

CO₂气腹对胃癌细胞NF-κB p65、TNF-α和IL-6表达的影响

查勇, 寸英丽

■背景资料

腹腔镜手术是一种微创的治疗方法, 近年来用于胃肠道肿瘤的治疗中。但腹腔镜胃肠道手术中CO₂气腹对残存肿瘤细胞生长的影响及其作用机制仍然存在一定的争议。

查勇, 寸英丽, 昆明医学院第三附属医院 云南省肿瘤医院腹部肿瘤外科 云南省昆明市 650118

云南省自然科学基金资助项目, No. 2010CD179

作者贡献分布: 此课题由查勇与寸英丽设计; 研究过程由查勇操作完成; 论文写作由查勇与寸英丽完成。

通讯作者: 寸英丽, 主任医师, 650118, 云南省昆明市, 昆明医学院第三附属医院腹部外科。cunyingli@medmail.com.cn
电话: 0871-8185656-2572

收稿日期: 2011-03-12 修回日期: 2011-05-20

接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-28

Impact of carbon dioxide pneumoperitoneum on the expression of nuclear factor kappa B p65, TNF-α, and IL-6 in human gastric cancer xenografts in a nude mouse model

Yong Zha, Ying-Li Cun

Yong Zha, Ying-Li Cun, Department of Abdominal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118, Yunnan Province, China

Supported by: the Yunnan Provincial Science Foundation of China, No. 2010CD179

Correspondence to: Ying-Li Cun, Department of Abdominal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118, Yunnan Province, China. cunyingli@medmail.com.cn

Received: 2011-03-12 Revised: 2011-05-20

Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-28

Abstract

AIM: To assess the impact of carbon dioxide (CO₂) pneumoperitoneum versus laparotomy on the expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), and nuclear factor kappa B (NF-κB) in human gastric cancer xenografts in a nude mouse model.

METHODS: Nude mice were inoculated intraperitoneally with human gastric cancer cells (MKN45) to generate a xenograft mouse model of human gastric cancer. The model mice were randomly divided into three groups to undergo laparotomy, CO₂ pneumoperitoneum, and anesthesia alone, respectively. Tumor growth and

expression of TNF-α, IL-6 expression and NF-κB in tumor xenografts were determined.

RESULTS: Total tumor weight was higher in mice undergoing laparotomy than in those undergoing CO₂ pneumoperitoneum (0.72 ± 0.02 vs 0.43 ± 0.06 , $P < 0.05$). The mRNA expression levels of NF-κB p65, TNF-α, and IL-6 were significantly higher at 24 h after laparotomy than after CO₂ pneumoperitoneum (1.09 ± 0.12 vs 0.63 ± 0.07 ; 1.14 ± 0.11 vs 0.31 ± 0.05 ; 0.65 ± 0.08 vs 0.42 ± 0.04 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: In a xenograft mouse model of human gastric cancer, CO₂ pneumoperitoneum resulted in slower tumor growth and lower expression levels of TNF-α, IL-6 and NF-κB p65 in tumor tissue than laparotomy, suggesting that laparoscopy is a minimally invasive technique in gastrointestinal oncologic surgery.

Key Words: Gastric cancer; CO₂ pneumoperitoneum; Nuclear factor-kappa B; Tumor necrosis factor-α; Interleukin 6

Zha Y, Cun YL. Impact of carbon dioxide pneumoperitoneum on the expression of nuclear factor kappa B p65, TNF-α, and IL-6 in human gastric cancer xenografts in a nude mouse model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(18): 1932-1935

摘要

目的: 探讨CO₂气腹对胃癌细胞转录因子(NF-κB)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白介素6(IL-6)表达的影响。

方法: 将胃癌细胞MKN45种植于裸鼠腹腔, 建立胃癌移植瘤动物模型, 实验动物随机分为CO₂气腹组、开腹组和对照组, 观察各组肿瘤细胞的生长, 采用RT-PCR检测NF-κB转录因子p65亚单元、TNF-α和IL-6表达的变化。

结果: 开腹组肿瘤病灶质量(mg)比CO₂气腹组重, 组间存在显著差异(0.72 ± 0.02 vs 0.43 ± 0.06 , $P < 0.05$)。实验处理后24 h, 开腹组NF-κB

■同行评议者

蔡三军, 主任医师, 复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

p65、TNF-α和IL-6表达比CO₂气腹组高, 组间存在显著差异(1.09 ± 0.12 vs 0.63 ± 0.07 ; 1.14 ± 0.11 vs 0.31 ± 0.05 ; 0.65 ± 0.08 vs 0.42 ± 0.04 , 均 $P < 0.05$).

