基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1201-04

模拟二氧化碳气腹对人肾癌 786-O 细胞体外增殖的影响

邓新军,胡自力,姚善华
(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:通过建立体外模拟 CO_2 气腹环境,研究 CO_2 气腹对人肾癌 786-O 细胞增殖的影响。方法:建立体外模拟 CO_2 气腹环境,以 14 mmHg 气压对人肾癌 786-O 细胞作用不同时间(2、4 h),以培养于常规条件下肾癌细胞为对照,用 MTT 法检测细胞增殖情况;流式细胞仪检测细胞周期分布和细胞凋亡率;免疫细胞化学法检测增殖细胞核抗原(PCNA)和 Survivin 蛋白表达水平。结果:与对照组比较,CO_2 气腹处理后的两组人肾癌 786-O 细胞增殖速度明显加快($P<0.05$),且 48 h 后细胞增殖速度的加快与气腹作用时间呈直线相关($R^2=1$,$P<0.01$);细胞周期中处于增殖期的细胞比例显著增高($P<0.01$);PCNA 表达明显增强($P<0.01$);细胞凋亡率亦显著减少($P<0.05$),且凋亡率的减少与气腹作用时间呈直线相关($R^2=1$,$P<0.01$);Survivin 表达显著增强($P<0.01$)。结论:体外模拟 CO_2 气腹环境,可促进人肾癌 786-O 细胞增殖,且随着接触 CO_2 时间的延长,肾癌 786-O 细胞增殖速度加快。

【关键词】肾肿瘤;二氧化碳;气腹;增殖;凋亡
【中国图书分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-23

Effect of simulated CO_2 pneumoperitoneum on cell proliferation of human renal carcinoma 786-O cells line

DENG Xin-jun, et al
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of simulated carbon dioxide pneumoperitoneum environment on cell proliferation of human renal carcinoma 786-O cells in vitro. *Methods*: The renal carcinoma 786-O cells were exposed to simulated CO_2 pneumoperitoneum environment for different time periods (2 h or 4 h) under the pressure of 14 mmHg and those cultured in normal experimental condition as control, then proliferation viability of 786-O cells was observed by MTT assay close behind the exposure; cell cycle and apoptotic rate were detected by flow cytometry, the protein expression of PCNA and Survivin were examined by immunocytochemistry 48 h after exposure respectively. *Results*: Compared with the control group, Both of the treated groups showed cell proliferation was significantly increased ($P<0.05$), and the increasing had a linear relationship with exposure time ($R^2=1$, $P<0.01$); The proliferative index (PI) showed significant difference from that of control group ($P<0.01$); In cell cycle, the percentages of S-phase and G_2/M phase were significantly higher in treated groups than those in control group ($P<0.05$); PCNA protein was found to be significantly upregulated in treated groups ($P<0.05$). The apoptotic rates were significantly decreased ($P<0.01$), and the decreasing had a linear relationship with exposure time; the expressions of Survivin, which related with apoptosis, were significantly increased ($P<0.01$). *Conclusion*: Carbon dioxide could promote the proliferation of human renal carcinoma 786-O cells, and the proliferation would be sped up with the prolongation of exposure time.

【Key words】Tumor of kidney; Carbon dioxide; Pneumoperitoneum; Proliferation; Apoptosis

随着微创技术的发展,采用 CO_2 人工气腹腹腔镜替代传统开放手术治疗肿瘤正成为一种趋势,然而术后肿瘤腹腔扩散和穿刺点转移时有报道[1-3],其安全性受到质疑。关于术后肿瘤腹腔播散和转移的机制,研究认为气腹介质是影响肿瘤细胞增殖的重要因素之一[4]。本研究探讨了体外模拟 CO_2 气腹环境对肾癌细胞增殖的影响,报道如下。

作者简介:邓新军(1983-),男,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤。
通讯作者:胡自力,男,主任医师,E-mail:huzili6767@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

