

## · 实验研究 ·

# CO<sub>2</sub> 气腹对荷瘤大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和腹膜巨噬细胞功能的影响

郭庆军<sup>①</sup> 裘正军 刘 俊 王瑞涛 钟福全 祝哲诚

(上海市第一人民医院普外科, 上海, 200080)

**【摘要】 目的** 采用种植性大鼠肝脏肿瘤模型观察 CO<sub>2</sub> 气腹对细胞因子和腹膜巨噬细胞功能的影响。 **方法** 荷瘤大鼠 32 只随机分为 4 组 (n=8): 对照组 (仅麻醉)、开腹组、免气腹组和 CO<sub>2</sub> 气腹组。术后 2、24 h 收集血清, 检测血清中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平; 术后 48 h, 收集培养腹膜巨噬细胞, 检测巨噬细胞产生的 TNF- $\alpha$  水平。 **结果** 术后 2、24 h 开腹组 IL-6 的水平分别为 (57.92  $\pm$  2.06) pg/ml, (35.49  $\pm$  1.15) pg/ml, 显著高于 CO<sub>2</sub> 气腹组 (14.64  $\pm$  0.34) pg/ml, (15.39  $\pm$  0.86) pg/ml, 免气腹组 (24.75  $\pm$  1.53) pg/ml, (17.10  $\pm$  0.97) pg/ml 和对照组 (17.75  $\pm$  1.60) pg/ml, (14.55  $\pm$  0.25) pg/ml ( $P < 0.05$ )。术后 2 h 开腹组 IL-1 $\beta$  的水平为 (92.63  $\pm$  4.81) pg/ml, 显著高于 CO<sub>2</sub> 气腹组 (57.94  $\pm$  4.46) pg/ml、免气腹组 (58.48  $\pm$  3.20) pg/ml 和对照组 (58.99  $\pm$  2.30) pg/ml ( $P < 0.05$ )。CO<sub>2</sub> 气腹组腹膜巨噬细胞产生的 TNF- $\alpha$  水平为 (35.69  $\pm$  3.54) pg/ml, 显著低于免气腹组 (68.87  $\pm$  4.08) pg/ml、开腹组 (82.96  $\pm$  5.39) pg/ml 和对照组 (66.45  $\pm$  7.96) pg/ml ( $P < 0.05$ )。 **结论** 腹腔镜术后机体应激反应较小, CO<sub>2</sub> 气腹可能抑制腹膜巨噬细胞的功能。

**【关键词】** IL-1 $\beta$ ; IL-6; 巨噬细胞; TNF- $\alpha$

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2006)04-0306-03

**Effects of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on levels of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6, and peritoneal macrophages in tumor-bearing rats** Guo Qingjun, Qiu Zhengjun\*, Liu Jun\*, et al. \* Department of General Surgery, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China

**【Abstract】 Objective** To investigate effects of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on cytokines and peritoneal macrophages in a rat model with implanted liver tumor. **Methods** A total of 32 Wistar rats with implanted liver tumor were randomly divided into 4 groups (n=8): Control Group (anesthesia only), Laparotomy Group, Gasless Group (gasless laparoscopy), and Pneumoperitoneum Group (laparoscopy under CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum). Serum samples were collected at the 2nd and 24th hours after the procedure respectively for the detection of levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6). Samples of peritoneal macrophages were collected and incubated for the detection of levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a product of macrophages. **Results** At the 2nd and 24th hours after surgery, levels of serum IL-6 in the Laparotomy Group (57.92  $\pm$  2.06 pg/ml and 35.49  $\pm$  1.15 pg/ml) were significantly greater than those in the Pneumoperitoneum Group (14.64  $\pm$  0.34 pg/ml and 15.39  $\pm$  0.86 pg/ml), the Gasless Group (24.75  $\pm$  1.53 pg/ml and 17.10  $\pm$  0.97 pg/ml), and the Control Group (17.75  $\pm$  1.60 pg/ml and 14.55  $\pm$  0.25 pg/ml) ( $P < 0.05$ ). Levels of serum IL-1 $\beta$  at the 2nd postoperative hours were significantly higher in the Laparotomy Group (92.63  $\pm$  4.81 pg/ml) than in the Pneumoperitoneum Group (57.94  $\pm$  4.46 pg/ml), the Gasless Group (58.48  $\pm$  3.20 pg/ml), and the Control Group (58.99  $\pm$  2.30 pg/ml) ( $P < 0.05$ ). Levels of TNF- $\alpha$  from peritoneal macrophages were significantly lower in the Pneumoperitoneum Group (35.69  $\pm$  3.54 pg/ml) than in the Gasless Group (68.87  $\pm$  4.08 pg/ml), the Laparotomy Group (82.96  $\pm$  5.39 pg/ml), and the Control Group (66.45  $\pm$  7.96 pg/ml) ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** During laparoscopic surgery the systemic stress reaction is not distinctive. The carbon dioxide pneumoperitoneum may suppress functions of peritoneal macrophages.

