

2 种不同工作原理气腹机形成 CO₂ 气腹对大鼠腹膜浅方肌组织超微结构的影响

刘海防 陈 旭 黄润瀚 刘 彦*

(第二军医大学附属长征医院妇产科, 上海 200003)

【摘要】 目的 探讨不同充气方式形成 CO₂ 气腹对大鼠腹膜浅方肌组织超微结构的影响。 **方法** 选择脉冲式和恒压变流式 2 种不同工作原理的气腹机分别对 2 组各 40 只大鼠腹腔进行 CO₂ 充气, 设定气腹压力 15 mm Hg, 在充气后 60、90、120 和 180 min 时分别取 10 只大鼠腹膜浅方横纹肌组织, 用透射电镜方法观察气腹作用后大鼠腹膜浅方肌组织超微结构的变化。对照组 10 只大鼠, 仅行麻醉。 **结果** 2 组大鼠在气腹后 60 min 即在腹膜浅方肌细胞中出现空泡变性, 随气腹作用时间延长而越发显著。上述变化在脉冲式气腹机充气组更为明显。180 min 后脉冲式气腹机肌细胞出现明显增宽的间隙, 肌细胞之间也出现气泡, 而恒压气腹机组不明显。 **结论** CO₂ 气腹可以导致大鼠腹膜浅方肌组织损伤, 应用恒压气腹机充气可能有助于减少这种损伤。

【关键词】 CO₂ 气腹; 腹膜; 肌细胞; 透射电子显微镜

中图分类号: R-332 文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2009)04-0311-03

Effect of Different Types of Pneumoperitoneum on the Ultrastructure of the Extraperitoneal Muscular Tissues in Rat Liu Haifang, Chen Xu, Huang Runhan, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of different types of pneumoperitoneum on the ultrastructure of the extraperitoneal muscular tissues in rats. **Methods** By using pulse-mode or constant-pressure mode insufflators, we established CO₂ pneumoperitoneum in 80 rats (40 for each) with the pressure set at 15 mmHg. At 60, 90, 120 and 180 minutes after the insufflation, the muscular tissues below the peritoneum of the rats (10 rats at each time point) were obtained to observe the ultrastructural change under a transmission electron microscope (TEM). Ten rats that received anesthesia only were set as a control. **Results** In both the groups, vacuolar degeneration was found in the myocytes below the peritoneum after 60 minutes of pneumoperitoneum, and became more and more marked with time. Moreover, the phenomenon was more significant in the pulse-mode insufflator group, in which, we observed widened gaps and vacuoles among the myocytes at 180 minutes after the insufflation, while in the other group, such changes were not apparently detected. **Conclusions** CO₂ pneumoperitoneum may injure the muscular tissues below the peritoneum in rats. Constant-pressure mode insufflator is helpful to decrease such an injury.

【Key Words】 CO₂ pneumoperitoneum; Peritoneum; Myocyte; Transmission electron microscope (TEM)

腹腔镜技术应用于恶性肿瘤患者的手术日渐广泛, 术后穿刺口恶性肿瘤种植转移的报道也越来越多^[1], 且发生穿刺口恶性肿瘤转移患者的预后往往较差^[2-4]。除肿瘤本身的生物学特性外, 手术医生质疑腹腔镜手术的安全性, 特别是腹腔镜技术应用于以种植转移为主要转移方式的恶性肿瘤手术一直存在争议^[3], 如卵巢上皮性恶性肿瘤。已经有 CO₂ 气腹可以导致腹膜损伤的报道^[5,6], 认为这可能是穿刺口恶性肿瘤种植的解剖学基础。我们前期的研

究^[7]表明, 脉冲式充气的气腹机可以使腹内压在瞬间达到 40 mm Hg 或更高, 因此, 我们选择脉冲式和恒压变流式两种不同工作原理的气腹机分别进行大鼠腹腔 CO₂ 充气实验, 应用透射电镜方法观察大鼠腹膜浅方肌肉在 CO₂ 气腹作用下的变化, 探讨 CO₂ 不同充气方式的安全性及其对腹膜肌纤维的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

* 通讯作者

1.1.1 实验动物 健康 10 周龄雌性 SD 大鼠,体重(294 ± 16)g,共 90 只,由中国科学院上海分院实验动物中心提供,SPF 级饲养,随机分为 3 组:正常对照组(10 只);脉冲式气腹机组(40 只);恒压变流式气腹机组(40 只)。

