维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0261-03

腹腔镜不同气腹介质对人宫颈癌细胞株 CaSki 体外生长影响的研究

干晓琴,姚珍薇,王华斌

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨腹腔镜不同气腹介质对人宫颈癌细胞株 CaSki 体外生长的影响。方法:体外培养 CaSki 细胞,模拟腹腔镜建立 CO_2 气腹和 N_2 气腹处理细胞,另设未处理组为对照。采用 MTT 法、流式细胞术及电镜比较各组 CaSki 细胞的生长情况。结果:处理后 48h 起 CO_2 促进 CaSki 细胞生长,N_2 组在处理后 48~72h 短暂抑制细胞增殖;CO_2 组 G_2-M 期细胞明显增加;CO_2 组细胞见明显核分裂像,N_2 组可见线粒体肿胀,核周间隙扩大。结论:CO_2 气腹促进 CaSki 细胞生长,而 N_2 气腹则起一定的抑制作用。

【关键词】腹腔镜;二氧化碳;N_2;气腹;宫颈肿瘤;体外生长

【中国图书分类法分类号】R737.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-08-15

Effect of different pneumoperitoneums on the growth of human cervical carcinoma cells in vitro

GAN Xiaoqin, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the effects of different pneumoperitoneums used in laparoscopy on the growth of human cervical carcinoma cells in vitro. *Methods*: Human cervical carcinoma cell line (CaSki) were cultured in vitro and then exposed to pneumoperitoneums of pure carbon dioxide or pure nitrogen gas with the untreated group as control. The cell growth was determined by MTT assay, flow cytometry and electron microscopy. *Results*: Carbon dioxide stimulated the cell growth from 48h to 120h after treatment. For nitrogen gas group, there was a transient descent of cell proliferation from 48h to 72h after treatment. The tumor cells of carbon dioxide group in G_2-M phases significantly increased. Active karyokinesis was observed in carbon dioxide group while slight mitochondrion swelling was observed in nitrogen gas group with the nucleus space expanded. *Conclusions*: Carbon dioxide pneumoperitoneum could increase the growth of human cervical carcinoma cells in vitro whereas nitrogen gas pneumoperitoneum had inhibiting effect on the cell growth.

【Key words】Laparoscopy; Carbon dioxide; Nitrogen gas; Pneumoperitoneum; Cervical neoplasm; Cell growth in vitro

自 1993 年腹腔镜治疗恶性肿瘤后腹壁切口肿瘤转移被报道以来,人们开始认识到需要作深入的研究来评估腹腔镜行恶性肿瘤手术的安全性。目前认为腹腔镜术后出现腹壁切口和腹腔内肿瘤种植和转移的机制,除与手术者操作粗暴和技术不熟练、肿瘤的侵袭性、气腹的压力、机体免疫功能等有关外,还与腹腔镜术中人工气腹所采用的气腹介质类型有密切的关系。研究认为,不同气腹介质对肿瘤细胞的生长所产生的影响也不同。本研究旨在通过建立腹腔镜体外模型,比较 CO_2 气腹和 N_2 气腹对人宫颈癌细胞株 CaSki 细胞体外生长的影响。

作者介绍:干晓琴(1975-),女,博士生,
主要研究方向:妇科肿瘤与腹腔镜。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 模拟人工气腹培养罐 为不锈钢密封罐,内有一金属支架,外有压力表和通气孔。北京市检测仪器厂产品。

1.1.2 细胞株来源 人宫颈癌细胞株 CaSki 由重庆医科大学基础医学院分子生物学教研室宋芳洲教授惠赠。

1.1.3 RPMI-1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司,新生牛血清购自杭州四季青公司,MTT 和胰蛋白酶购自美国 Amresco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

维普资讯 http://www.cqvip.com

CaSki 细胞培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液中，pH 值为 7.2~7.4。置于含 5% CO_2 和 95% 空气的 37℃恒温孵箱内培养。0.9% 生理盐水或磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞，0.1% 胰酶 +0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化细胞。2~3 天更换培养液，4~5 天传代。

