

HA 纳米载体转 hGM-CSF 基因的 HepG2 疫苗的抗肿瘤活性研究 *

苏小芳¹ 段晓明^{2△} 黄璐³ 曾治中⁴ 程元星⁵ 贺修胜⁶

(1 南华大学研究生学院 湖南 衡阳 421001 2 长沙市第四医院消化内科 湖南 长沙 410006 ;

3 南华大学附属第二医院消化内科 湖南 衡阳 421001 ;

4 湖南中医药高等专科学校附属第一医院消化内科 湖南 株洲 412000 ;

5 程元星 山东单县中心医院消化内科 山东 单县 274300 6 南华大学肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:评价 HA 纳米载体转 hGM-CSF 基因的 HepG2 疫苗的抗肿瘤活性。方法:SCID 小鼠 20 只腹腔内注射健康志愿者外周血淋巴细胞(1×10^7 /ml)1.0 ml,同时背部皮下接种人肝癌 HepG2 细胞(1×10^7 ml)0.2 ml。当皮下移植瘤体积长至 100 mm³时,随机分四组:组¹,⁶⁰Co 照射的转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞组,组²,⁶⁰Co 照射的 HepG2 细胞组,组³生理盐水组,组⁴接种前,每组 5 只。MTT 法检测各组小鼠脾细胞 CTL 活性,ELISA 法检测血清 IL-4 和 IL-12 的水平。结果:转染 GM-CSF 基因的 HepG2 疫苗组小鼠脾细胞 CTL 活性明显高于其余组($P < 0.05$),同时血清 Th1 类细胞因子 IL-12 的水平明显升高($P < 0.05$),而 Th2 类细胞因子 IL-4 的水平无统计学意义($P > 0.05$)。结论:HA 纳米载体转 hGM-CSF 基因的 HepG2 疫苗可刺激机体产生特异性免疫反应。

关键词 肝癌;HA 纳米载体;GM-CSF 基因;肿瘤疫苗;Hu-PBL-SCID 小鼠

中图分类号 R735.7 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)10-1824-04

The Anti-Tumor Activity of HepG2 Tumor Vaccine Transfected hGM-CSF Gene Mediated by HA Nanoparticles*

SU Xiao-fang¹, DUAN Xiao-ming^{2△}, HUANG Lu³, ZENG Zhi-zhong⁴, CHENG Yuan-xing⁵, HE Xiu-sheng⁶

(1 Postgraduate Institute, Nanhua University, Hengyang, 421001, China; 2 Department of Gastroenterology, Fouth Hospital of Changsha,

Changsha, 410006, China; 3 Department of Gastroenterology, Second Hospital of Nanhua University, Hengyang, 421001, China;

4 Department of Gastroenterology, 1st Hospital of Hunan Institute of Herbal Medical, Zhuzhou, 412000, China;

5 Department of Gastroenterology, Shan Center Hospital, Shandong, 274300, China;

6 The Cancer Research Institute of Nanhua University, Hengyang, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the anti-tumor effects and mechanism of HepG2 tumor vaccine transfected hGM-CSF gene mediated by HA nanoparticles. **Methods:** Health human peripheral blood lymphocytes were isolated from peripheral blood of healthy donors and intraperitoneal injected into SCID mice at 2×10^7 /ml. Simultaneously, hepatocellular carcinoma cells were intracutaneously injected into SCID mouse at 2×10^7 /ml. When the xenografted to a 100 mm³, mice was randomly divided into 4 groups: Group 1, HepG2 cells transfected with GM-CSF Gene after ⁶⁰Co irradiation group; Group 2, HepG2 cells after ⁶⁰Co irradiation group; Group 3, normal saline group; Group 4, uninjected group. Every group had 5 mice. Cytotoxic rates were detected by using MTT assay. The level of IL-12 and IL-4 in serum was detected by ELISA method. **Results:** The activity of CTL were significantly higher in group HepG2 tumor vaccine transfected hGM-CSF gene mediated by HA nanoparticles than those in other groups ($P < 0.05$); Serum level of Th1-type cytokine IL-12 increased after vaccination($P < 0.05$), whereas Th2-type cytokine IL-4 showed no significant changes($P > 0.05$). **Conclusion:** The HepG2 tumor vaccine transfected hGM-CSF gene mediated by HA nanoparticles can induce immune response.

