

论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1708-05

## 超声微泡携 MAGL-shRNA 靶向释放对大鼠肝细胞肝癌转移作用的实验研究

陈懿<sup>1</sup>, 王晓波<sup>2</sup>, 张俊勇<sup>1</sup>, 连峥嵘<sup>1</sup>, 龚建平<sup>1</sup> (400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科<sup>1</sup>; 408000 重庆, 重庆市涪陵中心医院肝胆外科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 观察超声微泡携单酰基甘油脂肪酶沉默基因(monoacylglycerol lipase short hairpin RNA, MAGL-shRNA)在大鼠肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中转染及对HCC转移的作用。方法 建立大鼠肝细胞肝癌模型,病理解剖和二维超声验证肝脏成瘤情况。40只SD大鼠完全随机分成4组,分别为PBS液组、MAGL-shRNA质粒微泡组(MAGL-shRNA + microbubble, MB)、空白质粒微泡 + 超声辐照组(microbubbles + ultrasound, MB + US)、MAGL-shRNA质粒微泡 + 超声辐照组(MAGL-shRNA + MB + US)。每只注射1 mL,对MB + US组和MAGL-shRNA + MB + US组大鼠肝区同时给予超声辐照,辐照条件为300 kHz, 2 W/cm<sup>2</sup>,辐照10 s,间隔10 s,共20 min。Western blot检测大鼠HCC组织MAGL蛋白的表达,免疫组化检测MAGL和基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达。比较各组动物的肿瘤转移情况。结果 MAGL在HCC组织中表达明显高于正常肝组织( $P < 0.05$ );微泡携MAGL-shRNA可以在HCC组织被超声辐照击破后靶向释放,在各组HCC组织中均有MAGL蛋白的表达,其中MAGL-shRNA + MB + US组表达量明显低于其他组( $P < 0.01$ );免疫组化检测MAGL-shRNA + MB + US组MMP-2表达均低于其他组( $P < 0.01$ );各组动物均见肿瘤转移,但MAGL-shRNA + MB + US组转移率最低( $P < 0.05$ )。结论 超声辐照可破坏携MAGL-shRNA的微泡使之靶向释放并增强了MAGL-shRNA的转染效率,MAGL-MMP-2通路可能与HCC的转移相关。

**[关键词]** 肝细胞肝癌;单酰基甘油脂肪酶;超声微泡;转移

**[中图分类号]** R454.3;R73-362;R735.7

**[文献标志码]** A

## Effect of ultrasound microbubble carrying MAGL-shRNA on metastasis of hepatocellular carcinoma in rats

Chen Yi<sup>1</sup>, Wang Xiaobo<sup>2</sup>, Zhang Junyong<sup>1</sup>, Lian Zhengrong<sup>1</sup>, Gong Jianping<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; <sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, Central Hospital of Fuling District, Chongqing, 408000, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of silencing monoacylglycerol lipase by short hairpin RNA (shRNA) on the metastasis of hepatocellular carcinoma in rats by using ultrasound-targeted microbubble destruction. **Methods** Liver tumor models of rats were established by intragastrically injection of 0.2% DEN in 5 times per week for 14 weeks. The successful establishment of tumor model was testified by pathologic biopsy and two-dimensional ultrasonography. Totally 40 rats with liver tumor were randomly divided into 4 groups, phosphate-buffered solution (PBS) group, lipid microbubbles loaded MAGL-shRNA (MAGL-shRNA + microbubble group), pure lipid microbubbles + ultrasound (MB + US group), and lipid microbubbles loaded MAGL-shRNA + ultrasound (MAGL-shRNA + MB + US group). The microbubbles of 1 mL containing MAGL-shRNA plasmid or not were injected through tail vein. Ultrasound radiation was applied on the rats of MB + US and MAGL-shRNA + MB + US groups after the injection of target gene, with the radiation frequency of 1 kHz, sound intensity of 2 W/cm<sup>2</sup>, with the pulse irradiation of 10 s and interval time of 10 s for totally 20 min. The expression of MAGL protein was detected in the tumor mass by Western blotting. Protein expression of MAGL and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) was detected by immunohistochemistry (IHC). Tumor metastasis were observed and compared among different groups. **Results** The protein expression of MAGL was significantly higher in HCC tissue than in normal tissue ( $P < 0.05$ ). Microbubbles containing MAGL-shRNA were injected