人肾癌 786-O 细胞株由第三军医大学野战外科研究所提供;高纯 CO_2 气体由重庆医科大学附属第二医院供气中心提供;模拟人工气腹培养罐(YG-1 型厌氧罐,北京检测仪器

有限公司)由重庆医科大学检验系微生物学教研室提供;自动气腹机(德国 MGB 公司)由重庆医科大学附属第二医院手术室提供;全自动酶标仪(Bio-Rad 公司)由重庆医科大学附属第一医院实验研究中心提供;流式细胞仪(Beckman Coulter 公司)由重庆医科大学生命科学研究所提供;鼠抗人 PCNA 单克隆抗体、兔抗人 Survivin 多克隆抗体及兔/鼠 SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肾癌 786-O 细胞培养于 RPMI1640、10%小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 培养液中,pH 值 7.2~7.4,孵育于 37℃、5%CO_2 环境中。每 2 d 更换 1 次培养液,磷酸盐缓冲液 (PBS)漂洗,0.25%胰酶 +0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)用于细胞消化,制成细胞悬液。

1.2.2 模拟 CO_2 气腹处理[5] 人肾癌 786-O 细胞置于紫外线消毒后的培养罐内,真空泵抽空罐内空气,通气孔接自动气腹机并通入 100%CO_2 气体,调节自动气腹机,维持罐内压力为 14 mmHg,分别处理 2 h 和 4 h 后放出罐内 CO_2,取出细胞继续培养于 37℃、5%CO_2 恒温孵育箱中。对照组细胞不做处理,直接培养于 37℃、5%CO_2 恒温孵育箱中。

1.2.3 四唑盐(MTT)比色试验 取处理组和对照组的细胞,分别制成细胞悬液,调整细胞浓度为 2.0×10^4 个/ml,按对照组、2 h 组及 4 h 组分别接种于 6 块 96 孔板中,置于 37℃、5%CO_2 培养箱内孵育,于处理后的第 0~5 d,每天同一时间取出 1 块 96 孔板,加入 MTT 后继续孵育 4 h 再加入二甲亚砜,充分混匀、溶解后,自动酶标仪选择 570 nm 波长,测定光吸收值(OD),记录其均值和标准差。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期变化及凋亡率 体外模拟 CO_2 气腹处理 2、4 h 后放在与对照组相同的环境中继续培养 48 h,取出培养瓶,消化、离心 10 min(1 000 r/min),PBS 漂洗后重复离心,弃上清,PBS 制备成单细胞悬液,将细胞滴入预冷的 75%乙醇,终浓度为 70%,边滴边振荡,放入 4℃冰箱待测。取出细胞悬液后 PBS 洗涤 2 次,PI 染液一步荧光插入法进行细胞核 DNA 染色 30 min,200 目尼龙网过滤,采用流式细胞仪分析,所得数据和图形应用 Multicycle DNA 含量和细胞周期分析软件进行处理。流式细胞仪检测及分析由重庆医科大学生命科学研究所完成。

1.2.5 免疫细胞化学 SP 法检测 PCNA 和 Survivin 表达 体外模拟 CO_2 气腹处理 2、4 h 后放在与对照组相同的环境中继续培养 48 h 后,取各组细胞制备细胞爬片,95%乙醇固定,按照 SP 试剂盒说明检测 PCNA 和 Survivin 蛋白的表达,以 PBS 代替一抗做阴性对照,以胞核或胞浆着色呈棕黄色或棕褐色为阳性结果。根据染色强度及阳性细胞数目进行半定量分析,采用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统随机计 200 个细胞,阳性表达率 =(阳性细胞数/200)×100%,所得结果进行统计学分析。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,所得数据采用单因素方差分析和 LSD-t 检验进行统计学分析,细胞增殖指数或凋亡率与气腹处理时间的关系采用线性回归分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测结果