Key words: Hepatoma carcinoma; Nano-hydroxyapatite vector; GM-CSF gene; Tumor vaccine; Hu-PBL-SCID mouse

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1824-04

前言

肝癌是严重威胁人类健康的一种疾病,目前,用肝癌细胞制备肝癌疫苗的研究已成为热点,而诱导特异性免疫是其研究

的主要方面。但单纯的肿瘤细胞难以刺激有效的免疫反应,利用基因修饰如细胞因子、刺激分子等,可增强机体的免疫应答,而研究证实 GM-CSF 的作用最强^[1]。GM-CSF 可以刺激 DC 的

* 基金项目:湖南省卫生厅科研基金资助项目(B2005-178)

作者简介:苏小芳,女,硕士,医师,研究方向:消化道肿瘤, Tel: 15802586960, E-mail: 422920460@qq.com

△通讯作者:段晓明,男,博士后,职称:主任医师,教授,研究方向:消化道肿瘤,电话:0731-88835975,

E-mail: xiaomingduan@21cn.com

(收稿日期:2011-12-21 接受日期:2012-01-17)

增殖、成熟,而 DC 作为体内最为强大的抗原递呈细胞可以进一步激活 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞。本课题组前期研究发现 HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因能增加 HepG2 细胞疫苗的免疫原性,转 hGM-CSF 基因 HepG2 细胞疫苗可有效诱导 PBMC 增殖、分化,增加 INF- γ 的分泌,提高其对 HepG2 细胞的杀伤作用^[2]。而 GM-CSF 修饰的疫苗用于恶性黑色素瘤、前列腺癌、非小细胞肺癌、肾癌等的治疗已经进入临床试验,结果显示,该方法可以诱导抗肿瘤免疫反应^[3-6]。SCID 鼠是一种严重联合免疫缺陷小鼠,鼠体内植入人外周血淋巴细胞可模拟人免疫系统的实验模型,是迄今为止最具说服力的用于评估生物治疗的体内模型^[7]。所以本研究利用 SCID 鼠肝癌模型,检测疫苗接种后小鼠 CTL 活性及血清细胞因子水平,为肿瘤疫苗的临床应用累计资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验细胞及动物 雄性 SCID 小鼠,4-6 周龄,体重 16-20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,所用水、饲料、垫料均经过高温消毒,HepG2 细胞株由南华大学肿瘤研究所提供,HA 纳米载体介导 GM-CSF 基因转染 HepG2 细胞株由本课题前期试验做出并 -80℃ 保存;新鲜人血液由健康志愿者提供。

1.1.2 主要仪器试剂 RPMI-1640 培养基购于美国 Meco 公司;新生牛血清杭州四季清公司;胰蛋白酶 Gibco 公司;MTT 粉购自长沙艾杰生物公司;人外周血淋巴细胞分离液(比重 1.077)购自天津灏洋生物公司;小鼠 IL-12 及 IL-4 ELISA 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;钴 60 机由南华大学附属南华医院提供。

1.2 方法

1.2.1 密度梯度离心法分离人淋巴细胞 (1)取健康志愿者肝素抗凝外周静脉血 3 ml,与未添加小牛血清的 1640 培养液 1:1 混匀 (2)加于 4 ml 的淋巴细胞分离液之液面上 (3)2500 r/min 离心(半径 15 cm 水平转子)20 分钟 (4)弃去血浆,将淋巴细胞层全部吸出至另一管 (5)无血清的 1640 培养液洗 2 遍后悬于完全 RPMI 1640 中,配成 2×10^7 /ml。

1.2.2 疫苗的制备 将体外培养的转入 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞和单纯 HepG2 细胞分别给予亚致死剂量的 ⁶⁰Co 照射,使其成为疫苗。

1.2.3 Hu-PBL-SCID 小鼠模型的建立 SCID 小鼠 20 只,首先每

只 SCID 鼠给予 100 mg/kg 的环磷酰胺腹腔注射,然后每只 SCID 鼠接受腹腔内注射 2×10^7 (1.0 ml) 个人 PBL,最后每只 SCID 鼠背部皮下接种约 0.2 ml (2×10^7 ml) HepG2 细胞,每日观察肿瘤形成情况。

1.2.4 试验分组及接种 当皮下移植瘤长至体积约 100 mm³ 时,随机分四组: 组,⁶⁰Co 照射的转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞组, 组,⁶⁰Co 照射的 HepG2 细胞组, 组,生理盐水组; 组,接种前,每组 5 只。 、 、 组分别于小鼠后肢内侧皮下注射 ⁶⁰Co 照射的转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞 (2×10^7 /ml) 0.2 ml/只, ⁶⁰Co 照射的 HepG2 细胞 (2×10^7 /ml) 0.2 ml/只,生理盐水 0.2 ml/只,每七天重复一次,共三次。同时设接种前组作为对照。

