文章编号:1000-5404(2005)21-0139-03

论著

能量可控陡脉冲对人脐静脉血管内皮细胞的体外作用

罗小东[1],胡丽娜[1],孙才新[2],姚陈果[2],熊 兰[2],米 彦[2],王士彬[2] ([1]重庆医科大学第二附属医院妇产科,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 研究不同剂量的能量可控陡脉冲对体外培养的人脐静脉血管内皮细胞生物学性状的影响。**方法** 对人脐静脉血管内皮细胞施以不同剂量的陡脉冲,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法及细胞增殖曲线观察细胞的损伤效应,流式细胞技术分析作用前后细胞周期的情况。**结果** ①MTT试验证明能量可控陡脉冲对人脐静脉内皮细胞的作用存在剂量-效应关系,其杀伤率随剂量的增加而增加,揭示高剂量的能量可控陡脉冲可导致血管内皮细胞急性损伤效应;②细胞增殖曲线表明随能量可控陡脉冲剂量的增加,对细胞增殖能力抑制越明显;③流式细胞分析结果表明,能量可控陡脉冲处理前后,细胞周期变化不明显。**结论** 能量可控陡脉冲对血管内皮细胞有明显的杀伤和抑制作用。

关键词:陡脉冲;血管内皮细胞;体外培养
中图法分类号:R322.123;R329.25;R454.1 **文献标识码**:A

Effects of energy controllable steep pulse on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*

LUO Xiao-dong[1], HU Li-na[1], SUN Cai-xin[2], YAO Chen-guo[2], XIONG Lan[2], MI Yan[2], WANG Shi-bin[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, [2]Key Lab of High Voltage Engineering and New Electrical Technology, Chongqing University, Chongqing 400044, china)

Abstract: Objective To investigate the effects of energy controllable steep pulse on the biological properties of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro*. **Methods** After action of steep pulses of 10 V and 80 V, the acute and delayed effects on human umbilical vein endothelial cells were investigated by measuring the cell growth curves and by MTT assay, and cell cycle changes were detected by flow cytometry (FCM). **Results** MTT assay demonstrated the effects of steep pulses on HUVECs were in a dose-dependent manner. The cell growth curve showed that the higher dose mainly resulted in acute effects, but there were no changes in cell cycle. **Conclusion** It shows that energy controllable steep pulse can change the feature of human umbilical vein endothelial cells and induce the apoptosis of HUVEC.

Key words: steep pulse; human umbilical vein endothelial cell; culture *in vitro*

恶性肿瘤的治疗已进入综合治疗模式阶段,随着生物医学技术的发展,电化学治疗等新技术在肿瘤的局部治疗中展现了广阔的应用前景[1]。本课题组曾报道用能量可控陡脉冲(energy controllable steep pulse, ECSP)使肿瘤细胞发生不可逆电击穿而死亡[2],并发现ECSP可明显改善荷瘤小鼠的生存状况,延长其生存期,对肿瘤具有明显的杀伤和抑制效应。而血管内皮细胞结构和功能的变化,在肿瘤诱导的新生血管生长中起重要作用。因此,本实验拟以人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为对象,进一步研究陡脉冲对肿瘤血管内皮细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 人脐静脉血管内皮细胞HUVEC细胞系 购于重庆医科大学肝炎研究所。HUVEC细胞株培养于DMEM培养液(含10%精制小牛血清,青霉素100 U/ml,链霉素100 U/ml,pH 7.0~7.2),置于37 ℃,5% CO_2 孵箱中扩增,0.25%胰酶消化传代。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、精制小牛血清为Hyclone

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271484)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271484)
作者简介:罗小东(1978-),女,四川省峨边县人,博士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。电话:(023)63631395, E-mail: luodong301196@sohu.com
通讯作者:胡丽娜,电话:(023)85503655, E-mail:cqhulina@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-01-29;修回日期:2005-06-10

产品,四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)为 Sigma 产品,胰酶为 Gibco 产品,其余试剂由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.1.3 仪器设备 采用由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的能量可控陡脉冲治疗仪,能输出电压(0~2 kV)、脉冲前沿、脉宽(μs~ms 级)及周期可调的陡脉冲信号,电极针用足铂金制成。实验时用美国 Tektronix TDS3032B 示波器测量输出波形。

1.2 实验方法

1.2.1 陡脉冲处理方式 根据脉冲能量公式:总能量 = 1/2 · CUm^2 · f · △T,其中 C:放电电容值(μF),Um:脉冲峰值(V),f:频率(Hz),△T:作用时间(s)。我们选择固定放电电容值,频率及时间 3 个参数,改变脉冲峰值观察能量可控陡脉冲对人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 细胞的杀伤效应。实验时将细胞用不含血清的 DMEM 培养液(含酚红,pH 7.0~7.2)制成单细胞悬液,调整细胞密度为 3×10^6/ml,盛于 24 孔细胞培养板中,将预先转好小孔并焊接好间距为 1.0 cm 铂金电极针的 24 孔培养板盖换上,使电极针前端插入细胞悬液中,接通自行研制的能量可控陡脉冲发生仪行电击处理,施加不同剂量的陡脉冲,而正常对照组仅插入电极而不给予陡脉冲刺激。