**[基金项目]** 重庆市卫生局重点科研项目(2011-1-123)

**[通信作者]** 龚建平, E-mail: gongjianping11@126.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1712.020.html>(2013-04-10)

precisely into the tumor tissue and then released to the target, and the expression of MAGL protein was found in all HCC tissue. Its expression in MAGL-shRNA + MB + US group was significantly lower than the other groups ( $P < 0.01$ ). The MMP-2 expression detected by IHC in MAGL-shRNA + MB + US group was significantly lower than others ( $P < 0.01$ ). Tumor metastasis was found in all groups, but the metastasis rate in MAGL-shRNA + MB + US group was the lowest ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ultrasound targeted microbubble destruction can effectively transfect MAGL-shRNA into the target tissues, and play a inhibitory effect on the metastasis in liver cancer through MAGL-MMP-2 signal pathway.

[ **Key words** ] hepatocellular carcinoma; monoacylglycerol lipase; ultrasound microbubble; metastasis

Supported by the Key Project of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-123). Corresponding author: Gong Jianping, E-mail: gongjianping11@126.com

单酰基甘油脂肪酶 (monoacylglycerol lipase, MAGL) 是一种脂代谢关键酶,其在促进肿瘤的发生,以及增加恶性程度上有重要作用,以 RNA 干扰和 JZL184 药理学阻断 MAGL 后肿瘤的生长和转移明显被抑制<sup>[1-2]</sup>。研究表明,肥胖和脂质代谢紊乱是肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发生的高危因素<sup>[3]</sup>,且肝炎病毒感染造成的脂代谢异常以及非酒精性肝脂肪变均有可能是 HCC 发生、发展的根本原因<sup>[4]</sup>。HCC 的转移仍是患者术后长期存活的主要障碍,目前尚无有效的治疗手段预防 HCC 的转移。

近年来超声辐照破坏携靶基因的微泡定向释放技术以它的无创、安全、高效、靶向性好及不引起免疫反应的优点已经成为肝癌基因治疗的热点和方向<sup>[5-6]</sup>。本研究通过超声微泡技术靶向转染 MAGL-shRNA,特异性抑制 HCC 细胞内 MAGL 的表达,探究以 MAGL 为靶点调节脂质代谢为手段抑制 HCC 转移的可行性以及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 ( $216.5 \pm 16.2$ ) g, 8 周龄,购自重庆医科大学实验动物中心。所有动物分笼饲养于重庆医科大学 SPF 级实验动物房,采用标准化光照,自由饮水、进食,定期更换垫料,适应环境 1 周。动物使用许可证号: CQLA-2011-2443。实验过程中对大鼠的饲养和处置均遵循《重庆市实验动物管理办法》。

### 1.2 主要仪器及试剂

752 型紫外分光光度仪购自日本岛津公司,CGZZ 型超声基因转染治疗仪 (1 MHz) 为重庆医科大学超声影像学研究所研制,自制脂质微泡为重庆医科大学超声影像学研究所惠赠。MAGL-shRNA 质粒购自美国 Santa Cruz 公司,Omega 质粒试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司,多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司。二乙基亚硝胺 (DEN),纯度为 99.5%,购自美国 Sigma 公司。抗 MAGL 抗体购自英国 Abcam 公司,抗 MMP-2 抗体购自武汉三鹰公司。

### 1.3 大鼠肝癌模型的建立

大鼠适应喂养 1 周后,从第 2 周开始给予体积分数 0.2%

DEN (500 mL 生理盐水加 1 mL DEN,振荡混匀,避光保存)溶液灌胃,按体质量 10 mg/kg 给药,5 次/周,至 14 周停药。建模后随机处理 5 只大鼠,给予肝区二维 B 超检测后收集大鼠肿瘤组织作常规切片,HE 染色,经病理诊断均为肝细胞癌,即建立大鼠 HCC 模型成功。剩余 40 只大鼠采用完全随机法分成 4 组:分别为 PBS 液组、MAGL-shRNA 质粒微泡组 (MAGL-shRNA + MB)、空白质粒微泡 + 超声辐照组 (MB + US)、MAGL-shRNA 质粒微泡 + 超声辐照组 (MAGL-shRNA + MB + US)。

