

# 不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹对人胃癌 MKN-45 细胞生长的影响<sup>\*</sup>

石 彦 余佩武<sup>\*\*</sup> 雷 晓 钱 锋 赵永亮 唐 波 罗华星

(第三军医大学西南医院普通外科、微创胃肠外科中心,重庆 400038)

**【摘要】 目的** 研究体外模拟不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹环境对人胃癌 MKN-45 细胞生长增殖能力的影响。**方法** 实验组于体外建立模拟 CO<sub>2</sub> 气腹环境,全自动气腹机维持气腹压力分别为 9、12、15 mm Hg,作用时间均为 4 h,对照组直接放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。处理后第 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h,用 pH 计检测细胞培养液 pH 值变化;第 1、2、3、4、5、6、7 天,MTT 法检测细胞增殖情况。**结果** 15 mm Hg CO<sub>2</sub> 气腹处理后胃癌细胞增殖较对照组下降显著( $P < 0.05$ ),但 9、12 mm Hg 组与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。CO<sub>2</sub> 气腹处理后细胞培养液 pH 值较对照组下降非常显著( $P < 0.01$ ),但在恢复正常培养后最长 3 h 即恢复正常。胃癌细胞增殖在第 1 天与不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹处理后细胞培养液的即时 pH 值有显著相关性( $P < 0.05$ ),而第 2、3、4、5、6、7 天均无相关性( $P > 0.05$ )。**结论** 模拟 9、12 mm Hg CO<sub>2</sub> 气腹对胃癌 MKN-45 细胞增殖没有显著影响,模拟 15 mm Hg CO<sub>2</sub> 气腹对胃癌 MKN-45 细胞增殖有显著的抑制作用。

**【关键词】** CO<sub>2</sub> 气腹; 胃癌细胞; 生长增殖

中图分类号:R735.2

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2008)06-0548-04

**Effect of CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum on Proliferation of Gastric Cancer Cell MKN-45** Shi Yan, Yu Peiwu, Lei Xiao, et al. Department of General Surgery and Center of Microinvasive Gastrointestinal Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**【Abstract】 Objective** To study the effect of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum with different pressures on the proliferation of human gastric cancer cells MKN-45. **Methods** The MKN-45 cells were divided into experiment and control groups. In the experiment group, the MKN-45 cells were exposed to CO<sub>2</sub> with different pressures (9, 12, or 15 mm Hg) for 4 hours. The cells in the control group were cultured at 37℃ with 5% CO<sub>2</sub>. After being treated for 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 hours, the pH of culture media was measured. MTT assay was employed to detect the proliferation of the cells 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days after the treatment. **Results** Compared with the control, the proliferation of the MKN-45 cells was not affected by CO<sub>2</sub> at a pressure of 9 or 12 mm Hg ( $P > 0.05$ ), but were significantly inhibited after being treated with 15 mm Hg CO<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ). The pH value of the experiment group was significantly lower than that in the control ( $P < 0.01$ ). After being cultured in a normal environment for at most 3 hours, the pH of the experiment group increased to a normal range. The proliferation of the cells was significantly related to the pH value of culture media determined after being exposed to CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum with different pressures ( $P < 0.05$ ) at the first day. However, no such relationship was observed from days 2 to 7 ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** *In vitro*, the proliferation can not be influenced by CO<sub>2</sub> with a pressure of 9 or 12 mm Hg, but can be significantly inhibited by CO<sub>2</sub> with a pressure of 15 mm Hg.

**【Key Words】** Carbon dioxide pneumoperitoneum; Gastric cancer cells; Proliferation

腹腔镜胃癌根治术在国内外逐步得到了开展,具有疼痛轻、恢复快、瘢痕小和对机体功能影响小等优点,近期疗效满意<sup>[1-3]</sup>。但对腹腔镜是否会促进胃癌的播散与转移尚有争议,尤其担心 CO<sub>2</sub> 气腹会促进胃癌细胞生长增殖、更有利于胃癌的种植转移。因此,本研究于体外模拟不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹环境,探讨 CO<sub>2</sub> 气腹对人胃癌细胞生长增殖的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