人肾癌 786-O 细胞经压力为 14 mmHg CO_2 气腹处理后,两气腹组细胞生长速度显著快于对照组,且 4 h 组细胞生长速度显著快于 2 h 组,它们的增殖幅度均于第 5 d 较前下降(图 1)。分析各组 OD 值发现,2 h 组和 4 h 组分别与对照组比较,1~5 d 均高于对照组,但经统计学分析,第 1 d 差异不明显($P>0.05$),自第 2 d 起均有显著差异($P<0.05$);4 h 组与 2 h 组比较,得出以上同样的结果。

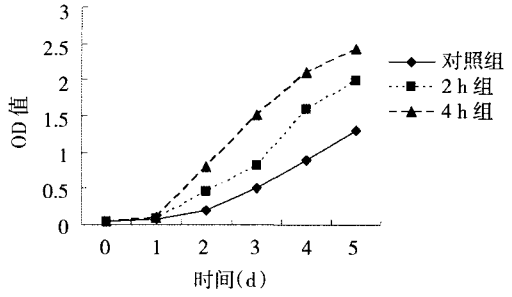


图 1 不同 CO_2 气腹时间处理后 786-O 细胞的生长曲线

2.2 各组细胞周期分布情况

流式细胞仪检测人肾癌 786-O 细胞周期结果显示,细胞周期中,两气腹组与对照组比较,G_0/G_1 所占比例均显著降低($P<0.01$),进入 S 及 G_2/M 期的细胞比例显著增高(P 均 <0.05);两气腹组相比得到同上结果。计算各组细胞增殖指数(Profileindex,PI),计算公式为 $PI=(S+G_2/M)/(G_0/G_1+S+G_2/M)\times100\%$,结果经统计学分析,2 h 组与对照组比较($P<0.01$)、4 h 组与对照组比较($P<0.01$)、4 h 组与 2 h 组比较($P<0.01$),均有非常显著差异(表 1),且经线性回归分析,786-O 的 PI 值与气腹处理时间存在直线关系($R^2=0.984$,$P<0.01$)。

2.3 PCNA 蛋白表达变化

PCNA 阳性表达呈棕黄色,强阳性呈棕褐色,主要分布于细胞核内,经 CO_2 气腹处理后,PCNA 蛋白的表达明显增多(如图 2~4)。计算各组 PCNA 蛋白阳性表达率分别为对照组(0.20 ± 0.11)、2 h 组(0.26 ± 0.32)、4 h 组(0.32 ± 0.14),经统计学分析,2 h 组和 4 h 组分别与对照组比较,差异均有统计学意义(P 均 <0.01);4 h 组与 2 h 比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 各组细胞凋亡率的改变

流式细胞术检测各组凋亡率,结果为:对照组(5.43 ± 0.34)、2 h 组(3.65 ± 0.17)、4 h 组(1.96 ± 0.33)。经统计学分析,2 h 组和 4 h 组分别与对照组比较,差异均有统计学意义(P 均 <0.01);4 h 组与 2 h 组比较,差异亦有统计学意义($P<0.01$)。且采用线性回归分析发现,细胞凋亡率与气腹持续时间存在

直线关系（R^2=1.000，P<0.01）。

2.5 Survivin 蛋白的表达变化

Survivin 阳性表达呈棕黄色或棕褐色，主要分布于细胞浆内，经 CO_2 气腹处理后，Survivin 蛋白的表达较对照组显著增强（如图 5~7）。计算各组 Survivin 蛋白阳性表达率分别为对照组（0.048 ± 0.11）、2 h 组（0.065 ± 0.05）、4 h 组（0.084 ± 0.21），经统计学分析，2 h 组和 4 h 组分别与对照组比较，差异均有显著性（P 均 <0.01）；4h 组与 2h 比较，差异亦有统计学意义（P<0.01）。

表 1 CO_2 气腹对人肾癌 786-O 细胞周期的影响（$\bar{x} \pm s$，%）

分组	细胞周期			PI
	G_0/G_1	S	G_2/M	
对照组	91.41 ± 0.62	4.42 ± 0.13	4.17 ± 0.05	8.59 ± 0.62
2 h 组	88.23 ± 0.32#	6.75 ± 0.35*	5.01 ± 0.07*	11.77 ± 0.32#
4 h 组	84.58 ± 0.21#	10.16 ± 0.20*	5.26 ± 0.05*	15.42 ± 0.21#