**【Key Words】** Interleukin-1 $\beta$ ; Interleukin-6; Macrophage; Tumor necrosis factor- $\alpha$

<sup>①</sup> (现在天津市第一中心医院移植外科, 天津 300192)

腹腔镜恶性肿瘤手术存在戳孔肿瘤种植、转移,迄今为止其机制仍不清楚。本研究应用种植性 Wistar 大鼠肝脏肿瘤模型,观察腹腔镜手术对机体全身免疫功能和腹膜局部免疫功能的影响,探讨腹腔镜恶性肿瘤术后戳孔肿瘤种植、转移机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 种植性肝脏肿瘤动物模型的建立

①用空针从生长有 Walker256 腹水瘤的 Wistar 大鼠(购自上海医学工业研究院)腹腔内抽取腹水 0.5 ml,注入 Wistar 大鼠(健康、雄性、220 g 左右,购自中国科学院上海实验动物中心)腹股沟皮下,7 d 后形成直径约 5 mm 肿瘤。②切取肿块并切割成 2 mm×2 mm×3 mm 大小,放入 D-Hanks 液(Gibco 公司)中,4℃保存,存放时间<4 h。③取大鼠上腹部正中切口,长 3 cm,上至剑突,暴露肝脏,在肝右叶用显微镊钝性分离直径 3 mm 小裂口,将肿块塞入肝脏裂口内,1 周后在肝脏形成直径约 5 mm 肿瘤。

### 1.2 动物分组及手术过程

雄性荷瘤 Wistar 大鼠 32 只,采用随机数字表法将其分成 4 组( $n=8$ ):①对照组:仅予乙醚吸入麻醉;②开腹组:上腹正中切口,长约 6 cm,上至剑突,暴露肝脏,不处理肝脏肿瘤;③免气腹组:用 7 号丝线经剑突下悬吊腹壁于机械支架上,在腹正中线下 1/3 交点处做一横行切口,用丝线做一荷包缝合,放入 5 mm trocar 后,收紧打结,经此 trocar 置入关节镜(直径 5 mm,30°,德国 Storz 公司)。在左、右上腹部同上置入 trocar,经此 2 个 trocar 分别置入分离钳和抓持钳,不处理肝脏肿瘤;④CO<sub>2</sub> 气腹组:同免气腹组置入 trocar,CO<sub>2</sub> 气体经下腹部 trocar 冲入,压力为 6 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),流量为 2 L/min。在左、右上腹部 trocar 分别置入分离钳和抓持钳,不处理肝脏肿瘤。

### 1.3 细胞因子检测

1.3.1 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的检测 术后 2 h 和 24 h,断尾取血 1 ml,静置 2 h,离心取血清约 200  $\mu$ l, -80℃保存待测。用 ELISA 法检测血清中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6(试剂盒由上海茂元科技有限公司提供)。

1.3.2 巨噬细胞培养及 TNF- $\alpha$  检测 ①术后 48 h,取下腹正中小切口,置入 7 号导管。将 20 ml D-Hanks 液冲入腹腔内。2 min 后,虹吸法吸取 12 ml 灌洗液。4℃,1000 r/min,离心 5 min,收集沉淀。②将沉淀放入 RPMI1640 培养液(含加强型小

