

体外模拟气腹环境对胃癌细胞增殖凋亡的影响*

郝迎学 钟 华^① 张 超 曾冬竹 石 彦 饶 芸 余佩武**

(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 通过体外模拟气腹环境,观察二氧化碳(CO₂)和氦气(He)在不同压力下对胃癌细胞 MKN-45 增殖、凋亡的影响。方法 实验分为对照组、CO₂ 组和 He 组,其中 CO₂ 组和 He 组又按照压力不同分为 0、5、10、15 mm Hg 组(作用时间均为 4 h)。细胞在密闭培养箱内经不同压力 CO₂ 或 He 作用 4 h 后用血气分析仪检测培养液 pH 值;MTT 法检测细胞增殖情况;流式细胞仪观察细胞凋亡指数变化;Annexin V-FITC/PI 双标染色、流式细胞仪测定凋亡细胞比例。结果 处理结束后即刻检测,CO₂ 组细胞培养液呈弱酸性,He 组细胞培养液呈弱碱性。MTT 法检测细胞增殖变化,CO₂ 组 0、5、10 mm Hg 组 OD 值与对照组比较无明显差异($P > 0.05$),15 mm Hg 组 OD 值与对照组比较在前 3 天无明显差异($P > 0.05$),在 4~7 天 OD 值明显低于对照组($P < 0.01$)。而在 He 组,不同压力组细胞增殖活性与对照组比较无明显差异($P > 0.05$)。在 CO₂ 环境下,0、5 mm Hg 组细胞凋亡指数与对照组比较无明显差异($P > 0.05$),而 10、15 mm Hg 组明显大于正常对照组($P < 0.01$)。0、5 mm Hg 组细胞凋亡比例与对照组比较无显著差异($P > 0.05$),而 10、15 mm Hg 组细胞凋亡比例明显大于对照组($P < 0.01$)。在 He 环境下 0、5、10、15 mm Hg 组细胞凋亡指数和凋亡比例较对照组均无明显差异($P > 0.05$)。结论 在临床常用压力范围内(≤ 10 mm Hg),CO₂ 对胃癌细胞增殖、凋亡无明显影响,而在 15 mm Hg 压力下,CO₂ 抑制细胞的增殖。

【关键词】 气腹; 胃癌细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号:R735.2

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2008)06-0552-04

Effects of Simulated Pneumoperitoneum on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cells Hao Yingxue*, Zhong Hua, Zhang Chao*, et al. *Department of General Surgery and Center of Microinvasive Gastrointestinal Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of CO₂ and helium insufflation administered at different pressures on the proliferation and apoptosis of cultured human gastric cancer cells, MKN-45. **Methods** The gastric cancer cells MKN-45 were divided into control, CO₂, and helium groups. In CO₂ and helium groups, the cells were exposed to CO₂ or helium at different pressures (0, 5, 10, and 15 mm Hg) for 4 hours. And then pH of each culture media in the three groups was analyzed, the proliferation of the cells was detected by MTT assay, and the apoptotic index (AI) of each group was determined by flow cytometry. The cells were double labeled by Annexin V-FITC/PI staining, and the proportion of apoptotic cells in each group was tested by flow cytometry. **Results** The cell media was weak acid in the CO₂ group, and was weak basic in the helium group. MTT assay showed that the OD value of the 0, 5, and 10 mm Hg subgroups in the CO₂ group was not significantly different from that in the control ($P > 0.05$). Whereas, in the 15 mm Hg subgroup of the CO₂ group, the OD value was similar to that of the control during the first 3 days ($P > 0.05$), but decreased significantly from 4 to 7 days ($P < 0.01$). The OD value of each subgroup of the helium group was similar to that of the control ($P > 0.05$). In the CO₂ group, the AI and proportion of apoptotic cells of the 0 and 5 mm Hg subgroups were not significantly different from those of the control (both $P > 0.05$), while those of the 10 and 15 mm Hg subgroups were significantly higher than that of the control (both $P < 0.01$). The AI and proportion of apoptotic cells in the helium group were similar to those of the control (both $P > 0.05$). **Conclusions** A pressure of CO₂ ≤ 10 mm Hg do not influence the proliferation and apoptosis of gastric cancer MKN-45 cells. When the pressure reach 15 mm Hg, the proliferation of the cells is inhibited.

