论著

文章编号:1000-5404(2009)04-0338-03

体外模拟 CO_2、He 气腹对胃癌细胞增殖的影响

石 彦,雷 晓,余佩武,罗华星,郝迎学,赵永亮,钱 锋,唐 波,饶 云 (第三军医大学西南医院全军普通外科专科中心,微创胃肠外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 研究体外建立模拟 CO_2、He 气腹环境对胃癌 MKN-45 细胞增殖的影响,初步探讨 CO_2 气腹腹腔镜胃癌手术的安全性。**方法** 体外建立模拟 CO_2、He 气腹环境,全自动气腹机维持压力为 12 mmHg,作用 3 h 并没对照组。处理后 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h,用 pH 计检测细胞培养液 pH 值变化;用 MTT 法检测第 1、2、3、4、5、6、7 天细胞增殖情况。**结果** 处理结束后 CO_2 气腹组细胞培养液 pH 值呈弱酸性,与对照组比下降非常显著($P<0.01$),处理后 2 h pH 值恢复正常;He 气腹组 pH 值呈弱碱性,与对照组比升高显著($P<0.05$),1.5 h 恢复正常。MTT 法检测细胞增殖结果显示,CO_2 气腹组和 He 气腹组人胃癌 MKN-45 细胞的增殖与对照组比无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 体外模拟 12 mmHg CO_2 气腹和 He 气腹持续作用 3 h 时,均不促进胃癌细胞增殖。

关键词: 气腹;胃癌细胞;增殖;细胞培养液;pH 值

中图法分类号: R656;R73-354;R735.2 **文献标识码:** A

Effects of simulated carbon dioxide or helium pneumoperitoneum on proliferation of gastric cancer cells

SHI Yan, LEI Xiao, YU Pei-wu, LUO Hua-xing, HAO Ying-xue, ZHAO Yong-liang, QIAN Feng, TANG Bo, RAO Yun (Department of General Surgery, Center of Minimally Invasive Gastrointestinal Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of carbon dioxide or helium pneumoperitoneum on the human gastric cancer cells in terms of proliferation and to provide evidence for the safety of CO_2 pneumoperitoneum in laparoscopic radical distal gastrectomy. Methods The cultured gastric cancer cell line MKN-45 was exposed to CO_2 or helium environment maintained at 12 mmHg for 3 h. The cells exposed to 5% CO_2 at 37 ℃ served as control. In every half an hour during 3-hour exposure, the pH value of culture media was measured. On each day in the following week after exposure, the proliferation of MKN-45 was examined by MTT method. Results The pH value of culture media was a little bit lower than 7 after exposed to CO_2 environment, significantly different with that of control group ($P<0.01$), but it recovered to normal levels 2 h later. The pH value of helium group was a little bit higher than 7, significantly different with that of control group ($P<0.05$), then down to normal level in 1.5 h. MTT results showed the proliferation of MKN-45 cells showed no significant difference among CO_2 group, helium group and control group ($P>0.05$). Conclusion Simulated CO_2 or He pneumoperitoneum at 12 mmHg does not affect the proliferation of gastric cancer cells MKN-45 *in vitro*.

Key words: pneumoperitoneum; gastric cancer cells; proliferation; culture media; pH

基金项目: 重庆市自然科学基金(2008BB5127)

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Municipal (2008BB5127)

作者简介: 石 彦,男,山东省济南市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事胃肠道肿瘤诊治方面的研究。电话:(023)68765267

通信作者: 余佩武,电话:(023)68754661,E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com

收稿日期: 2007-10-10;**修回日期:** 2008-04-02

微创是 21 世纪外科发展的两大方向之一,腹腔镜代表了外科微创技术发展的最新方向,在外科领域的应用日益广泛,现已成功用于胃癌的治疗[1],其具有疼痛轻、恢复快、疤痕小和对机体功能影响小、并发症低等优点。但对腹腔镜气腹是否会促进肿瘤的增殖,提高播散率与转移率尚有争议。本研究于体外模拟 CO_2、He 气腹环境,研究其对人胃癌细胞增殖的影响,同时监测细胞培养液 pH 值变化,初步探讨 CO_2 气腹用于胃癌根治术的安全性。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

