论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0490-04

能量可控陡脉冲联合 H-ras 干扰性 RNA 治疗卵巢癌裸鼠皮下移植瘤的实验研究

王萍玲[1],胡丽娜[1],李 聪[1],孙才新[2],米 彦[2],王士彬[2],姚成果[2] ([1]重庆医科大学第二临床学院妇产科,重庆 400010;[2]重庆大学高电压与电工新技术教育部重点实验室,重庆 400044)

提 要:目的 利用陡脉冲电场的可逆性电穿孔电转基因,观察陡脉冲治疗仪联合基因治疗对肿瘤生长的影响。**方法** 构建抗 H-ras 基因表达的小发夹状 RNA 重组质粒载体(pshRNA/H-ras);建立卵巢癌荷瘤裸鼠模型,光、电镜观察陡脉冲对肿瘤组织的病理学改变,荧光报告质粒观察陡脉冲电场的可逆性电穿孔;实验分为 4 组:对照组、陡脉冲治疗组、陡脉冲加基因单次干扰治疗组和加基因重复干扰治疗组,记录治疗后 21 d 各荷瘤鼠肿瘤的体积和体质量。**结果** 陡脉冲对肿瘤组织有明显的破坏作用,肿瘤边缘残存有活性的癌细胞;各治疗组肿瘤体积与体质量明显低于对照组,差异具有极显著性($P<0.01$),其中,陡脉冲加基因重复干扰治疗组肿瘤体积和重量显著低于仅用陡脉冲治疗组($P<0.01$)。**结论** 陡脉冲是一种新型有效的治癌工具,联合基因治疗能更有效地抑制肿瘤生长。

关键词: 能量可控陡脉冲;RNAi;基因,H-ras;卵巢肿瘤;肿瘤

中图法分类号: R454.1; R459.9; R737.31 **文献标识码:** A

Experimental study of energy controllable steep pulses and RNA interference targeting H-ras gene on inhibiting growth of xenografted tumor of ovarian cancer cells

WANG Ping-ling[1], HU Li-na[1], LI Cong[1], SUN Cai-xin[2], MI Yan[2], WANG SHI-bin[2], YAO Cheng-guo[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016; [2]Key Lab of High Voltage Engineering and Electrical New Technology, Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of energy controllable steep pulses (ECSP) and the small hairpin RNA recombinant plasmid targeting H-ras gene (pshRNA/H-ras) on the growth of xenografted ovarian tumor cells. **Methods** The recombinant plasmids targeting H-ras gene coding sequence (pshRNA/H-ras) were constructed successfully. ECSP were applied to ovarian tumor-bearing nude mice. After exposed to ECSP, tissues were obtained and present for routine HE and transmission electron microscope (TEM) observation. The reversible electroporation were observed by fluorescent reporter plasmids. Tumor modeling were achieved in 20 nude mice and divided into four groups: ECSP group, ECSP and pshRNA/H-ras 1 (injecting one time), ECSP and pshRNA/H-ras 4 (injecting 4 times), and unexposed group. The volume and weight of tumors in each group were recorded at predetermined times. **Results** ECSP show effectively destructive action as compared with unexposed group. Irreversible cell changes could be seen under TEM. There were survived cells close to the necrotized regions. The volume and weight of tumors in each experimental group were significantly smaller than unexposed group ($P<0.01$). In ECSP and pshRNA/H-ras 4 group, ECSP was far more effective than ECSP group in retarding tumor growth ($P<0.01$). **Conclusion** ECSP is a new and effective way for solid tumor treatment and can inhibit the growth of tumors with the combination of gene method.

Key words: energy controllable steep pulses (ECSP); RNA interfering; gene, H-ras; ovarian neoplasms; neoplasms

电穿孔是在短时电脉冲作用下细胞膜出现微孔的物理过程,这种短时可逆的膜渗透性改变为肿瘤的电化学治疗提供了有效的治疗手段,而陡脉冲电场对肿瘤细胞膜产生不可逆性电击穿作用使细胞膜出现孔洞并发生破裂,大量微粒出入细胞膜,破坏了膜内外的化学平衡,从而改变肿瘤细胞的结构和生存环境,达到杀伤肿瘤细胞和抑制其增殖的目的,将电化学疗法中电脉冲的辅助治疗作用转变为主要的治疗手段。但是,陡脉冲的电穿孔治疗作为一种局部治疗手段,布阵等局部挤压操作理论上有致瘤体边缘瘤细胞扩散的可能,同时在较大的瘤体边缘随电场强度的衰减可在治疗野内产生细胞膜的不可逆性电穿孔,对这些瘤体边