牛血清、青霉素和庆大霉素,Gibco 公司),混匀并计数巨噬细胞,每毫升培养液含  $1 \times 10^6$  个细胞,用苜蓿蓝染色,活细胞计数在 95% 以上。将 1 ml 悬浮液放入 24 孔培养板(Costar 公司)中,每一标本同时培养 2 份,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中(37℃、CO<sub>2</sub> 5%)进行培养。③培养 3 h 后轻摇培养板,倾弃培养板中液体,用 Hanks 液清洗 2 次,除去未贴壁的细胞;此时,贴壁的细胞主要是巨噬细胞,纯度可达 95%<sup>[1]</sup>。在培养板中加入 1 ml 培养液,每孔中加入 LPS 5  $\mu$ g,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h。④收集培养液,4℃,3000 r/min 离心 5 min,取上清液, -80℃保存待测。用 ELISA 法检测细胞培养液中的 TNF- $\alpha$ (试剂盒由上海茂元科技有限公司提供)。

### 1.5 统计学方法

用 SPSS11.0 软件处理数据。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组资料应用方差分析进行检验,如果有显著性差异,应用 Student-Newman-Keuls 法进行比较。 $P<0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 手术时间

对照组为 20 min,开腹组为  $(16 \pm 2.4)$  min,免气腹组为  $(25 \pm 3.4)$  min, CO<sub>2</sub> 气腹组为  $(28 \pm 4.4)$  min。开腹组操作时间显著短于 CO<sub>2</sub> 气腹组( $q=11.208, P<0.05$ )、免气腹组( $q=8.406, P<0.05$ )和对照组( $q=3.736, P<0.05$ ),而 CO<sub>2</sub> 气腹组操作时间显著长于对照组( $q=7.472, P<0.05$ )。

### 2.2 术后各组 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的比较

术后 2 h 和 24 h,开腹组大鼠血清 IL-6 的水平明显高于 CO<sub>2</sub> 气腹组( $q=80.455, 64.941; P<0.05$ )、免气腹组( $q=61.661, 59.416; P<0.05$ )和对照组( $q=74.674, 67.655; P<0.05$ ),见表 1。

术后 2 h,开腹组大鼠血清 IL-1 $\beta$  的水平明显高于 CO<sub>2</sub> 气腹组( $q=25.644, P<0.05$ )、免气腹组( $q=25.245, P<0.05$ )和对照组( $q=24.868, P<0.05$ )。术后 24 h,开腹组 IL-1 $\beta$  的水平与 CO<sub>2</sub> 气腹组、免气腹组和对照组之间无统计学意义( $P>0.05$ ),仍高于免气腹组( $q=6.797, P<0.05$ ),见表 1。

术后 48 h,CO<sub>2</sub> 气腹组大鼠腹膜巨噬细胞产生的 TNF- $\alpha$  水平明显低于免气腹组( $q=17.022, P<0.05$ )、开腹组( $q=24.250, P<0.05$ )和对照组( $q=15.780, P<0.05$ ),见表 1。

表 1 术后各组 IL-6、IL-1β、TNF-α 的比较 ( pg/ml)

组别	IL-6		IL-1β		TNF-α
	术后 2 h	术后 24 h	术后 2 h	术后 24 h	术后 48 h
对照组 (n=8)	17.75 ± 1.60	14.55 ± 0.25	58.99 ± 2.30	50.89 ± 2.97	66.45 ± 7.96
开腹组 (n=8)	57.92 ± 2.06	35.49 ± 1.15	92.63 ± 4.81	49.06 ± 1.42	82.96 ± 5.39
免气腹组 (n=8)	24.75 ± 1.53	17.10 ± 0.97	58.48 ± 3.20	53.91 ± 2.05	68.87 ± 4.08
CO <sub>2</sub> 气腹组 (n=8)	14.64 ± 0.34	15.39 ± 0.86	57.94 ± 4.46	49.01 ± 1.12	35.69 ± 3.54
F 值	1367.28	1035.89	159.52	10.40	104.36
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论