### 1.4 质粒提取及携 MAGL-shRNA 基因微泡的合成

MAGL-shRNA 质粒转化 JM109 大肠杆菌;经氨苄西林筛选出阳性克隆,在 LB 培养基中大量扩增细菌;参照 GIGA 质粒抽提试剂盒说明书大量抽提纯化质粒;紫外分光光度计检测质粒浓度和纯度,调整浓度为 1 mg/mL,  $D(260)/D(280) = 1.9$ ,其纯度符合实验要求。参照文献<sup>[7]</sup>的方法制备载有 MAGL-shRNA 及赖氨酸的超声微泡造影剂,调整浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

### 1.5 治疗方法

第 15 周开始经大鼠尾静脉注射入载有 MAGL-shRNA 质粒的微泡 1 mL。空白质粒微泡 + 超声辐照组和 MAGL-shRNA 质粒微泡 + 超声辐照组注射后采用超声监测微泡到达靶组织的情况,辐照条件为 300 kHz, 2 W/cm<sup>2</sup>,辐照 10 s,间隔 10 s,共 20 min<sup>[8]</sup>。

### 1.6 检测指标

①建模后肿瘤超声、肿瘤标本及病理观察:50 只大鼠随机处理 5 只,给予二维 B 超检测后收集大鼠肝癌组织及正常肝组织,常规石蜡切片,HE 染色观察肿瘤组织的病理学变化情况,采用免疫组织化学二步法进行染色检测 MAGL 蛋白在 HCC 组织及正常组织中的表达。②Western blot 检测 MAGL 蛋白的表达情况:转染 1 周后,每组各处死 5 只大鼠采用 Western blot 检测 MAGL 蛋白的表达情况,操作按常规方法进行:收集大鼠肝癌组织,提取总蛋白, -20 °C 保存。配胶后加入预染蛋白和样本总蛋白,对各泳道等量上样电泳,同步化将蛋白转移至 PVDF 膜上,转膜后室温下封闭 4 h,依次加入一抗,4 °C 孵育过夜,洗膜,加二抗,室温下孵育 2 h,洗膜,显影,采用 Quantity One 软件分析各组 MAGL 与内参  $\beta$ -actin 的表达。③转染后肿瘤组织病理学检查和免疫组织化学染色:处死大鼠后取出肿瘤组织用 4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡切片;HE 染色,观察肿瘤组织的病理学变化情况。经苏木精伊红染色病理检查确诊后均采用免疫组织化学二步法进行染色检测 MMP-2 的表

达。④动物肿瘤转移情况:每组剩下的5只大鼠喂养至自然死亡,观察其肿瘤的转移情况(包括腹壁转移、结肠转移、胃转移、肺转移等),比较每组大鼠转移率的差异,转移率=每组发生转移的大鼠只数/5×100%。

### 1.7 统计学分析

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,多组重复测量资料运用单因素方差分析,各组转移率比较用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  (双侧)为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤超声及肿瘤标本 HE 染色结果

建模结束后,用二维超声观察大鼠肝脏成瘤情况,肿瘤表现为略低回声,周围可见低回声声晕;用彩色多普勒超声观察可见肿瘤周围点、线状血流信号(图1)。HCC 组织跟正常肝组织分界不清,外观呈圆形灰白色鱼肉样结构,表明光滑,质稍硬。病理切片观察,低倍镜下可见肝内浸润性癌巢,与肝实质无明显边界,结缔组织较少,癌巢边缘分布着浸润的肝索结构,肿瘤细胞分散排列,可见纤维间隔,新生毛细血管丰富;高倍镜下可见瘤细胞体积大,形态不规则,细胞排列不规则,细胞质丰富,淡红色,核肥大,其大小及形态各异,染色浓淡不均,核分裂像多见(图2)。

