维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0722-03

一种腹腔镜人工气腹体外模型的建立及评价

干晓琴[1],姚珍薇[1],王华斌[1],袁 瑞[1],余 琴[1],彭 勤[1],赵纯全[1],刘明方[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;2.重庆医科大学检验系微生物教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立腹腔镜人工气腹体外模型并评价其效果。方法:采用不锈钢密封罐和自动气腹机建立腹腔镜人工气腹体外模型,用 MTT 法观察 CO_2 气腹(7mmHg,4h)对人宫颈癌细胞 CaSki 体外生长的影响, 实验重复 3 次。设未处理组为对照。结果:CO_2 气腹组和对照组同次处理的组间比较结果显示, 处理后第 24h、48h 两组吸光度值无明显差异 ($P>0.05$), 处理后第 72h、96h、120h CO_2 组各时间点吸光度值明显高于对照组($P<0.05$)。两组组内 3 次重复实验同一时间点所测吸光度值(A)无显著差异($P>0.05$)。结论:采用密封罐和自动气腹机建立的腹腔镜人工气腹体外模型是一种进行腹腔镜体外研究的理想模型;采用该模型发现 CO_2 气腹促进人宫颈癌细胞 CaSki 的体外生长。

【关键词】腹腔镜;人工气腹;体外模型;宫颈肿瘤

【中国图书分类法分类号】R713,R737.33 【文献标识码】B 【收稿日期】2006-3-30

Establishment and assessment of a laparoscopic pneumoperitoneum model in vitro

GAN Xiaoqin, et al

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

【Abstract】*Objective*: To establish and assess a laparoscopic pneumoperitoneum model in vitro. *Methods*: The model was established by a special airtight container made of stainless steel and an automatic pneumoperitoneum meter. After the cervical carcinoma cell line (CaSki) was exposed to 100% carbon dioxide in this model, the effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on the cell growth was determined with MTT assay. And the experiment was repeated for three times. *Results*: There was no significant difference of the absorbance values at 24h、48h after exposure between the two groups ($P>0.05$), but at 72h, 96h, 120h after exposure, the absorbance values in carbon dioxide pneumoperitoneum group were always significantly higher than those in control group at the same time ($P<0.05$). There was no significant difference of the change of the absorbance values either in the carbon dioxide pneumoperitoneum group or in the control group among three times ($P>0.05$). *Conclusions*: The model established with a special airtight container and an automatic pneumoperitoneum meter is an ideal one for research about laparoscopy in vitro, and the carbon dioxide pneumoperitoneum in this model increases the in vitro growth of human cervical carcinoma cells.

【Key words】Laparoscopy; Pneumoperitoneum; Model in vitro; Cervical neoplasm

近年来,腹腔镜手术在恶性肿瘤领域的应用引起了广泛的关注,尤其是 CO_2 人工气腹是否促进肿瘤细胞的生长是目前研究的热点。这方面的认识多来自于动物模型的研究, 体外模型较少且不统一。我们采用不锈钢密封罐和自动气腹机建立了一种模拟腹腔镜人工气腹的体外模型,用于研究 CO_2 人工气腹是否促进人宫颈癌细胞株 CaSki 的体外生长。本文将对该模型的建立方法作一阐述并进行评价。

作者介绍: 干晓琴(1975-),女,博士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 模拟人工气腹培养罐(见图 1、2) 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。由重庆医科大学检验系微生物教研室提供。

1.1.2 自动气腹机 由重庆医科大学附属第一医院妇产科提供。

1.1.3 真空泵 由重庆医科大学基础医学院研究所提供。

1.1.4 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方洲教授惠赠。

1.2 方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

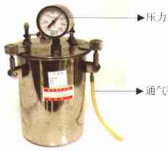


图 1 培养罐外观



图 2 培养罐构造

1.2.1 实验前准备 将密封罐用 75%酒精擦拭消毒，再置于超净工作台上用紫外灯照射 4~6h。

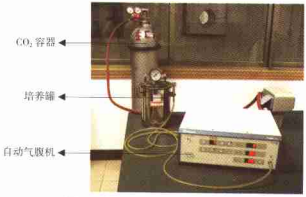


图 3 人工气腹体外模型示意图

1.2.2 模拟人工气腹模型的建立（见图 3）

在密封罐底部放适量温热三蒸水保持罐内湿度。将 CaSki 细胞接种于培养瓶后置于密封罐内的金属支架上，保持培养罐密封状态。用真空泵从通气孔处抽空罐内空气，再经自动气腹机向罐内通入 100% CO_2 使罐内压力达到 7mmHg 后夹闭通气孔。将密封罐置于恒温水浴箱中保持罐内温度稳定在 37℃。4h 后放出罐内 CO_2，取出细胞继续培养于含 5%CO_2 和 95%空气的 37℃恒温孵箱内。对照组细胞直接培养于含 5%CO_2 和 95%空气的 37℃恒温孵箱内。

1.2.3 MTT 法检测气腹处理后细胞生长情况：

将 CO_2 气腹处理后的细胞和对照组细胞用胰酶消化，以每孔 200μl，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 后吸去 RPMI1640 和 MTT，加入 200μl/孔二甲基亚砜（DMSO）。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（$\bar{x}\pm s$）。

1.3 统计学方法

组间比较用两样本 t 检验，组内 3 次重复实验的结果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

CO_2 气腹组和对照组分别重复 3 次实验，组内同一时间点所测吸光度值无显著差异（$P>0.05$）（见表 1、2）。

CO_2 气腹组和对照组同次处理的组间比较显示，处理后第 24h、48h 两组吸光度值无显著差异（$P>0.05$），而处理后第 72h、96h、120h CO_2 组各时间点吸光度值明显高于对照组（$P<0.05$）（见表 1、2）。

