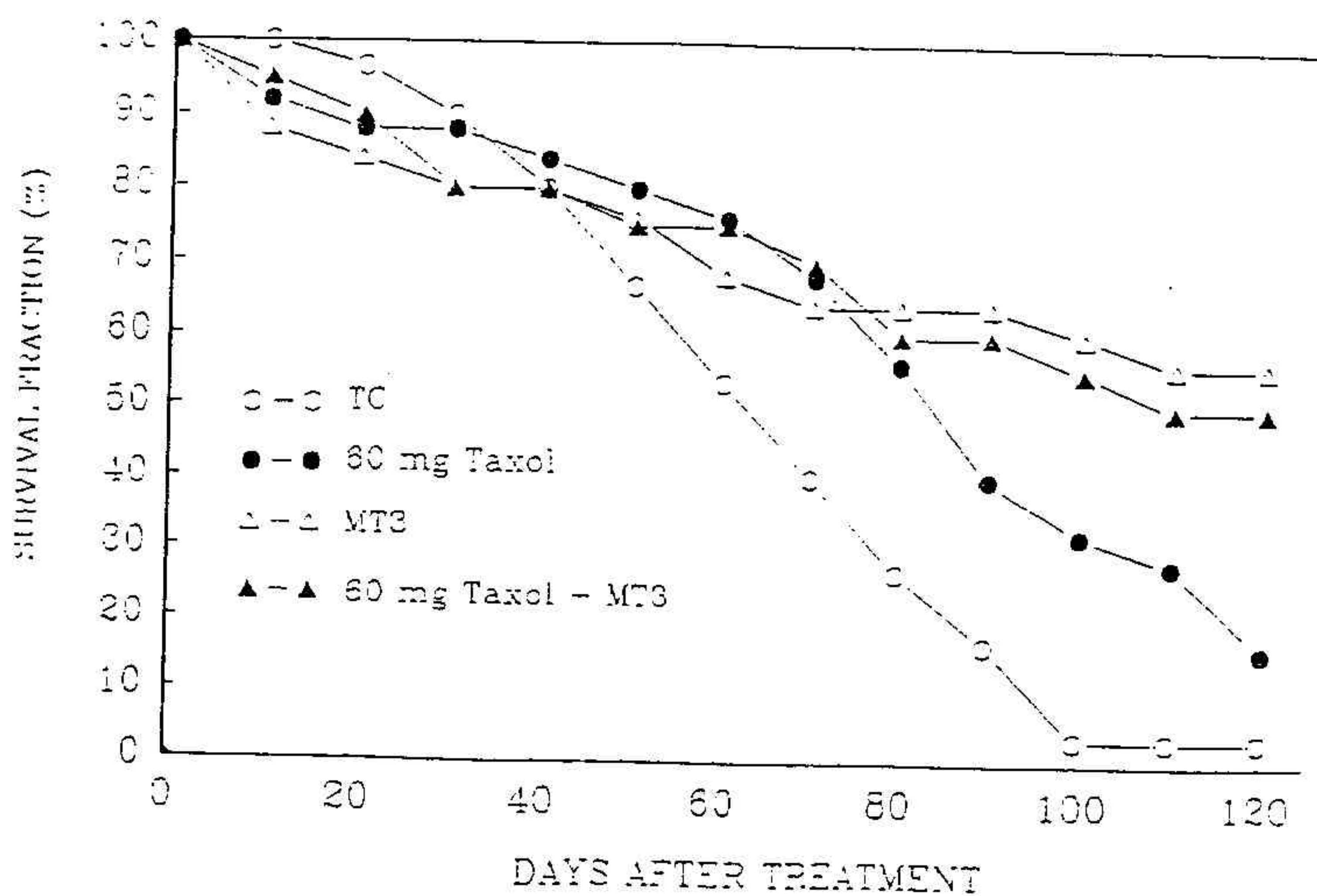


Fig. 6. Survival fraction of mice bearing experimental tumor during treatment of 60 mg/kg taxol in combination with MT3.

Table 6. Therapeutic effects of 60 mg/kg taxol in combination with MT3 on mice bearing experimental tumor.