1.2.2 模拟人工气腹处理：

将密封罐消毒后，放适量温热三蒸水于罐底保持罐内湿度。处理时将细胞置于密封罐内，用真空泵抽空罐内空气，经自动气腹机通入 100% CO_2 或 100% N_2，保持罐内压力为 7mmHg。4h 后放出罐内气体，取出细胞继续培养于含 5% CO_2 和 95% 空气的 37℃恒温孵箱内。对照组：细胞直接置于含 5% CO_2 和 95% 空气的 37℃恒温孵箱内培养。

1.2.3 MTT 法描绘细胞生长曲线：

将人工气腹处理后的细胞和对照组细胞继续培养 6~8h 后，经胰酶消化，台盼蓝计数，稀释成 2.5×10^4 个 /ml 细胞悬液，以每孔 200μl 细胞悬液即 5×10^3 个细胞接种于 5 块 96 孔板，每组设 8 个平行孔。分别于处理后 24h、48h、72h、96h、120h 从孵箱中取出一块 96 孔板，吸去培养液，加入 200μl/ 孔 RPMI1640 和 20μl/ 孔 MTT(5mg/ml)。在孵箱中继续培养 4h 后取出，吸去 RPMI1640 和 MTT，加入 200μl/ 孔二甲基亚砜 (DMSO)。然后在自动酶标仪内振荡 10min 后测定各孔在 570nm 波长处的吸光度值(A 值)。实验重复 3 次，记录其均值和标准差($\bar{x}\pm s$)。以处理后的培养时间(h)为横坐标，吸光度值(A 值)均值为纵坐标，绘制各组细胞的生长曲线。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期：

将人工气腹处理后的细胞和对照组细胞置孵箱内继续培养 48h，经胰酶消化、离心、PBS 洗涤 2 次后，缓慢加入 -20℃预冷的 70% 乙醇固定细胞，将细胞吹散成单个细胞，每组标记好置于 4℃冰箱中待测。标本用 PBS 洗涤 2 次后将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合，4℃放置 30min，将样本放入流式细胞仪的样品室，以激发波长 488nm 测定，用 ModFit.LT2.0 软件分析细胞周期分布。

1.2.5 透视电镜观察细胞超微结构变化：

将人工气腹处理后的细胞和对照组细胞置孵箱内继续培养 48h，经胰酶消化、离心、PBS 洗涤 2 次后缓慢加入 4℃保存的 4% 戊二醛作预固定，固定 2h 后去掉戊二醛，再用 1% 四氧化锇作后固定 2h(pH7.2~7.4)，酒精及丙酮逐级脱水，环氧树脂 618 浸透包埋。先制作 0.5μm 厚的半薄切片，经甲苯胺兰染色后定位，再制备超薄切片，经醋酸双氧铀及枸橼酸铅双重电子染色，H-600 型透视电镜观察。

1.3 统计学方法

数据均用($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用多个样本均数间的多重比较 SNK-q 检验，用 SPSS10.0 软件处理数据。

2 结 果

2.1 各组细胞的生长曲线比较(见图 1)

处理后第 24h、48h，各组的吸光度值无明显差异($P>0.05$)。第 72h、96h、120hCO_2 组各时间点吸光度值均明显高于 N_2 组和对照组，差异有统计学意义；N_2 组吸光度值在处理后第 48~72h 下降，之后上升，但各时间点吸光度值始终低于 CO_2 组和对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 各组细胞周期分布比较(见表 1)

处于 G_2-M 期的细胞比例 CO_2 组明显高于 N_2 组和对照组，差异有显著性($P<0.05$)。而处于

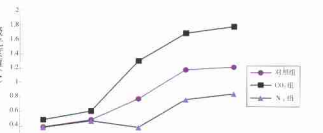


图 1 不同气体处理后 CaSki 细胞的生长曲线

表 1 不同气体处理后细胞周期分布情况(%)($\bar{x}\pm s$)

组别	G_0-G_1	S	G_2-M
CO_2 组	65.40 ± 0.48	20.59 ± 0.19	14.0 ± 0.21
N_2 组	68.60 ± 0.35	27.35 ± 0.32	4.05 ± 0.09
对照组	67.58 ± 0.74	22.13 ± 0.27	10.29 ± 0.14

