

• 实验研究 •

腹腔镜手术 CO₂ 气腹对绿色荧光蛋白标记活细胞血路肝迁徙的影响^{*}袁喜红 印 慨 高 军^① 吴红玉^① 郑成竹

(第二军医大学附属长海医院微创外科中心, 上海 200433)

【摘要】 目的 探讨腹腔镜手术 CO₂ 气腹对绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记活细胞血路肝迁徙的影响。 **方法** 将 SD 大鼠剖腹, 经门静脉注入转染 GFP 的 C57BL/6 小鼠肝细胞 (5×10^6 cells/只), 立即关腹后随机分成 4 组 (每组 10 只), 快速建立大鼠体内 CO₂ 气腹模型, 采用持续性不同强度的 CO₂ 气腹压力 (0.5、10、15 mm Hg) 进行处理。30 min 后处死动物取出肝脏, 肝组织取样行快速冰冻切片检查, 比较各组动物肝内荧光细胞的表达情况。 **结果** 各组 GFP 荧光细胞表达阳性率分别为: 无气腹组 8 只, 5 mm Hg 气腹组 9 只, 10 mm Hg 气腹组 9 只和 15 mm Hg 气腹组 10 只, 4 组差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.222, P = 0.528$)。各组 GFP 荧光细胞数日分别为: 无气腹组 6.63 ± 2.45 , 5 mm Hg 组 7.67 ± 2.83 , 10 mm Hg 组 13.89 ± 4.37 和 15 mm Hg 组 15.50 ± 6.29 , 4 组 GFP 荧光细胞数日有显著统计学差异 ($F = 10.78, P = 0.000$); 其中 10 mm Hg 和 15 mm Hg 气腹组 GFP 荧光细胞数日均明显高于无气腹组气和 5 mm Hg 气腹组, 有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。 **结论** 腹腔镜手术 CO₂ 气腹能促进 GFP 标记活细胞经血路肝脏迁徙、积累的发生, 并且随着气腹压力的升高作用越明显。

【关键词】 人工气腹; 动物模型; 绿色荧光蛋白; 大鼠

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2007)11-1108-03

Effect of CO₂ Pneumoperitoneum during Laparoscopy on Migration of GFP-labeled Living Cells into the Liver through Blood Route Yuan Xihong*, Yin Kai*, Gao Jun, et al. *Center of Microinvasive Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective To study the effect of CO₂ pneumoperitoneum on migration of GFP-labeled living cells into the liver through blood route in rat model. **Methods** SD rats was inoculated intraportally with high-dose (5×10^6) GFP-labeled liver cells from C57BL/6 mice after cutting belly open. Pneumoperitoneum was established immediately after closing the abdominal wall. The rats were randomly divided into four groups ($n = 10$ in each) to receive CO₂ pneumoperitoneum at 5, 10, or 15 mmHg, or no treatment other than cells inoculation (control). The pneumoperitoneum was maintained for 30 min. Afterwards, the rats were euthanized by cervical dislocation, and the liver of the rats was removed for fast frozen section biopsy. The expression of GFP-labeled living cells in rat livers was compared between the groups. **Results** No significant difference was detected in the positive expression of GFP-labeled cells between the groups (8 rats in the control group, 9 in the 5 mm Hg group, 9 in the 10 mm Hg group, and 10 in the 15 mm Hg group, $\chi^2 = 2.222, P = 0.528$). The mean number of GFP-positive cells in the four groups was 6.63 ± 2.45 (control), 7.67 ± 2.83 (5 mm Hg), 13.89 ± 4.37 (10 mm Hg), and 15.50 ± 6.29 (15 mm Hg). There was significant differences between the four groups ($F = 10.78, P = 0.000$). In addition, the numbers of GFP-positive cells in the high pressure groups (15 mm Hg and 10 mm Hg) were significantly higher than that in the low pressure group (5 mm Hg) and the control ($P < 0.05$). **Conclusions** CO₂ pneumoperitoneum can enhance the migration of GFP-labeled living cells into the liver through blood route. The effect of pneumoperitoneum increases with the pressure.