结论:腹腔镜手术中, CO₂气腹诱导更低的NF-κB p65、TNF-α和IL-6表达, 对肿瘤生长的影响较小, 本实验支持腹腔镜技术在胃癌治疗中的应用.

关键词: 胃癌; CO₂气腹; 核因子κB; 肿瘤坏死因子α; 白介素6

查勇, 寸英丽. CO₂气腹对胃癌细胞NF-κB p65、TNF-α和IL-6表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(18): 1932-1935
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1932.asp>

0 引言

手术是治疗恶性肿瘤的首选方法, 然而, 亦有人认为手术创伤可能促进肿瘤生长, 但创伤对肿瘤生长影响的机制尚未完全明了^[1,2]. 腹腔镜手术是一种微创的治疗方法, 近年来用于胃肠道肿瘤的治疗中^[3-5]. 一些研究表明, 腹腔镜手术比开腹手术对残留肿瘤细胞生长的影响较小, 与手术应激有关的黏附分子、细胞趋化因子、生长因子的血浆浓度较低^[6,7]. 但腹腔镜胃肠道手术中CO₂气腹对残存肿瘤细胞生长的影响及其作用机制仍然存在一定的争议^[8,9].

本研究中, 我们探讨腹腔镜手术中CO₂气腹对胃癌细胞核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB) p65亚单元、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白介素6(interleukin 6, IL-6)表达的影响, 为腹腔镜技术在胃癌治疗中的应用提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株MKN45购于中科院上海细胞库; 细胞培养液DMEM和胎牛血清购自hyclone公司; BALB/c裸鼠由中国科学院上海实验动物中心提供; 一步法RT-PCR试剂盒(Invitrogen, 昆明绿晨分子生物科技有限公司代购)、PCR引物由上海生工生物工程公司合成、总RNA抽提液TRIzol Reagent购自Invitrogen公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 采用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养细胞, 放置于含50 mL/L CO₂的培养箱中, 温度维持在37 ℃. 待细胞对数期生长时, 用0.25%的胰酶消化, PBS洗涤, 离心收集, 再用

PBS重新悬浮细胞, 动物实验备用.

1.2.2 造模: BALB/c裸鼠在昆明医学院药物重点实验室动物房SPF环境下饲养. 6周龄, 雌雄不限, 体质量25-30 g. 按照Matsui的方法腹腔种植MKN45细胞(3×10^6 个), 建立肿瘤腹腔种植动物模型. 成模后, 实验动物随机分为开腹组、CO₂气腹组 and 对照组(仅接受麻醉).

1.2.3 手术: 参照文献[7]的方法, 实验鼠采用乙醚吸入麻醉, 仰卧位固定于手术台上. 在开腹组中, 实验动物腹部中央取一3 cm的手术切口, 开腹20 min后, 关闭腹腔. 在CO₂气腹组中, 闭合法建立CO₂气腹, 气腹压6 cmH₂O, 维持20 min. 对照组实验动物仅接受乙醚麻醉20 min.

1.2.4 RT-PCR检测各组肿瘤组织中NF-κB p65、TNF-α和IL-6表达水平: 使用一步法RT-PCR试剂盒, 利用TRIzol RNA抽提试剂, 根据厂家推荐的操作步骤提取各组胃癌组织中总RNA, 引物序列见表1. PCR反应条件: NF-κB p65的反应参数为94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 32循环, 最后72 ℃ 10 min(扩增产物长为204 bp). β₂-GM的反应参数为94 ℃ 45 s, 55.5 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 32循环, 最后72 ℃ 10 min(扩增产物长为264 bp). TNF-α的反应参数为94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 32循环, 最后72 ℃ 10 min(扩增产物长为324 bp). IL-6的反应参数为94 ℃ 45 s, 52.2 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 32循环, 最后72 ℃ 10 min(扩增产物长为260 bp). 紫外分光光度计测A₂₆₀、A₂₈₀值, 标本的总RNA的A₂₆₀/A₂₈₀值均在1.6-1.8.

