文章编号:1000-5404(2005)17-1745-03

论著

能量可控陡脉冲对小鼠 U_{14} 宫颈癌杀伤作用的实验研究

胡 娅[1],胡丽娜[2],米 彦[3],姚成国[3],熊 兰[3],孙才新[2] ([1]中国人民解放军324医院妇产科,重庆 400020;[2]四川大学华西临床医学院妇产科,成都 610041;[3]重庆大学电气工程学院,重庆 400044)

提 要:目的 观察能量可控陡脉冲对小鼠 U_{14} 宫颈癌的杀伤作用。**方法** 取雌性BALB/C小鼠48只,建立 U_{14} 宫颈癌皮下移植瘤模型,分别观察实验组和对照组各时相的组织形态学变化,并对抑瘤曲线进行分析。**结果** 通过组织学和抑瘤曲线检测证实:陡脉冲电场能选择性杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞的增殖。组织形态学改变在治疗后即刻光、电镜观察可见肿瘤细胞变性,核固缩、核碎裂、核溶解坏死等征象,并随时间推移坏死更加明显。**结论** 能量可控陡脉冲对肿瘤具有杀灭和抑制作用。

关键词: 陡脉冲;宫颈肿瘤/电疗法;小鼠
中图法分类号: R454.1; R73-36; R737.33 **文献标识码:** A

Lethal effects of energy controllable steep pulses on U_{14} cervical cancer in mice

HU Ya[1], HU Li-na[2], MI Yan[3], YAO Cheng-guo[3], XIONG Lan[3], SUN Cai-xin[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Huaxi Medical College, Sichuan University, Chengdu 610041; [3]College of Electrical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: **Objective** To investigate the lethal effects of energy controllable steep pulses on U_{14} cervical cancer in mice. **Methods** A total of 48 female BALB/C mice were inoculated subcutaneously with the solution of U_{14} cervical cancer cells line at the right hind limb. The histomorphological changes were observed and the suppressive curve of the tumor was analyzed between experimental group ($n=26$) treated with steep pulse stimulation and control group ($n=22$) without any treatment. **Results** Steep pulses electrical field could selectively injure tumor cells and inhibit cell proliferation. In the experimental group, the phenomena of pyknosis, karyorrhexis and karyolysis of tumor cells were observed by light and electron microscope and got worse as time prolonged. **Conclusion** Energy controllable steep pulses have a lethal or inhibitory effects on cervical cancer cells.

Key words: steep pulse; cervical carcinoma/electrotherapy; mouse

近年来,电工技术特别是电脉冲技术的研究表明,脉冲电场能引起细胞膜通透性增加有利于细胞吸收各种药物、基因物质、蛋白质、其它大分子和脂质体。这项技术已广泛应用于生物医学工程领域中。20世纪80年代,Okino[1]首次将其与化疗药物相结合治疗肿瘤获得成功,创立了肿瘤的电脉冲化学疗法,至今其临床试验研究已取得了显著成效。但是,在这些研究中,电脉冲仅起辅助作用,用于增强化疗药物的抗肿瘤效应。而真正单用脉冲电场治疗肿瘤的实验研究则较少。我们采用能量可控陡脉冲电场(energy controllable steep pulse, ECSP)直接作用于接种 U_{14} 宫颈癌的BALB/c小鼠,通过对组织形态学改变及抑瘤效应进行研究,探讨脉冲电场治疗肿瘤的有效性和安全性,初探其杀伤机制,为将来临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 能量可控陡脉冲治疗样机

与重庆大学高电压技术和系统监测省级重点实验室联合研制。能输出电压可调(20~250 V),电容可调(0.01~0.1 μF),重复频率10 Hz~1 kHz不同组合的陡脉冲。

1.2 动物模型的建立

雌性BALB/c小鼠48只,鼠龄10~12周,体质量25~28 g,由第三军医大学实验动物中心提供。将重庆医科大学超声

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50077027)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (50077027)
作者简介:胡 娅(1974-),女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤的临床综合治疗方面的研究。电话:(023)66741004
收稿日期:2004-07-28;修回日期:2004-11-19