1.1.2 仪器和试剂 电子脉冲式气腹机(Stortz 264305-20L),恒压变流式气腹机(HPQK-A-30L);气腹机压力测试仪(Type694 瑞士,并经上海市计量测试技术研究院测试通过);透射电镜(HITACHI-H500),LKBV 型超薄切片机。4% (pH 值 7.2)戊二醛、0.01 mmol/L 磷酸缓冲液、1% 锇酸、乙醇、丙酮、环氧丙烷试剂由复旦大学电镜室提供。

1.2 方法

所有大鼠采用 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉。2 个实验组分别应用电子脉冲式气腹机或恒压变流式气腹机向大鼠腹腔内充气,设定腹腔内压力 15 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa),于充气开始计时后 60、90、120、180 min 每组分别取 10 只大鼠,消毒后切开前腹壁,无菌剪刀剪除大鼠前腹壁腹膜及其浅方肌肉组织一块,修剪为 5 mm × 5 mm × 5 mm 组织块,生理盐水漂洗后迅速投入 4

℃ 4% 戊二醛中固定。对照组仅行麻醉,麻醉成功后立即剪取腹膜及其浅方肌组织并固定。

透射电镜观察:1% 锇酸进行后固定,乙醇梯度脱水,环氧丙烷置换,618 包埋剂包埋浸透,干燥,超薄切片机切片,用枸橼酸铅染液染片,透射电镜观察腹膜浅方肌细胞变化。由 2 名有经验的电镜专家分别观察,对结果进行描述性分析。

2 结果

对照组腹膜浅方肌组织形态:正常肌肉组织的肌纤维相互排列紧密,无空泡变性(图 1)。

实验组腹膜浅方肌组织形态:CO₂ 气腹作用后 60 min(图 2,3),2 组大鼠腹膜浅方肌纤维中出现散在空泡变性,脉冲式气腹机组明显,该组的肌纤维组织局部还出现大量气泡(图 3)。随气腹作用时间延长,2 组大鼠肌纤维中空泡变性均增多(图 4,5),仍为脉冲式气腹机组明显(图 5)。至气腹作用 180 min 时,恒压气腹机组无明显细胞间隙及气泡的变化(图 6),而脉冲式气腹机组除空泡变性外,细胞间隙显著增宽,间隙内见大量气泡(图 7)。