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371619)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371619)

作者简介: 王萍玲(1964-),女,贵州省贵阳市人,博士研究生,副主任医师,主要从事妇科肿瘤的综合治疗方面的研究。电话:13167952908,E-mail:wangpingling@sohu.com

通讯作者: 胡丽娜,电话:13881896666,E-mail:cqhulina@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-12-10;**修回日期:** 2005-01-19

缘部分瘤细胞的抑制或进一步杀伤是陡脉冲治疗后肿瘤是否残留、复发和转移的重要决定因素。RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)，也称为基因沉寂(Gene Silencing)疗法，是近年来发展起来的一种新型基因阻断技术。其作用机制是双链 RNA 在细胞内 Dicer 酶的作用下，被裂解成 21 ~ 23 个 nt 的小干涉 RNA(siRNA)，通过特异性结合互补链介导其同源 mRNA 降解，从而特异性地抑制目的蛋白的表达。

本研究试图利用陡脉冲治疗时电场中瘤细胞的可逆性电穿孔和 RNA 干扰技术结合起来，将靶向于卵巢癌细胞中高度表达的 H-ras 基因的重组质粒导入对电场覆盖不到的较大瘤体边缘瘤细胞，达到对陡脉冲治疗后边缘局部残留瘤细胞的生长抑制作用，解决陡脉冲治疗后肿瘤的残留和复发问题。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　细胞株　　卵巢浆液性囊腺癌细胞株 SKOV3 为重庆医科大学超研所惠赠。

1.1.2　质粒　　绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-C_1 由美国 University of Chicago Medical Center 的 Tong-Chuan He 博士惠赠。H-ras 小发夹状 RNA(small hairpin RNA, shRNA)重组质粒载体 pshRNA/H-ras 在重庆医科大学肝病研究所构建，该质粒是在转录载体 pTZU6 + 1 启动子下游的 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切位点之间插入 56 bp H-ras 基因编码区特异性序列(包括其反向重复序列、茎环结构、转录终止序列和酶切位点)而构成，经酶切和 DNA 序列鉴定为正确的重组质粒。其中，构建的两重组质粒的 H-ras 基因序列为 5′-GGCAAGAGTGCGCTGACCATC-3′和 5′-TACGACCCCACTATAGAGGAT-3′。

1.1.3　能量可控陡脉冲样机　　为重庆大学高电压与电工新技术教育部重点实验室自行设计与研制。脉冲参数：电压峰值可高达 2 kV，上升时间纳秒(ns)级，脉宽微秒至毫秒(μs-ms)级，频率 10 ~ 1 000 Hz，可组合不同的脉冲参数(频率、脉宽、峰值)通过电容的储能放电产生能量可控的电磁脉冲，电极用足铂金制成，实验时用美国 Tektronix TDS3032B 示波器。

1.2　方法

1.2.1　裸鼠皮下成瘤实验　　取 4 ~ 6 周龄的雌性 Balb/c 裸鼠 22 只(购自中国科学院上海动物研究所，由第三军医大学大坪医院动物实验中心无菌条件下饲养)，体质量 17.5 ~ 20 g，每只鼠背皮下接种 4×10^6 个癌细胞(随机选 2 只作双侧接种)，连续观察，记录成瘤时间和瘤体的大小，待肿瘤最大径长至 0.8 ~ 1.0 cm 时将荷瘤鼠完全随机分为 4 组，每组 5 只，即对照组、陡脉冲治疗组、陡脉冲联合基因单次治疗组、陡脉冲联合基因重复治疗组。2 只双侧接种的荷瘤鼠用于陡脉冲治疗后的组织学观察和不可逆性电穿孔研究。