3.1 腹腔镜手术对机体全身的免疫功能的影响

血清中 IL-6、IL-1β 是反映组织损伤早期、敏感度的指标,它们的水平反映了手术创伤的严重程度<sup>[2]</sup>。本研究发现,尽管开腹组操作时间显著短于其他 3 组,但术后 2、24 h,开腹组 IL-6 水平明显高于 CO<sub>2</sub> 气腹组、免气腹组和对照组;术后 2 h,开腹组 IL-1β 水平显著高于 CO<sub>2</sub> 气腹组、免气腹组和对照组。Haq 等<sup>[3]</sup>在临床研究发现,开腹胆囊切除术后血清 IL-6 水平显著高于腹腔镜胆囊切除组。Suter 等<sup>[4]</sup>在另一临床对照研究中也发现,开腹疝修补术后 IL-1β、IL-6 水平显著高于腹腔镜腹膜外修补术组。上述结果说明腹腔镜术后机体的应激反应程度较轻,对机体免疫功能影响较小,不利于肿瘤的转移生长。

3.2 CO<sub>2</sub> 气腹对腹膜局部免疫功能的影响

腹膜巨噬细胞在腹膜局部免疫功能的调节中起着重要作用,如抵抗感染和肿瘤细胞的侵袭<sup>[5]</sup>。巨噬细胞清除异物的功能,部分是通过其分泌的细胞因子 TNF-α 介导的<sup>[6]</sup>。CO<sub>2</sub> 气腹可能改变了腹膜局部的微环境,使腹膜局部免疫功能降低<sup>[7,8]</sup>。其机制可能是腹膜局部酸性化致腹膜局部巨噬细胞功能降低<sup>[9]</sup>。本研究结果表明术后 48 h CO<sub>2</sub> 气腹组大鼠巨噬细胞分泌 TNF-α 的含量明显低于免气腹组、开腹组和对照组。West 等<sup>[10]</sup>在体外试验中,将小鼠的腹膜巨噬细胞和 CO<sub>2</sub> 进行混合培养,发现其分泌 TNF-α 的含量明显低于氮气。Jackson 等<sup>[5]</sup>将人的单核细胞暴露于高浓度的 CO<sub>2</sub> 气体环境中,发现单核细胞分泌细胞因子的能力和吞噬功能降低,从而对结肠癌细胞的杀伤能力降低。结合本研究的结果,可以认为 CO<sub>2</sub> 气体能够抑制腹膜巨噬细胞的功能,使 TNF-α 的分泌减少,有利于肿瘤细胞的生长转移。

总之,腹腔镜术后机体应激反应较小,较好地保

留了机体的全身免疫功能;但 CO<sub>2</sub> 气体可能抑制腹膜局部巨噬细胞的功能,可能是戳孔处肿瘤转移的机制之一。

参考文献

1 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学技术出版社, 2001. 455.

2 Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, et al. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. Clin Sci, 1990, 79: 161 - 165.

3 Haq Z, Rahman M, Siddique MA, et al. Interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor-alpha in open and laparoscopic cholecystectomy. Mymensingh Med J, 2004, 13(2): 153 - 156.

4 Suter M, Martinet O, Spertini F. Reduced acute phase response after laparoscopic total extraperitoneal bilateral hernia repair compared to open repair with the Stoppa procedure. Surg Endosc, 2002, 16(8): 1214 - 1219.

5 Jackson PG, Evans SR. Intraperitoneal macrophages and tumor immunity: A review. J Surg Oncol, 2000, 75(2): 146 - 154.

6 Rofe AM, Bourgeois CS, Coyle P. Beneficial effects of endotoxin treatment on metabolism in tumor-bearing rats. Immunol Cell Biol, 1992, 70: 1 - 7.

7 Dahn S, Schwalbach P, Wohleke F, et al. Influence of different gases used for laparoscopy (helium, carbon dioxide, room air, xenon) on tumor volume, proliferation, and apoptosis. Surg Endosc, 2003, 17(10): 1653 - 1657.

8 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. Surg Endosc, 2005, 19(1): 65 - 70.

9 Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, et al. Influence of gases on intraperitoneal immunity during laparoscopy in tumor-bearing rats. World J Surg, 2000, 24: 1227 - 1231.

10 West MA, Hackam DJ, Baker J, et al. Mechanism of decreased in vitro murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide: relevance to laparoscopic surgery. Ann Surg, 1997, 226: 179.

(收稿日期: 2005 - 04 - 29)

(修回日期: 2005 - 06 - 27)