Treated condition	No. of	MR ₁₂₀	TCR ₁₂₀	MST ₁₂₀	ILS ₁₂₀
Mode Fraction	mice	(%)	(%)	days	(%)
TC	30	96.7	3.3	60.2±23.9	0.0
60 mg taxol 3	25	84.0	20.0	78.3±29.8*	30.1
MT 3	25	44.0	56.0	87.8±43.1**	45.8
60 mg taxol 3	20	50.0	55.0	88.9±37.8**	47.7
+ MT 3					

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ (Student's t-test, compared with TC)

MR₁₂₀ : Mortality rate within 120 days after treatment.

TCR₁₂₀ : Tumor control rate within 120 days after treatment.

MST₁₂₀ : Mean survival time within 120 days after treatment.

ILS₁₂₀ : Increasing lifespan within 120 days after treatment.

Table 7. Change of ^{86}Rb activity and uptake in tumor of mice after MT treatment

Item tested	Treated condition		Hours after treatment		
	Mode	Fraction	1	5	24
^{86}Rb activity (cpm)	Tumor control		2030±905	2739±1395	4101±2034
	MT ₂	2	417±211**	157±71**	326±171**
	MT ₃	3	262±95**	267±101**	238±124**
	MT ₄	4	578±227**	425±230**	368±244**
Tumor dry weight (gm)	Tumor control		0.551±0.233	0.373±0.123	0.685±0.210
	MT ₂	2	0.258±0.017*	0.212±0.018	0.227±0.021*
	MT ₃	3	0.232±0.062*	0.160±0.025*	0.162±0.038*
	MT ₄	4	0.263±0.091*	0.214±0.036	0.209±0.097*
^{86}Rb uptake (% of ^{86}Rb /gm)	Tumor control		2.26±0.58	5.07±2.28	4.22±1.26
	MT ₂	2	0.85±0.37*	0.39±0.14**	0.76±0.33**
	MT ₃	3	0.66±0.33*	0.94±0.51**	0.77±0.36**
	MT ₄	4	1.20±0.44	1.03±0.41**	0.88±0.34**

MT : Moxibustion ; TC : Tumor control.

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ (Student's t-test, compared with tumor control).

Table 8. Change of ^{86}Rb activity and uptake in tumor of mice after moxibustion and taxol treatment.

Item tested	Treated condition		Hours after treatment		
	Mode	Fraction	1	5	24
^{86}Rb activity (cpm)	Tumor control		2030±905	2739±1395	4101±2034
	MT ₃	3	262±95*	267±101*	238±124*
	Tx	3	1290±241	2133±963	1992±996
	MT ₃ + Tx	3/3	508±118*	414±149*	930±417*
Tumor dry weight (gm)	Tumor control		0.551±0.233	0.373±0.123	0.685±0.210
	MT ₃	3	0.232±0.062	0.160±0.025*	0.162±0.038**
	Tx	3	0.353±0.067	0.321±0.104	0.300±0.031*
	MT ₃ + Tx	3/3	0.323±0.106	0.363±0.050	0.297±0.071*
^{86}Rb uptake (% of ^{86}Rb /gm)	Tumor control		2.26±0.58	5.07±2.28	4.22±1.26
	MT ₃	3	0.66±0.33*	0.94±0.51*	0.77±0.36**
	Tx	3	3.64±0.37	6.59±1.26	6.80±4.00
	MT ₃ + Tx	3/3	1.22±0.16*	1.20±0.60*	2.04±1.42*

MT : Moxibustion ; Tx : 60 mg/kg of taxol.

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ (Student's t-test, compared with tumor control).

Table 9. Effects of moxibustion (MT) on cell phase distribution in the cell cycle of ascitic sarcoma-180 cells tested 24 h after treatment.

Treated condition		Cell phase in cell cycle (%)		
Mode	Fraction	G1	S	G2/M
TC		57.52 ± 22.03	31.68 ± 16.43	10.92 ± 6.33
MT ₂	2	60.73 ± 18.40	29.02 ± 15.91	10.11 ± 2.60
MT ₃	3	54.25 ± 17.85	31.01 ± 16.57	14.37 ± 5.35
MT ₄	4	54.22 ± 22.83	33.49 ± 19.33	12.18 ± 4.07

* : P < 0.05 (Student's t-test, compared with tumor control),
TC :Tumor control.