1.2.2　电脉冲治疗　　取双侧接种的荷瘤鼠乙醚麻醉，肿瘤体表部位常规消毒，将质粒 pEGFP-C_1 40 μg 与 100 μl 的磷酸盐缓冲液(PBS)混合后多点注入左侧瘤体边缘(对侧作为对照)，5 min 后在瘤体中心部位插入电极针(两针电极)并施于陡脉冲电场。陡脉冲治疗后 48 h 处死裸鼠，取出瘤体边缘的组织置于 4% 的多聚甲醛中冰上放置 2 h，将标本切成 10 μm 厚度，封片，荧光显微镜下观察。将其余 4% 多聚甲醛固定的组织石蜡包埋切片，HE 染色光镜下观察。

1.2.3　细胞超微结构观察　　切取陡脉冲治疗野中的瘤组织，修剪成 1 mm^3，先后经戊二醛、锇酸固定、脱水，环氧树脂包埋，超薄切片，铀/铅染色，行透射电镜(H-600 HITACHI)观察超微结构变化。

1.2.4　抑瘤效应观察　　将各治疗组的荷瘤鼠共 15 只，乙醚麻醉，施于脉冲电场，考虑小鼠的电压耐受性和安全因素，调整脉冲参数为：脉冲峰值 40 V，脉冲宽度 26 ~ 34 μs，重复频率 50 Hz，脉冲陡度 165 ns，治疗时间为 5 min。联合基因治疗组在脉冲治疗前予 40 μg 的 pshRNA/H-ras 与 100 μl 的磷酸盐缓冲液(PBS)混合后多点注入瘤体边缘，5 min 后在瘤体中心部位插入电极针并施于陡脉冲电场，脉冲参数同单纯脉冲治疗组。基因重复治疗组则分别于治疗后第 5、10、15 天瘤体边缘注射 pshRNA/H-ras 40 μg(注射前用 100 μl RPMI1640 与 10 μl 脂质体包裹 20 min)。5 只对照组荷瘤鼠治疗方式同单纯脉冲治疗组，但不开启电源。连续观察 3 周，记录肿瘤体积的大小及肿瘤表面有无红肿破溃等。然后处死裸鼠，取肿瘤组织，称量瘤体质量并计算肿瘤的体积。肿瘤体积计算(V) = abcπ/6 (其中 a、b、c 为瘤体的长、短径和厚度)，抑瘤率 = $\frac{V_{对照组} - V_{治疗组}}{V_{对照组}} \times 100\%$。

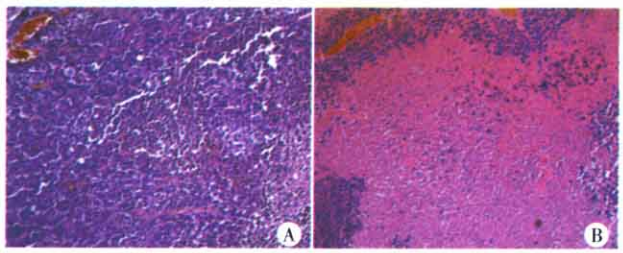
1.3　统计学方法

用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　光镜下陡脉冲电场对裸鼠皮下移植瘤的杀伤作用和残余瘤细胞的存在

陡脉冲电场作用后 48 h 处死裸鼠，光镜下观察陡脉冲的杀伤效应，如图 1。对照组癌细胞生长活跃，细胞密集，呈片状分布，细胞异型性明显，癌细胞呈不规则形，核大深染，可见多核、巨核及核分裂象(图 1A)。处理组治疗的中心区肿瘤细胞呈广泛凝固性坏死，细胞结构不清，在凝固性坏死边缘见残存的癌细胞(图 1B)。



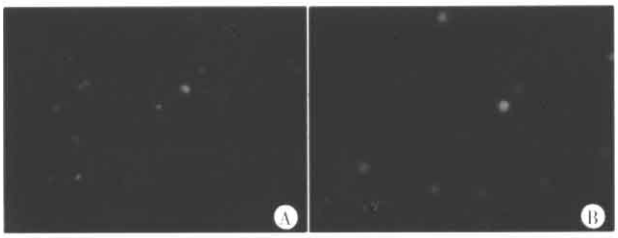
A: Cancer cells in control group; B: The ECSP treatment group: Extensive coagulation necrosis in central zone

图 1　卵巢癌皮下移植瘤组织　(HE × 100)