注：* 各气腹组与对照组比较 P<0.05，# 各气腹组与对照组比较 P<0.01

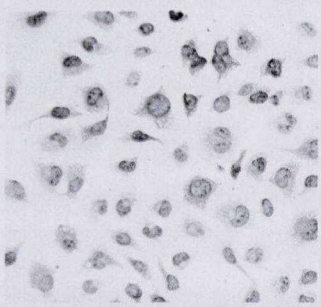


图 2 对照组 PCNA 蛋白的表达（SP × 100）



图 3 2 h 组 PCNA 蛋白的表达（SP × 100）

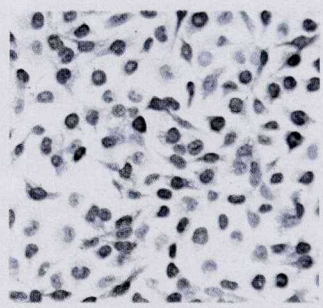


图 4 4 h 组 PCNA 蛋白的表达（SP × 100）

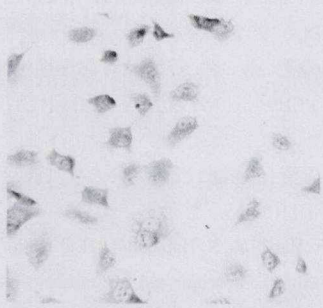


图 5 对照组 Survivin 蛋白的表达（SP × 100）

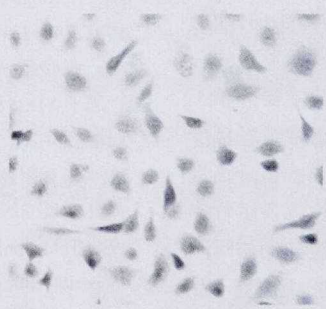


图 6 2 h 组 Survivin 蛋白的表达（SP × 100）

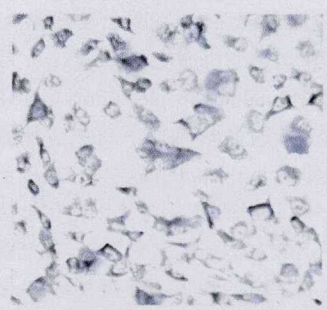


图 7 4 h 组 Survivin 蛋白的表达（SP × 100）

3 讨 论

腹腔镜下肿瘤切除术最早用于治疗盆腔、腹腔肿瘤。直到 1990 年 6 月 Clayman 等[6]应用腹腔镜为 1 例 85 岁妇女施行肾切除，并获成功，从此，腹腔镜在泌尿系统肿瘤的治疗中得以发展。特别是近年来经腹腔镜根治性肾切除、保留肾功能的肾部分切除、肾肿瘤剜除等新手术的开展，成为泌尿外科微创手术的热点。腹腔镜手术与开放手术比较，具有术后疼痛轻、术中出血少、住院时间短、康复快、并发症少、切口瘢痕小等优点，但术后肿瘤腹腔播散和穿刺孔转移时有发生[1-3]，而关于 CO_2 气腹对肿瘤细胞生物学特性影响的报道很不一致，多数学者认为 CO_2 气腹对肿瘤细胞的增殖起促进作用[7,8]，但也有学者认为 CO_2 气腹并不能促进肿瘤细胞的增殖[9]。而有关 CO_2 气腹对肾癌细胞生长的影响，目前尚未见报道。