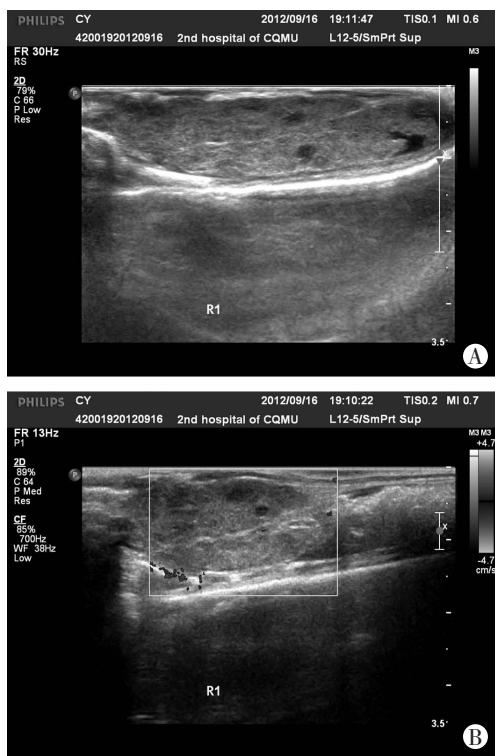


图1 大鼠肝细胞肝癌二维超声(A)和彩色多普勒超声(B)表现

### 2.2 Western blot 结果

Western blot 结果显示各组在  $33 \times 10^3$  处均有特异性条带,以  $\beta$ -actin 为内参,定量分析各组 MAGL 蛋白的表达,PBS 组、MAGL-shRNA + MB 组、MB + US 组、MAGL-shRNA + MB + US 组大鼠 HCC 组织 MAGL 灰度值分别为  $0.2074 \pm 0.0160$ 、 $0.1923 \pm 0.0198$ 、 $0.1953 \pm 0.0121$ 、 $0.0624 \pm 0.0134$ ,结果显示 MAGL-

shRNA + MB + US 组的 MAGL 蛋白表达明显低于其他各组 ( $P = 0.000$ ),见图3。

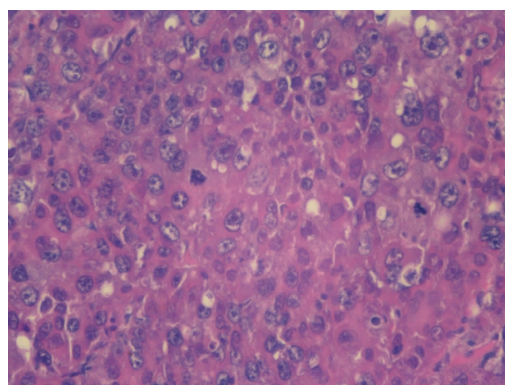
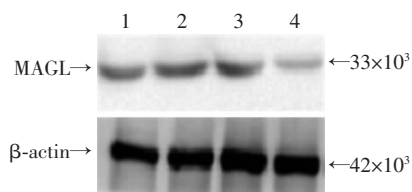


图2 大鼠肝细胞肝癌组织 HE 染色观察 (×400)

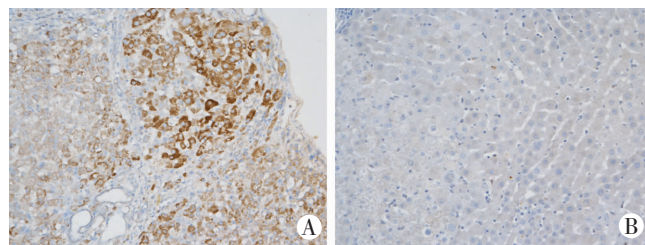


1:PBS 组; 2:MAGL-shRNA + MB 组; 3:MB + US 组; 4:MAGL-shRNA + MB + US 组

图3 Western blot 检测各组大鼠肝细胞肝癌组织中 MAGL 蛋白表达

### 2.3 免疫组化检测 MAGL 和 MMP-2 的表达

HCC 组织中 MAGL 表达明显高于正常肝组织中的表达 ( $P = 0.045$ ),正常肝组织中 MAGL 呈弥漫性弱表达;HCC 组织内 MAGL 表达较高,细胞质内棕黄色或棕褐色染色(图4)。各组 HCC 组织均见 MMP-2 表达,表现为肿瘤细胞质内出现棕黄色或棕褐色染色(图5),PBS 组、MAGL-shRNA + MB 组、MB + US 组、MAGL-shRNA + MB + US 组 MMP-2 光密度值分别为  $0.2683 \pm 0.0105$ 、 $0.2735 \pm 0.0114$ 、 $0.2672 \pm 0.0111$ 、 $0.1166 \pm 0.0135$ ,MAGL-shRNA + MB + US 组的光密度值明显低于其他各组 ( $P = 0.000$ )。

