

脉冲电场作用下 Hela 细胞穿孔率研究

姜 松, 朱 策

(上海理工大学 机械工程学院, 上海 200093)

摘要: 以宫颈癌 Hela 细胞为实验对象, 利用自制脉冲电源和台盼蓝染色法计数, 针对不同的电脉冲参数作用于 Hela 细胞上, 研究了细胞可逆和不可逆电穿孔的场强阈值范围, 重点研究了脉冲个数、脉冲宽度和电场强度对细胞不可逆穿孔率的影响, 并选择了优化的参数组合。实验发现, 在固定脉冲宽度 $50\ \mu\text{s}$ 和 20 个脉冲个数不变的情况下, Hela 细胞出现可逆电穿孔 (存活) 的场强阈值范围分别为 $500\sim 750\ \text{V/cm}$, 出现不可逆电穿孔 (死亡) 的场强阈值范围为 $750\sim 1\ 000\ \text{V/cm}$ 。在对电脉冲参数优化组合的实验中, Hela 细胞的不可逆穿孔率随着脉冲个数、脉冲宽度和脉冲场强的增加而增加, 最终趋于饱和。宜选择场强 $1\ 500\ \text{V/cm}$ 、脉宽 $60\ \mu\text{s}$ 和 70 个脉冲的参数组合, 不可逆穿孔率为 93.42%。

关键词: 脉冲电场; 电穿孔; 电场强度; 脉冲宽度; 脉冲个数; 不可逆穿孔率

中图分类号: Q 233 文献标志码: A

Study on perforation rate of Hela cells under pulsed electric field

JIANG Song, ZHU Ce

(School of Mechanical Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In view of different electrical parameters on cervical cancer Hela cells, the self-made pulse power supply and trypan blue were used to study the threshold of electric field intensity for reversible and irreversible electroporation of cells. In particular, the influences of the number of pulses, pulse width and electric field intensity on irreversible perforation rate of cells were investigated. The optimal parameter combination was chosen. The experiments results show that the threshold of reversible electroporation (survival) for Hela cells ranges from $500\ \text{V/cm}$ to $750\ \text{V/cm}$ with a fixed pulse width of $50\ \mu\text{s}$ and a constant number of 20 pulses. Besides, the threshold of irreversible electroporation (death) ranges from $750\ \text{V/cm}$ to $1\ 000\ \text{V/cm}$. In the experiment of optimized parameter combination, the irreversible perforation rate of Hela cells increases with the increase of the number of pluses, pulse width and pulse field intensity, and finally reaches saturation. The irreversible perforation rate of Hela cells is 93.42% when the parameter combination of $1\ 500\ \text{V/cm}$, $60\ \mu\text{s}$ and 70 pulses is selected.

Keywords: pulse electric field; electroporation; electric field intensity; pulse width; pulse number; irreversible perforation rate

电穿孔现象最早发现于上世纪70年代,最初应用在辅助细菌细胞和哺乳动物细胞的体外基因转移方面^[1]。电脉冲消融法是基于电穿孔现象提出的,所谓电穿孔:是指细胞在外加电场的作用下,细胞膜磷脂双分子层上形成瞬时微孔的生物物理过程。当细胞膜发生电穿孔时,膜的通透性会瞬时增大,使亲水分子、DNA、蛋白质、病毒颗粒、药物和染料颗粒等正常情况下不能通过细胞膜的分子得以进入细胞^[2]。在外加脉冲电场取消后,如果微孔能够闭合,则称为可逆性电穿孔;如果微孔不能自我闭合,则称为不可逆性电穿孔^[3]。近年来,脉冲电场以其独特的生物电效应成为研究热点,并广泛应用于基因转染、药物导入、肿瘤治疗、创伤修复等领域^[4-5]。电穿孔疗法由日本Okino等^[6]首次提出,随后,国内外许多学者陆续开展了这方面的研究工作,并逐渐运用到临床实践。美国Hofmann教授等将其用于头颈癌、皮肤癌、胰腺癌、肝癌的临床治疗中,并获得了成功^[7-8]。重庆大学姚陈果等^[9]利用流式细胞仪对脉冲电场处理后的细胞周期进行了检测,证明了脉冲电场抑制肿瘤细胞DNA的合成。在对动物的临床实验中,电穿孔疗法也取得了不错的效果,结果表明肿瘤区域明显减少^[10]。该课题组随后还研究了脉冲电场的生物非热效应及作用机理,将绝缘电介质的电击穿和生物电介质的电穿孔联系起来,通过调整电脉冲参数,提出了不用化学药物,仅用高强度的脉冲电场,使肿瘤细胞发生不可逆电穿孔(即细胞死亡),从而实现非热效应治疗肿瘤^[11-12]。