人胃癌 MKN-45 细胞购于第四军医大学西京医院全军消化病研究所;碘化丙啶染液(PI)、二甲基亚枫(DMSO)、胰蛋白酶、氯化硝基四氮唑蓝(MTT)均购于 Sigma 公司。全自动气腹机购自 MGB 公司、Sartorius PB-21 电子 pH 计购于德国,3350 型全自动酶标仪(Bio-Rad 公司)。

1.2　方法

1.2.1　胃癌细胞培养　　低分化人胃腺癌 MKN-45 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中生长,培养环境为 37 ℃、5% CO_2,每 2 天换液 1 次。

1.2.2　CO_2 压力箱的制作[2]　　容积 5.5 L 聚丙烯密封箱,一侧壁开孔接 CO_2 分压仪;对侧壁开孔接全自动气腹机,通过气腹机调节 CO_2 气流量和压力箱内压力。

1.2.3　CO_2、He 持续气腹处理　　压力箱紫外线消毒 40 min 后放入培养板,关闭密封箱盖,开放出气孔并接分压仪,进气孔通过气腹机通入高浓度 CO_2 或 He,待分压仪显示密闭箱内气体浓度 >99% ,即说明箱内已达到实验条件。实验组共 2 组,分别以 CO_2、He 作为实验气体建立模拟气腹环境,压力均为 12 mmHg,3 h 后排气,将培养板放在与对照组相同环境培养 24 h 后更换培养液。对照组:将培养板直接放入 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。

1.2.4　电子 pH 计测定细胞培养液 pH 值　　取常规条件下培养对数生长期的人低分化胃腺癌 MKN-45 细胞,用 PBS 漂洗,0.25% 胰酶 +0.02% EDTA 消化,重悬并制成细胞悬液,调整细胞数为 2.0×10^5 ml^{-1},分别取 1 ml 加入 24 孔培养板中。于处理前和处理后 0、0.5、1、1.5、2、2.5 h 取各组培养液1 ml,用电子 pH 计测 pH 值,每个时相点测 3 次,取均值。

1.2.5　MTT 法检测细胞增殖活性　　同样用 1.2.4 方法重悬并制成细胞悬液,调整细胞数为 1.0×10^4 ml^{-1},接种于 96 孔板中,每孔加入细胞悬液 200 μl(即每孔含细胞 2.0×10^3 个)。贴壁后换液,体外模拟 CO_2 或 He 气腹环境培养,分别于培养后第 1、2、3、4、5、6、7 天取 6 个复孔,弃培养液,每孔加入 50 g/L 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h 后吸出培养液和 MTT 溶液,每孔加入 DMSO 150 μl,振荡器微振荡 10 min,全自动酶标仪于波长 490 nm 处测定各孔吸光度值[$D(490)$],取均值,绘制生长曲线。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,行独立样本 t 检验和方差分析 F 检验。

2　结果

2.1　体外模拟 CO_2、He 气腹对人胃癌 MKN-45 细胞培养液 pH 值的影响

CO_2 气腹组经 12 mmHg 压力持续作用 3 h 后,细胞培养液 pH 值呈弱酸性,与对照组比下降非常显著($P < 0.01$),此后连续检测处理后 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 细胞培养液 pH 值,结果 pH 值恢复迅速,处理后 2 h 后与对照组比无显著差异($P > 0.05$);He 气腹组经 12 mmHg 压力持续作用 3 h 后,立即检测细胞培养液 pH 值呈弱碱性,与对照组比升高显著($P < 0.05$),处理后 pH 值也较快恢复,在 1.5 h 时与对照组比无显著差异($P > 0.05$,表 1)。