本研究通过建立体外 CO_2 气腹模型，采用腹腔镜手术时常用气腹压力 14 mmHg，研究 CO_2 气腹及不同气腹作用时间对人肾癌 786-O 细胞生长的影响，MTT 比色法检测结果表明，2 h 组和 4 h 组细胞生长速度均明显快于对照组（P<0.05），这说明 CO_2 人工气腹可促进人肾癌 786-O 细胞的增殖。对人宫颈癌 CaSki 细胞的研究也得到了类似的结果[10]，促进其增殖的机制可能与气腹产生的机械压力、局部微酸环境、机体免疫力和肿瘤细胞生物学特性的改变等方面有关[11]。

细胞周期分为 DNA 合成期（Synthesis phase，S 期）、DNA 合成前的第 1 间隔期（Gap 1 phase，G_1 期）、DNA 合成后的第 2 间隔期（Gap 2 phase，G_2 期）及有丝分裂期（Mitosis phase，M 期），细胞生长活跃时其 DNA 合成及有丝分裂活动旺盛，即细胞增殖指数（PI）较高。本实验中，流式细胞术结果表明，无论是 2 h 组还是 4 h 组，人肾癌 786-O 细胞的增殖指数均明显高于对照组（P<0.01），即细胞增殖速度明显加快。我们还发现，两气腹组比对照组细胞处于 G_0/G_1 期的比例显著降低（P<0.01），而进入 S 期和 G_2/M 期细胞比例均较对照组增高

($P<0.05$),说明经 CO_2 人工气腹处理后,有更多的细胞越过了 G_1/S 限制点进入分裂增殖期。因此我们认为,CO_2 促进人肾癌细胞增殖可能是通过某种机制改变其分裂周期,促进 DNA 合成及其有丝分裂来实现的。

为进一步探讨 CO_2 气腹改变肾癌细胞周期的可能机制,我们检测了 PCNA 的表达情况,PCNA 又称周期蛋白(Cyclin),是一种核内蛋白,在增殖细胞中的含量变化有明显的周期性,在 G_0 期基本无表达,G_1 晚期开始增加,在 S 期达高峰,G_2-M 期迅速下降,此变化与细胞内 DNA 复制的时相变化相一致。因此 PCNA 是伴随细胞增殖而表达的一种核内蛋白[12]。Jussila 等进行了一系列研究,其结果表明 PCNA 的合成与表达均与肿瘤细胞增殖状态相关,可作为 S 期的特异性标志[13]。本研究中,流式细胞术结果显示 2 h 组和 4 h 组肾癌细胞处于 S 期比例均显著高于对照组($P<0.01$),进一步采用免疫细胞化学 SP 法检测 PCNA 表达情况,结果显示 PCNA 在 2 h 组和 4 h 组肾癌细胞中的表达分别与对照组比较均明显增强($P<0.01$),由此我们进一步推断,CO_2 促进人肾癌细胞增殖可能是通过增加 PCNA 基因的表达,以改变细胞分裂周期,从而促进了肾癌细胞的 DNA 合成及有丝分裂。

细胞凋亡与增殖总是相辅相成的,细胞凋亡减少,使细胞不断聚集,有利于细胞增殖。本研究检测各组细胞凋亡率发现,经 CO_2 气腹处理后,细胞凋亡显著减少($P<0.01$),这可能也是促进细胞增殖的机制之一。Survivin 是新近发现的一种凋亡抑制蛋白(Inhibitor apoptosis protein,IAP)。主要分布于胚胎及分化未成熟的组织,在成人终末分化的正常组织极少表达。肾癌组织中 Survivin 的高表达往往提示患者预后不良及较高的复发率。本研究采用免疫细胞化学法检测各组肾癌细胞中 Survivin 蛋白的表达,结果发现,各气腹组分别与对照组比较,Survivin 蛋白的表达明显增加($P<0.01$),说明经 CO_2 气腹处理后,人肾癌 786-O 细胞的抗凋亡能力增强,从而有助于细胞的增殖。