人低分化胃癌 MKN-45 细胞购于第四军医大学西京医院全军消化研究所。碘化丙啶染液(PI, Sigma)、二甲基亚砷(DMSO, Sigma)、胰蛋白酶(Sigma)、噻唑兰(MTT, Sigma)。全自动气腹机(MGB, Germany),全自动酶标仪(Bio-Rad 3350, USA),电子 pH 计(Sartorius PB-21, Germany)。

### 1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞培养 胃癌 MKN-45 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中生长,培养环

\* 基金项目:全军“十一五”计划课题资助项目(06MB240);重庆市医学重点学科建设资助项目

\*\* 通讯作者

境为 37℃、5% CO<sub>2</sub> 中,每 2 天更换培养液。

1.2.2 CO<sub>2</sub> 压力箱的制作 选用容积 5.5 L 的韩国乐扣乐扣聚丙烯密封箱(顶端有密封箱盖,内衬密封硅胶板),一侧壁近顶部开出气孔,接 CO<sub>2</sub> 分压仪;出气孔对侧壁靠底部开进气孔,通过橡胶软管与全自动气腹机出气口相连,气腹机进气口接高纯度 CO<sub>2</sub> 钢瓶减压阀,通过气腹机调节 CO<sub>2</sub> 气流量和压力箱内的压力,将其置恒温水浴箱,控制温度为 37℃。

1.2.3 不同压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹处理 CO<sub>2</sub> 压力箱紫外线消毒 40 min 后放入培养板,关闭密封箱盖,开放出气孔并接 CO<sub>2</sub> 分压仪,进气孔通过气腹机通入 100% 浓度 CO<sub>2</sub> (控制流量 10 L/min) 持续 15 min,CO<sub>2</sub> 分压仪显示的 CO<sub>2</sub> 浓度 > 99%,即说明箱内已达到纯 CO<sub>2</sub> 的条件。实验组共设 3 组,气腹机设定 CO<sub>2</sub> 气腹压力分别为 9、12 和 15 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa),持续通入 100% 浓度 CO<sub>2</sub> 作用 4 h 后排气,放在与对照组相同的环境中培养 24 h 后更换培养液。对照组:直接放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

1.2.4 电子 pH 计测定细胞培养液 pH 值 取常规条件下培养对数生长期的胃癌 MKN-45 细胞,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)漂洗,0.25% 胰酶 + 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化,重悬并制成细胞悬液,调整细胞浓度为 2.0 × 10<sup>5</sup> 个/ml,分别取 1 ml 加入 24 孔培养板中。每孔含细胞 2.0 × 10<sup>5</sup> 个。分为 4 组,对照组:培养板直接放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 4 h;3 个 CO<sub>2</sub> 气腹组:将培养板分次置于压力控制为 9、12、15 mm Hg 的压力箱中,维持孵育时间 4 h 后排气,继续放在与对照组相同的环境中培养。分别于处置前和处置后 0、0.5、1、1.5、2、2.5 h 取各组培养液各 1 ml 用电子 pH 计测 pH 值,每个时相点测 4 次,取均值。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖活性 同样方法重悬并制成细胞悬液,调整细胞浓度为 1.0 × 10<sup>4</sup> 个/ml,接种于 96 孔板中,每孔加入细胞悬液 200 μl (即每孔含细胞 2.0 × 10<sup>3</sup> 个)。贴壁后换液,体外模拟

CO<sub>2</sub> 气腹环境培养,分别于培养后第 1、2、3、4、5、6、7 天取 6 个复孔,弃培养液,每孔加入 50 g/L 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h 后吸出培养液和 MTT 溶液,每孔加入 DMSO 150 μl,振荡器微振荡 10 min,全自动酶标仪于 490 nm 处测定各孔吸光度值,取均值,绘制生长曲线。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料基本服从正态分布,采用  $\bar{x} \pm s$  反映其平均水平和变异性,运用 One-Way ANOVA 单因素方差分析比较组间差异,Test of Homogeneity of Variances 检验方差齐性,方差齐时采用 LSD *t* 检验完成各组均值间比较,方差不齐时采用 Tamhane's T2 *t* 检验完成各组均值间比较。