1.2.5 小鼠脾细胞 CTL 活性检测 取小鼠脾脏,机械研磨法制备小鼠脾细胞悬液,以低渗法除去红细胞,并以完全 RPMI 1640 配成 2×10^6 /ml 作为效应细胞,以 HepG2 为靶细胞。按效/靶 = 20:1,先加入密度为 2×10^5 的 HepG2 细胞 50 μ l/孔,再加入小鼠脾细胞各 100 μ l/孔。设立靶细胞对照组、效应细胞对照组。各组均设三复孔。以 RPMI 1640 加至各孔总体积 200 μ l。37℃ 5%CO₂ 孵育 4 小时后 MTT 法测定 CTL 活性。CTL 活性 = [1-(效-靶细胞的 A 值-效应细胞的 A 值)/靶细胞的 A 值] X 100%。

1.2.6 ELISA 法检测血清白细胞介素 12(IL-12)和白细胞介素 4(IL-4)水平 分别收集接种前组及其余三组第 3 次免疫接种后小鼠血清,检测 IL-12 和 IL-4 分泌水平。将标准品和待测样品加入相应反应孔,混匀 30 S,封住孔板,37℃ 反应 30 min。洗板 5 次,加入酶标试剂,37℃ 反应 30 min,洗板 5 次,加入显色剂 A、B,37℃ 显色 10 min,加入终止液。15 分钟之内在酶标仪上读取 A450 值。以 A450 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据血清样品的 A 值,计算其浓度。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件做统计学分析,以 t 检验比较组间均数差异,以 P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠脾细胞 CTL 活性

在效/靶比 = 20:1 的情况下,接种 ⁶⁰Co 照射的转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞组的小鼠 CTL 活性为 (42.10 \pm 3.58)%,明显高于 ⁶⁰Co 照射的 HepG2 细胞组、生理盐水组及接种前的杀伤活性(P<0.05,表 1)。

表 1 各组小鼠脾细胞 CTL 活性
Table 1 Activity of CTL in each group

Group	n	Activity of CTL(%)	P
HepG2 cells transfected with GM-CSF Gene after ⁶⁰ Co irradiation group	5	(42.10 \pm 3.58)	
HepG2 cells after ⁶⁰ Co irradiation group	5	(17.93 \pm 3.98)	<0.05
Normal saline group	5	(11.45 \pm 2.69)	<0.05
Uninjected group	5	(9.83 \pm 3.16)	<0.05

2.2 疫苗治疗后小鼠血清 IL-12 和 IL-4 水平

接种 ⁶⁰Co 照射的转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞组后,

小鼠血清 Th1 类细胞因子 IL-12 水平为 (224.22 ± 20.04) pg/ml, 明显高于 ^{60}Co 照射的 HepG2 细胞组的 (37.02 ± 5.45) pg/ml、生理盐水组的 (33.07 ± 5.03) pg/ml、接种前的 (31.20 ± 7.05) pg/ml ($P < 0.05$, 表 2)。各组小鼠血清 Th2 类细胞因子

IL-4 水平分别为 (26.20 ± 2.78) pg/ml、 (25.92 ± 3.42) pg/ml、 (25.04 ± 2.23) pg/ml、 (24.54 ± 2.91) pg/ml, 无明显变化, 且与其他各组间差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$ 表 3)。

表 2 各组小鼠血清 IL-12 水平

Table 2 The level of IL-12 in serum in each group

Group	N	Level of IL-12(pg/ml)	P
HepG2 cells transfected with GM-CSF Gene after ^{60}Co irradiation group	5	(224.22 ± 20.04)	
HepG2 cells after ^{60}Co irradiation group	5	(37.02 ± 5.45)	<0.05
Normal saline group	5	(33.07 ± 5.03)	<0.05
Uninjected group	5	(31.20 ± 7.05)	<0.05

表 3 各组小鼠血清 IL-4 水平

Table 3 The level of IL-4 in serum in each group

Group	N	Level of IL-4(pg/ml)	P
HepG2 cells transfected with GM-CSF Gene after ^{60}Co irradiation group	5	(26.20 ± 2.78)	
HepG2 cells after ^{60}Co irradiation group	5	(25.92 ± 3.42)	>0.05
Normal saline group	5	(25.04 ± 2.23)	>0.05
Uninjected group	5	(24.54 ± 2.91)	>0.05