【Key Words】 Pneumoperitoneum; Gastric cancer cells; Proliferation; Apoptosis

腹腔镜辅助胃癌根治术治疗早期胃癌已取得满意的近期和远期效果,Kitano 等^[1]报道 116 例早期胃癌行腹腔镜辅助胃癌根治术,术后随访 2 个月~10 年,平均 45 个月,无一例出现复发或腹壁种植。由于腹腔镜辅助胃癌根治术治疗进展期胃癌开展较晚,对其远期疗效尚在观察中。我中心自 2004 年 3 月开展腹腔镜胃癌根治术以来,已行腹腔镜辅助胃癌根治术 302 例,其中进展期胃癌 236 例,近期效果良好,在肿瘤切除范围、淋巴结清扫数目等方面与开

腹手术无明显差异^[2,3]。但对于进展期胃癌行腹腔镜手术是否会促进腹腔种植转移,是目前研究的热点。为探讨临床常用气体介质 CO₂ 是否会促进胃癌细胞的生长增殖,本研究在体外以 CO₂ 或 He 充当气体介质模拟气腹环境,观察其对胃癌细胞增殖凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

* 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

① 超声诊断科

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)培养于 RPMI-1640、10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 培养液中, pH 值 7.2 ~ 7.4, 孵育于 37℃、5% CO₂ 环境中。每 2 天更换一次培养液, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗, 0.25% 胰酶 + 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)用于细胞消化, 制成细胞悬液。

1.2 CO₂ 压力箱的制作

选用厚 5 mm 的有机玻璃, 制成体积为 60 cm × 40 cm × 30 cm 的压力箱, 其顶端为箱盖, 内衬有密封的硅胶板; 侧壁的一面靠近底部开有一进气孔, 另一面靠近顶部处开有一出气孔; 进气孔通过一橡胶软管与气腹机出气口相连, 气腹机进气口与高纯度的 CO₂ 或 He 钢瓶减压阀相连, 通过气腹机调节气流量和压力箱内的压力。

1.3 高纯度气体环境的建立

首先对模拟气腹压力箱行紫外线消毒 40 ~ 60 min, 关闭紫外线后盖上箱盖, 开放出气孔及进气孔, 通入高纯度 CO₂ 或 He(流量为 5 ~ 8 L/min)持续 1 h。1 h 后如气体分压仪显示压力箱内的 CO₂ 或 He 浓度 > 99%, 即说明压力箱内已达到纯 CO₂ 或 He 的条件, 此时可关闭出气孔, 调整气体流量至需要的压力并保持该压力。

1.4 血气分析仪测定培养液 pH 值

将处于对数生长期的 MKN-45 细胞用 PBS 缓冲液漂洗后, 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化 2 ~ 3 min, 培养液中和吹打制成细胞悬液, 以 1000 r/min, 离心 10 min, 用培养液重悬, 调整细胞浓度为 2.0 × 10⁵ 个/ml。分别取 1 ml 加入 24 孔培养板中, 每孔含细胞约 2.0 × 10⁵ 个。分为以下三个大组: 对照组, 培养板直接放入 37℃、5% CO₂ 孵箱中孵育 4 h; CO₂ 组, 根据压力不同又分为 0.5、10、15 mm Hg 组; He 组, 同样分为 0.5、10、15 mm Hg 组。将培养板置于不同气体介质、不同压力下孵育 4 h。4 h 后排出气体, 继续放在与对照组相同的培养环境中培养。分别于排气后 0、2、4、6、8 h 取各组培养液用血气分析仪(美国 AVL 公司生产)测 pH 值, 每组 4 孔, 取均值。