Fig 1　The histological changes of xenograft tissue of ovarian cancer in control group and ECSP treatment group　(HE × 100)

2.2 荧光显微镜下残余瘤细胞绿色荧光蛋白的表达

瘤体边缘注射质粒 pEGFP-C_1 后，在脉冲电场作用下，荧光显微镜观察到荧光报告质粒的存在，证明了陡脉冲电场作用下的可逆性电穿孔。如图2。



A: The electric parameter of ECSP treatment: 100 V peak value and 34 μs width of electric pulses at 100 Hz frequency for 60 s

B: The electric parameter of ECSP treatment: 150 V peak value and 34 μs width of electric pulses at 100 Hz frequency for 60 s

图2 陡脉冲治疗后肿瘤组织边缘绿色荧光蛋白的表达

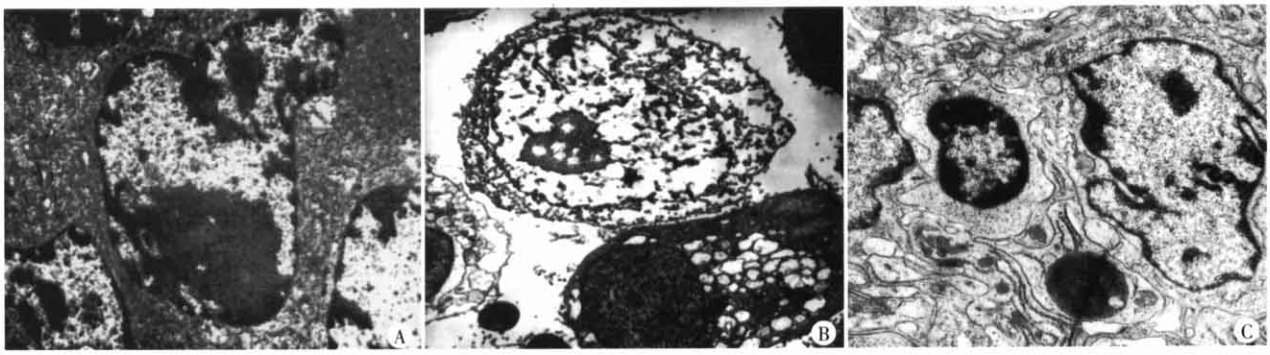
Fig 2 The expression of GFP fluorescence images in marginal tumor tissues

2.3 超微结构改变

对照组肿瘤细胞核浆比大，核仁大、边集，细胞器少，胞浆内有大量游离核蛋白体(图3A)。实验组肿瘤细胞表现为细胞肿胀，溶解性坏死，仅留细胞轮廓，细胞膜完整性破坏，线粒体空化、肿胀，局部胞质有空化(图3B)，并出现凋亡小体(图3C)。

2.4 各治疗组肿瘤的体积和体质量

治疗后3周，断颈处死，分离皮下肿瘤，测量肿瘤的经线并称量肿瘤质量。对照组、陡脉冲治疗组、陡脉冲联合单次基因干扰治疗组和陡脉冲联合重复基因干扰治疗组平均肿瘤的终体积分别为(1.43 ± 0.16)cm^3、(0.75 ± 0.17) cm^3、(0.49 ± 0.11) cm^3、(0.33 ± 0.06) cm^3；肿瘤平均质量分别为(1.39 ± 0.10)g、(0.65 ± 0.16)g、(0.50 ± 0.11) g、(0.36 ± 0.10) g。各肿瘤治疗组的体积和质量均明显小于对照组，差异有极显著性($P < 0.01$)，其中，陡脉冲联合基因干扰治疗组肿瘤体积和质量明显低于仅用陡脉冲治疗组($P < 0.05$)，以陡脉冲联合重复基因治疗组最为明显($P < 0.01$)。与对照组相比，陡脉冲治疗组、陡脉冲联合单次基因治疗组和联合重复基因治疗组对肿瘤体积和质量的抑制率分别为 47.6%、65.7%、76.9% 和 53.2%、64.4%、74.1%。



A: Control group (TEM × 8 000); B: Experimental group (TEM × 5 000); C: Experimental group (TEM × 8 000)