肾癌细胞的增殖指数与气腹作用时间存在直线相关($P<0.01$),其凋亡率的减少与气腹作用时间亦存在直线相关($P<0.01$)。这些说明随着 CO_2 气腹处理时间的延长,肾癌细胞的增殖能力增强,而凋亡减少。干晓琴等[14]通过研究 CO_2 气腹对宫颈癌细胞的影响,亦发现类似的现象。关于 CO_2 气腹持续时间与肿瘤细胞增殖的关系,Kume 等[15]通过比较术前肉眼均未发现膀胱肿瘤的 28 例开腹肾癌根治术和 13 例腹腔镜肾癌根治术,结果发现腹腔镜组的术后膀胱转移率显著高于开腹组,经多因素分析结果显示两组的区别主要在于腹腔镜组手术时间显著长于开腹手术,从而推测手术时间过长可能是腹腔镜手术造成肿瘤转移的重要因素。

我们认为,体外模拟持续 14 mmHg 压力 CO_2 气腹环境,能促进人肾癌 786-O 细胞的增殖和生长,且随着暴露于 CO_2 环境中时间的延长,肿瘤细胞增殖速度加快。因此,临床操作时应尽量缩短手术时间,可有助于降低术后 PSM 的发生。但我们的研究是基于体外实验,CO_2 气腹促进肿瘤细胞生长的机制还需进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Yasuda K, Kawa G, Kinoshita H, et al. Port-site metastasis of an upper urinary tract urothelial carcinoma after laparoscopic nephrouretere ctomy: a case report[J]. Hinyokika Kiyo, 2009, 55(3): 141-144.

[2] Kumar A, Gupta N P, Hemal A K, et al. A single institution experience of 141 cases of laparoscopic radical nephrectomy with cost-reductive measures[J]. J Endourol, 2009, 23(3): 445-449.

[3] Davies A R, Ahmed W, Purkiss S F. Port site metastasis following diagnostic laparoscopy for a malignant Gastro-intestinal stromal tumour[J]. World J Surg Oncol, 2008, 6(5): 55.

[4] Jacobi C A, Sabat R, Hm B, et al. Pneumoperitoneum with carbon dioxide stimulates growth of malignant colonic cancer cells [J]. Surgery, 1997, 121(8): 72-78.

[5] 干晓琴,姚珍薇,王华斌,等.一种腹腔镜人工气腹体外模型的建立及评价[J]. 重庆医科大学学报,2006,31(5):722-724.

[6] Clayman R V. Laparoscopic nephrectomy: initial case report[J]. J urol, 1991, 146(1): 278.

[7] 张晓慧,张爱荣,张 萍,等.CO_2 对卵巢癌细胞株 SKOV3 抗凋亡因子 XIAP 和 PED/PEA-15 表达的影响[J].现代妇产科进展,2007,1(16):25-28.

[8] 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.

[9] Takiguchi S, Matsuura N, Hamada Y, et al. Influence of CO_2 pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth [J]. Surg Endosc, 2000, 14(1): 41-44.

[10] 王华斌,姚珍薇,干晓琴,等. CO_2 对人宫颈癌细胞株 CASKI 的增殖及 CDK4 和 Cyclin D1 表达的研究[J].重庆医科大学学报,2007,32(12):384-386.

[11] 袁喜红,印 慨. 腹腔镜 CO_2 气腹对肿瘤种植转移影响的研究进展[J]. 腹腔镜外科杂志,2007,3(12):259-262.

[12] 李 刚,李 强,党建功.增殖细胞核抗原与泌尿系肿瘤[J]. J Modern Urol, 2002, 7(2): 120-121.

[13] Jussila T, Stenback F. Cell proliferation markers and growth factors in overian cancer[J]. Ann Med, 1995, 27(1): 87.

[14] 干晓琴,姚珍薇. CO_2 气腹对人宫颈癌 CaSki 细胞 Survivin 和 Bcl-2 表达的影响[J].第三军医大学报,2007,13(29):1323-1325.

[15] Kume H, Teramoto S, Tomita K, et al. Bladder recurrence of upper urinary tract cancer after laparoscopic surgery[J]. J Surg Oncol, 2006, 1593(3): 318-322.

(责任编辑:冉明会)