1.2.5 动物体内病灶生长情况的观察: 各实验因素处理后3 wk后, 处死3组实验动物, 收集肿瘤病灶, 称质量, 并进行比较.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件, TNF-α、NF-κB和β₂-GM mRNA表达比及肿瘤质量用mean±SD表示, 两样本均数比较采用成组t检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 各组肿瘤组织中NF-κB p65、TNF-α和IL-6的表达 在开腹组、CO₂气腹组TNF-α、IL-6、NF-κB p65 mRNA在实验开始后24 h均显著升高, 开腹组TNF-α、IL-6、NF-κB p65 mRNA水平比CO₂气腹组高, 组间具有显著差异($P < 0.05$, 图1, 表2).

2.2 病灶的生长情况 实验因素处理后3 wk后, 开腹组肿瘤质量比对照组及CO₂气腹组增加, 开腹组肿瘤质量为(0.72 ± 0.02) mg, 对照组为($0.30 \pm$

■研发前沿

近年来, 肿瘤生物活性及相关基因的表达变化成为研究CO₂气腹对肿瘤影响的热点.

■相关报道

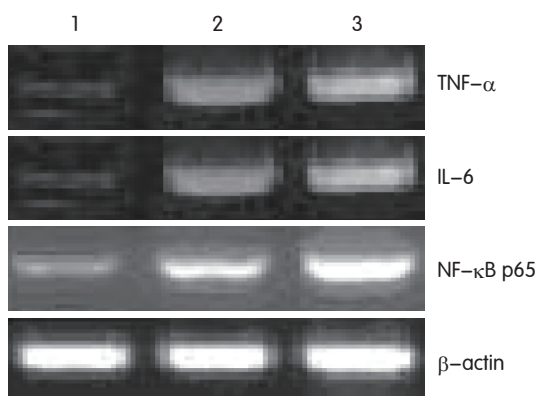
Amin等以裸鼠腹腔移植瘤为动物模型研究CO₂气腹和开腹手术对肿瘤生存素、表皮生长因子受体1、表皮生长因子受体2表达的影响, 结果显示, 术后48 h开腹组肿瘤组织中生存素、表皮生长因子受体1、表皮生长因子受体2的水平比CO₂气腹组高, 组间存在显著差异.

■创新盘点

本研究通过RT-PCR检测肿瘤组织中NF- κ B p65、TNF- α 和IL-6的表达变化,进一步分析CO₂气腹对胃癌生长的影响及其作用机制。

表 1 PCR反应引物序列

目的基因	引物序列	扩增产物大小(bp)
β_2 -GM	TTAGCTCTCGCGTACTCTCTC	264
	GTCGGATTGATGAAACCCAGACACA	
NF- κ B p65	GGGAAGGAACGCTGTCAGAG	204
	TAGCCTCAGGGTACTCCATCA	
IL-6	TCAATGA GGA GACTTGCCTG	260
	GATGA GTTGTCTATGCTCTGC	
TNF- α	CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG	324
	CCTTGGTCTGGTAGGAGACG	

图 1 术后24 h各基因mRNA的表达. 1: 对照组; 2: CO₂气腹组; 3: 开腹组表 2 3组TNF- α 、IL-6、NF- κ B p65基因的相对表达(mean \pm SD)

分组	TNF- α	IL-6	NF- κ B p65
开腹组	1.14 \pm 0.11 ^{ac}	0.65 \pm 0.08 ^{ac}	1.09 \pm 0.12 ^{ac}
CO ₂ 气腹组	0.31 \pm 0.05	0.42 \pm 0.04 ^c	0.63 \pm 0.07 ^c
对照组	0.29 \pm 0.06	0.16 \pm 0.04	0.24 \pm 0.03

^aP<0.05 vs CO₂气腹组; ^cP<0.05 vs 对照组.

■应用要点

在临床上,即使完全切除肿瘤,仍然有多数患者术后复发,其中术后残留的微转移病灶,被认为是术后复发的重要原因. 本研究结果显示,与开腹手术中的腹壁切口相比,腹腔镜手术中的CO₂气腹对腹腔胃癌细胞的生长影响较小,伴有肿瘤组织中NF- κ B p65、TNF- α 、IL-6的表达,提示腹腔镜手术在胃癌治疗中具有重要的临床意义。

0.04) mg, CO₂气腹组为(0.43 \pm 0.06) mg, 组间存在显著差异(P<0.05)。

3 讨论

手术切除是恶性实体肿瘤首选的治疗方法,然而,有研究报道,手术创伤可引起局部和全身代谢、内分泌和免疫反应,促进残存恶性肿瘤细胞的生长^[1,2]。手术创伤引起机体一些细胞因子浓度的变化,这些细胞因子是机体免疫细胞重要的调节者,引起局部和全身的炎症反应,同时这些细胞因子及生长因子可影响肿瘤的生长及病情的进展^[10-12]。近年来一些微创手术,如腹腔镜手术在恶性肿瘤的治疗中获得了一定程度的