表 1 CO_2 气腹重复 3 次处理后各时间点的吸光度值(A)

处理次数	24h（$\bar{x}\pm s$）	48h（$\bar{x}\pm s$）	72h（$\bar{x}\pm s$）	96h（$\bar{x}\pm s$）	120（$\bar{x}\pm s$）
第 1 次	0.4851 ± 0.0252	0.6107 ± 0.0358	1.3485 ± 0.0455	1.6941 ± 0.0511	1.7597 ± 0.0621
第 2 次	0.4925 ± 0.0196	0.6212 ± 0.0405	1.3042 ± 0.0397	1.7021 ± 0.0567	1.8042 ± 0.0704
第 3 次	0.4885 ± 0.0247	0.6252 ± 0.0410	1.2731 ± 0.0385	1.6960 ± 0.0624	1.8052 ± 0.0715

表 2 对照组重复 3 次实验各时间点的吸光度值(A)

处理次数	24h（$\bar{x}\pm s$）	48h（$\bar{x}\pm s$）	72h（$\bar{x}\pm s$）	96h（$\bar{x}\pm s$）	120（$\bar{x}\pm s$）
第 1 次	0.4024 ± 0.0114	0.5081 ± 0.0325	0.7952 ± 0.0327	1.1796 ± 0.0329	1.2092 ± 0.0623
第 2 次	0.3956 ± 0.0125	0.5066 ± 0.0347	0.7803 ± 0.0314	1.1985 ± 0.0318	1.2397 ± 0.0581
第 3 次	0.3963 ± 0.0237	0.4907 ± 0.0421	0.7918 ± 0.0205	1.2015 ± 0.0401	1.2738 ± 0.0596

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

近年来，随着腹腔镜应用范围的逐渐扩大，临床医生开始将腹腔镜试用于恶性肿瘤的手术治疗。但是，自从关于腹腔镜术后发生腹壁切口和腹腔内肿瘤种植和转移的报道以来，腹腔镜应用于恶性肿瘤治疗的安全性成为近年来腹腔镜专家们广泛关注的问题。也因此开展了大量关于腹腔镜 CO_2 气腹是否促进肿瘤细胞生长的基础研究。

以往的研究长期依赖于动物模型，以裸鼠模型多见。不仅耗时、耗财，而且由于裸鼠体积小，也不能很好地模拟腹腔镜人工气腹环境。体外模型研究较少。国内孟宪瑛等[1]建立的体外模型是将细胞悬液注入无菌医用引流袋（带防漏阀）中，用自动气腹仪经无菌过滤系统自引流袋入口注入 CO_2 等气体。徐春阳等[2]则直接将 CO_2 通入培养瓶中或将培养板放入塑料容器中进行处理。而 Smidt VJ 等[3]将细胞培养于一个带有进气阀和出气阀的密闭容器中。我们在实验中采用不锈钢材料的密封罐和气腹机建立腹腔镜人工气腹体外模型，突破了以往体外模型易污染、实验条件不易控制、重复性差等局限性，具备以下特点和优点：

①培养罐密封性能好，夹闭通气孔后能保持罐内压力恒定，无需持续通气；

②真空泵预先抽空罐内空气，可保证罐内充入气体的纯度；

③与自动气腹机连接，可根据实验需要精确调控如充入气体类型、气体流量、处理压力和处理时间等实验条件；

④能保证实验所需湿度和温度；

⑤能保证细胞处于无菌状态不被污染。

基于上述原因，我们建立的体外模型能最大程度地模拟腹腔镜人工气腹环境，因而结论也更客观、准确。我们的研究发现，与对照组相比，CO_2 气腹促进 CaSki 细胞的体外生长。这与大多数学者的报道一致。孟宪瑛等[1]采用 3H-TdR 掺入法，比较了 R15 肝癌细胞株在经过 CO_2、He 和 Air 气腹条件后肿瘤细胞摄取胸腺嘧啶核苷合成 DNA 的情况，结果表明 CO_2 刺激肝癌细胞的体外生长。国内徐春阳等[2]发现 CO_2 气腹可以促进子宫内膜癌细胞的体外生长。但是，Takiguchi S[4]等对人结肠癌细胞的研究却得出了相反的结论。他们的研究认为 CO_2 并不促进肿瘤细胞的生长，相反还起一定的毒性作用。分析发生结论差异的原因可能与不同细胞株具有不同生物学特性有关。但是，同样的细胞株也有不同的结论。Smidt VJ 等[3]报道 CO_2 可以促进人卵巢癌细胞 $SKOV_3$ 的生长，但蒋宇林等[5]的研究则认为 CO_2 对人卵巢癌细胞 $SKOV_3$ 的体外生长起抑制作用。因此研究者所建立体外模型的方法不同可能也是导致结论差异的原因之一。

总之，关于腹腔镜 CO_2 人工气腹是否促进恶性肿瘤细胞的生长及其可能的机制目前尚未明确。理想的实验模型有助于评估腹腔镜应用于恶性肿瘤的治疗安全性，为临床腹腔镜的应用和发展提供理论指导。我们建立的体外模型操作简单、快捷、经济、重复性好，为腹腔镜的基础研究提供了一种有效、实用的实验手段，是一种理想的体外模型。

参 考 文 献

[1] 孟宪瑛，王广义，许淑芬，等.不同气腹介质对肿瘤细胞体外生长的影响[J].中华普通外科杂志，2003；18（8）：483-484.

[2] 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.

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

[5] 蒋宇林，冷金花，郎景和.体外模拟二氧化碳气腹环境对卵巢癌细胞凋亡的影响[J].中华妇产科杂志，2004；39（9）：634-635.