【Key Words】 Pneumoperitoneum, artificial; Animal model; Green fluorescent protein; Rat

腹腔镜技术在消化道恶性肿瘤手术中的应用已广泛开展, 但腹腔镜肿瘤手术后肿瘤腹腔扩散和穿刺点转移 (port-site metastasis, PSM) 的报道^[1,2] 使此项技术在消化道恶性肿瘤外科方面的应用受到质疑。近来有研究表明^[3], 持续 CO₂ 气腹压力可能促进结肠癌血路肝转移的发生, 但其具体过程尚不清楚。因此, 我们通过大鼠体内 CO₂ 人工气腹模型, 先经门静脉注入转染 GFP 基因的 C57BL/6 小鼠肝细胞, 采用不同强度的 CO₂ 气腹压力进行处理, 探讨腹腔镜不同 CO₂ 气腹压力对 GFP 标记细胞经血

路肝迁徙的影响, 旨在为今后临床腹腔镜 CO₂ 气腹手术中恶性肿瘤血路肝转移的防治提供实验和理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4~6 周龄 (体重 18~22 g) 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的转基因雄性 C57BL/6 小鼠 3 只 (长海医院心胸外科研究所惠赠); 6 周龄左右 (体重 200~220 g) 雄性 SD

* 全军“十一五”面上项目, 课题编号: 06MA162。

① (第二军医大学附属长海医院全军消化内科研究所, 上海 200433)

大鼠 40 只,购于第二军医大学动物中心。

1.1.2 主要仪器 荧光显微镜(德国 Leica 公司)、倒置显微镜(德国 Leica 公司)、冰冻切片机(德国 Leica 公司)和二氧化碳高流量气腹机(日本 OLYMPUS 公司)各 1 台。

1.2 方法

1.2.1 GFP 标记活细胞的获取 取 GFP 标记的转基因雄性 C57BL/6 小鼠,颈脱臼处死,采用胰蛋白酶消化法^[4],红细胞裂解液 4℃裂解红细胞 10 min, PBS 洗涤,将得到的细胞重新制成 5×10^6 cells/0.2 ml,行台盼蓝拒染色法检测细胞活力 >95% 以上,备用。

1.2.2 GFP 标记活细胞的接种 取禁食 8 h、禁饮 4 h 的 SD 大鼠,3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉;取左上腹 1.0 cm 左右长切口,于肝叶下方找到肝门静脉,用 29 G 针管经门静脉缓慢注入 GFP 标记小鼠肝细胞(5×10^6 cells/0.2 ml PBS),无菌纱布压迫注射点 30 s 左右,防止出血和细胞溢出迅速逐层关腹。

1.2.3 大鼠体内 CO₂ 气腹模型的建立 所有动物在 GFP 细胞接种后 3 min 内立即建立稳定 CO₂ 气腹。将动物随机分为 0、5、10、15 mm Hg 气腹组($n=10$),用 22 G 针管于大鼠右下腹穿刺,接 CO₂ 气腹机,流量为 0.4 L/min,气腹持续 30 min 后处死大鼠,获取肝脏组织,于肝右叶相同位置取样 1 cm³ 大小组织做厚约 10 μ m 的连续冰冻切片。

1.2.4 观察 ①荧光显微镜下观察各组大鼠肝脏组织中 GFP 荧光细胞表达的情况,描述其组织学分布特征;②各组大鼠肝组织 GFP 荧光细胞计数:每张冰冻切片高倍镜下计数 5 个视野,连续计数 10 张切片,相加为每只大鼠荧光细胞数目。

1.3 统计学分析

比较各组大鼠肝组织 GFP 荧光细胞表达阳性率(%),采用 χ^2 检验。各组大鼠肝组织 GFP 荧光细胞数目以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用单因素方差分析进行统计检验,多组间两样本均数比较采用 q 检验。用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 时有统计学差异, $P < 0.01$ 时有显著统计学差异。