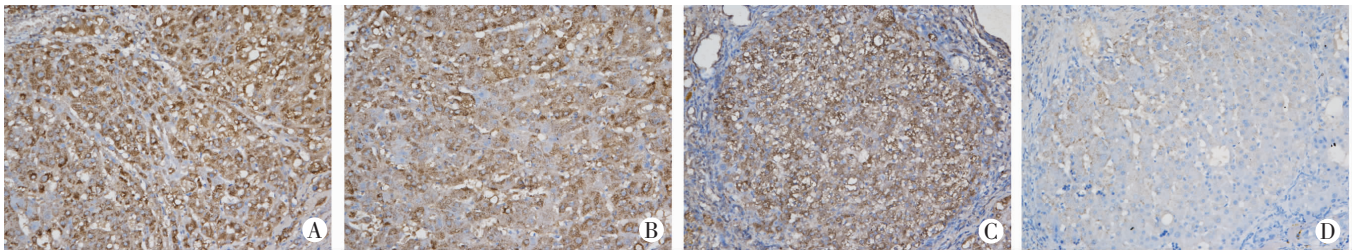


A:肝细胞肝癌组织;B:正常组织

图4 免疫组织化学法检测大鼠肝细胞肝癌组织与正常肝组织中 MAGL 的表达 (S-P×200)

### 2.4 各组转移率

每组剩余5只大鼠喂养至自然死亡,死亡后作解剖观察其肿瘤转移情况。结果显示,各组大鼠的肿瘤均有转移发生,PBS 组、MAGL-shRNA + MB 组、MB + US 组、MAGL-shRNA + MB + US 组转移率分别为 100%、100%、100%、40%,MAGL-shRNA + MB + US 组的肿瘤转移率较其他组低,差异有统计学意义 ( $P = 0.038$ )。



A: PBS 组; B: MAGL-shRNA + MB 组; C: MB + US 组; D: MAGL-shRNA + MB + US 组  
图5 免疫组织化学法检测各组大鼠肝细胞肝癌组织中 MMP-2 的表达 (S-P × 200)

### 3 讨论

二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 诱发大鼠肝细胞肝癌模型是实验性肝癌研究应用最为广泛的动物模型之一。DEN 是 N-亚硝基化合物,是具有中毒性和致癌性双重效应的化学毒剂,对肝脏有强烈的致癌作用,诱癌率高,诱癌周期短<sup>[9]</sup>。DEN 作为化学诱癌剂能引起肝细胞 DNA 损伤,使大鼠肝脏发生中毒性改变(如变性、坏死),继而出现肝细胞结节性增生和肝硬化,最后形成 HCC,即经历肝炎、肝硬化阶段进而形成肝癌<sup>[10]</sup>,模拟了人类 HCC 发生发展过程的特点,是一种非常理想的研究人类肝癌发生发展机制的动物模型。为了研究肿瘤的转移机制,建立于接近人体的肿瘤动物模型也显得尤为重要,原位肿瘤模型更能完整的表达人类肿瘤的转移特性。因此,我们选用了该化学诱导剂来建立大鼠肝癌模型。

超声微泡作为超声造影剂不断走向成熟,超声微泡造影剂经外周静脉注射后可以使血液产生强散射,可随血液循环到达身体各重要器官,并可以维持较高浓度,使实质器官、肿瘤显影。近年来超声微泡作为一种新的基因载体用于肿瘤等疾病治疗的研究也有了进一步发展,研究表明超声微泡携带肿瘤治疗基因可以实现靶向结合肿瘤并有效治疗肿瘤<sup>[11]</sup>。在肿瘤局部给予一定能量的超声辐照,超声波作用于微泡使之在局部破裂,产生的空化效应和声孔效应导致靶区细胞膜通透性增高及血管内皮细胞间隙增宽,使得外源基因更容易透过血管内皮进入靶组织被吸收,并且由于微泡在血循环中的稳定性较好,可减少基因在到达肿瘤等靶器官前在体内的破坏,可明显增强基因的转染和表达<sup>[12]</sup>。

肝细胞肝癌(HCC)是全球第五大恶性肿瘤,位于恶性肿瘤致死原因第二位。其发病率日益增高,且恶性度高、复发率高、预后差<sup>[13-14]</sup>。现阶段针对肝细胞肝癌的治疗以肝移植、手术切除、化疗以及放疗为主,然而大多数肝细胞肝癌患者发现时已经处于晚期阶段,失去了手术机会同时化疗及放疗效果也较差<sup>[15]</sup>。我国人群由于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染率高,HCC 发病率和死亡率高,随着分子生物学的不断发展,肝癌的基因治疗已越来越受到大家的关注。