G_0-G_1 期和 S 期的细胞比例三组无显著差异($P>0.05$)。

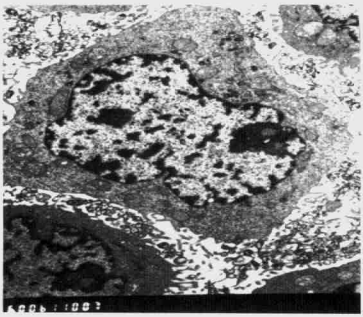
2.3 各组细胞超微结构形态特征比较(见图 2)

对照组电镜下见肿瘤细胞核大，畸形、核仁明显，多个核仁边集。胞核以常染色质为主，胞浆游离核糖体丰富，微绒毛长。CO_2 组可见明显核分裂像。N_2 组可见细胞轻度损伤：线粒体肿胀、核周间隙扩大。

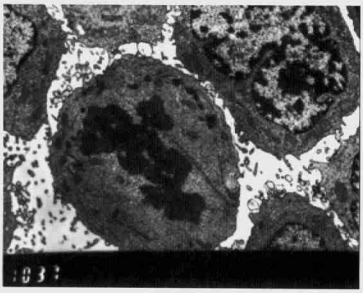
3 讨 论

自法国 Mouret 完成第 1 例腹腔镜胆囊切除术以来，由于其创伤小、恢复快、住院日短等优点，以腹腔镜为代表的微创外科手术在普外、妇产[1]、泌尿等各个外科领域得到广泛应用。但腹腔镜应用于恶性肿瘤的治疗其安全性一直是腹腔镜专家们关注的问题，尤其是 CO_2 人工气腹是否促进肿瘤生长和转移，目前尚存在较多分歧。大多数的研究显示，与氮气、氙气、空气、氧化亚氮等气体相比较，CO_2 促进肿瘤细胞的生长和转移[1,2]。在妇科恶性肿瘤中，已有关于 CO_2 人工气腹促进卵巢癌[3]、子宫内膜癌[4]体

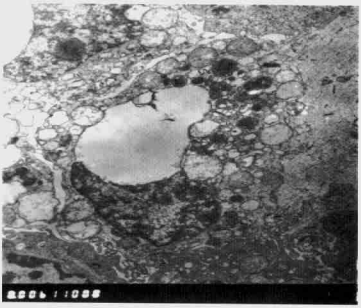
维普资讯 http://www.cqvip.com



对照组(6000×)



CO_2 处理组(3500×)



N_2 处理组(8000×)

图 2 各组细胞电镜观察结果

外生长的研究,但其对宫颈癌细胞体外生长的影响目前尚未见报道。本实验中我们选用高危型人乳头瘤病毒 HPV16 阳性的人宫颈癌细胞株 CaSki 细胞作为研究对象,其能很好地反映宫颈癌的临床生物学特性。

我们的实验发现,与对照组和 N_2 气腹相比,CO_2 气腹促进 CaSki 细胞的体外生长。关于 CO_2 气腹促肿瘤生长的机制,目前尚不清楚。有研究[5]认为,CO_2 气腹后造成一过性的酸性环境,而在酸性环境中,细胞有能力将需氧代谢转化为厌氧代谢,从而有利于激活细胞有丝分裂相关酶类;此外,瘤细胞内辅酶Ⅰ/Ⅱ比值下降,可保护之不受氧自由基的损害,认为这可能是 CO_2 气腹促肿瘤生长的原因。但国内吴步初等[6]的动物实验却发现静脉推注 5%$NaHCO_3$ 纠正酸中毒后并不能改善 CO_2 气腹对肿瘤细胞生长的影响,表明酸中毒并不是 CO_2 气腹促肿瘤细胞生长的原因。Smidt VJ 等[7]的研究也发现单纯的酸性培养基并无促进人卵巢癌细胞 $SKOV_3$ 生长的作用,认为 CO_2 可能不是通过降低 pH 值,而是直接特异地影响了人卵巢癌细胞的生长。也有人[8]认为 CO_2 人工气腹后细胞内外缺氧,细胞增殖时游离 Ca^{2+} 浓度下降,从而引起细胞内外调节的基本功能参数发生变化如 ATP 氧化磷酸化作用等可能是 CO_2 促肿瘤细胞生长和增殖的原因。我们的研究表明,处于 G_2-M 期的细胞比例 CO_2 组明显高于 N_2 组和对照组,差异有显著性($P<0.05$),因而推测 CO_2 促进 CaSki 细胞的生长可能是通过某种未知的机制调节细胞周期使 CaSki 细胞更多的从 S 期进入 G_2-M 期进行分裂增殖所致。而这种可能的机制有待我们进一步研究。