本文以宫颈癌Hela细胞作为研究对象,经脉冲电场处理后,利用台盼蓝染色原理分析细胞膜的穿孔程度。在固定脉冲宽度和个数的情况下,研究Hela细胞发生可逆和不可逆穿孔的场强阈值范围,重点研究脉冲个数、脉冲宽度和电场强度对Hela细胞不可逆电穿孔的影响,并选择优化的参数组合。

1 实验材料、设备和方法

1.1 实验材料

以宫颈癌Hela细胞为实验对象,将其在恒温培养箱中传代大量培养后供实验使用。为保证细胞的活性,用于实验的均为对数生长期的细胞。

实验中用到的其他材料包括:台盼蓝染色剂、酒精、培养皿、磷酸缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)溶液、小牛血清、DMEM培养基、胰蛋白

酶、移液枪、试管等。

1.2 实验设备

实验所用的处理电源为自制的脉冲电源。该电源可输出方波脉冲,脉宽在5~100 μs内精确可调,频率在1~1 000 Hz内精确可调。其实物如图1所示。脉冲作用下负载两端的输出电压波形如图2所示。



图1 脉冲电源

Fig.1 Pulse power supply

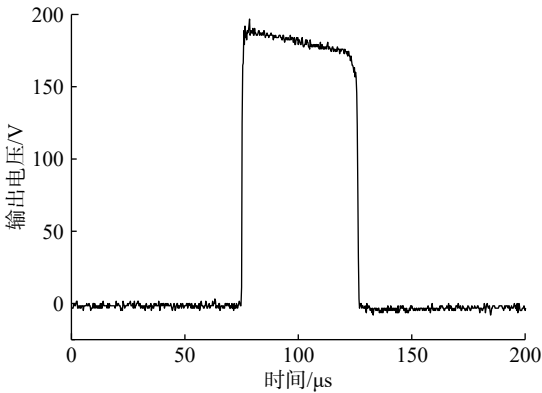


图2 输出脉冲电压波形

Fig.2 Waveform of output pulse voltage

实验采用的反应器为电极杯,电极间的距离为0.2 cm,容量为400 μl。其横截面如图3所示。

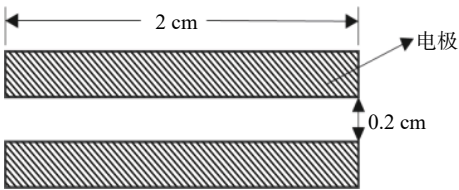


图3 反应器横截面

Fig.3 Reactor cross section

实验中用到的其他设备还有示波器、液氮罐、水浴锅、离心机、细胞计数板、荧光显微镜等。

1.3 实验方法

样品配置:先将Hela细胞放在综合培养基(10%小牛血清、90%DMEM)中,然后将其置于恒温培养箱(37℃,5%CO₂)中传代到对数生长期。将培养好的细胞用胰蛋白酶消化后离心,再

用PBS溶液洗涤2次，重悬，制成浓度约为 10^6 cfu/ml的细胞悬液。

电场处理：用质量分数为75%的酒精清洗电极杯，取上述细胞悬液与台盼蓝试剂均匀混合，用移液枪吸取悬液分别装入电极杯中，每组400 μ l。设置电脉冲参数，脉冲电场处理过后，取10 μ l细胞悬液滴入计数板并计算穿孔率(包含可逆与不可逆)。同等条件下取上述细胞悬液先经电场处理后，再与台盼蓝试剂均匀混合，计算其不可逆电穿孔率。