2 结果

2.1 不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹对胃癌 MKN-45 细胞增殖的影响

不同压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹组和对照组吸光度值见表 1,各实验组胃癌 MKN-45 细胞在第 1~7 天的平均吸光值均小于对照组,且随着气腹压力增加,OD 值下降,尤其在持续 15 mm Hg CO<sub>2</sub> 气腹压力作用 4 h 后下降显著(*P* < 0.05)。绘制细胞生长曲线(图 1),可看出各气腹组胃癌 MKN-45 细胞生长速度均慢于对照组,经统计学分析,15 mm Hg CO<sub>2</sub> 气腹组与对照组比较差异显著(*P* < 0.05)。

2.2 不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹对胃癌 MKN-45 细胞培养液 pH 值的影响

实验组经不同压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹作用 4 h 后,立即检测细胞培养液 pH 值,结果与对照组比较均下降非常显著(*P* < 0.01),尤其以 15 mm Hg 组最为显著。此后连续检测处理后第 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 各组细胞培养液 pH 值,结果各组 pH 值均恢复迅速,且压力越小的恢复越快,9、12 mm Hg 组处理后 3 h 与对照组比无显著差异;15 mm Hg 组处理后 3 h 与对照组仍差异显著(表 2,图 2)。

表 1 不同压力 CO <sub>2</sub> 气腹组与对照组平均吸光度(OD)值的比较( <i>n</i> = 6, $\bar{x} \pm s$ )							
组别	处理后时间						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
对照组①	0.302 ± 0.023	0.433 ± 0.048	0.664 ± 0.100	1.332 ± 0.086	1.920 ± 0.240	2.245 ± 0.086	2.154 ± 0.079
9 mm Hg 组②	0.296 ± 0.022	0.403 ± 0.047	0.601 ± 0.070	1.293 ± 0.092	1.836 ± 0.143	2.184 ± 0.111	2.092 ± 0.116
12 mm Hg 组③	0.281 ± 0.025	0.386 ± 0.048	0.578 ± 0.065	1.212 ± 0.146	1.754 ± 0.152	2.116 ± 0.175	2.045 ± 0.100
15 mm Hg 组④	0.266 ± 0.038	0.343 ± 0.036	0.495 ± 0.068	0.810 ± 0.079	1.418 ± 0.103	1.657 ± 0.129	1.563 ± 0.131
<i>F</i> , <i>P</i> 值	1.900, 0.162	4.193, 0.019	5.001, 0.010	31.637, 0.000	10.429, 0.000	25.635, 0.000	37.837, 0.000
<i>P</i> <sub>1-2</sub> 值	0.736	0.266	0.174	0.527	0.398	0.423	0.334
<i>P</i> <sub>1-3</sub> 值	0.227	0.086	0.065	0.060	0.101	0.098	0.096
<i>P</i> <sub>1-4</sub> 值	0.042	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>P</i> <sub>2-3</sub> 值	0.377	0.515	0.591	0.193	0.401	0.371	0.459
<i>P</i> <sub>2-4</sub> 值	0.082	0.031	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>P</i> <sub>3-4</sub> 值	0.366	0.113	0.077	0.000	0.002	0.000	0.000

表 2 不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹组与对照组细胞培养液 pH 值的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	处理前	处理后						
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h
对照组①	7.433 ± 0.017	7.420 ± 0.014	7.418 ± 0.015	7.415 ± 0.013	7.403 ± 0.013	7.395 ± 0.013	7.390 ± 0.016	7.382 ± 0.025
9 mm Hg 组②	7.433 ± 0.022	6.508 ± 0.084	6.968 ± 0.039	7.303 ± 0.033	7.330 ± 0.037	7.365 ± 0.031	7.375 ± 0.021	7.380 ± 0.026
12 mm Hg 组③	7.438 ± 0.017	6.285 ± 0.075	6.865 ± 0.079	7.268 ± 0.051	7.318 ± 0.030	7.338 ± 0.025	7.368 ± 0.022	7.375 ± 0.017
15 mm Hg 组④	7.434 ± 0.017	6.078 ± 0.104	6.758 ± 0.073	7.205 ± 0.069	7.295 ± 0.054	7.310 ± 0.045	7.358 ± 0.009	7.372 ± 0.017
F, P 值	0.064, 0.978	236.49, 0.000	101.142, 0.000	14.470, 0.000	6.741, 0.006	5.986, 0.010	3.996, 0.035	2.145, 0.148
P <sub>1-2</sub> 值	1.000	0.000	0.000	0.021	0.014	0.019	0.032	0.208
P <sub>1-3</sub> 值	0.716	0.000	0.004	0.048	0.004	0.011	0.010	0.058
P <sub>1-4</sub> 值	0.855	0.000	0.001	0.044	0.001	0.002	0.014	0.042
P <sub>2-3</sub> 值	0.716	0.002	0.376	0.884	0.539	0.760	0.555	0.462
P <sub>2-4</sub> 值	0.855	0.000	0.029	0.301	0.230	0.201	0.657	0.361
P <sub>3-4</sub> 值	0.855	0.002	0.444	0.734	0.539	0.319	0.882	0.852