我们的研究还发现,N_2 气腹抑制人宫颈癌细胞株 CaSki 的体外生长。关于 N_2 气腹对肿瘤细胞生长的影响研究较少,目前国内外尚无关于 N_2 气腹抑制肿瘤细胞生长的报道。Tan BJ 等[9]的体外研究发现,与 CO_2 气腹相比,N_2 气腹可以促进肿瘤细胞的黏附和增殖。但国内黄锐等[10]的裸鼠模型实验却认为 N_2 气腹对 SD 大鼠的乳腺癌细胞 SHZ88 细胞种植和生长并无促进作用。我们的电镜结果发现,N_2 组可见细胞线粒体肿胀,核周间隙扩大。因此我们推测 N_2 气腹可能通过改变部分细胞超微结构而对 CaSki 细胞起一定的抑制和损伤作用,从而抑制肿瘤细胞的生长。N_2 是一种比较低廉、易得的惰性气体,如果用 N_2 气腹代替 CO_2 气腹将不失为一种经济、简便的办法。但目前关于 N_2 气腹抑制肿瘤细胞生长的报道极少,及如何杜绝其可能引起栓塞的安全隐患,还需要作进一步的研究。

(下转第 321 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

中 1 例瘤体中心可见瘢痕,伴放射状结缔组织梁状结构,均未行 MRI 检查。

3.2 本组 21 例误诊原因及教训

①对良性肾脏肿瘤的临床及影象学表现的认识不足,遇到肾脏占位性病变时,常误诊为肾脏恶性肿瘤。②没有详细的把病史、症状、体征和影像学检查结合起来综合分析,造成误诊。③对于肾脏单发低密度灶,需密切结合临床及其他辅助检查,除外肾脏良性占位病变后,方可诊断为肾癌[13]。④腹腔镜肾切除的应用也相应增加了误诊率,诊断不明确的肾良性肿瘤应谨慎选用腹腔镜技术治疗[14]。⑤术中冰冻病理检查没有得到应有的重视。⑥对于特殊病例,术前没有进行穿刺活检;近来报道 CT 引导下穿刺活检敏感性和准确率均接近 100%[15]。⑦临床对保留肾单位手术重视不够。有目的,有依据的行保留肾单位的肿瘤切除术或肾部分切除术是减少误诊误治的最后机会[16]。所以对一些特殊病例,如孤立肾、双肾多发肿瘤查找原发病变、高度怀疑淋巴瘤等行保留肾单位的肿瘤切除术就显得尤为重要。

参 考 文 献

[1] Warshauer DM,McCarth SM,StreeL,et al.Detection of renal mass:Sensitivities and specificities of excretory urography/linertomography,US and CT[J].Radiology,1988,169:363-365.

[2] 方昆亳.泌尿生殖系疾病影像诊断图谱[M].广州:广东科技出版社,1998.137-138.

[3] Bosniak MA,Megibow AJ,Hulnick DH,et al.CT diagnosis of renal angiomyolipoma:the importance of detecting small amounts of fat[J].AJR,1988;151:497-501.

[4] 孔祥田,夏同礼,曾 荔,等.肾血管平滑肌脂肪瘤影像学误诊原因的探讨[J].中华泌尿外科杂志,1998;19:685-659.

[5] Hendrson RJ,Germany R,Peavy PW,et al.Fat density in renal cell carcinoma:demonstration with computerized tomography[J].J Urol,1997;157:1347-1348.

