DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.041

3 讨论

腰5横突有各种变异或畸形,导致横突与骶骨翼之间间隙不对称、变小等,所以腰5_1骶$_1$椎间盘穿刺应根据腰5椎体特点(X线片)结合临床表现决定从何侧进针,腰5_1骶$_1$椎间盘前侧方为大血管和神经,腰5神经根粗,多有动静脉伴行穿出横突,髂腰韧带与骶骨翼之间的横行隧道,故腰5神经及其血管比较固定,不易移行,穿刺时易损伤。采用细穿刺针,正确的穿刺角度及屈髋、屈膝、俯卧位能减少这一并发症,术中应严密监视并及时X光摄片证实穿刺针位置。

APLD技术作为治疗腰椎间盘突出症的一种新方法,在国内外文献已多见报道,且在西方国家作为一种常规方法应用于临床,说明该方法的疗效是肯定的,目前国内外对该项技术的研究也有日趋深入、成熟。文献记载国内外较普遍使用的APLS、AMD、PLD等,我们认为它们虽然在名称上、器械、操作等有些不同,但经皮穿刺腰椎间盘切除均需在X线引导下进行;套管内操作等方面是一致的。我院采用的是不带关节镜的国产APLD系统,尚未发现严重并发症,优良率达94%,我们认为无论从安全的角度还是疗效上来看,与是否有关节镜无明显差异。

采用APLD的技术治疗腰椎间盘突出症,因其属微孔手术且又属介入放射范畴,故其适应证的选择是不同于开放式手术的。笔者参考了其它作者的文献和我们的体会认为适应症经CT、MRI等方法确诊为:①膨隆型;②后外侧突出型;③滑动脱出型(包括中央型);脱出之椎间盘不超过椎管矢状径的50%,不伴有嵌顿、CT片示没有锐角形成。④症状与体位(包括放射学检查)基本一致;⑤经保守治疗3~6个月无效或反复发作者;⑥直腿抬高试验在60°以下者。禁忌证:①既往有椎间盘及椎管内开放手术;②有严重的小关节内聚,黄韧带肥厚,侧隐窝狭窄等退行性改变;③纤维环破裂髓核游离于椎管内;④椎管间盘脱出以外的其它占位性病变;⑤严重的心肺功能疾患。

APLD术治疗腰椎间盘突出症的治疗机理主要是减压、吸气、复位、孙钢等的尸体实验报告发现该方法可将30%的髓核组织吸出[2]。1985年Kambin通过椎间盘内压力传感器测量在APLD手术前椎间盘内压高达18 mmHg;术后压力骤降至9.4 mmHg,差异十分显著。一般认为髓核抽吸量为1.8 g即可达到治疗效果[3],本组30例髓核切吸量均2.0 g以上,所以我们认为切吸出足够量的髓核,特别是椎间盘背侧的瘢痕组织的切除会使减压和复位更充分,效果非常明显。

切吸术与其它疗法的关系:①切吸术与开放手术及传统的保守疗法可互相补充,而不能互相取代。②当腰椎间盘突出部分尚无钙化、骨化、破裂、髓核疝出的情况下,行切吸治疗是恰当的,如有核间盘突出合并黄韧带肥厚、骨性椎管狭窄、骨性侧陷窝狭窄、小关节退行性变者,则应开放手术。

根据目前文献报道,实施该手术时只要定位准备、角度及穿刺距离适当,操作过程中严密监视,有较高的安全性,且损伤小、恢复快,无严重并发症,患者容易接受等优点,使部分患者免受开刀之苦,成本低,适合有条件医院开展。

关键词:腰5_1骶$_1$椎间盘突出;APLD;髓核
中图法分类号:R681.53 文献标识码:B

参考文献:

[1] 刘加林. 关于经皮髓核摘除术的三个问题[J]. 中华骨科杂志,1993,121(2):11.
[2] 孙钢等. 自控式经皮穿刺椎间盘切吸仪及临床应用[J]. 中华放射学杂志 1992,26(6):367.
[3] 王 胜. 经皮腰椎间盘切除术中国骨伤,中华骨科杂志,1993,6(1):45.