Table 10. Effects of moxibustion (MT) and taxol (Tx) on cell phase distribution in the cell cycle of ascitic sarcoma-180 cells tested 24 h after treatment.

Treated condition		Cell phase in cell cycle (%)		
Mode	Fraction	G1	S	G2/M
TC		57.52±22.03	31.68±16.43	10.92±6.33
MT ₃	3	54.25±17.85	31.01±16.57	14.37±5.35
Tx(60 mg/kg)	3	38.27± 6.41	45.61± 5.51	16.24±2.70*
MT ₃ +Tx	3	54.88±18.81	35.84±15.76	9.20±3.02

* : P < 0.05 (Student's t-test, compared with tumor control),
TC :Tumor control.

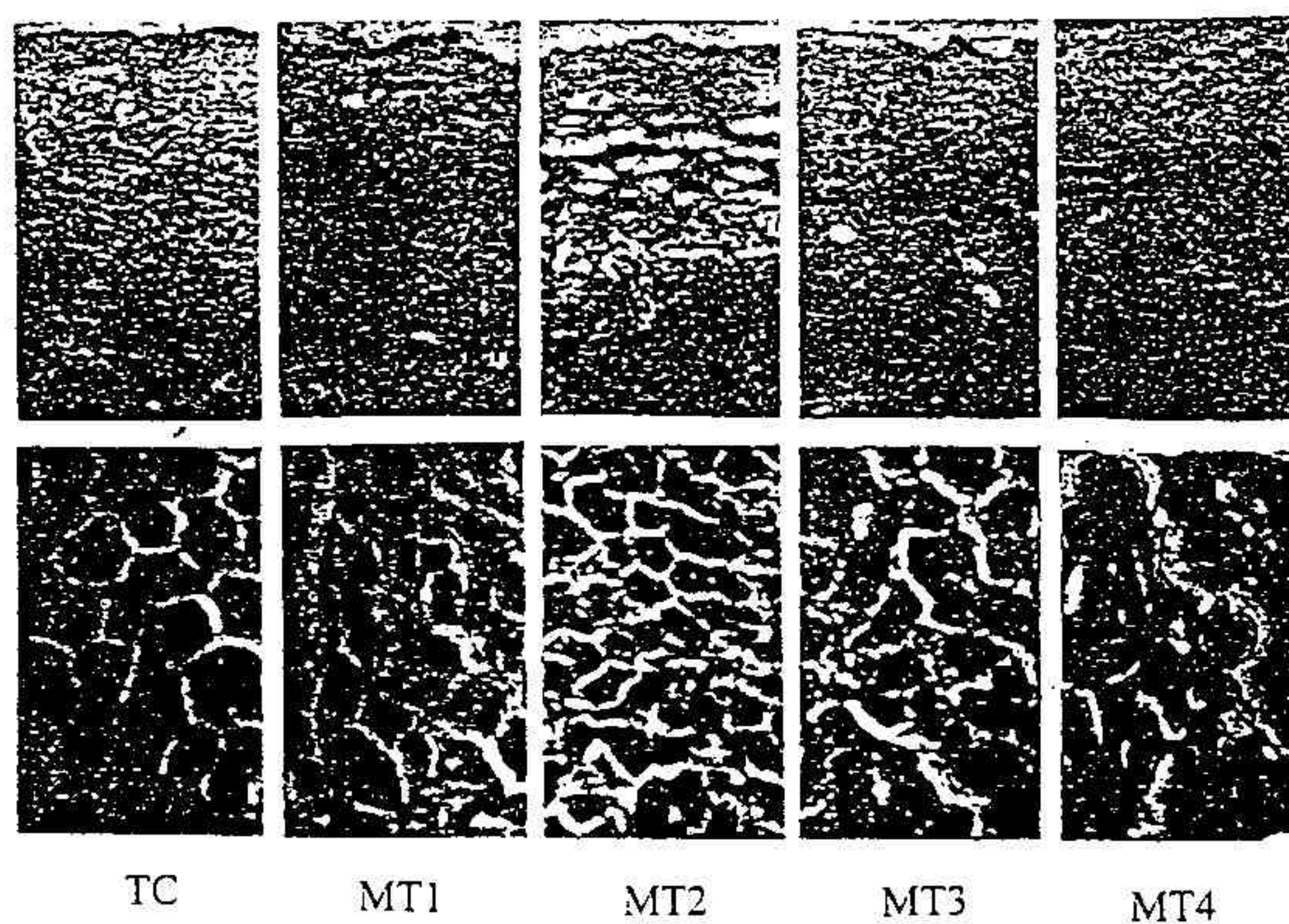


Fig. 7. Pathological changes after treatments of moxibustion (MT).
TC : Tumor control ; the others were treated with 1, 2, 3 and 4 times of moxibustion. The photograph in the upper row was magnified by 60 x ; the photograph in the lower row was magnified by 1000 x.