本研究以 MAGL 为靶点,通过动物实验途径,超声辐照破坏携 MAGL-shRNA 的微泡使之靶向释放,探讨抑制 MAGL 对 HCC 转移的作用。本实验中,我们采用 Western blot 检测大鼠 HCC 组织 MAGL 蛋白的表达,MAGL-shRNA + MB + US 组 MAGL 蛋白较其他组都明显降低,结果说明超声辐照可明显提高 MAGL-shRNA 的转染效率。近来 Nomura 等<sup>[1]</sup>提出了一条全新的关于癌症生长和侵袭的通路,即 MAGL-FFAs 通路,MAGL 催化产物游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)的生成,并引起溶血性磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)等脂质信号的增加从而促进肿瘤的发生发展。研究表明,LPA 及其下游的 MMP-2 在 HCC 的侵袭转移中有重要作用,LPA 激活 MMP-2 的表达增强 HCC 的侵袭和转移能力<sup>[16]</sup>。在本实验中我们建模后处死 5 只大鼠做病理检查的同时通过免疫组化检测 MAGL 在大鼠 HCC 组织和正常肝组织中的表达,发现 MAGL 在 HCC 组织中的表达较正常肝组织明显升高,这提示 MAGL 很有可能在促进 HCC 的发生发展中也扮演着重要角色。转染 1 周后我们检测了各组 HCC 组织 MMP-2 的表达,结果显示 MAGL-shRNA + MB + US 组的 MMP-2 蛋白表达明显低于其他组,由于 Western blot 检测 MAGL-shRNA + MB + US 组 MAGL 的表达也低于其他各组,说明了 MAGL 表达降低后可以引起 MMP-2 活性的降低。同时从各组肿瘤转移情况来看,MAGL-shRNA + MB + US 组转移率也低于其他组,这与 MAGL 和 MMP-2 结果一致。我们推测其原因可能是 HCC 中 MAGL 表达降低后可以引起 LPA 表达减少从而导致 MMP-2 活性的降低,引起细胞外的胶原质和蛋白聚糖类等基质蛋白的降解减少<sup>[17]</sup>,通过 MAGL-MMP-2 途径降低 HCC 的转移。

综上所述,MAGL-MMP-2 通路可能与大鼠 HCC 的转移相关,这为以 MAGL 为肝细胞肝癌治疗中潜在的靶点以及 MAGL-LPA-MMP-2-HCC 通路研究提供了很好的基础。

参考文献:

[1] Nomura D K, Long J Z, Niessen S, *et al.* Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 49-61.

[2] Yecies J L, Manning B D. Chewing the fat on tumor cell metabolism [J]. *Cell*, 2010, 140(1): 28-30.

[3] Kurosaki M, Hosokawa T, Matsunaga K, *et al.* Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing hepatocellular carcinoma independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy[J]. *Hepato Res*, 2010, 40(9): 870-877.

[4] Rosmorduc O, Fartoux L. HCC and NASH: how strong is the clinical demonstration? [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2012, 36(3): 202-208.

[5] Suzuki J, Ogawa M, Takayama K, *et al.* Ultrasound-microbubble-mediated intercellular adhesion molecule-1 small interfering ribonucleic acid transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(9): 904-913.

[6] Zhou S, Li S, Liu Z, *et al.* Ultrasound-targeted microbubble destruction mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene treats hepatoma in mice[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 170.

[7] Wang Z X, Wang Z G, Ran H T, *et al.* The treatment of liver fibrosis induced by hepatocyte growth factor-directed, ultrasound-targeted microbubble destruction in rats[J]. *Clin Imaging*, 2009, 33(6): 454-461.

[8] Chen S, Shimoda M, Wang M Y, *et al.* Regeneration of pancreatic islets *in vivo* by ultrasound-targeted gene therapy[J]. *Gene Ther*, 2010, 17(11): 1411-1420.

[9] Bjorkhem-Bergman L, Torndal U B, Eken S, *et al.* Selenium prevents

tumor development in a rat model for chemical carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(1): 125-131.

[10] Gupta C, Vikram A, Tripathi D N, *et al.* Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(1): 119-128.

[11] Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Encapsulated ultrasound microbubbles; therapeutic application in drug/gene delivery[J]. *J Control Release*, 2006, 114(1): 89-99.

[12] Daigeler A, Chromik A M, Haendschke K, *et al.* Synergistic effects of sonoporation and taurolidin/TRAIL on apoptosis in human fibrosarcoma[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(11): 1893-1906.

[13] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[14] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29.

[15] Rossi L, Zoratto F, Papa A, *et al.* Current approach in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2010, 2(9): 349-359.