(编辑 薛国文)

经验交流

文章编号:1000-5404(2003)18-1682-02

三氧化二砷诱导结肠癌LS-174T细胞凋亡及其抑制增殖作用

Apoptosis induction and proliferation inhibition by arsenic trioxide on colon cancer cell line LS-174T

陈红兵,葛海燕 (第三军医大学附属新桥医院普通外科,重庆 400037)

结直肠癌是当前最常见的消化道恶性肿瘤之一,癌细胞的早期浸润和转移特别是肝转移使其预后一直无显著的改善。三氧化二砷(As_2O_3)已成功地应用于临床治疗急性早幼粒细胞性白血病(Acute promyelocytic leukemia, APL),取得良好的效果[1]。本实验研究As_2O_3作用于人结肠腺癌细胞株LS-174T,观察其体外诱导肿瘤细胞凋亡和抑制增殖作用,为临床上应用As_2O_3治疗结直肠癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠腺癌LS-174T细胞株购自中科院上海细胞所,常规于CO_2孵箱中培养。亚砷酸注射液(每支10 ml,内含As_2O_3 10 mg)由哈尔滨医科大学第一临床医院提供(批号:国药准字

作者简介:陈红兵(1972-),男,河南省信阳县人,硕士研究生,医师,主要从事于结直肠癌肝转移的治疗方面的研究。电话:(023)68774605
收稿日期:2001-09-29;修回日期:2001-12-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

X19990191)。凋亡(TUNEL)试剂盒为德国 Roche 公司产品。

1.2　方法

取对数生长期细胞接种于 24 孔培养板(1×10^4/孔), 实验组分别加含 As_2O_3 浓度为 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 μmol/L 的培养液 200 μl, 对照组加等体积的正常培养液。连续培养 6 d。倒置显微镜观察细胞增殖及形态改变。每天消化各浓度 3 孔, 台盼蓝染色, 计活细胞数, 绘制生长曲线, 计算各浓度细胞增殖抑制率(%)=(对照组 6 d 癌细胞数－实验组 6 d 癌细胞数)/对照组 6 d 癌细胞数×100%。另收集各组分别培养 24、48 h 的细胞, 流式细胞仪(Flow cytometry, FCM)检测凋亡细胞百分数。

含 4.0、8.0 μmol/L As_2O_3 的培养液于内置盖玻片的培养皿中培养细胞 48 h 后取出盖玻片, 按照 Roche 公司凋亡试剂盒说明书进行: 各标本加 TUNEL 反应液 50 μl 37 ℃ 60 min; POD 液 50 μl 37 ℃ 30 min; 50 μl DAB-H_2O_2 显色液室温显色 10 min。光镜下观察, 细胞核呈棕黄色为 TUNEL 阳性。根据染色强度分为 5 级: 阴性(－); 淡棕色为弱阳性(±); 阳性(＋); 棕色为中度阳性(＋＋); 褐色为强阳性(＋＋＋)。正常培养细胞为阴性对照。另取盖玻片 HE 染色后光镜下观察。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 8.0 统计软件包直线相关分析和 χ^2 检验进行数据统计和分析。

2　结果

2.1　As_2O_3 对 LS-174T 细胞增殖的影响

正常 LS-174T 细胞呈梭形上皮样贴壁生长。在 As_2O_3 作用下, 癌细胞逐渐变圆、变小, 折光性减弱, 贴壁能力下降, 细胞间隙增大直至漂浮死亡。As_2O_3 浓度越大, 上述表现越明显。活细胞计数表明, As_2O_3 对 LS-174T 细胞增殖的抑制作用随浓度增大和时间延长而增强, 呈现明显量效和时效关系, 见图 1。各浓度细胞增殖抑制率分别为: 15.3%、37.9%、74.2%、89.9%、97.2%, 与 As_2O_3 浓度呈正相关(相关系数 $r=0.83$, $P<0.01$)。