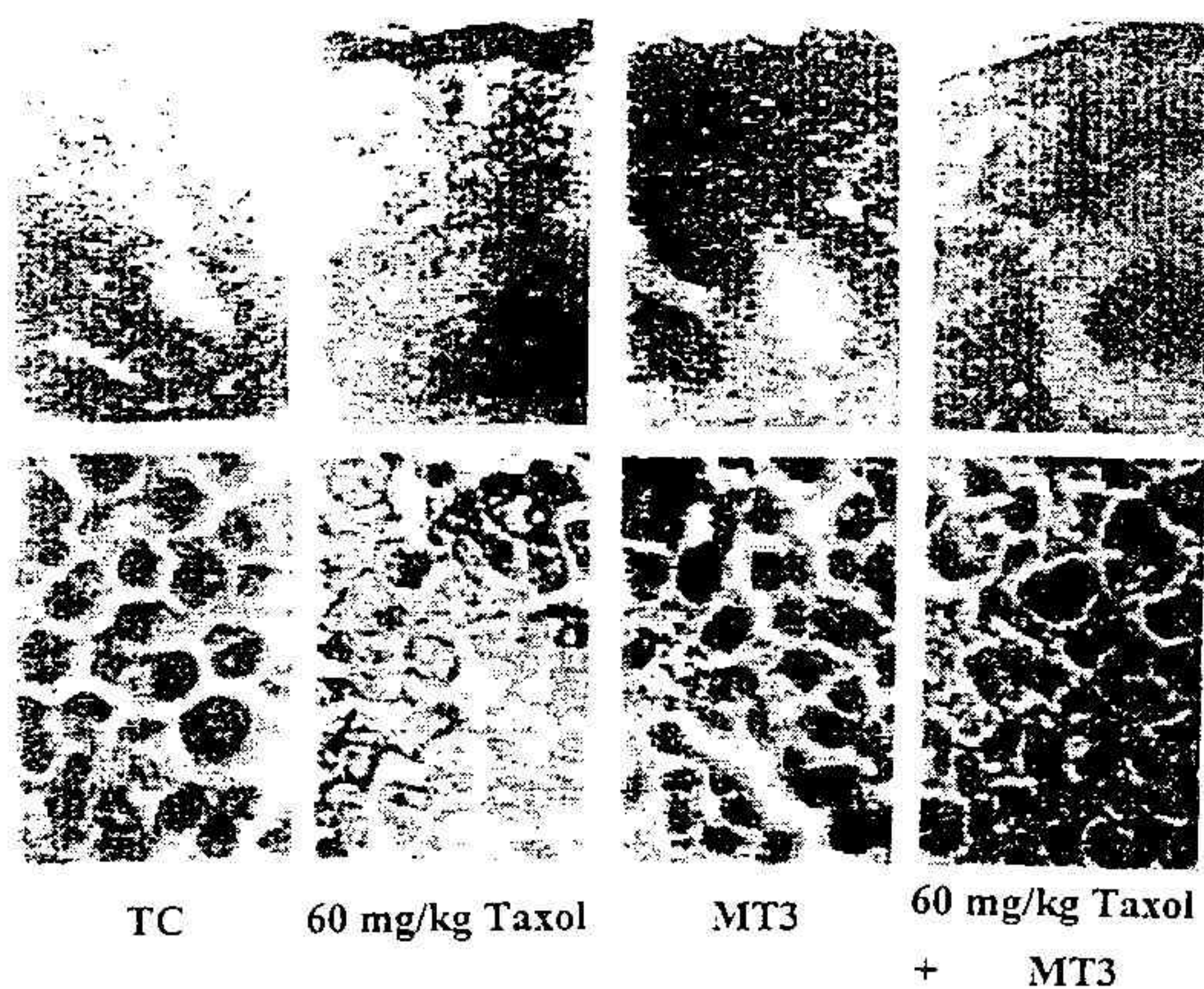


Fig. 8. Pathological changes after treatments of moxibustion (MT) and taxol. TC : Tumor control. The photograph in the upper row was magnified by 60 x ; the photograph in the lower row was magnified by 1000 x.

肆、討論

本研究所採用的艾灸療法乃根據局部高溫療法的原理 (22)，將腫瘤內深層溫度控制在 42.5°C 以上，故對皮下腫瘤有較佳的療效。高溫療法導致細胞死亡的機制，是因高溫對細胞內的蛋白質及 DNA 造成抑制和破壞 (23)。高溫使得細胞膜的流動性 (fluidity) 增加，而使細胞膜受損。而且高溫造成細胞膜通透性的改變，而導致細胞死亡 (24)。莫氏等認為：高溫可能降低腫瘤細胞主要系統的活化，而使其核酸和蛋白質的合成受阻 (25)。另外高溫可抑制 DNA 的複製 (26)，並抑制腫瘤細胞蛋白質及核酸的合成 (27)。

經由高溫處理，腫瘤內的溫度較正常組織者為高，而使微血管受損，因而氧氣供應缺乏及無氧代謝增加，乳酸產量增加，使細胞內的 pH 值降低，而使細胞內的溶解體 (lysosomes) 容易破裂，放出大量分解酵素，而致使細胞死亡 (28, 29)。另有報告指出：高溫會造成腫瘤之胞核產生嚴重皺縮，細胞質中出現大液泡，而致細胞死亡 (30)；高溫也會對粒線體造成破壞性的影響 (31)。