研究所提供的传代腹水型 BALB/c 小鼠 U_{14} 宫颈癌瘤株，以无菌生理盐水稀释至所需浓度，每只小鼠于右后肢外侧皮下接种 0.2 ml（含瘤细胞 2×10^6 个），接种后常温下正常饮食饲养。

1.3 方法

将雌性 BALB/c 小鼠 48 只接种瘤株，待肿瘤最大直径达（0.9±0.1）cm 时（用游标卡尺测量），采用随机数字法随机分为实验组 26 只和对照组 22 只。实验组将小鼠麻醉后固定在治疗板上，充分暴露肿瘤组织。将能量可控陡脉冲治疗仪的两根铂金电极针（固定两针间距为 0.5 cm）插入肿瘤组织，给予幅值 25～40 V，频率 50 Hz，脉宽 25～37 μs，电容 0.033～0.047 μF，作用时间 30 min 的陡脉冲刺激。对照组小鼠接种后不作任何治疗，两组同等条件下饲养。

1.3.1 组织学观察 将治疗前（对照组）和治疗后（实验组）即刻、9、18 d 时间点各处死两只小鼠，取瘤组织分别置于 10% 中性甲醛中固定，常规石蜡包埋、切片，HE 染色，光镜下观察。同时将对照组和处理后即刻的瘤组织切取 1 mm×1 mm×1 mm，戊二醛，锇酸固定，脱水，环氧树脂包埋，超薄切片，铀/铅染色，应用 H-600 型透射电镜观察超微结构差异。

1.3.2 抑瘤效应检测 肿瘤接种方法、分组及实验治疗同上。以陡脉冲治疗日作为第 1 天，以后每隔 1 天用游标卡尺分别测量两组各 20 只小鼠的瘤体积，按公式 $V=abc\pi/6$ 计算瘤体积（单位 cm^3），其中 a、b、c 分别表示瘤组织长、短径和厚度[2]。取对照组每天平均瘤体积作肿瘤自然生长曲线，取实验组每天平均瘤体积作肿瘤抑制曲线。于观察第 15 天计算体积抑瘤率 =（对照组瘤体积-实验组瘤体积）/ 对照组瘤体积 × 100%。

1.4 统计学处理

采用 SAS 统计软件对计量资料进行 t 检验。

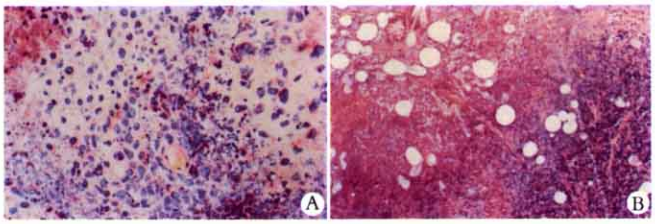
2 结果

2.1 形态学变化

2.1.1 肉眼观察 对照组肿瘤切面呈灰红色鱼肉状，有包膜包被，质硬。实验组肿瘤治疗过程中，针电极作用处无出血现象，治疗后即刻切面可见液滴，质软，呈灰白色。治疗后 18 d 时观察，肿瘤组织表面结痂，体积缩小，切面可见淤血坏死区，质变硬。

2.1.2 光镜观察 对照组肿瘤细胞生长活跃，细胞密集，间质少，呈片状分布，瘤细胞异型性明显，可见多核、巨核，核仁明显，核分裂象多见。实验组在治疗后即刻见电极针阴、阳两极区形态改变有明显差异：阳极区有大片均质红染区，细胞结构模糊不清，呈凝固性坏死；阴极区细胞轮廓尚清楚，形态变化不明显（图 1A）。治疗后 18 d，整个肿瘤细胞坏死更加明显，有大片坏死区，呈核固缩、核碎裂、核溶解等征象（图 1B），一些切片中发现残留瘤细胞现象。