1.5 MTT 法检测细胞增殖活性

细胞消化、重悬、分组同血气分析, 调整细胞浓度为 1.0 × 10⁴ 个/ml, 取 200 ml 加入 96 孔培养板中, 即每孔含细胞 2.0 × 10³ 个。分别于排气后第 1、2、3、4、5、6、7 天检测细胞增殖活性, 于检测前 4 h 在 96 孔培养板中加入噻唑兰(MTT)溶液 20 μl, 4 h 后

吸出培养液和 MTT 溶液, 再加入 150 ml 二甲基亚砜(DMSO), 混匀后于酶标仪 490 nm 测吸光度(OD 值), 每天测 8 个孔, 取均值。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡指数

细胞消化、重悬、分组同血气分析, 调整细胞浓度为 2.0 × 10⁵ 个/ml, 取 10 ml 加入 50 ml 培养瓶中, 即每培养瓶含细胞 2.0 × 10⁶ 个。于处理后 24 h 消化、离心(1000 r/min)、PBS 漂洗后, 重复离心, 弃上清液, 留 0.5 ml 细胞悬液, 用振荡器使细胞分散, 将细胞滴入 75% 乙醇, 终浓度为 70%, 边滴边振荡, 放入 4℃ 冰箱待测。上机: 用碘化丙啶(PI)一步荧光插入法进行细胞核 DNA 染色, 置 360 目尼龙网过滤, 采用流式细胞仪(美国 Beckman 公司)分析。通过细胞样本 DNA 含量分布测定细胞凋亡指数, 每组测 5 个样本。

1.7 Annexin V-FITC/PI 双标染色、流式细胞仪检测凋亡细胞比例

待测细胞置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 收集细胞并用 1 ml 冷 PBS 制成 1.0 × 10⁵/ml 细胞悬液, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将细胞重悬于 200 μl 结合缓冲液中, 加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI, 轻轻混匀, 避光, 室温反应 15 min, 加入 300 μl 结合缓冲液, 用流式细胞仪以激发波长 488 nm 检测, 流式细胞仪测定结果输入计算机, 应用分析软件进行处理, 直接给出细胞直方图及凋亡百分比, 其中左下象限代表正常细胞(An⁻/PI⁻), 右下象限代表早期凋亡细胞(An⁺/PI⁻), 右上象限代表晚期凋亡及坏死细胞(An⁺/PI⁺)。

1.8 统计学处理

所得数据均采用 SPSS10.0 软件处理, 运用单因素方差分析 F 检验分析处理, 组间差异采用 Scheffe 法进行分析。

2 结果

2.1 pH 值的变化

在气体介质为 CO₂ 情况下(表 1), 0.5、10 和 15 mm Hg 组与对照组比较, 处理后 0 h 培养液 pH 值明显降低, 压力越大, 降低越明显, 15 mm Hg 组 pH 值下降至 6.18; 之后连续检测处理后第 2、4、6、8 h 血气结果, 移至正常培养环境后, 各组 pH 值很快恢复正常(pH 7.2 ~ 7.4)。在气体介质为 He 的情况下(表 2), 不同压力组细胞培养液 pH 值不同程度升高, 其中 15 mm Hg 组升至 8.19。

表 1 体外模拟气腹环境(CO₂)不同压力、不同时间培养液 pH 值的变化(n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
对照组①	7.20 ± 0.02	7.18 ± 0.02	7.15 ± 0.01	7.16 ± 0.03	7.20 ± 0.02
0 mm Hg②	7.13 ± 0.04	7.15 ± 0.03	7.15 ± 0.03	7.19 ± 0.01	7.23 ± 0.04
5 mm Hg③	7.00 ± 0.05	7.13 ± 0.03	7.22 ± 0.02	7.22 ± 0.02	7.24 ± 0.02
10 mm Hg④	6.77 ± 0.03	6.95 ± 0.05	7.16 ± 0.03	7.22 ± 0.01	7.21 ± 0.01
15 mm Hg⑤	6.18 ± 0.02	6.91 ± 0.02	7.08 ± 0.04	7.20 ± 0.02	7.22 ± 0.01
F, P 值	314.61, 0.00	54.75, 0.00	12.92, 0.00	5.21, 0.02	4.57, 0.02
P ₁₋₂ 值	0.00	0.73	1.00	0.57	0.08
P ₁₋₃ 值	0.00	0.39	0.06	0.07	0.05
P ₁₋₄ 值	0.00	0.00	0.99	0.12	0.82
P ₁₋₅ 值	0.00	0.00	0.06	1.00	0.39