艾條是由艾絨捲捻作成，經由化學分析得知：艾葉內含 eucalyptol 及 α 、 β -thujone 與 Choline, Adenine 及維生素等 (32)。艾條灸治癌腫瘤，除高溫因子外，是否艾葉的成份有其作用，有待進一步研究。

本研究所用之紫杉醇處理，旨在找出治療實驗性乳部皮下腫瘤之泰克索最佳濃度。曾有報告指出：紫杉醇可以抑制腫瘤細胞的生長 (16, 17)，但對正常之細胞亦會影響，尤其是快速增生的細胞，如骨髓之細胞。紫杉醇造成之副作用，包括嗜中性白血球過低症、過敏反應、低血壓或心跳過慢及消化道黏膜炎等，紫杉醇也會降低單核球、自然殺手細胞 (NK cells) 及 T 細胞等之細胞毒性 (12, 35)。本研究結果顯示：紫杉醇的濃度愈高，腫瘤受到之抑制愈大，但隨小鼠之平均存活時間 (MST_{120})，則以 60 mg/kg 體重之紫杉醇處理者為最高。由於紫杉醇對正常之細胞亦會有影響，故處理濃度高於此值，其 MST_{120} 反而有下降之趨勢。故在臨床上治癌時必須注意紫杉醇的毒性，以免對病人造成不必要的副作用。此藥毒殺癌細胞的機制是能產生使紡錘絲失去作用，而造成 G_2/M 停滯，阻止細胞分裂。最後導致癌細胞凋亡 (apoptosis) (13, 33)。本研究結果顯示：紫杉醇單獨處理均造成較多 G_2/M 細胞和多核細胞。Tx 與 MT 合併會增加 MT 的治癌效果。

曾有報告指出：局部高溫能改變腫瘤的血流，可以用注入的 ^{86}Rb 表示之。高溫若能破壞腫瘤內的血管，則供給腫瘤的血量就會減少。於是 ^{86}Rb 分佈到腫瘤的含量亦隨之而減少 (34)。本研究結果顯示：艾條灸 2, 3 及 4 次者均使腫瘤內血管破壞，致分佈在腫瘤內 ^{86}Rb 活性大量降低。顯示艾灸會使腫瘤內的血流量大量減少。而致該處細胞會缺乏氧氣及營養品，以及