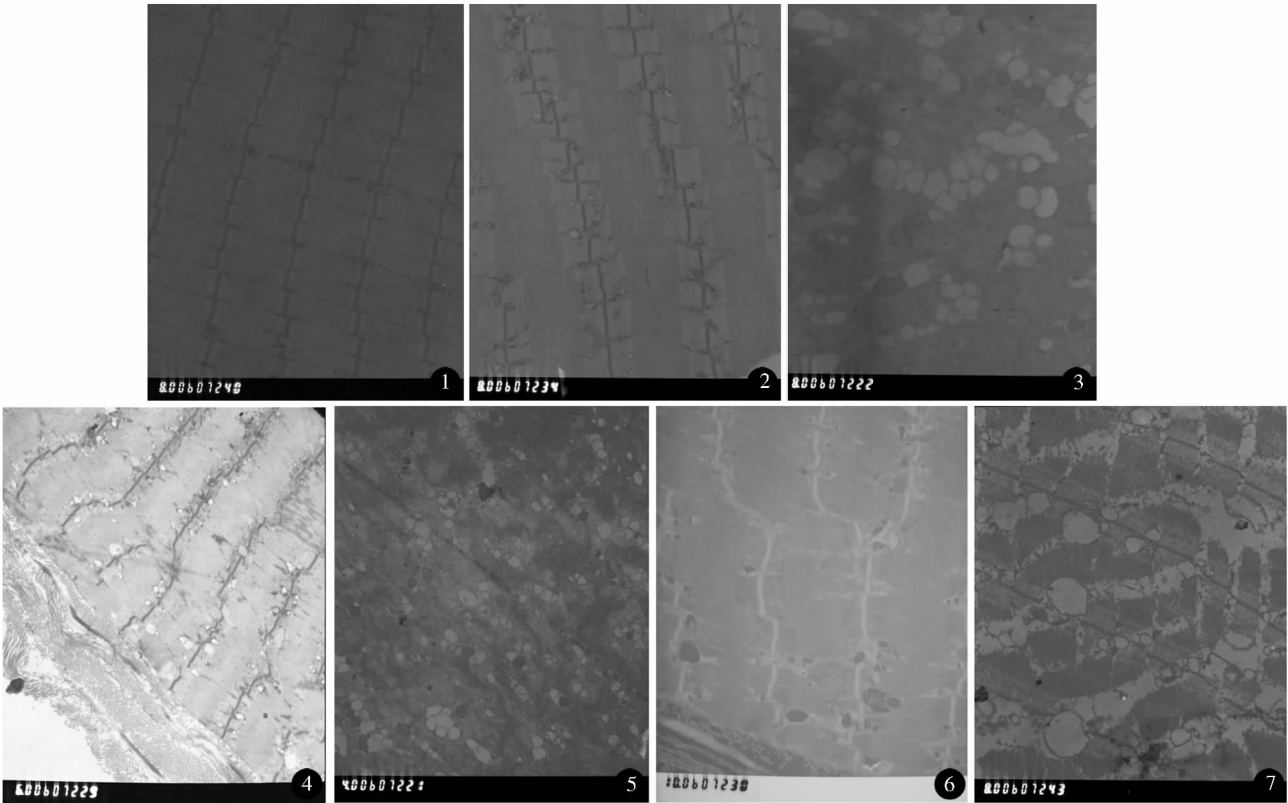


图 1 腹膜浅方正常肌纤维形态:肌纤维排列紧密,无空泡变性(×8000) 图 2 恒压气腹机作用 60 min:肌细胞内出现空泡变性,但较少(×8000) 图 3 脉冲气腹机作用 60 min:肌细胞内出现空泡变性,明显多于恒压气腹机组(×8000) 图 4 恒压气腹机作用 90 min:空泡变性有所增多(×6000) 图 5 脉冲气腹机作用 90 min:空泡变性增多,有的融合成大的“气泡状”(×4000) 图 6 恒压气腹机作用 180 min:尚能保持肌纤维的基本排列,无大的间隙出现(×10 000) 图 7 脉冲气腹机作用 180 min:除线粒体空泡变性外,肌质网明显扩张,甚至破裂,致肌原纤维间隔增大,部分肌带结构有破坏(×8000)

3 讨论

腹膜由单层扁平细胞和少量的细胞间质构成,其浅方为横纹肌及结缔组织,扁平的单层细胞即为腹膜间皮细胞,具有分泌功能,保持腹膜表面光滑,防止粘连发生。而其浅方的横纹肌组织,构成腹膜的屏障。Volz^[5]、Suematsu^[6]等已经观察到 CO₂ 气腹作用后的大鼠腹膜间皮细胞肿胀、细胞间连接断裂、基底膜暴露等现象,国内也有在 CO₂ 气腹腹腔镜手术后人体腹膜间皮细胞形态学变化的报道^[8]。还有人应用加热、加湿的 CO₂ 对动物进行充气,证实了 CO₂ 气腹对腹膜间皮细胞的损伤是无疑的^[9-11]。腹腔镜恶性肿瘤手术后腹壁穿刺口种植转移现象是基于气腹后腹膜损伤这一解剖学基础的观点目前已被学者广泛接受,但尚不知 CO₂ 气腹对腹膜下肌组织有何影响。

本研究观察到 CO₂ 气腹作用后大鼠腹膜浅方肌细胞内出现空泡变性,提示 CO₂ 气腹可能通过压力、局部酸碱平衡失调等物理和化学机制,损伤暴露出的间皮细胞基层,并使间皮细胞浅方肌组织中的细胞发生肌质网扩张及线粒体空泡变性。作用时间越长,则气体进入到腹膜间皮细胞下肌组织中越多,造成腹壁横纹肌组织的损伤,进而影响腹壁的屏障作用,这一点在腹壁穿刺口肿瘤种植转移的发生、发展中意义重大。CO₂ 气腹导致的腹膜局部血液循环障碍、酸碱平衡失调和局部免疫功能降低^[12,13]亦会增加穿刺口肿瘤种植转移的几率,Bergstrom^[14]等观察到在酸性环境中,间皮细胞通过纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)的合成与释放应对酸化反应,与气腹后形态学上微绒毛的改变相吻合。我们有理由推测,在 CO₂ 气腹导致的腹膜损伤基础上,腹膜局部及全身免疫功能下降、肿瘤生物学特性、临床分期以及患者机体免疫状态等因素共同作用下,CO₂ 气腹腹腔镜用于盆腔恶性肿瘤手术易导致穿刺口肿瘤种植转移发生,这种穿刺口肿瘤种植转移往往同时累及肌肉组织乃至腹壁全层,可能与本研究观察到的 CO₂ 气腹导致的组织细胞损伤有关。