3 讨论

GM-CSF 是一种强烈刺激巨噬细胞和 DC 等抗原递呈细胞的增殖、分化、活化、成熟及趋化的细胞因子。GM-CSF 基因修饰的肿瘤细胞被放射线灭活后往体内注射,可增加局部炎症反应,大量多核细胞、巨噬细胞和 DC 浸润,促进肿瘤抗原呈递,能够诱导强烈的抗肿瘤免疫反应。GM-CSF 修饰的疫苗用于恶性黑色素瘤、前列腺癌、非小细胞肺癌、肾癌等的治疗已经进入临床试验。结果显示,该方法可以诱导抗肿瘤免疫反应^[3-6]。

本试验所用的肿瘤疫苗为 HA 纳米载体介导 GM-CSF 基因转染 HepG2 细胞经辐射制成。HA 纳米颗粒作为一种新出现的基因转移工具,具有无免疫原性、无遗传毒性、可介导外源基因在宿主染色体中的整合而获得基因的长期稳定表达^[8]。本课题组前期研究发现 HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因能增加 HepG2 细胞疫苗的免疫原性,转 hGM-CSF 基因 HepG2 细胞疫苗可有效诱导 PBMC 增殖、分化,增加 INF- γ 的分泌,提高其对 HepG2 细胞的杀伤作用^[2]。

SCID 鼠是一种严重联合免疫缺陷小鼠,鼠体内植入人外周血淋巴细胞可模拟人免疫系统的实验模型,是迄今为止最具说服力的用于评估生物治疗的体内模型^[7]。本试验通过建立具有人免疫系统及人肝癌的复合动物模型,为肝癌疫苗免疫治疗研究提供很好的试验模型。我们利用 SCID 鼠肝癌模型,检测疫苗接种后小鼠 CTL 活性及血清细胞因子水平,为肿瘤疫苗的临床应用累计资料。

分别取免疫前及免疫后各组小鼠脾细胞为效应细胞,以 HepG2 细胞作为靶细胞进行杀伤试验。结果表明,接种 ^{60}Co 照

射的转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞组的小鼠 CTL 活性明显高于 ^{60}Co 照射的 HepG2 细胞组、生理盐水组及接种前。即转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗可刺激体内淋巴细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤活性。

Th1/Th2 细胞是免疫应答调节中的关键环节,正常情况下,Th1/Th2 细胞处于平衡状态。当这个平衡失调并向 Th1 或 Th2 转化时,称为 Th1/Th2 的偏移^[9]。大量研究表明,Th1 型细胞因子具有重要的抗肿瘤作用^[10-12]。进展期肿瘤患者外周血中通常 Th2 优势状态,且随着肿瘤恶性程度增加 Th2 漂移更加明显^[13-14],而在抗肿瘤免疫中起重要作用的 Th1 免疫却受到抑制,因而逆转 Th1/Th2 漂移方向,增强 Th1 免疫,是肿瘤免疫治疗的重要手段^[15],将为肿瘤的免疫治疗提供一种新的方法^[16]。研究 Th1/Th2 细胞亚群漂移,为肿瘤的免疫治疗提供一个新型的方案,已成为当前的研究热点^[17-19]。IL-12 是 Th1 细胞分泌的细胞因子中抑制局部肿瘤形成的作用最强,而 IL-4 是 Th2 细胞分泌的最特异细胞因子^[20],所以 IL-12 及 IL-4 水平可很好评价机体 Th1/Th2 细胞状态。分别收集接种前组及免疫后各组小鼠免疫接种后血清,检测小鼠 IL-12 及 IL-4 水平。结果显示,接种 ^{60}Co 照射的转染 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞组后,小鼠血清 Th1 类细胞因子 IL-12 水平明显高于其余各组,即其可诱导产生 Th1 漂移。小鼠血清 Th2 类细胞因子 IL-4 水平并无明显变化,且与其他各组间差异亦无统计学意义,即无 Th2 漂移现象,因此诱导 Th1 漂移将有利于抗肿瘤免疫应答^[21]。