使乳酸量增加，使細胞內的 pH 值降低，而促使溶解體破裂，放出大量的分解酵素，終而導致該處之癌細胞死亡。

伍、結論與建議

1. 單獨用紫杉醇 (Tx) 處理患有胸部皮下腫瘤的鯉鼠，共分為 20, 60 及 100 mg/kg 體重等劑量，其中以 60 mg/kg 體重之 Tx 單獨處理的療效最佳，其 MST_{120} 最長 (78.3 天)。
2. 單獨用艾條灸 (MT) 處理共有 1, 2, 3 及 4 次，其中以三次的 MT 的療效最佳，其 MST_{120} 最長 (84.7 天)。
3. 在合併處理中，以 60 mg/kg 體重之 Tx 與 3 次之 MT 合併處理，其療效最佳，其 MST_{120} 為 188.9 天。
4. 經用 ^{86}Rb 為追蹤劑，測得腫瘤內 ^{86}Rb 的放射活性 (表示該處的供血量)，在 MT 處理後，腫瘤內的供血量均顯著降低。
5. 經用流式細胞術測得：經用 Tx 處理後，在腫瘤內可以產生較多的 G_2/M 期細胞。
6. 組織病理切片顯示：經用 Tx 處理之動物，其腫瘤內之細胞會出現一些多微核。用 MT 單獨或與 Tx 合併處理者卻無多微核出現，但卻引起壞死，其壞死的程度，卻隨 MT 次數增加而加大，亦隨著與 Tx 的合併，而增加其壞死程度。

陸、參考文獻

1. 行政院衛生署編印：中華民國 73 年衛生統計(一)，生命統計 1. 死亡原因分析， pp. 32-33, 1985.
2. Mendecki, J., E. Friedenthal, and C. Botstein, Effects of microwave-induced local hyperthermia on mammary carcinoma in C₃H mice. Cancer Res. 36:2113-2114, 1976.
3. Marmor, J.B., Tumor cure and all survival after localized radiofrequency heating. Cancer Res. 37:879-883, 1977.
4. Hau, D. M. and S. S. Lin, Preliminary study on therapeutic effects

- of locally fractionated heat acupuncture on subcutaneous tumor of mice. Bull. Chinese Oncol. Quart. 5:9-17, 1984.
5. Hau, D. M., J. C. Wu, Y. H. Chang and J. T. Hwang, Effects of moxibustion of cellular immunocompetence of γ -irradiated mice. Am. J. Chin. Med. 17:1-7, 1989.
 6. 王冰，中國子學名著集成，孟子註疏（上），中國子學名著基金會出版。pp. 487-522, 1978.
 7. 顧世澄：瘍毒大全，卷八旋風出版社，台北。pp. 29-31, 1973.
 8. Hau, D. M., F. G. Lo, T. H. Chen, and C. K. Yu, Preliminary study on effects of moxibustion on mice bearing subcutaneous tumor. Acup. Res. Quart. 8:91-97, 1984.
 9. 張永賢，郝道猛，黃玉治，艾灸與十全大補湯合併治療實驗性乳癌的研究，中醫學報，15:101-113, 1989.
 10. Oda, M., S. Koga and M. Maeta, Effects of total body hyperthermia on metastases from experimental mouse tumors. Cancer Res. 45:1532-1535, 1985.
 11. Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, et al., Plant antitumor agents, VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc. 93:2325-2327, 1971.
 12. Rowinsky, E. K., L. A. Cazenave, and R. C. Donehower, Paclitaxel: A novel investigational antimicrotubule agent. JNCI 82:1247-1259, 1990.
 13. Chang, Y. F., L. L. Li, C. W. Wu, T. Y. Liu, W. Y. Lui, F. K. Peng and C. W. Chi, Paclitaxel-induced apoptosis in human gastric