我们前期的研究^[7]表明,目前临床使用的电子脉冲式气腹机在充气中存在控制盲区,设定腹内压 15 mm Hg 的情况下,最高可达 40 mm Hg 甚至更高;而另一种恒压变流式气腹机在同样设定值的情况下可以使腹内压稳定在不超过 15 mm Hg 的 $\pm 10\%$ 区间内。尤其是实际手术过程中的 CO₂ 泄漏,会使电子脉冲式气腹机产生的气腹造成更大范围的腹内压波动。实验结果表现出的 CO₂ 气腹对腹膜浅方肌纤维组织超微结构的影响以脉冲式气腹机充气更为

明显,提示我们在恶性肿瘤的腹腔镜手术中应尽可能降低气腹压力,或减少术中气体泄漏以稳定腹内压,或者应用能够保持腹内压恒定的气腹机,缩短手术时间,把气腹对腹膜的损伤程度降到最低。

参考文献

- 1 Martinez-Palones JM, Gil-Moreno AG, Perez-Benavente MA, et al. Umbilical metastasis after laparoscopic retroperitoneal paraaortic lymphadenectomy for cervical cancer: a true port-site metastasis? *Gynecol Oncol*, 2005, 97(1): 292-295.
- 2 Sanjuan A, Hernandez S, Pahisa J, et al. Port site metastasis after laparoscopic surgery for endometrial carcinoma: two case reports. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(2): 539-542.
- 3 Huang KG, Wang CJ, Chang TC, et al. Management of port-site metastasis after laparoscopic surgery for ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 189(1): 16-21.
- 4 Hirabayashi Y, Yamaguchi K, Shiraishi N, et al. Development of port-site metastasis after pneumoperitoneum. *Surg Endosc*, 2002, 16(5): 864-868.
- 5 Volz J, Koster S, Spacek Z, et al. Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. *Surg Endosc*, 1999, 13(6): 611-614.
- 6 Suematsu T, Hirabayashi Y, Shiraishi N, et al. Morphology of the murine peritoneum after pneumoperitoneum vs laparotomy: a scanning electron microscopy study. *Surg Endosc*, 2001, 15(9): 954-958.
- 7 刘海防,刘彦,庄海.两种不同工作原理的气腹机对妇科腹腔镜手术中患者腹腔压力的影响. *中华医学杂志*, 2006, 86(3): 3225-3226.
- 8 刘彦,侯庆香.二氧化碳气腹腹腔镜手术对人体腹膜形态学的影响. *中华医学杂志*, 2006, 86(45): 164-166.
- 9 Hazebroek EJ, Schreve MA, Visser P. Impact of temperature and humidity of carbon dioxide pneumoperitoneum on body temperature and peritoneal morphology. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*, 2002, 12(5): 355-364.
- 10 Erikoglu M, Yol S, Avunduk MC. Electron-microscopic alterations of the peritoneum after both cold and heated carbon dioxide pneumoperitoneum. *J Surg Res*, 2005, 125(1): 73-77.
- 11 Rosario MT, Ribeiro U Jr, Corbett CE, et al. Does CO₂ pneumoperitoneum alter the ultra-structure of the mesothelium? *J Surg Res*, 2006, 133(2): 84-88.
- 12 Brundell SM, Tsopelas C, Chatterton B, et al. Experimental study of peritoneal blood flow and insufflation pressure during laparoscopy. *Br J Surg*, 2002, 89(5): 617-622.
- 13 Sietes C, von Blomberg ME, Eijssbouts QA, et al. The influence of CO₂ versus helium insufflation or the abdominal wall lifting technique on the systemic immune response. *Surg Endosc*, 2002, 16(3): 525-528.
- 14 Bergstrom M, Falk P, Holmdahl L. Effect of acidosis on expression of mesothelial cell plasminogen activator inhibitor type-1. *Surg Endosc*, 2006, 20(9): 1448-1452.

(收稿日期:2008-12-15)

(修回日期:2009-02-13)

(责任编辑:王惠群)