表 2 体外模拟气腹环境 (He) 不同压力、不同时间培养液 pH 值的变化 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	时间				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
对照组①	7.20 ± 0.01	7.18 ± 0.02	7.15 ± 0.01	7.17 ± 0.03	7.20 ± 0.02
0 mm Hg②	7.42 ± 0.02	7.23 ± 0.03	7.18 ± 0.01	7.15 ± 0.01	7.16 ± 0.03
5 mm Hg③	7.53 ± 0.03	7.28 ± 0.02	7.21 ± 0.02	7.19 ± 0.03	7.15 ± 0.01
10 mm Hg④	7.82 ± 0.02	7.31 ± 0.01	7.23 ± 0.02	7.20 ± 0.05	7.15 ± 0.02
15 mm Hg⑤	8.19 ± 0.04	7.96 ± 0.03	7.33 ± 0.05	7.22 ± 0.01	7.19 ± 0.02
<i>F, P</i> 值	1054.48, 0.00	706.34, 0.00	71.80, 0.00	5.77, 0.01	5.32, 0.02
P_{1-2} 值	0.00	0.15	0.32	0.91	0.16
P_{1-3} 值	0.00	0.00	0.01	0.84	0.08
P_{1-4} 值	0.00	0.00	0.00	0.57	0.08
P_{1-5} 值	0.00	0.00	0.00	0.07	0.99

2.2 细胞增殖活性的变化

在模拟气腹环境为 CO₂ 情况下 (表 3), 0、5、10 mm Hg 组与对照组比较 OD 值无明显差异 ($P > 0.05$), 15 mm Hg 组与对照组比较 OD 值在前 3 天

无明显差异 ($P > 0.05$), 在 4 ~ 7 天 OD 值明显低于对照组 ($P < 0.01$)。而在气腹环境为 He 情况下 (表 4), 不同压力组胃癌细胞增殖活性与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。

表 3 MTT 法测定体外模拟气腹环境 (CO₂) 胃癌细胞增殖活性的变化 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	时间						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
对照组①	0.31 ± 0.04	0.41 ± 0.02	0.53 ± 0.09	1.38 ± 0.04	1.81 ± 0.09	2.33 ± 0.04	2.33 ± 0.06
0 mm Hg②	0.28 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.56 ± 0.06	1.37 ± 0.07	1.58 ± 0.02	2.38 ± 0.06	2.39 ± 0.08
5 mm Hg③	0.31 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.56 ± 0.04	1.34 ± 0.04	1.59 ± 0.07	2.50 ± 0.07	2.32 ± 0.04
10 mm Hg④	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.53 ± 0.05	1.27 ± 0.05	1.57 ± 0.14	2.54 ± 0.10	2.40 ± 0.03
15 mm Hg⑤	0.32 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.68 ± 0.04	0.80 ± 0.04	1.16 ± 0.08	1.42 ± 0.02
<i>F, P</i> 值	0.46, 0.77	1.41, 0.30	1.23, 0.36	112.33, 0.00	63.71, 0.00	194.86, 0.00	218.15, 0.00
P_{1-2} 值	-	-	-	1.00	0.10	0.93	0.75
P_{1-3} 值	-	-	-	1.00	0.12	0.16	1.00
P_{1-4} 值	-	-	-	0.24	0.07	0.07	0.67
P_{1-5} 值	-	-	-	0.00	0.00	0.00	0.00