2.2　体外模拟 CO_2、He 气腹对人胃癌 MKN-45 细胞增殖的影响

12 mmHg CO_2 气腹处理 3 h 后,人胃癌 MKN-45 细胞在第 1 ~ 7 天的平均 $D(490)$ 值均小于对照组,绘制细胞生长曲线,可看出气腹组人胃癌 MKN-45 细胞在第 5 ~ 7 天的生长速度慢于对照组,但 2 组无统计学差异($P > 0.05$),说明体外模拟 12 mmHg CO_2 气腹作用 3 h,对人胃癌 MKN-45 细胞的增殖无促进作用。He 气腹组经 12 mmHg 压力持续处理 3 h 后,胃癌细胞第 1 ~ 7 天的平均 $D(490)$ 值略大于对照组,但 2 组无统计学差异($P > 0.05$)。说明体外模拟 12 mmHg He 气腹作用 3 h,对人胃癌 MKN-45 细胞增殖也无显著促进作用(表 2)。

表 1　CO_2、He 气腹组与对照组细胞培养液 pH 值的比较($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	处理前	处理后时间						
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h
对照组	7.434 ± 0.015	7.430 ± 0.010	7.423 ± 0.012	7.420 ± 0.010	7.417 ± 0.015	7.413 ± 0.012	7.410 ± 0.010	7.403 ± 0.012
CO_2 气腹组	7.437 ± 0.021	6.273 ± 0.087[a]	6.877 ± 0.093[a]	7.287 ± 0.042[a]	7.327 ± 0.025[a]	7.380 ± 0.010	7.387 ± 0.015	7.393 ± 0.015
He 气腹组	7.433 ± 0.021	7.640 ± 0.060[a]	7.537 ± 0.074[a]	7.483 ± 0.025[a]	7.460 ± 0.026	7.443 ± 0.023	7.423 ± 0.015	7.403 ± 0.015

a:$P < 0.05$,与对照组比较

表2 气腹处理后各组平均 $D(490)$ 值比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
对照组	0.288 ±0.040	0.378 ±0.046	0.556 ±0.057	1.310 ±0.088	1.894 ±0.121	2.337 ±0.111	2.230 ±0.111
CO_2气腹组	0.264 ±0.037	0.359 ±0.044	0.525 ±0.062	1.276 ±0.074	1.777 ±0.117	2.232 ±0.099	2.123 ±0.104
He 气腹组	0.296 ±0.022	0.379 ±0.040	0.587 ±0.084	1.391 ±0.088	2.012 ±0.109	2.481 ±0.149	2.341 ±0.124

3 讨论

近年腹腔镜技术被用于恶性肿瘤根治手术的报道越来越多，但至今仍存有很多争议，焦点之一即是持续CO_2气腹是否会促进肿瘤细胞的增殖，增加播散和种植转移的危险[3]。应用 He 等惰性气体代替 CO_2，预防 CO_2气腹可能增加肿瘤播撒的危险性，已成为人们研究的热点。Gutt 等[4]在体外建立模拟持续 CO_2气腹环境，对胰腺癌细胞 DAN-G 和结肠癌细胞 CX-2 在CO_2气腹处理后的生长增殖情况进行研究，结果显示，处理后早期 2 种细胞增殖均显著受抑，而后期则显著加快。徐春阳等[5]研究发现，在持续 CO_2气腹环境下，早期可抑制子宫内膜癌 HTB-113 细胞的生长。Schmidt 等[6]对多种小儿恶性肿瘤的研究结果提示：体外模拟 CO_2气腹对成神经细胞瘤、淋巴瘤、肝胚胎细胞瘤和肝细胞癌细胞株增殖有显著的抑制作用；体外模拟 He 气腹对成神经细胞、瘤细胞增殖也有抑制作用，但对淋巴瘤和肝细胞癌细胞无影响。众所周知，胃癌是一种侵袭性较强的恶性肿瘤，其发生腹腔种植转移几率高，极有必要对其在 CO_2、He 气腹环境下的生物学行为进行研究，以评估 CO_2气腹腹腔镜胃癌手术的安全性。