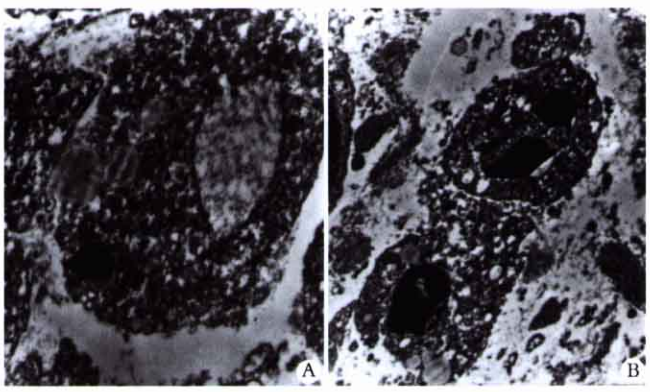
2.1.3 透射电镜观察 对照组肿瘤细胞核浆比大，核仁大边集，细胞器少，胞浆内有大量游离核蛋白体，少量粗面内质网及少量线粒体，伴轻度内室肿胀。而实验组肿瘤细胞膜失去连续性，核固缩、碎裂、溶解，出现较多脂滴，其细胞器严重受损，不能辨认其结构，显示肿瘤细胞受到不可逆性损伤（图 2）。



A：Immediately；B：18 d

图 1 陡脉冲治疗后 U_{14} 鼠宫颈癌细胞病理表现（HE×100）

Fig 1 The instant pathological changes of U_{14} cervical cancer cells after steep pulse stimulation（HE×100）



A：Karyolysis in experimental group indicated with arrow（TEM×8 000）；B：Pyknosis and karyoclasis in experimental group indicated with arrows（TEM×5 000）

图 2 宫颈癌细胞超微结构变化

Fig 2 Ultrastructural changes of cervical tumor cells

2.2 抑瘤效应

治疗前，对照组与实验组瘤体积分别为（0.153 5±0.063 9）cm^3、（0.147 5±0.044 7）cm^3，差异无显著性（$P>0.05$）。于治疗后第 7 天两组肿瘤生长出现差别（$P<0.05$）：实验组肿瘤生长受到抑制，并随荷瘤鼠生存时间延长，两组肿瘤生长速度差别逐渐增大，到第 15 天时对照组瘤体积为（0.493 9±0.334 2）cm^3，实验组瘤体积（0.223±0.245）cm^3（$P<0.05$），体积抑瘤率为 54.85%。

3 讨论

电脉冲化学疗法（electrical impulse chemotherapy，EIC）用于肿瘤的局部治疗，自 Okino 等[1]开创以来受到国内外学者的广泛关注。它将低渗透性化疗药物与电脉冲相结合，极大的提高了化疗药物的抗肿瘤效应。目前已在Ⅰ期临床实验体表肿瘤的治疗上取得了很大进展。在上述治疗过程中，脉冲电场的强度较低，仅引起膜可逆性电穿孔。如果增加脉冲电场强度，就可导

致细胞膜不可逆性电击穿，直接杀死肿瘤细胞。我们进行的体外培养细胞实验[3]已证实高强度陡脉冲电场(ECSP)能直接杀伤肿瘤细胞，并抑制肿瘤细胞的增殖。说明单用 ECSP 治疗肿瘤是可行的。在此基础上，本实验进一步探讨了陡脉冲电场对小鼠 U_{14} 宫颈癌治疗的有效性及安全性。

本研究结果显示在陡脉冲治疗后即刻取样，在光镜下(图 1)观察到两针电极周围发生不同程度的病理变化，阳极区呈现凝固性坏死征象，而阴极区细胞结构仍可见；其交界处组织超微结构显示(图 2)部分肿瘤细胞膜失去连续性，核固缩、碎裂、溶解，出现较多脂滴，细胞器严重受损，不能辨认其结构。可以推测 ECSP 作用在靠近两针电极处，尤其是在阳极区对肿瘤细胞的杀伤作用明显，呈凝固性坏死征象，这可能与恶性肿瘤细胞具负电性[4]有关；而进一步从超微结构变化分析揭示 ECSP 作用可通过不可逆性电击穿直接杀伤肿瘤细胞，呈现急性损伤效应。

Cemazar 等[5]采用 EPC 治疗 A/J 鼠 SA-1 纤维肉瘤时，设立了单用电脉冲治疗组，发现 EP 作用能明显抑制肿瘤的生长($P<0.01$)，组织学观察发现大片肿瘤细胞结构丧失，呈凝固性坏死，其坏死程度与对照组相比有明显差异($P<0.01$)，并且这种坏死呈进行性发展。本实验对抑瘤效应进行分析后也得到相似的结果：两组瘤体积变化于治疗后第 7 天出现显著性差别($P<0.05$)，实验组瘤体积生长受到抑制，并随小鼠生存时间延长，两组肿瘤生长速度差别逐渐增大。而相应的组织病理变化显示肿瘤组织坏死程度也呈进行性发展(图 1,2)。提示 ECSP 抑制了肿瘤细胞的增殖。