细胞计数：台盼蓝是检测细胞膜完整性最常用的生物染色剂，正常细胞会排斥这种染料，而对于膜的完整性丧失的细胞，通透性会增加，所以台盼蓝会进入细胞内将其染色。

穿孔率 = $\frac{\text{计数区域中被染色的细胞个数}}{\text{计数区域中所有细胞个数}} \times 100\%$

图4和图5分别为用胰蛋白酶消化后，显微镜下的Hela细胞和被台盼蓝试剂染色的细胞。

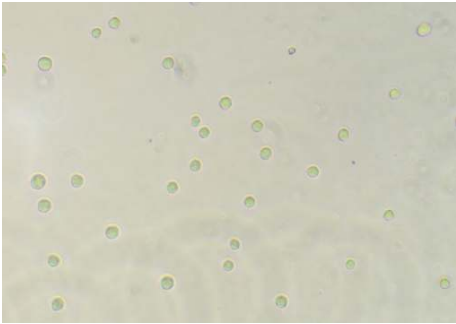


图4 消化后的Hela细胞
Fig.4 Digested HeLa cells

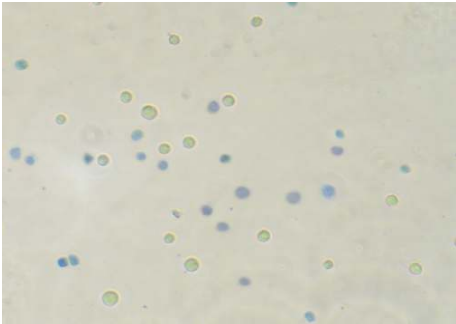


图5 被染色后的Hela细胞
Fig.5 Stained HeLa cells

2 电脉冲作用对细胞穿孔的影响

2.1 可逆与不可逆穿孔的场强范围

设置电脉冲参数：脉宽为50 μ s；脉冲为20

个；电场强度依次取250，500，750，1000，1250，1500，1750 V/cm。第一组实验：细胞悬液与台盼蓝试剂均匀混合后施加脉冲电场作用，测量穿孔率；第二组实验：细胞悬液先经脉冲电场处理后，再与台盼蓝试剂均匀混合，测量不可逆电穿孔率。未施加电场强度的细胞悬液为对照组。细胞被染色，则说明该细胞发生了穿孔。以样品中被染色的量作为统计指标，研究不同电场强度对细胞穿孔的影响，其结果如图6所示。

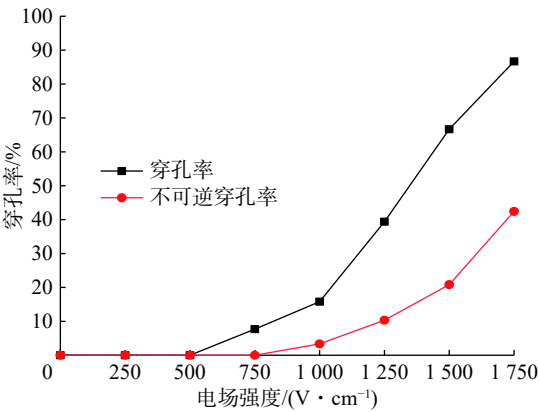


图6 脉冲强度对细胞穿孔的影响
Fig.6 Effect of pulse intensity on cell perforation

由图6可知，在脉冲宽度和脉冲个数不变的情况下，随着脉冲电场强度的增加，Hela细胞被染色的数量越来越多，最终会趋于饱和。由第一组实验可知，当场强在500 V/cm时，细胞几乎未被染色；当场强达到750 V/cm时，有少量细胞呈现蓝色。依据台盼蓝染色原理可知，被染色的细胞的细胞膜破裂发生了穿孔，此时，并不能确定细胞膜穿孔是可逆的还是不可逆的。在第二组实验中，当场强为750 V/cm时，并没有发现被染色的细胞，说明在该场强作用下的第一组实验中，被染色的细胞发生了可逆性穿孔，细胞膜上形成的微孔短时间内又自我修复了；当场强为1000 V/cm时，少量细胞被染色。由此可以推出：在脉宽为50 μ s和20个脉冲作用下，Hela细胞发生可逆性电穿孔的场强阈值范围为500~750 V/cm；同理，Hela细胞发生不可逆性电穿孔的场强阈值范围为750~1000 V/cm。

细胞膜基本上是一个绝缘体，两面浸在含离子的电解质溶液中，外加电场会引起两边的离子去极化，从而形成外加的膜电位差，此电位差就称为跨膜电压。在外加电场的诱导下，当外加电场频率很低或为直流电场时，跨膜电位的表达式

可简化为^[13]

$$U = 1.5ER\cos\theta$$

(1)

式中： R 为细胞半径； E 为外加电场强度； θ 为细胞膜上任意一点的径向与电场方向之间的夹角。细胞模型如图 7 所示。由细胞跨膜电位的计算公式可知，相同强度的外加电场对大细胞的跨膜电位更高。即使是同种类细胞，其大小也有偏差。因此，电穿孔首先出现在那些大细胞上。跨膜电位的大小也随着外加电场强度的增大而增大，细胞膜上的微孔将首先出现在 0° 和 180° 的两个极点处。随着电场强度的进一步增大，电穿孔出现的位置一般按 $\cos\theta$ 的值由大到小顺序进行扩展。在 90° 和 270° 时， $\cos\theta$ 为 0，跨膜电位始终为 0，不会发生电穿孔。