图3 对照组和实验组癌细胞超微结果

Fig 3 Ultrastructure of cancer cells in control group and experimental group under TEM

3 讨论

恶性肿瘤已成为威胁人类健康的主要疾病，现有的治疗方法如手术治疗、放射治疗和化疗皆有一定的适应证、禁忌证和副作用，限制了这些治疗方法的广泛应用。1987年 Okino 等[1]创立了癌症的电脉冲化学疗法，成为了癌症综合治疗的有效补充手段之一。进一步的研究表明，当施加脉冲的瞬时电场强度高于 1 kV/cm 时，会产生细胞膜的不可逆性电击穿，导致细胞的破碎直至死亡[2]。据此，重庆大学电气工程学院研制开发了一种新的癌症物理治疗方法——能量可控陡脉冲疗法(energy controllable steep pulses, ECSP)，把电脉冲的辅助治疗转变为主要的治疗手段，并在离体肿瘤细胞和荷瘤动物实验中取得了肯定的治疗效果[3~5]。

陡脉冲电场覆盖范围内有两种形式的电穿孔：可逆性电穿孔和不可逆性电穿孔。在远离电极，电场强度渐减至不足以使瘤细胞发生不可逆性电穿孔时，则出现可逆性电穿孔改变，此种形式的电穿孔则保存了瘤细胞的活性，这为我们的实验所证实：在给予荧光报告质粒并陡脉冲治疗后 48 h 的瘤体边缘组织，经 HE 染色可见瘤细胞广泛凝固性坏死并见残存的肿瘤细胞，而荧光显微镜下有绿色荧光蛋白表达，表明在陡脉冲作用下的肿瘤中心不可逆性电击穿和边缘组织中可逆性电穿孔的存在，为进一步陡脉冲联合基因治疗癌症的可行性提供了实验依据。

应用脉冲电场电转基因治疗肿瘤已经有了很多的探索，并显示了电基因疗法(electro-gene therapy, EGT)治疗实体瘤的良好应用前景[6]。Takeshi 等[7]在正常肝组织中探索了电转基因的最佳治疗参数为 50 V 电压持续 50 ms 的 8 个脉冲方波。本研究中采用的陡脉冲

电场可产生高频脉冲波，脉冲数量大，上升时间和持续时间短，对肿瘤中心细胞有直接的致死性作用。Ras 基因是一种在肿瘤细胞内高表达的原癌基因，并常常在 12、13、61 氨基酸残基位点发生突变，其突变、缺失或过度表达均可导致细胞恶性增殖。本研究根据 shRNA 的设计原则成功构建了靶向卵巢癌细胞中高度表达的 H-ras 基因的小发夹状 RNA 重组质粒 pshRNA/H-ras，在体外实验中显著抑制了 SKOV3 细胞 mRNA 和蛋白的表达并抑制了 SKOV3 细胞的增殖，这与 Gong 等[8]的研究结果相似。实验过程中我们将 pshRNA/H-ras 注入荷瘤鼠的瘤体边缘再予陡脉冲电场处理，观察陡脉冲联合基因导入对肿瘤生长的抑制作用。由于电基因疗法转基因在裸鼠肿瘤组织内表达的持续时间约为 6 d[9]，因此，我们还设计了分别于脉冲治疗后的第 5、10、15 天用阳离子脂质体包裹 pshRNA/H-ras 并于瘤体边缘注射治疗组。实验结果表明：各治疗组肿瘤的体积和质量均明显小于对照组，其中，陡脉冲联合重复基因干扰治疗组对肿瘤生长的抑制作用显著高于仅用陡脉冲治疗组。研究结果表明陡脉冲是一种有效的新型肿瘤治疗工具，利用其可逆性电穿孔导入肿瘤自杀基因补充杀伤陡脉冲治疗盲区内的瘤细胞可起到有效的二线补充杀伤作用，减少陡脉冲治疗后的瘤细胞残留和复发。进一步的研究还可联合导入能刺激宿主细胞对肿瘤产生免疫反应的细胞因子基因，达到对基因未转导部位的旁观者效应或对远处转移病变的协同治疗效应。