- carcinoma cell lines. *Cancer* 77:14-18, 1996.
14. Nygren, P., K. Csoka, B. Jonsson, and H. Fridborg, The cytotoxic cells from patients is partly mediated by cremophor EL. *Br. J. Cancer* 71:478-481, 1995.
 15. Chan, W. K., T. H. Lin, M. Liu, Y. M. Chen, M. F. Wu and J. W. Peng, A pilot study of taxol treatment in carcinoma of unknown primary site: preliminary results. *Therapeut. Radiol. Oncol.* 3:217-227, 1994.
 16. Bissett, D. and S. B. Kaye, Taxol and taxotere-current status and future prospects. *Europ. J. Cancer* 29:1228-1231, 1993.
 17. Long, B. H. and C. R. Fairchild, Paclitaxol, inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telophase. *Cancer Res.* 54:4355-4361, 1994.
 18. Tanniki, T., N. Prajda, Y. Monden and G. Weber, Synergistic action of taxol and tiazofurin in human ovarian, pancreatic and lung carcinoma cells. *Cancer Biochem. Biophys.* 13:297-302, 1993.
 19. 黃玉治，郝道猛，局部分次輻射與艾灸對罹患腫瘤小白鼠的影響，中醫藥雜誌。6:13-25, 1995.
 20. Alanen, K. A., P. J. Klemi, S. Taimela and H. Joensuu, A simple preservative for Flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 10:86-89, 1989.
 21. Song, C. W., J. C. Lin, L. M. Chelstrom and S. K. Sahu, Induction of thermoresistance in tumor blood vessels. *Intl. J. Radiat. Biol.* 60:355-361, 1991.

22. Leith, J. T., R. C. Miller, E. W. Gerner and M. L. Boone, Hyperthermic potentiation : Biological aspects and applications to radiation therapy. *Cancer* 39:483-487, 1977.
23. Hall, E. J., *Radiobiology for the radiologist* (4th Ed.), Lippincott Co., Philadelphia, pp.258-285, 1994.
24. Sato, C., T. Nakayabama, K. Kojima, Y. Nishimoto and W. Nakamal, Effects of hyperthermia on cell surface charge and cell survival in Mastcytoma cells. *Cancer Res.* 41:4107-4110, 1981.
25. Moncovi B., A. Finassi-Agro, G. Rotilio, R. Strom, G. Moricca, A. Rossi-Fanelli, The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. II. Studies on nucleic acids and protein synthesis. *Eur. J. Cancer* 5:137-147, 1969.
26. Warters, R. L. and O. L. Stone, The effects of hyperthermia on DNA replication. *Radiat. Res.* 93:71-84, 1983.
27. Storm R., A. Santoro, C. Crifro, A. Bozzi, B. Mondove and A. R. Fanelli, The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. IV. Inhibition of RNA synthesis. *Eur. J. Cancer* 9:103-112, 1973.
28. Hall, E. J. and L. R. Towle, Biological effects of heat. *Cancer Res.* 44:4708s-4713s, 1984.
29. Gerweek. L. E., W. K. Dahlberg, L. F. Epstein and D. S. Shimm, Influence of nutrient and energy deprivation on cellular response to single and fractionated heat treatment. *Radiat. Res.* 99:571-581, 1984.

30. Suit, H. and D. Dandophil, Hyperthermic effect on animal tissue. Radiology 123:483-487, 1977.
31. Overgaard J., Effect of hyperthermia on the cytochrome C oxidase activity in tumor cells. IRCS Med. Sci. Biochem. Cancer 3:225-228, 1975.
32. Kobayashi, K., Organic components of moxa. Am. J. Chinese Med. 16:179-185, 1988.
33. Milas L., N. R. Hunter, B. Kurdiglu, K. A. Mason, R. E. Meyn, L. C. Stephen and L. J. Peters, Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol. Cancer chemother. Pharmacol. 35:297-303, 1995.
34. Sone, C. W., I. M. Chelstrom and J. H. Sung, Effects of a second heating on blood flow in tumors. Radiat. Res. 122:66-71, 1990.
35. Chuang, L. T., E. Lotzova, J. Heath, K. R. Cook, A. Munkarah, M. Morris and J. T. Wharton, Alteration of lymphocyte microtubule assembly, cytotoxicity and activation by the anticancer drug, taxol. Cancer Res. 54:1286-1291, 1994.