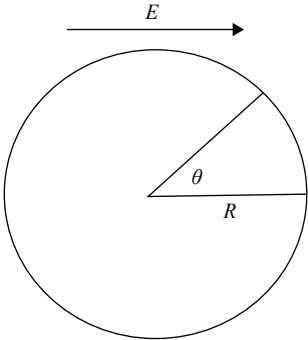


图 7 简化的细胞模型
Fig.7 Simplified cell model

图 8 是细胞的等效电路图。根据细胞膜、细胞质的电特性，细胞膜可等效为电容 C_1 和电阻 R_1 的并联；细胞核膜可等效为电容 C_2 和电阻 R_2 的并联；细胞质可等效为电阻 R_3 ；细胞外液可等效为电阻 R_4 ； U_m 表示外加的跨膜电压大小。当

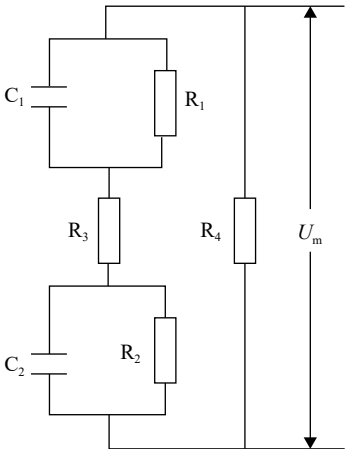


图 8 细胞等效电路图
Fig. 8 Cell equivalent circuit diagram

给细胞悬液加电压时，容性细胞膜充电，当超过细胞膜穿孔的阈值后，细胞膜发生穿孔，此时细胞内外离子流动大大削弱了细胞膜的屏蔽作用。如果将细胞中更小的细胞器如线粒体考虑进来，也可以把这些细胞器等效为细胞核。

2.2 脉冲个数对细胞不可逆穿孔的影响

根据以上实验得到的 Hela 细胞发生不可逆电穿孔的场强阈值范围，本次实验固定场强 1 000 V/cm 和脉宽 50 μ s 不变，在不同脉冲个数的作用下研究细胞不可逆穿孔率，其结果如图 9 所示。

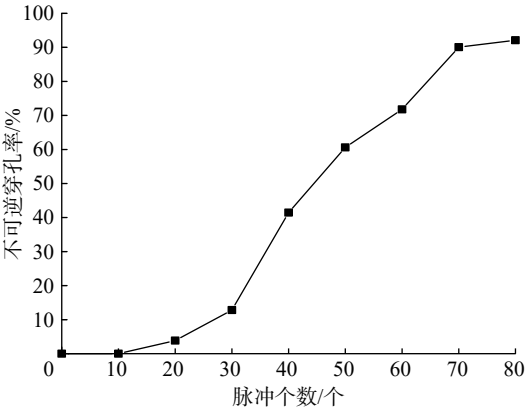


图 9 脉冲个数对不可逆穿孔率的影响
Fig.9 Effect of the number of pulses on irreversible perforation rate

由图 9 可知，固定场强 1 000 V/cm 和脉宽 50 μ s 不变的情况下，随着脉冲个数的增加，被染色的细胞数量也越来越多，电脉冲对细胞的不可逆穿孔率也随之增加。当 70 个脉冲时，不可逆穿孔率达到 90.07%；当 80 个脉冲时，不可逆穿孔率达到 92.10%；随着脉冲个数的继续增加，Hela 细胞的不可逆穿孔率会趋于饱和。所以，对于优化参数的选择，本次实验中脉冲个数选择 70 个。

由脉冲个数对细胞的不可逆电穿孔实验说明，脉冲电场对细胞膜的穿孔作用具有累积效应。单对细胞膜而言，膜电位主要由电荷的总量所控制，细胞膜可以看作是一个等效电容，在电脉冲的作用下，脉冲宽度 T_1 、脉冲间隔时间 T_2 、细胞膜的充电时间 T_3 和细胞膜的弹性恢复时间 T_4 ，这 4 个时间量是非常重要的参数。对于脉冲个数的增加，相当于增加了作用时间，累积效应主要发生在 $T_1+T_2<T_3+T_4$ 这种情况下。在前一个脉冲作用下，细胞膜会逐渐出现微孔，等下一个脉冲作用到来之时，细胞膜表面的微孔并没有完全恢复，这样不断累积叠加，最终会导致细胞膜的不