2 结果

2.1 各组 GFP 荧光细胞表达的情况

荧光显微镜下观察,各组均有 GFP 荧光细胞表达:无气腹组 8 例,5 mm Hg 气腹组 9 例,10 mm Hg 气腹组 9 例和 15 mm Hg 气腹组 10 例,4 组间差异无统计学意义($\chi^2 = 2.222, P = 0.528$)。镜下观察无气腹和 5 mm Hg 低压力气腹组大部分 GFP 荧光细胞的组织学分布以肝血窦内为主,多数为散在单个分布,血管内均未能见到 GFP 荧光细胞的表达;10 mm Hg 和 15 mm Hg 高压力气腹组 GFP 荧光细胞表达更强,镜下可见 2 个成对分布于汇管区,甚至发现有成团状、成条状积聚于中央静脉、小叶下静脉(图 1~4)。

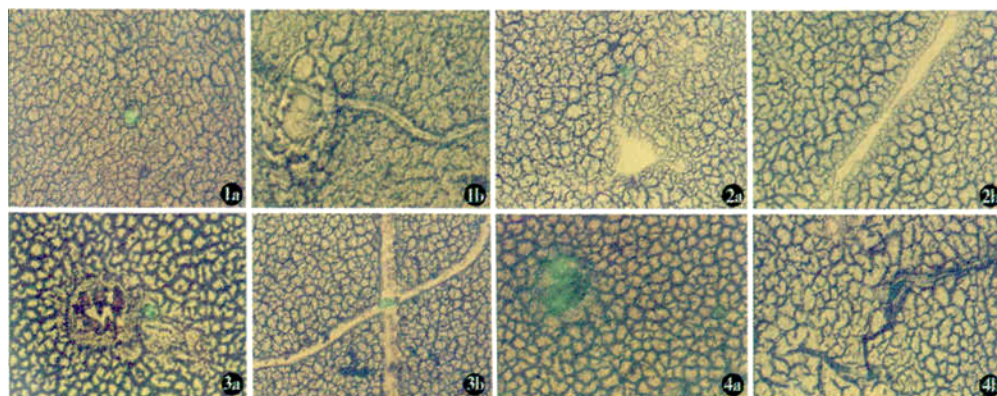


图 1 无气腹组:GFP 荧光细胞呈散在分布于肝血窦内,血管内未能见到 GFP 荧光细胞的表达 $\times 200$ 图 2 5 mm Hg 气腹组:GFP 荧光细胞呈散在地分布于肝血窦内,肝小叶中央静脉内、肝小叶下静脉内均未能见到 GFP 荧光细胞的表达 $\times 200$
图 3 10 mm Hg 气腹组:成对 GFP 荧光细胞分布于肝脉管区内,游离分布于小叶下静脉血管内 $\times 200$ 图 4 15 mm Hg 气腹组:大量呈团状的 GFP 荧光细胞分布于小叶中央静脉内,呈条状分布于小叶下静脉血管内 $\times 200$

2.2 各组 GFP 荧光细胞数目比较

无气腹组、5 mm Hg 气腹组、10 mm Hg 气腹组和 15 mm Hg 气腹组 GFP 荧光细胞数目见表 1。各组间 GFP 荧光细胞数目有显著统计学差异($F = 10.78, P = 0.000$)。15 mm Hg 气腹组和 10 mm Hg 气腹组 GFP 荧光细胞数目均明显高于无气腹组和 5 mm Hg 气腹组,有显著统计学差异($P < 0.01$),15 mm Hg 气腹组和 10 mm Hg 气腹组之间、无气腹组和 5 mm Hg 气腹组之间 GFP 荧光细胞数目却无统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来,国内外学者的许多研究主要集中在 CO₂ 气腹引起种植转移和加速肿瘤细胞生长等方面。研究结果显示,CO₂ 气腹下腹腔内气体的流动可造成手术穿刺孔的种植转移^[5],CO₂ 气体形成的腹腔内局部微酸性环境可促进某些肿瘤细胞的生长^[6]。这些研究结果对腹腔镜手术在恶性肿瘤治疗中应用的安全性评价具有一定的意义,但也存在较大的缺陷。这主要是因为这些研究的实验环境与临床实际应用有着较大的差距。例如,对 CO₂ 气腹