[6] Nelson CP,Sanda MG.Contemporary diagnosis and managementof renal angiomyolipoma[J].J Urol,2002;168(4Pt1):1315-1325.

[7] 林 涛,魏 强,杨宇如,等.肾癌与肾血管平滑肌脂肪瘤间的误诊分析[J].中华泌尿外科杂志,2002;23:138-139.

[8] Cloix P,Martin X,Pangaud C,et al.Surgial management of complex renal cysts:aseries of 32 cases[J].J Urol,1996;156:28-30.

[9] 赵 力,苗延巍,郎志谨.肾癌的 MRI 诊断、鉴别诊断及术前分期评估[J].实用放射学杂志,1999;15:663-666.

[10] Jinzaki M,Tanimoto A,Narimatsu Y,et al.Angiomyolipoma:Imaging find in lesions with minimal fat[J].Radiiology,1997;205:497-502.

[11] 唐孝达.良性肾实质肿瘤.见:郭应禄,主编.泌尿男生殖系肿瘤[M].北京:人民卫生出版社,2000.302-307.

[12] Newhouse JH,Wagner BJ.Renal oncocytomas [J].Abdom Imag,1998;23:249-255.

[13] 齐 桓,郑少斌,谭万龙.良性占位性病变误诊为肾癌的原因分析[J].中华泌尿外科杂志,2004;25(5):300-302.

[14] GillIS,Desa iMM,Kaouk JH.Laparoscopic partial nephrectomy for renal tumor:duplicating open surgical techniques [J].J Urol,2002;167:469,24-72.

[15] Caoili EM,Bude RO,Higgins EJ,et al.Evaluation of sonographically guided percutaneous core biopsy of renal masses[J].AJR,2002;179:373-378.

[16] 蔡 伟,王晓雄,洪宝发,等.肾良性肿瘤和瘤样病变诊治分析中华泌尿外科杂志,2004;25(3):149-151.

(上接第 263 页)

总之,鉴于我们的研究发现 CO_2 气腹可以促进人宫颈癌细胞株 CaSki 的体外生长,N_2 气腹则起一定的抑制和损伤作用,因此在临床中应用腹腔镜 CO_2 人工气腹行宫颈癌根治术时应持审慎态度。N_2 是否可能成为代替 CO_2 的候选气腹介质值得深入研究。

参 考 文 献

[1] Dahn S,Schwalbach P,Maksan S,et al. Influence of different gases used for laparoscopy (helium,carbon dioxide,room air,and xenon)on tumor volume,histomorphology,and leukocyte-tumor-endothelium interaction in intravital microscopy[J].Surg Endosc,2005;19(1)65-70.

[2] 喇端端,季晓琼,王 灏,等.腹腔镜中不同膨腹气体抑制肿瘤细胞生长的体外对比研究[J].中华实验外科杂志,2001;18(2):183.

[3] Smidt VJ,Singh DM,Hurteau JA,et al. Effect of carbon dioxide on human ovarian carcinoma cell growth[J].Am J Obstet Gynecol,2001;185(6):1314-1317.

[4] 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.

[5] Jacobi CA,Sabat R,Bohm B,et al. Pneumoperitoneum with carbon dioxide stimulates growth of malignant colonic cells [J].Surgery,1997;121(1):72-78.

[6] 吴步初,喇端端,季晓琼,等.二氧化碳气腹对肿瘤细胞生长和播散影响的研究[J].现代诊断与治疗,2004;15(4):199 - 201;205.

[7] Wildbrett P,Oh A,Naundorf D,et al. Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function[J]. Surg Endosc,2003;17(1):78-82.

[8] Tan BJ,Dy JS,Chiu PY,et al.Effects of pneumoperitoneal gases and pressures on transitional cell carcinoma adhesion, growth, apoptosis and necrosis: an in vitro study [J]. Urol,2005; 174 (4 Pt 1):1463-1467.

[9] 黄 锐,刘 彦,金志军,等.气腹对裸鼠腹腔恶性肿瘤细胞种植和生长的影响[J].第二军医大学学报,2003;24(3):285-287.