接受。已有实验和临床研究证明腹腔镜手术治疗恶性肿瘤的可行性^[3-5,13]。与开腹手术不同,腹腔镜手术常通过CO₂气腹显露手术野。但CO₂气腹对腹腔残存肿瘤细胞生长的影响仍然存在一定的争议。在本研究中,我们进一步探讨CO₂气腹对胃癌生长的影响,分析其作用机制。

我们研究结果提示,腹腔镜手术中的CO₂气腹比开腹手术中的腹壁切口对肿瘤生长的影响更小,CO₂气腹组肿瘤重量比开腹组小。此外,我们通过提取各组肿瘤结节中RNA,分析各组肿瘤组织中TNF- α 、IL-6、NF- κ B p65的表达,研究结果亦提示,CO₂气腹组TNF- α 、IL-6、NF- κ B p65表达水平较低。

有研究表明,IL-6水平和手术的方式、创伤程度及手术时间有关^[14,15]。Luk等^[15]以BALB/c鼠为动物模型采用ELISA法检测腹腔镜和开腹手术中血浆和肠黏膜中IL-6的浓度。结果显示,术后4 h,开腹手术组实验动物血浆和肠黏膜中IL-6浓度比腹腔镜组显著增高,多变量分析显示,腹壁手术切口大小是IL-6浓度升高的重要因素。此外,我们认为,开腹手术中,腹腔水分蒸发,腹膜和内脏浆膜干燥亦是增加创伤,导致IL-6水平升高的原因之一;而在腹腔镜手术中CO₂腹下,腹腔内环境温暖、潮湿,这种创伤较小。West等^[16]报道腹腔镜手术中CO₂气腹可抑制巨噬细胞功能,巨噬细胞功能收到抑制可能是细胞因子产生减少的重要原因。本研究结果提示腹腔残留肿瘤细胞亦可表达IL-6,而且开腹组IL-6表达水平比腹腔镜组高。IL-6可促进肝脏炎症相关蛋白的合成和趋化,引起局部炎症反应,这一炎症反应在促进手术创伤部位组织修复同时,亦可促进残存肿瘤细胞生长。

TNF- α 是一种可促进多种炎症反应的细胞因子,炎症样微环境和肿瘤的生长存在密切的关系。有研究表明,TNF- α 也是各种应激反应必

要的调节物质, 应激反应可影响免疫细胞的功能、细胞的增生、分化及凋亡^[17-20]. NF- κ B是一种细胞核转录因子, 由p65、p52、p50、RelB和c-Rel 5个亚单元组成, 在无外界刺激因素时, NF- κ B通过与细胞质内抑制蛋白(inhibitory proteins I κ B, I κ B)结合, 以无活性状态存在, 滞留在细胞质中. 在接收到外界信号时, NF- κ B转录因子和I κ B分离, 进入细胞核, 和特异的DNA结合后, 可导致一些基因表达增加, 如细胞周期、细胞生存、细胞黏附和血管生成、免疫和炎症反应相关的基因^[21,22]. NF- κ B激活不仅促进恶性肿瘤细胞转化、肿瘤进展, 亦可促进肿瘤免疫监测、产生治疗耐受^[23-26]. 本研究中, 我们的结果亦显示开腹组NF- κ B转录因子亚单元p65和TNF- α 表达增加, 与CO₂气腹组有显著的差异.

总之, 与开腹手术相比, 腹腔镜手术中CO₂气腹诱导更低的NF- κ B p65、TNF- α 、IL-6表达, 对胃癌细胞的生长影响较小. 本研究为CO₂气腹在胃癌腹腔镜手术中的安全应用提供实验依据, 提示腹腔镜手术在恶性肿瘤治疗中具有重要的潜在价值.