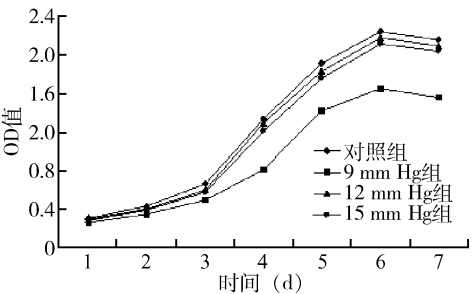


图 1 不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹组与对照组的生长曲线

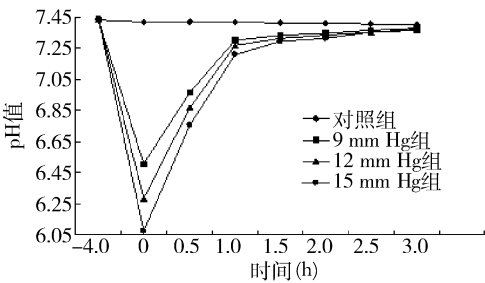


图 2 不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹组与对照组的 pH 值变化曲线

表 3 不同压力 CO<sub>2</sub> 气腹处理后细胞增殖能力与细胞培养液 pH 值的相关性

	处理后时间						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
r 值	1.000	0.965	0.944	0.926	0.936	0.911	0.894
P 值	0.014	0.170	0.215	0.247	0.228	0.271	0.296

性显著低于对照组。提示体外模拟持续 CO<sub>2</sub> 气腹环境不会促进胃癌 MKN-45 细胞增殖,且在较高 CO<sub>2</sub> 气腹压力时对细胞增殖有抑制作用。关于 CO<sub>2</sub> 气腹对其他腹腔恶性肿瘤生长增殖影响方面的研究存在较大争议,甚至出现了两种截然不同的结果。早期部分学者认为,CO<sub>2</sub> 气腹有促进恶性肿瘤增殖的作用<sup>[5,6]</sup>,然而近年来,许多学者的研究却得出了相反的结论,即 CO<sub>2</sub> 气腹环境对肿瘤细胞的生长增殖有抑制作用<sup>[7,8]</sup>。因此有学者提出,CO<sub>2</sub> 气腹对不同恶性肿瘤细胞生长增殖的影响是不同的<sup>[9]</sup>。

2.3 CO<sub>2</sub> 气腹处理后细胞增殖能力与细胞培养液 pH 值的相关性

选择经不同压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹处理后细胞培养液的即时 pH 值,与处理后胃癌 MKN-45 细胞每天的细胞增殖情况做相关分析,结果除第 1 天有显著相关性外,第 2、3、4、5、6、7 天均无相关性(表 3)。

3 讨论

胃癌作为一种侵袭性较强的恶性肿瘤,发生腹腔种植转移的机会高,随着腹腔镜胃癌根治术的开展,CO<sub>2</sub> 气腹是否会促进肿瘤细胞的生长增殖逐渐引起广大学者的关注,成为学术界争论的焦点问题之一<sup>[4]</sup>。本研究成功建立了体外模拟 CO<sub>2</sub> 气腹模型,方法简单易行,可操控性强,能准确设置实验所需的压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹环境。我们采用 MTT 比色法,研究体外模拟不同压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹环境对胃癌 MKN-45 细胞增殖的影响,结果实验组细胞增殖能力均小于对照组,且随着气腹压力增加下降明显,在低 CO<sub>2</sub> 压力条件下,其增殖活性与对照组比较无显著差异,而在 15 mmHg 条件下,其增殖活