临床实际工作中，腹腔镜胃癌根治术使用的 CO_2气腹压力一般是 11 ~ 13 mmHg，要研究气腹对人胃癌细胞生物学行为的影响，首先要建立可靠的体外模拟 CO_2、He 气腹环境。本研究成功建立了体外模拟气腹模型，方法简单易行，可操控性强，能准确控制实验所需的体外模拟 CO_2、He 气腹压力和时间。我们采用 MTT 比色法，研究了体外模拟 CO_2、He 持续气腹环境对人胃癌 MKN-45 细胞增殖的影响，结果显示，无论模拟 12 mmHg CO_2气腹还是 He 气腹，持续作用人胃癌 MKN-45 细胞 3 h，均无促进胃癌细胞增殖的作用。Leng 等[7]在体外对模拟 CO_2气腹环境对卵巢癌细胞增殖的影响进行了研究，结果提示 CO_2气腹有抑制卵巢癌细胞增殖的作用。

我们还研究了 CO_2、He 持续气腹对胃癌细胞培养液 pH 值的影响，结果显示 CO_2气腹组细胞培养液 pH 值呈弱酸性，与对照组比下降非常显著，而 He 气腹组细胞培养液 pH 值则呈弱碱性，与对照组比升高非常显著。此后追踪监测发现，脱离气腹环境后各组 pH 值均逐渐恢复。引起 CO_2气腹组 pH 值下降的原因是高压增加了 CO_2溶解度，细胞培养液中的碳酸增加，pH 值下降，一旦压力因素去除，溶解与培养液中的 CO_2随即释放，pH 值也随之快速恢复，因此我们根据文献[6]，选择了气腹处理后每 0.5 小时监测 1 次细胞培养液的 pH 值。而 He 为惰性气体，难溶于水，在 He 气腹作用下细胞培养液 pH 值升高的原因还不是很清楚，有待于进一步研究。细胞培养液 pH 值改变是否会影响肿瘤细胞的增殖尚有争议。Takiguchi 等[3]认为细胞培养液 pH 值下降会对肿瘤细胞的生长和代谢产生不利影响；而 Schmidt 等[6]则认为，肿瘤细胞在 CO_2、He 气腹环境处理后，增殖能力的改变与细胞外液 pH 值改变不相关。

因此，体外模拟 12 mmHg CO_2气腹或 He 气腹均不促进胃癌细胞增殖。

参考文献：

[1] 余佩武，王自强，钱 锋，等. 腹腔镜辅助胃癌根治术105 例[J]. 中华外科杂志，2006，44(19)：1303 -1306.

[2] 石 彦，郝迎学，雷 晓，等. 模拟 CO_2气腹对人胃癌 MKN-45 细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(23)：2274 -2276.

[3] Takiguchi S，Matsuura N，Hamada Y，*et al*. Influence of CO2 pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth[J]. Surg Endosc，2000，14(1)：41 -44.

[4] Gutt C N，Kim Z G，Hollander D，*et al*. CO_2 environment influences the growth of cultured human cancer cells dependent on insufflation pressure[J]. Surg Endosc，2001，15(3)：314 -318.

[5] 徐春阳，梁志清，熊光武. 二氧化碳人工气腹对子宫内膜癌细胞体外生长的影响[J]. 中华妇产科杂志，2003，38(12)：766 -767.

[6] Schmidt A I，Reismann M，Kubler J F，*et al*. Exposure to carbon dioxide and helium reduces *in vitro* proliferation of pediatric tumor cells[J]. Pediatr Surg Int，2006，22(1)：72 -77.

[7] Leng J，Lang J，Jiang Y，*et al*. Impact of different pressures and exposure times of a simulated carbon dioxide pneumoperitoneum environment on proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cell lines[J]. Surg Endosc，2006，20(10)：1556 -1559.

（编辑 张 维）