可逆电穿孔，即细胞不可逆穿孔。

2.3 脉冲脉宽对细胞不可逆穿孔的影响

根据以上实验选取的 70 个脉冲，再固定脉冲电场强度为 1 000 V/cm，在不同的脉冲宽度作用下研究细胞的不可逆穿孔率，其结果如图 10 所示。

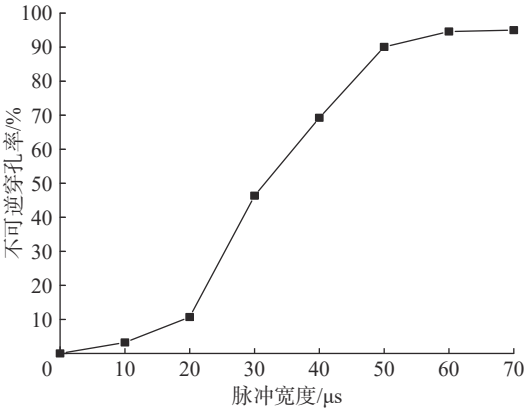


图 10 脉冲宽度对不可逆穿孔率的影响

Fig.10 Effect of pulse width on irreversible perforation rate

由图 10 可知，固定场强 1 000 V/cm 和 70 个脉冲的情况下，随着脉冲宽度的增加，细胞的不可逆穿孔率先缓慢增加，在 20 μs 时有明显增大趋势，50 μs 之后逐渐趋于饱和。所以，对于优化参数的选择，本次实验中脉冲宽度选取 60 μs ，该条件下不可逆穿孔率为 93.24%。

脉冲电场与细胞的相互作用是基于细胞膜充电，细胞膜可等效为一个电容。当外电场对细胞膜充电后，膜两侧存在相反的电荷，膜内电场力增加，细胞膜变薄，膜厚度的衰减程度取决于细胞膜的弹性模量。就脉宽为微秒级的单个脉冲而言，通常认为细胞膜电穿孔所需脉冲宽度的下限必须大于膜充电时间和膜的弹性恢复时间，这样才能在单个电脉冲的作用下维持孔洞的开放。一般来说，在 kV/cm 级的脉冲作用下，细胞膜穿孔所需时间至少达到 5 μs ^[14]。脉冲宽度的增加会扩大单个细胞穿孔的程度，如果脉冲宽度小于膜充电时间，则必须提供较大的电场强度以驱使膜电位达到穿孔的临界值。

2.4 脉冲场强对细胞不可逆穿孔的影响

根据上述实验，固定脉宽 60 μs 和 70 个脉冲不变，在不同的电场强度作用下研究细胞的不可逆穿孔率，其结果如图 11 所示。

由图 11 可知，在固定脉宽 60 μs 和 70 个脉冲不变的情况下，随着电场强度的增加，细胞膜的不可逆穿孔率也随之增加。当外加场强达 1 500 V/cm，

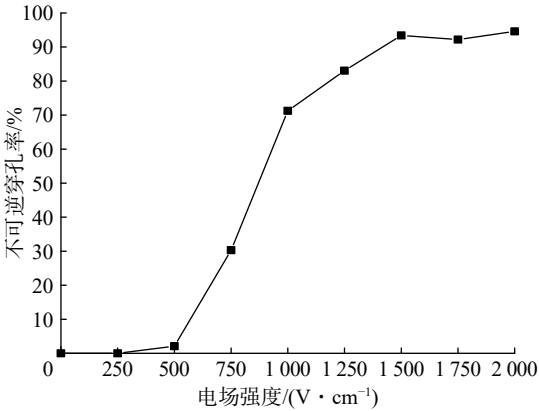


图 11 电场强度对不可逆穿孔率的影响

Fig.11 Effect of electric field intensity on Irreversible perforation rate

不可逆穿孔率为 93.42%，随后趋于饱和。

细胞膜破裂的根本原因均是由于外加脉冲电场诱导下细胞膜跨膜电压所形成的跨膜电场所导致的。细胞膜的厚度约为 5~10 nm，在无外加电场时，细胞为了维持自身的正常生理功能，细胞膜内外存在着 50~70 mV 的电位差^[15]。在跨膜电位的作用下，细胞的结构和形态产生了不可逆的变化，即使电脉冲的作用时间极短，但对生物体的破坏也是相当大的。