总之,转染 GM-CSF 基因的 HepG2 疫苗可以诱导抗原特异性免疫,具有良好的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90 (9): 3539-3543
- [2] 曾治中, 段晓明, 程元星, 等. HA 纳米载体介导转 hGM-CSF 基因的 HepG2 疫苗诱导的抗肿瘤效应研究 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3): 672-676
Zeng Zhi-zhong, Duan Xiao-ming, Cheng Yuan-xing, et al. Anti-Tumor effects of HepG2 tumor Vaccine transfected hGM-CSF Gene Mediated by HA Nanoparticle s[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(3): 672-676
- [3] Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, et al. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocytemacrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma [J]. J Clin Oncol, 2003, 21: 3343-3350
- [4] Tanii K, Azuma M, Nakazaki Y, et al. Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: clinical and immunological findings [J]. Mol Ther, 2004, 10: 799-816
- [5] Nemunaitis J, Sterman D, Jablon D, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96: 326-331
- [6] 张维红. Gm-Csf 基因修饰 同种异体肺癌细胞疫苗诱导 cd8⁺T 细胞的免疫反应 [J]. 免疫学杂志, 2008, 24(5): 545-548
Zhang Wei-hong. Gm-Csf gene-modified allogeneic lung cancer cell vaccine induced cd8⁺ + T cells in the immune response [J]. Immunology, 2008, 24 (5): 545-548
- [7] 殷晓煜, 黄嘉凌, 吕明德, 等. SCID 鼠人肝癌皮下移植及免疫重建复合模型的建立 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(3): 184-186
Yin Xiao-yu, Huang Jia-ling, Lv Ming-de, et al. Establishment of SCID murine model of subcutaneous transplantation of human hepatocellular carcinoma and reconstruction of human immune system [J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2004, 10(3): 184-186
- [8] 郭淦华, 段晓明. 羟基磷灰石纳米颗粒载体介导 hGM-CSF 基因转染 HepG2 细胞及其对生长的影响 [J]. 肿瘤, 2008, 28(3): 224-227
Guo Gan-hua, Duan Xiao-ming. Hydroxyapatite nanoparticles mediated hGM-CSF gene transfection HepG2 cells and their growth [J]. Cancer, 2008, 28(3): 224-227
- [9] Nagai H, Miyaki D, Mastsui T, et al. Th1/Th2 balance, an important indicator of efficacy for intra-arterial chemotherapy [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 62(6): 959-963
- [10] Sharma A, Rajappa M, Satyam A, et al. Cytokines (TH1 and TH2) in patients with advanced cervical cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation: correlation with treatment response [J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19(7): 1269-1275
- [11] Tassi E, Braga M, Longhi R. Non-redundant role for IL-12 and IL-27 in modulating Th2 polarization of carcinoembryonic antigen specific CD4 T cells from pancreatic cancer patients [J]. PLoS One, 2009, 4 (10): 7234-7239
- [12] Nonaka K, Saio M, Suwa T, et al. Skewing the Th cell phenotype toward Th1 alters the maturation of tumor-infiltrating mononuclear phagocytes [J]. J Leukoc Biol, 2008, 84(3): 679-688
- [13] Wu J, Lu Y, Ding YB, et al. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population [J]. Mol Carcinog, 2009, 48(7): 626-632
- [14] Horiuchi Y, Hanazawa A, Nakajima Y, et al. T-helper (Th)1 /Th2 imbalance in the peripheral blood of dogs with malignant tumor [J]. Microbiol Immunol, 2007, 51(11): 1135-1138
- [15] Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, et al. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy [J]. Cancer Sci, 2004, 95: 697-703
- [16] Indrová M, Bieblová J, Bubeník J, et al. IL-12 immunotherapy of minimal residual disease in murine models of HPV16-associated tumours: induction of immune responses, cytokine production and kinetics of immune cell subsets [J]. Int J Oncol, 2008, 32(2): 499-507
- [17] Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy [J]. Cancer Immunol Immunother, 2005, 54(8): 721-728
- [18] Knutson KL, Disis ML. Augmenting T helper cell immunity in cancer [J]. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2005, 5 (4): 365-371
- [19] Kikuchi T, Uehara S, Ariga H, et al. Augmented induction of CD8⁺ cytotoxic T-cell response and antitumor resistance by T helper type 1 - inducing peptide [J]. Immunology, 2006, 117(1): 47-58
- [20] Yamazaki K, Yano T, Kameyama T, et al. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. Surgery, 2002, 131(1 Suppl): S236-S241
- [21] Becker Y. Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancer: a review, hypothesis and implications [J]. Anticancer Res, 2006, 26: 1113-1134

(上接第 1945 页)

- [18] 杨广富. 行为护理的提出与探讨 [J]. 中国行为医学科学, 2002, 11(6): 702-703
Yang Guang-fu. Proposal and discussion of behavioral care [J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2002, 11(6): 702-703
- [19] 何灵, 陈思平, 王立君. 临床腧穴学 [M]. 北京人民军医出版社, 2003, 234
He Ling, Chen Si-ping, Wang Li-jun. Clinical Acupoint [M]. People's Military Medical Press, 2003, 234
- [20] 蔡加, 张统海, 赖春柏. 神门穴在治疗失眠中的应用 [J]. 赣南医学院学报, 2011, 3: 354
Cai Jia, Zhang Tong-hai, Lai Chun-bai. Acupoint of SHENMEN at the application in the treatment of insomnia [J]. Journal of Gannan Medical University, 2011, 3: 354