表 1 4 组 GFP 荧光细胞数目比较($\bar{x} \pm s$)

组别	GFP 荧光细胞数目
无气腹组($n=10$)①	6.63 \pm 2.45
5 mm Hg 气腹组($n=10$)②	7.67 \pm 2.83
10 mm Hg 气腹组($n=10$)③	13.89 \pm 4.37
15 mm Hg 气腹组($n=10$)④	15.50 \pm 6.29
F, P 值	10.78, 0.000
q, P 值	$q_{4-1} = 6.581, P < 0.05$
	$q_{4-2} = 5.809, P < 0.05$
	$q_{4-3} = 1.194, P > 0.05$
	$q_{3-1} = 5.386, P < 0.05$
	$q_{3-2} = 4.615, P < 0.05$
	$q_{2-1} = 0.772, P > 0.05$

状态下穿刺孔种植转移的研究方法是将肿瘤细胞悬液注入腹腔内。然而,目前腹腔镜手术在临床多用于较早期肿瘤的治疗方面,因此,不存在腹腔内有大量游离肿瘤细胞的状态。 CO_2 气腹对肿瘤细胞生长的促进作用则多是体外培养实验。已有研究证实,消化系统肿瘤患者在手术时血液中存在有游离的肿瘤细胞,这些肿瘤细胞与血路肝转移的发生有一定的相关性^[7]。在腹腔镜手术中, CO_2 气腹无疑会对腹腔内血管形成一定的压力,从而影响血流动力方面的变化,这种变化是否会影响肿瘤细胞的血路肝转移值得关注。

GFP 是从低等生物水母中分离出来的一种相对分子质量为 27 000 的蛋白质,在蓝光或近紫外光的照射下,不需要加入任何反应底物或酶即可发射绿色荧光,且荧光性质十分稳定,无光漂白现象发生^[8]。目前,GFP 已成为一种监测体内基因表达及细胞内蛋白定位、示踪完整活细胞生命现象的重要报告基因,在生物医学领域的应用日益广泛^[9,10]。在本实验中,我们通过成功建立稳定的大鼠体内 CO_2 气腹模型,先经门静脉注入转染 GFP 基因的 C57BL/6 小鼠肝细胞,采用不同强度的 CO_2 气腹压力进行处理;比较分析不同气压处理后 GFP 标记活细胞经血路迁徙在大鼠肝内积聚、表达的情况。实验大体上模拟了手术中肿瘤细胞在 CO_2 气腹作用下经血路肝转移、积聚的过程,从而间接分析腹腔镜手术 CO_2 气腹对肿瘤细胞经血路肝转移的影响。

本实验结果显示,虽然各组均发现有 GFP 荧光细胞表达,但从荧光细胞计数分析,10 mm Hg 和 15 mm Hg 高压气腹组 GFP 荧光细胞数高于 5 mm Hg 低压气腹组和无气腹组,有显著统计学差异($P < 0.01$);而 15 mm Hg 处理组和 10 mm Hg 处理组之间,无气腹处理组和 5 mm Hg 处理组之间 GFP 荧光细胞数目却无统计学差异($P > 0.05$)。本研究结果表明,随着气腹压力的升高, CO_2 气腹促进 GFP 细胞经血路肝转移、积聚的作用越明显;而低 CO_2 气腹压力不会明显增加 GFP 细胞经血路肝转移、积聚的机会,其影响较接近于无气腹状态。

分析 CO_2 气腹促进 GFP 标记活细胞经血路肝转移、积聚的机理可能与腹部 CO_2 气腹压力减少肝门静脉的血流有关。在 CO_2 气腹对人肝门静脉血流影响的研究中,Jakimowicz 等^[11]报道气腹压力为 7 mm Hg 时血流减少 37%,气腹压力为 14 mm Hg