表 4 MTT 法测定体外模拟气腹环境 (He) 胃癌细胞增殖活性的变化 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	时间						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
对照组①	0.29 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.58 ± 0.03	1.22 ± 0.05	1.83 ± 0.03	2.21 ± 0.04	2.62 ± 0.04
0 mm Hg②	0.30 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.60 ± 0.04	1.23 ± 0.06	1.86 ± 0.06	2.37 ± 0.05	2.64 ± 0.05
5 mm Hg③	0.30 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.58 ± 0.03	1.27 ± 0.05	1.80 ± 0.08	2.40 ± 0.33	2.75 ± 0.12
10 mm Hg④	0.31 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.57 ± 0.05	1.25 ± 0.06	1.78 ± 0.04	2.49 ± 0.26	2.71 ± 0.18
15 mm Hg⑤	0.33 ± 0.02	0.39 ± 0.04	0.54 ± 0.09	1.24 ± 0.23	1.81 ± 0.09	2.31 ± 0.20	2.73 ± 0.11
<i>F, P</i> 值	0.20, 0.93	1.06, 0.43	0.44, 0.78	0.09, 0.99	0.67, 0.63	0.74, 0.59	0.76, 0.58

2.3 细胞凋亡指数 (AI) 的变化

不同 CO₂ 压力作用时, 0、5 mm Hg 组细胞凋亡指数与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 而在 10、

15 mm Hg 组其凋亡指数明显大于对照组 ($P < 0.01$)。在气体介质为 He 时, 各组胃癌细胞凋亡指数与对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$) (表 5)。

表 5 体外模拟气腹环境 (CO₂、He) 不同压力下胃癌细胞凋亡指数 (AI) 的变化 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	对照组①	0 mm Hg②	5 mm Hg③	10 mm Hg④	15 mm Hg⑤	<i>F, P</i> 值	P_{1-2} 值	P_{1-3} 值	P_{1-4} 值	P_{1-5} 值
CO ₂ 组	0.31 ± 0.06	0.35 ± 0.10	0.32 ± 0.10	11.45 ± 1.37	15.75 ± 0.04	189.99, 0.00	1.00	1.00	0.00	0.00
He 组	0.30 ± 0.09	0.34 ± 0.07	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.44, 0.78				

2.4 细胞凋亡比例的变化

在 CO₂ 环境下, 0.5 mm Hg 组凋亡细胞比例较对照组无明显差异 ($P > 0.05$), 10、15 mm Hg 组调

亡细胞比例较对照组明显增多 ($P < 0.01$)。在气腹环境为 He 时, 各组胃癌细胞凋亡比例与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$) (表 6)。

表 6 体外模拟气腹环境 (CO₂、He) 不同压力下胃癌细胞凋亡比例 (AR) 的变化 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	对照组①	0 mm Hg②	5 mm Hg③	10 mm Hg④	15 mm Hg⑤	F, P 值	P ₁₋₂ 值	P ₁₋₃ 值	P ₁₋₄ 值	P ₁₋₅ 值
CO ₂ 组	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.29 ± 0.05	9.20 ± 0.44	11.60 ± 0.95	430.09, 0.00	1.00	1.00	0.00	0.00
He 组	0.28 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.31 ± 0.08	0.35 ± 0.11	0.37 ± 0.05	0.99, 0.457				

3 讨论

1994 年 Kitano 等^[4]首次报道腹腔镜远端胃癌根治术, 虽然腹腔镜胃癌手术时间较传统开腹手术长, 但微创优点明显, 如术后疼痛轻、胃肠功能恢复快、下床早、住院时间短、腹壁瘢痕小及对机体免疫功能影响小等, 显示了腹腔镜手术的优越性^[5]。