在 ECSP 治疗前后，我们肉眼观察到肿瘤组织由灰红色变成灰白色，并随时间的推移，肿瘤组织表面结痂，体积缩小，同时治疗过程中插针电极处组织无出血现象。Ramirez 等[6]在 ECT 治疗兔肝 VX2 鳞癌的实验中，研究了单独 EP 作用对肿瘤组织的影响。发现 EP 作用后局限于脉冲电场区域的肿瘤组织颜色发生改变。随后瘤体内注射荧光素，在钨灯照明下观察到脉冲作用区组织无染料着色，表明血流灌注被切断，大约 15 ~ 20 min 后开始逐渐恢复。并且在电极针插入处无出血现象。我们实验中也观察到 ECSP 致肿瘤组织颜色变化，组织切面有淤血区。据此推测 ECSP 作用可能导致肿瘤组织血流灌注降低，造成组织缺氧而抑制肿瘤细胞的生长。

在整个陡脉冲治疗过程中，荷瘤鼠均能耐受，仅治疗部位的肌肉有短暂的收缩反应。麻醉清醒后，该治疗部位的肢体没发现任何功能性损伤。并且电极针插入处组织未见明显的出血现象。这种良好的耐受能力可能与陡脉冲短时刺激的方式有关，同时由于电极针表面强电流密度产生电凝作用，因而能迅速止血且不产生热效应。Rabussay 等[7]研究发现针电极周围的正常组织因治疗导致的短时坏死、发炎，皮肤、肌肉、神经和血管组织纤维化，可在 56 d 内恢复，并无特殊后遗症，并且损伤仅限于针电极附近。至于对心脏的影响，根据所记录的施加脉冲时病人胸腔损伤 SKG 数据显示，作用前后没有明显变化。说明电场被有效地限制在电极之间，并且场强随距离的增加而迅速降低，因而不会对心脏带来损伤。在我们的实验中小鼠在治疗时及治疗后，生命体征平稳，生活习性无明显改变，没发现任何远期副作用。说明陡脉冲的治疗是安全的。

当然，我们还在一些切片中发现癌细胞残留现象，并且有些动物经治疗后体表肿瘤坏死、结痂脱落后发现该处皮下有新的肿瘤组织生成。这可能与电极针插入深度及产生有效电场覆盖范围不够有关。影响了治疗疗效。因而需进一步改进治疗仪，增强疗效。

总之，ECSP 对小鼠 U_{14} 宫颈癌组织有确切的损伤作用，能杀伤并抑制肿瘤细胞的增殖，改善小鼠的生存状况。同时对宿主较安全。与放疗、化疗相比有其独到的优点，有望成为一种新的局部物理治疗肿瘤的方法。

参考文献：

[1] Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on *in vivo* growing tumors[J]. Jpn J Cancer Res, 1987, 78(12): 1319 - 1321.

[2] Hyacinthe M, Jaroszeski M J, Dang V V, *et al*. Electrically enhanced drug delivery for the treatment of soft tissue sarcoma[J]. Cancer, 1999, 85(2): 409 - 417.

[3] 胡　娅，胡丽娜，米　彦，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.

[4] 高体玉，冯　军，慈云祥. 细胞电化学的研究进展[J]. 化学进展，1998，10(3)：305 - 311.

[5] Cemazar M, Miklavcic D, Scancar J, *et al*. Increased platinum accumulation in SA-1 tumour cells after *in vivo* electrochemotherapy with cisplatin[J]. Br J Cancer, 1999, 79(9-10): 1386 - 1391.

[6] Ramirez L H, Orlowski S, An D, *et al*. Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits[J]. Br J Cancer, 1998, 77(12): 2104 - 2111.

[7] Rabussay D, Kornhauser S. Frequently asked questions about electroporation therapy[J]. Medical Electronics , 1998, 1 - 5.

（编辑　龙　亮）