时血流减少 53%。而从以往一些动物的实验来看,8 ~ 10 mm Hg 气压会导致肝门静脉血流明显减少^[12,13]。因此,可能是由于腹部 CO_2 气腹压力减损了肝门静脉的血流,削弱了肝内门静脉系统血流对 GFP 标记活细胞的冲刷作用,从而有利于 GFP 标记活细胞在肝内的积聚。同时,本组实验结果表明不同 CO_2 气腹压力下 GFP 标记活细胞在肝内的积聚的组织形态学分布不同:无气腹和 5 mm Hg 低压气腹组大部分 GFP 荧光细胞的组织学分布以肝血窦内为主,多数为散在单个分布,血管内均未能见到 GFP 荧光细胞的表达;而 10 mm Hg 和 15 mm Hg 高压气腹组除散在分布于肝血窦内外,常可见 2 个成对 GFP 荧光细胞分布于肝血窦内、汇管区,甚至发现有成团状、成条状积聚于中央静脉、小叶下静脉的情况。这恰好能说明肝门脉系统血流减少导致 GFP 细胞肝内积聚增多。

本组实验结果间接提示,腹腔镜手术中高压 CO_2 气腹能增加肿瘤细胞经血路肝脏转移、积聚的机会,促进肝转移瘤的发生,其机理可能与腹部 CO_2 气腹压力减损了肝门静脉的血流有关。在临床腹腔镜肿瘤手术中,我们可以通过建立较低压力的 CO_2 气腹来规避肿瘤细胞经血路肝脏转移的风险。

参考文献

- 1 Wexner SD, Cohen SM. Port site metastases after laparoscopic colorectal surgery for cure of malignancy. Br J Surg, 1995, 82(3): 295 - 298.
- 2 Vukasin P, Ortega AE, Greene FL, et al. Wound recurrence following laparoscopic colon cancer resection. Results of the American Society of colon and rectal surgeons laparoscopic registry. Dis Colon Rectum, 1996, 39(Suppl): S20 - S23.
- 3 Chen WS, Lin WC, Kou YR, et al. Possible effect of pneumoperitoneum on the spreading of colon cancer tumor cells. Dis Colon Rectum 1997, 40: 791 - 797.
- 4 李素婷,杨鹤梅,周晓慧.新生小鼠肝细胞原代培养方法的改良.承德医学院学报,2006,23(2):164.
- 5 Wittich P, Steyerberg EW, Simoris SH, et al. Intraperitoneal tumor growth is influenced by pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum. Surg Endosc, 2000, 14(9): 819 - 823.
- 6 Vols J, Koster S, Spacek Z, et al. Characteristic alteration of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. Surg Endosc, 1999, 13: 611 - 614.
- 7 Ishida H, Idezuki Y, Yokoyama M, et al. Liver metastasis following pneumoperitoneum with different gases in a mouse model. Surg Endosc, 2001, 15(2): 189 - 192.
- 8 任高宏,刘晓静,杨磊,等.绿色荧光蛋白体外转染与体内示踪成骨细胞的研究.中华整形外科杂志,2004,20(6):439 - 442.
- 9 招震,马芸,陈系古,等.绿色荧光蛋白嵌合体小鼠的建立和鉴定.动物学报,2004,50(5):784 - 790.
- 10 李保春,张露,刘先峰,等.生理条件下骨髓细胞参与肾小管上皮细胞的更新.第二军医大学学报,2006,27(4):607 - 610.
- 11 Jakimowicz J, Stultiens G, Smulders F. Laparoscopic insufflation of the abdomen reduces portal venous flow. Surg Endosc, 1998, 12: 129 - 132.
- 12 Ishizaki Y, Bandai Y, Shimomura K, et al. Safe intraabdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery. Surgery, 1993, 114: 549 - 554.
- 13 Takagi S. Hepatic and portal vein blood flow during carbon dioxide pneumoperitoneum for laparoscopic hepatectomy. Surg Endosc, 1998, 12: 427 - 431.

(收稿日期:2007-06-06)

(修回日期:2007-09-10)

(责任编辑:李贺琼)