[16] Zhu B, Shi S, Ma Y G, *et al.* Lysophosphatidic acid enhances human hepatocellular carcinoma cell migration, invasion and adhesion through P38 MAPK pathway[J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59(115): 785-789.

[17] Wang N, Zhu M, Tsao S W, *et al.* Up-regulation of TIMP-1 by genipin inhibits MMP-2 activities and suppresses the metastatic potential of human hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46318.

(收稿:2013-02-25;修回:2013-03-26)

(编辑 邓强庭)

(上接 1707 页)

2 结果

经腹腔双套管引流 + 腹腔引流冲洗术治疗患者 32 例, 31 例肠外瘘口治愈(治愈率 96.88%), 1 例肠外瘘口未愈, 为患者主动放弃治疗。肠道通气时间(1.5 ± 0.3) d, 引流时间(2.5 ± 0.5) d, 拔管时间(4.0 ± 0.8) d, 住院时间(12.5 ± 0.3) d。经乳胶管单腔引流术治疗患者 31 例, 12 例肠外瘘口治愈(治愈率 36.67%), 19 例肠外瘘口未愈, 治愈率 38.71%, 肠道通气时间(3.5 ± 0.7) d, 引流时间(6.0 ± 1.2) d, 拔管时间(9.0 ± 1.8) d, 住院时间(35.0 ± 0.7) d。2 组治愈率相比, 差异具有统计学意义(P < 0.05)。腹腔双套管引流 + 腹腔引流冲洗术治疗组肠道通气时间、拔管时间及住院时间均短于经乳胶管单腔引流术治疗组, 差异也具有统计学意义(P < 0.05)。

3 讨论

妇科腹腔镜的发展, 是无数前辈努力探索、开拓进取的结果, 经历了曲折的发展过程, 整个过程伴随着经验的积累和各式各样手术并发症的出现。当盆腔广泛粘连或肠管粘连时, 尤其是严重的子宫内异位症时易发生肠管损伤。主要原因可能是能量器械操作不当导致局部电灼伤, 甚至在穿刺 Trocar 时损伤肠管。

肠管损伤在腹腔镜手术中的发生率为 0.08%, 而 70% 的肠穿孔在术中不能发现, 易被误诊为“肠麻痹”或单纯“腹腔感染”而延误了早期、有效的治疗, 致并发症发生率增加<sup>[2]</sup>。妇科腹腔镜后肠穿孔出现症状的时间比直接机械性肠穿孔晚, 为

4~5 d<sup>[3]</sup>。腹腔内常有肠液、粪便, 感染重, 常发生肠外瘘, 可因多种并发症危及生命。近年来随着对该病诊疗技术的改进, 死亡率明显下降, 但仍高于其他外科疾病, 通过有效的早期引流、控制感染和促进肠外瘘愈合的治疗, 大部分患者能愈合<sup>[4]</sup>。但由于肠外瘘发生后导致腹腔或盆腔感染, 且肠外瘘液体量大、多粘稠, 单腔被动引流无法充分引流, 而采用双套管持续负压引流变被动引流为主动引流, 不会对周围组织造成较大损伤, 且不易发生引流管堵塞, 引流量大, 故引流更充分有效。通过对院外及我科收治的妇科腹腔镜术后肠外瘘治疗患者的临床资料分析表明, 采用腹腔双套管引流 + 腹腔引流冲洗术能及时有效的清除漏出的肠液, 防止腹腔内持续感染及脓毒血症性脑病的进一步发展, 治愈率明显高于乳胶管单腔引流术患者。

参考文献:

[1] 吕翔, 王志敏, 汤丽英. 持续双套管冲洗负压引流在肠外瘘治疗中的应用[J]. *浙江创伤外科*, 2010, 15(6): 748-749.

[2] Paluszkiwicz P, Dudek W, Daulatzai N, *et al.* T-tube duodenocholangiostomy for the management of duodenal fistulae[J]. *World J Surg*, 2010, 34(4): 791-796.

[3] Baharestani M, Amjad I, Bookout K, *et al.* V. A. C. Therapy in the management of paediatric wounds; clinical review and experience[J]. *Int Wound J*, 2009, 6(Suppl 1): 1-26.

[4] Wright A, Wright M. Bedside management of an abdominal wound containing an enteroatmospheric fistula: a case report [J]. *Ostomy Wound Manage*, 2011, 57(1): 28-32.

(收稿:2013-01-15;修回:2013-04-15)

(编辑 栾嘉)