4 参考文献

- Belizon A, Kirman I, Balik E, Karten M, Jain S, Whelan RL. Major surgical trauma induces proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 in transgenic mice and is associated with a rapid increase in circulating levels of matrix metalloproteinase-9. *Surg Endosc* 2007; 21: 653-658
- El Saghir NS, Elhajj II, Geara FB, Hourani MH. Trauma-associated growth of suspected dormant micrometastasis. *BMC Cancer* 2005; 5: 94
- 龚涛, 王彤. 腹腔镜手术治疗结直肠癌进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2121-2126
- 张超, 刘涛, 余佩武, 甘露, 刘立业. 腹腔镜保留自主神经的直肠癌D3根治术的安全性. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 529-531
- Hur H, Jeon HM, Kim W. Laparoscopic pancreas- and spleen-preserving D2 lymph node dissection in advanced (cT2) upper-third gastric cancer. *J Surg Oncol* 2008; 97: 169-172
- 于歌, 唐波, 余佩武, 钱锋, 孙刚, 牛嫣阳. 腹腔镜与开腹胃癌手术腹腔冲洗液中IL-1 β 浓度的变化及其对腹膜间皮细胞与胃癌细胞黏附的影响. *解放军医学杂志* 2010; 35: 28-31
- Amin AT, Shiraishi N, Ninomiya S, Tajima M, Inomata M, Kitano S. Increased mRNA expression of epidermal growth factor receptor, human epidermal receptor, and survivin in human gastric cancer after the surgical stress of laparotomy versus carbon dioxide pneumoperitoneum in a murine model. *Surg Endosc* 2010; 24: 1427-1433
- Ma JJ, Feng B, Zhang Y, Li JW, Lu AG, Wang ML, Peng YF, Hu WG, Yue F, Zheng MH. Higher CO₂-insufflation pressure inhibits the expression of adhesion molecules and the invasion potential of colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2714-2722
- Shen MY, Huang IP, Chen WS, Chang JT, Lin JK. Influence of pneumoperitoneum on tumor growth and pattern of intra-abdominal tumor spreading: in vivo study of a murine model. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 947-951
- Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121: 2373-2380
- 李绍平, 李侠, 王颢. 恶性肿瘤的发病机制(一)-创伤修复自动反馈机制假说. *医学综述* 2006; 12: 1535-1536
- 付小兵, 程飏, 刘宏伟. 创伤修复与肿瘤发生之间的信号联系. *创伤外科杂志* 2007; 9: 174-176
- Hottenrott C. Totally laparoscopic vs. laparoscopically assisted distal gastrectomy for gastric cancer. *Surg Endosc* 2010; 24: 961-963
- 韩传宝, 周钦海, 钱燕宁, 刘华, 韩素萍. 比较悬吊式与气腹腹腔镜对妇科手术应激反应的影响及麻醉方式的干预作用. *中国内镜杂志* 2008; 14: 337-340
- Luk JM, Tung PH, Wong KF, Chan KL, Law S, Wong J. Laparoscopic surgery induced interleukin-6 levels in serum and gut mucosa: implications of peritoneum integrity and gas factors. *Surg Endosc* 2009; 23: 370-376
- West MA, Baker J, Bellingham J. Kinetics of decreased LPS-stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO₂. *J Surg Res* 1996; 63: 269-274
- Silke J, Brink R. Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell Death Differ* 2010; 17: 35-45
- 王峻, 郭德玉. TNF- α 对胃癌细胞MMP-2和MMP-9表达的诱导作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1208-1212
- 李晶媛, 李树臣, 杨维良. TNF- α 诱导肝细胞凋亡机制的回顾与展望. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 606-611
- 纪涛, 汤志刚, 黄强, 许戈良, 陈炯, 李建生. TNF- α 抑制剂对重症急性胰腺炎细胞凋亡及Caspase-3表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3324-3327
- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 2008; 132: 344-362
- Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431-436
- Tabruyn SP, Griffioen AW. A new role for NF- κ B in angiogenesis inhibition. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1393-1397
- Zhu BS, Xing CG, Lin F, Fan XQ, Zhao K, Qin ZH. Blocking NF- κ B nuclear translocation leads to p53-related autophagy activation and cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 478-487
- Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 431-435
- Matteucci C, Minutolo A, Balestrieri E, Marino-Merlo F, Bramanti P, Garaci E, Macchi B, Mastino A. Inhibition of NF- κ B activation sensitizes U937 cells to 3'-azido-3'-deoxythymidine induced apoptosis. *Cell Death Dis* 2010; 1: e81

■同行评价

本文设计合理, 数据可靠, 为临床开展腹腔镜手术提供更多有力的循证医学证据, 对临床开展腹腔镜胃癌手术有一定的参考价值.

编辑 李薇 电编 何基才