参考文献：

[1] Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and anticancer drug on *in vivo* growing tumors[J]. Jpn J Cancer Res, 1987, 78(12): 1319 - 1321.
[2] Weaver J C. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues[J]. J Cell Biochem, 1993, 51(4): 426 - 435.
[3] 孙才新，姚成果，熊　兰. 陡脉冲电场对恶性肿瘤细胞杀伤效应的研究[J]. 生物物理学报，2002，18(4)：474 - 477.
[4] 姚成果，孙才新，熊　兰. 陡脉冲电场对荷瘤 BALB/c 小鼠生存期的影响[J]. 生物医学工程学杂志，2004，21(3)：433 - 435.
[5] 胡　娅，胡丽娜，孙才新，等. 能量可控陡脉冲对人卵巢癌细胞的体外作用[J]. 第三军医大学学报，2003，25(16)：1441 - 1445.
[6] Tomoaki Goto, Toru Nishi, Takahiko Tamura, *et al*. Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(1): 354 - 359.
[7] Takeshi Suzuki, Bo-Chul Shin, Keiko Fujikura, *et al*. Direct gene transfer into rat liver cells by *in vivo* electroporation[J]. FEBS Lett, 1998, 425: 436 - 440.
[8] Gong Yang, Jennifer Anne Thompson, Bingliang Fang, *et al*. Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumorgrowth in a model of human ovarian cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(36): 5694 - 5701.
[9] 王　丰，陈霞芳，田毓华，等. 电穿孔介导质粒 DNA 肿瘤内转移抑制恶性肿瘤生长与转移[J]. 生物化学与生物物理进展，2002，29(5)：734 - 740.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)06-0493-01

个案与短篇

冠状动脉造影正常的急性心肌梗死 1 例

A case report of acute myocardium infarction with normal coronary angiogram

陈　婧，何国祥　（第三军医大学西南医院心血管内科，重庆市介入心脏病学研究所，重庆 400038）

患者，男，47 岁，工人。因反复心前区疼痛 3 个月，加重 29 h，于 2004 年 8 月 5 日入院。8 月 3 日 9 时突发心前区剧烈压榨样疼痛，伴气促、大汗，持续 1 h 无缓解，院外予“度冷丁”肌注后胸痛缓解。有高血压病史 4 年，血压最高达 170/120 mmHg，未服药治疗。有高血压家族史，无糖尿病史。吸烟 30 年，20 支/d。入院查体：BP 152/49 mmHg，HR 89 次/min，律齐，$A_2 > P_2$，未闻及杂音。心电图示：急性下壁及广泛前壁心肌梗死。实验室检查：血沉 32 mm/h，TG 2.85 mmol/L，LDH 276 IU/L(114 ~ 240)，CK 438 IU/L(25 ~ 75)，CK-MB29 IU/L(0 ~ 25)，心肌钙蛋白 7.32 μg/L(0 ~ 0.03)。入院后立即予尿激酶 75 万单位静注。2 h 后行冠状动脉造影未见异常。术后予抗凝、抗血小板、调脂、ACE-I、β 受体阻滞剂口服及心肌营养等治疗。超声心动图未见异常。Holter 未见心律失常。入院第 2 天心电图 V3 由 QS 变为 rS，V5 由 qRs 变为 Rs，$T_{V3\text{-}V5}$ 倒置变浅，T_{V6} 变为平坦。入院第 3 天始，每日无诱因发作心绞痛 2 ~ 3 次，发作时原 T 波倒置的导联变为直立，V1-V3 ST 段呈弓背上抬 0.2 ~ 0.4 mV，含服硝酸甘油片 0.5 mg 心绞痛即缓解。考虑为冠状动脉痉挛所致变异型心绞痛，加用鲁南欣康、硫氮卓酮口服，心绞痛发作逐渐减少至消失。2 周后好转出院。

讨论

随着冠状动脉造影的普及，冠状动脉造影正常的急性心肌梗死病例不断有报道，其发生率为 5% ~ 7%，在青年患者中可高达 16% ~ 21%[1]。其原因包括：①冠状动脉痉挛；②急性血

（下转 503 页）

作者简介：陈　婧（1968 - ），女，广东省湛江市人，主治医师，主要从事心血管内科疾病方面的研究，现在重庆市沙坪坝区人民医院内科工作。电话：(023)65345832

收稿日期：2004-09-28；修回日期：2004-12-11