2.5 结果与讨论

由上述实验结果可知，不同的脉冲参数会引发细胞膜不可逆穿孔程度的不同，其中脉冲个数、脉冲宽度和脉冲场强对细胞不可逆穿孔率的影响有相似之处。Hela 细胞不可逆穿孔率都是随着脉冲个数、脉冲宽度和脉冲场强的增加而增加的。在脉冲电场作用下，细胞主要经历无影响(电脉冲剂量低)、可逆性电穿孔(存活)和不可逆性电穿孔(死亡)3 个阶段。

对于脉冲个数的增加，主要是作用于扩大电脉冲作用的累积效应；对于脉冲宽度的增加，主要是作用在细胞膜上形成微孔后，能够维持孔洞的开放；对于脉冲场强的增加，就是增大细胞膜的跨膜电压，会扩大穿孔区域的面积。通过本次实验，对于这 3 种电脉冲参数的优化组合，宜选择场强 1 500 V/cm、脉宽 60 μs 和 70 个脉冲。

3 结 论

以宫颈癌 Hela 细胞为研究对象，通过外加脉冲电场处理和台盼蓝染色，进行穿孔率的检测。

在脉宽 50 μs 和 20 个脉冲的情况下, Hela 细胞发生可逆穿孔的场强范围为 500~750 V/cm, 发生不可逆穿孔的场强范围为 750~1 000 V/cm。在电脉冲的作用下, 随着脉冲场强、脉宽和个数的增加, Hela 细胞的不可逆穿孔率也随之增加。最终, 选取电脉冲参数 1 500 V/cm、60 μs 和 70 个脉冲为优化的参数组合, 该参数下 Hela 细胞不可逆穿孔率达到 93.42%。

电穿孔主要的生物学效应是使细胞膜发生可逆和不可逆击穿, 仍需大量实验研究将电穿孔的应用推向临床, 不断完善电化学疗法的临床应用。

参考文献:

- [1] LIU C J, WANG B Y, ZHANG H, et al. Mechanism of specific effects of transient electromagnetic pulses on cell model[J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 1998, 15(3): 294–297.
- [2] PRAUSNITZ M R, LEE C S, LIU C H, et al. Transdermal transport efficiency during skin electroporation and iontophoresis[J]. *Journal of Controlled Release*, 1996, 38(2/3): 205–217.
- [3] KOTNIK T, KRAMAR P, PUCIHAR G, et al. Cell membrane electroporation —part 1: the phenomenon[J]. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 2012, 28(5): 14–23.
- [4] 李成祥. 不可逆电穿孔治疗肿瘤的作用机理及临床应用关键技术的研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2011.
- [5] 姚陈果, 孙才新, 米彦, 等. 细胞膜电穿孔及其肿瘤治疗的研究 [J]. *高电压技术*, 2004, 30(1): 45–47, 51.
- [6] OKINO M, TOMIE H, KANESADA H, et al. Optimal electric conditions in electrical impulse chemotherapy[J]. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1992, 83(10): 1095–1101.
- [7] DEV S B, RABUSSAY D P, WIDERA G, et al. Medical applications of electroporation[J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2000, 28(1): 206–223.
- [8] 米彦, 姚陈果, 李成祥, 等. 陡脉冲电场对体外人肝癌细胞 SMMC-7721 的诱导凋亡作用 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2009, 28(5): 743–748.
- [9] 李成祥, 孙才新, 姚陈果, 等. 不可逆电穿孔治疗技术的临床前大动物实验研究 [J]. *高电压技术*, 2010, 36(5): 1253–1257.
- [10] RUBINSKY B. Irreversible electroporation in medicine[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2007, 6(4): 255–259.
- [11] ESSER A T, SMITH K C, GOWRISHANKAR T R, et al. Towards solid tumor treatment by irreversible electroporation: intrinsic redistribution of fields and currents in tissue[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2007, 6(4): 261–273.
- [12] SUZUKI D O H, RAMOS A, RIBEIRO M C M, et al. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2011, 58(12): 3310–3318.
- [13] 汪和睦, 谢廷栋. 细胞电穿孔电融合电刺激原理技术及应用 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2000: 3–19.
- [14] KOTNIK T, MIKLAVCIC D. Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2000, 47(8): 1074–1081.
- [15] WANG B Y, YANG J B, GUO Q G, et al. Experimental study and mechanism analysis on bioeffects by nanosecond electromagnetic pulses[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 1997, 40(3): 301–304.

(编辑: 董伟)