但是对进展期胃癌行腹腔镜胃癌根治术仍然发展缓慢, 主要原因是对腹腔镜手术是否会促进肿瘤细胞的腹腔内播散及戳口种植转移存在争议。目前有关 CO₂ 气腹对肿瘤细胞生物学行为影响的报道很不一致, 有些学者报道 CO₂ 气腹会促进肿瘤细胞的增殖和生长, 包括结直肠癌、腺癌和其他恶性肿瘤^[6]。而有些学者报道 CO₂ 气腹会抑制肿瘤细胞的增殖。如 Leng 等^[7]报道体外模拟 CO₂ 气腹环境, 培养的卵巢癌 HO8910 细胞和 SKOV3 细胞会随着压力的升高、时间的延长, 其凋亡的比例增加。徐春阳等^[8]报道在 CO₂ 气腹条件下, 早期抑制子宫内膜癌 HTB-113 细胞的生长, 而在处理后的 5 ~ 12 天促进细胞的生长。Gutt 等^[9]报道在充气后 1 ~ 4 天胰腺癌细胞 DAN-G 和结肠癌细胞 CX-2 生长明显受到抑制, 而在第 5 ~ 15 天两种细胞增殖明显加快, DAN-G 细胞的增殖独立于气腹压力, 而 CX-2 细胞的增殖则依赖于 CO₂ 的压力。我们的研究表明, 胃癌细胞 MKN-45 在 10 mm Hg 以下 CO₂ 压力条件下, 其增殖活性、凋亡指数、凋亡比例与对照组比较无显著差异, 而在 15 mm Hg 条件下其增殖活性明显低于对照组, 凋亡指数和凋亡比例则明显高于对照组。在以 He 充当气体介质建立气腹时, 气腹压力在 0 ~ 15 mm Hg 范围内, 对胃癌细胞 MKN-45 的增殖和凋亡均未产生明显影响。我们对细胞培养液的 pH 值检测结果表明, CO₂ 组细胞培养液呈弱酸性, 尤以 15 mm Hg 组细胞培养液 pH 值变化较大。而在 He 组培养液呈弱碱性。所以 CO₂ 气腹较高压力情况下抑制胃癌细胞增殖, 促进其凋亡, 可能与细胞外和细胞内酸性环境有关。Wildbrett 等^[10]报道 CO₂ 气腹会引起细胞外和细胞内 pH 值和钙离子水平发生改变, 而 pH 值和钙离子是细胞功能的重要

调控因子, 如 ATP 的产生、细胞周期、细胞内信号传导及凋亡等。

总之, 我们的研究结果显示, 在临床常用的气腹压力 (≤ 10 mm Hg) 下 CO₂ 不会促进胃癌细胞的增殖, 而在 15 mm Hg 压力下, CO₂ 抑制胃癌细胞的增殖、促进其凋亡, CO₂ 气腹引起的腹腔内酸化和腹膜酸化可能是影响肿瘤细胞增殖、凋亡的主要因素之一。

参考文献

- 1 Kitano S, Shiraiishi N, Kakisako K, et al. Laparoscopy assisted Billroth-I gastrectomy (LADG) for cancer: our 10 years' experience. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2002, 12: 204 - 207.
- 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: 1303 - 1306.
- 3 Ziqiang W, Feng Q, Zhimin C, et al. Comparison of laparoscopically assisted and open radical distal gastrectomy with extended lymphadenectomy for gastric cancer management. Surg Laparosc Endosc, 2006, 20: 1738 - 1743.
- 4 Kitano S, Iso Y, Moriyama M, et al. Laparoscopic-assisted Billroth I gastrectomy. Surg Laparosc Endosc, 1994, 4: 146 - 148.
- 5 Pugliese R, Maggioni D, Sansonna F, et al. Total and subtotal laparoscopic gastrectomy for adenocarcinoma. Surg Endosc, 2007, 21: 21 - 27.
- 6 Takiguchi S, Matsuura N, Hamada Y, et al. Influence of CO₂ pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth. Surg Endosc, 2000, 14: 41 - 44.
- 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: 1556 - 1559.
- 8 徐春阳, 梁志清. 二氧化碳人工气腹对子宫内膜癌细胞体外生长的影响. 中华妇产科杂志, 2003, 38: 766 - 767.
- 9 Gutt CN, Kim ZG, Hollander D, et al. CO₂ environment influences the growth of cultured human cancer cells dependent on insufflation pressure. Endosc Surg, 2001, 15: 314 - 318.
- 10 Wildbrett P, Oh A, Naundorf D, et al. Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function. Surg Endosc, 2003, 17: 78 - 82.

(收稿日期: 2007 - 08 - 13)

(修回日期: 2007 - 12 - 10)

(责任编辑: 王惠群)