我们还研究了不同压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹对胃癌细胞培养液 pH 值的影响,以及细胞培养液 pH 值改变与细胞增殖能力的关系。结果各实验组在不同压力持续 CO<sub>2</sub> 气腹作用 4 h 后,即时细胞培养液 pH 值与对照组比均下降非常显著,且压力越大 pH 值降低越明显,此后追踪监测表明,脱离气腹环境后各组 pH 值均逐渐恢复,压力越小恢复越快。分析原因,模拟较高压力 CO<sub>2</sub> 气腹环境下使 CO<sub>2</sub> 溶解度增加,导致细胞培养液中的碳酸含量增加,pH 值下降,一旦脱离模拟 CO<sub>2</sub> 气腹环境,溶解于胃癌 MKN-45 细胞培

养液中的过量  $\text{CO}_2$  随即释放,细胞培养液的 pH 值也随之恢复,因此,体外模拟不同压力  $\text{CO}_2$  气腹环境对细胞培养液 pH 值的影响是短暂的。进一步研究不同压力持续  $\text{CO}_2$  气腹处理后细胞培养液的即时 pH 值与处理后胃癌细胞增殖的相关性,结果除第 1 天外均无显著相关性。因此,虽然培养液 pH 值下降,会对肿瘤细胞的生长和代谢产生不利影响,但这种影响可能是短暂的。 $\text{CO}_2$  气腹抑制胃癌 MKN-45 细胞增殖的原因非常复杂,除了早期与 pH 值改变有关外,还可能与缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)有关,即在  $\text{CO}_2$  气腹导致的严重缺氧状态下,缺氧诱导因子  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) 磷酸化,与 HIF- $1\beta$  分离,转而与 P53 结合,从而促进细胞凋亡,抑制细胞增殖<sup>[10]</sup>。这些还有待进一步深入研究。

我们的研究表明,模拟 9、12 mm Hg  $\text{CO}_2$  气腹对胃癌 MKN-45 细胞增殖没有显著影响,模拟 15 mm Hg  $\text{CO}_2$  气腹对胃癌 MKN-45 细胞增殖有显著的抑制作用,其机制复杂,早期可能与细胞培养液 pH 值下降有关。

## 参考文献

- 1 Kiyama T, Mizutani T, Okuda T, et al. Laparoscopic surgery for gastric cancer: 5 years' experience. J Nippon Med Sch, 2006, 73(4): 214 - 220.
- 2 余佩武,王自强,钱 锋,等.腹腔镜辅助胃癌根治术 105 例.中

华外科杂志, 2006, 44(19): 1303 - 1306.

- 3 卢裕榕,陈钊德.腹腔镜辅助与开腹胃癌根治术的比较.中国微创外科杂志, 2007, 7(9): 831 - 833.
- 4 余佩武,罗华星.进展期胃癌腹腔镜根治术的应用进展.中华消化外科杂志, 2007, 6(3): 166 - 168.
- 5 Smidt VJ, Singh DM, Hurteau JA, et al. Effect of carbon dioxide on human ovarian carcinoma cell growth. Am J Obstet Gynecol, 2001, 185(6): 1314 - 1317.
- 6 Lee SW, Gleason NR, Blanco I, et al. Higher colon cancer tumor proliferative index and lower tumor cell death rate in mice undergoing laparotomy versus insufflation. Surg Endosc, 2002, 16(1): 36 - 39.
- 7 Leng J, Lang J, Jiang Y, et al. Impact of different pressures and exposure times of a simulated carbon dioxide pneumoperitoneum environment on proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cell lines. Surg Endosc, 2006, 20(10): 1556 - 1559.
- 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 Schmidt A, Reismann M, Kubler JF, et al. Exposure to carbon dioxide and helium reduces in vitro proliferation of pediatric tumor cells. Pediatr Surg Int, 2006, 22(1): 72 - 77.
- 10 Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Oncogene, 2001, 20(41): 5779 - 5788.

(收稿日期: 2008 - 01 - 03)

(修回日期: 2008 - 04 - 07)

(责任编辑: 王惠群)