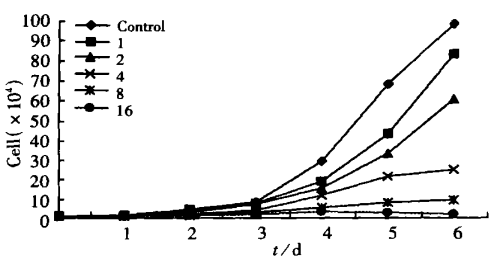


图 1　As_2O_3 作用下 LS-174T 细胞的生长曲线

2.2　As_2O_3 对 LS-174T 细胞凋亡的诱导

As_2O_3 作用后, FCM 均可检测到亚 G_1 期凋亡峰, 1.0～8.0 μmol/L 范围, 凋亡细胞百分数进行性增加, 见表 1, 24 h 组和 48 h 组凋亡细胞百分数与浓度均呈正相关(相关系数: 24 h 组 $r=0.999$; 48 h 组 $r=0.967$)。与对照组相比, 1.0～2.0 μmol/L 浓度组凋亡百分数均有显著差异($P<0.05$); 4.0～8.0 μmol/L 浓度组凋亡百分数差异非常显著($P<0.01$)。但 16.0 μmol/L 浓度组凋亡百分数反而下降, 与对照组相比无差异($P>0.05$)。原位凋亡检测, 4.0、8.0 μmol/L As_2O_3 作用 48 h 后镜下可见较多的 TUNEL 阳性细胞。HE 染色, 光镜下见细胞体积变小, 核固缩, 染色质凝聚、浓缩呈新月形紧贴于核膜周边及凋亡小体形成等凋亡形态学改变。

表 1　流式细胞仪凋亡百分率(μmol/L, %)

	对照组	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0
24 h	1.46	5.57 *	8.83 *	13.79 **	25.78 **	2.24
48 h	2.34	7.55 *	17.42 **	21.08 **	33.24 **	3.46

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

细胞凋亡是一种主动的细胞死亡形式。Wyllie[3] 认为, 肿瘤的发生发展同细胞凋亡的减少有关, 且通过逃避凋亡而促进肿瘤细胞的恶性转化及演进。因此, 人们逐渐认识到诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的治疗肿瘤的途径[3]。A_2O_3 是我国传统中药砒霜的主要成分, 1996 年, 张鹏等[1] 用 As_2O_3 注射液静滴治疗 72 例 APL, 完全缓解率高达 73.3%, 其机制为诱导 APL 细胞凋亡[4]。

本实验体外观察了不同浓度 As_2O_3 对结肠癌 LS-174T 细胞的生物学作用, 发现均不同程度地抑制 LS-174T 细胞的增殖, 且具有剂量-效应和时间-效应关系。倒置显微镜和 HE 染色光镜观察均可见细胞的凋亡改变。此外, FCM 结果显示随着 As_2O_3 浓度在 1.0～8.0 μmol/L 范围的增高和时间的延长, 细胞凋亡百分数进行性增加。证实 A_2O_3 通过诱导 LS-174T 细胞发生凋亡来抑制细胞的生长和增殖。而 A_2O_3 浓度为 16.0 μmol/L 时凋亡细胞百分数反而减少, 表明过高的剂量虽然有显著的细胞增殖抑制率, 但并非是通过诱导细胞凋亡途径, 而是使细胞受到极度刺激而造成病理性坏死。提示浓度过高, 对细胞毒性过大而造成大量细胞死亡。

实验结果表明, As_2O_3 可显著抑制人结肠腺癌 LS-174T 细胞的增殖和生长, 其机制与诱导人结肠腺癌 LS-174T 细胞发生凋亡有关, 且呈明显的剂量和时间依赖性, 显示应用 As_2O_3 治疗结肠癌细胞有一定的潜在价值。

关键词: 三氧化二砷; 结肠腺癌; LS-174T 细胞; 凋亡
中图法分类号: R735.35　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 闻勤生, 罗俊卿, 焦成松. 三氧化二砷诱导肝癌细胞 $HepG_2$ 凋亡作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 913－914.
[2] 张　鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病[J]. 中华血液病学杂志, 1996, 17(2): 58－60.
[3] Wyllie A H. Apoptosis and carcinogenesis[J]. Eur J Cell Biol, 1997, 73(5): 189.
[4] Hino N, Higashi T, Nouso K. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma[J]. Liver, 1996, 16(2): 123－129.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net