1.2.2 剂量-效应关系曲线 不同剂量陡脉冲作用后调整细胞浓度为 1×10^6/ml,吸取 100 μl(含 1×10^5/ml 个细胞)接种于 96 孔培养板,每个样品设 5~8 个平行孔,同时设立正常对照组,空白对照组(即只加不含血清的培养液),然后每组每孔加入 MTT(5 mg/ml)20 μl/孔,继续培养 4 h。1 000 r/min 离心 5 min 后小心吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μl,震荡 15 min 后在酶标仪上检测吸光度 D(490),根据公式[3]计算杀伤率:

$$细胞杀伤率(\%) = \frac{正常对照组\ D\ 值 - 实验组\ D\ 值}{正常对照组\ D\ 值 - 空白对照组\ D\ 值} \times 100\%$$

1.2.3 细胞增殖曲线 取陡脉冲作用后低剂量(10 V)组,高剂量(80 V)组和对照组细胞分别接种,每瓶接种 3×10^5 个细胞,自第 2 天起,于倒置显微镜下观察细胞并每日每组取 2 瓶细胞计数,绘制增殖曲线。

1.2.4 流式细胞技术分析细胞周期 将浓度为 9×10^5/ml 的 HUVEC 细胞接种于培养瓶中,置于 37 ℃,5% CO_2 条件下孵育,第 2 天待大部分细胞贴壁后,再置于 4 ℃培养 1 h,以促成细胞同步化生长。换液继续培养 48 h 后,用胰酶消化制成细胞悬液,陡脉冲(40 V)处理后 4 h,收集细胞,70% 乙醇固定,碘化丙啶染色后上流式细胞仪分析。

1.3 统计学处理

利用 SPSS10.0 统计软件,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 形态学观察

陡脉冲处理时,细胞悬液中阴阳两极处均有气泡产生,并随剂量增加而增多,阳极附近液体变黄。镜下观察为高剂量组(80 V)贴壁的细胞明显减少,而低剂量组(10 V)和对照组细胞生长迅速,呈铺路石样形态。

2.2 剂量-效应关系

能量可控陡脉冲对人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 有确切的抑制效应,陡脉冲脉冲峰值与 HUVEC 细胞杀伤率之间存在剂量-效应关系,细胞杀伤率随 ECSP 剂量的增加而增加,见图 1。

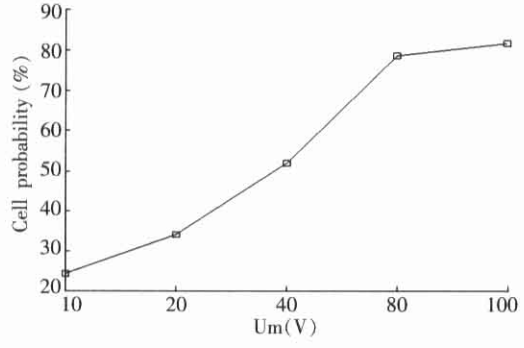


图 1 陡脉冲剂量-效应关系曲线

Fig 1 Dose-response relationship curve by steep pulse

2.3 细胞增殖曲线

细胞增殖曲线显示,对照组和低剂量(10 V)组细胞均在接种后即见增殖,两组比较无显著性差异($P > 0.05$),而高剂量(80 V)组则出现细胞数陡降,然后缓慢增殖,但增殖程度明显低于前两组($P < 0.01$),高剂量组可见血管内皮细胞较强的急性损伤效应,见图 2。

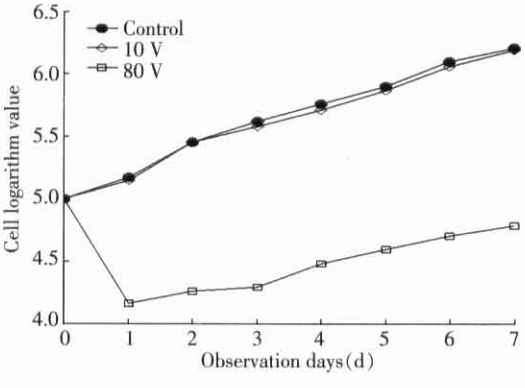


图 2 陡脉冲处理前后细胞增殖曲线

Fig 2 Cell proliferation curve by steep pulse

2.4 ECSP 对 HUVEC 细胞周期相分布的影响

流式细胞仪检测 ECSP 作用前后 HUVEC 细胞周期分布情况显示:$G_0 \sim G_1$ 期对照组为(58.38 ± 9.25)%,处理组为(59.50 ± 8.68)%;S 与 G_2/M 期对照组为(41.62 ± 6.25)%,处理组为(40.50 ± 8.64)%,细胞周期有改变,但统计学分析差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3 讨论

肿瘤组织诱导的血管生成是一个多因素相互影响、相互关联的复杂过程,其间涉及内皮细胞分裂、血管基底膜和血管周围基质的选择性降解以及内皮细胞

趋化移动等复杂过程。由内皮细胞增生形成的新血管促进了肿瘤的生长、浸润与转移，是决定肿瘤发展方向的关键因素，越来越多的研究证实，肿瘤生长、代谢是新生血管生成依赖性的[4]。

本实验利用 ECSP 作用于人脐静脉血管内皮细胞，检测其体外抗血管内皮细胞增殖的活性。结果显示它除了对细胞有急性的杀伤作用以外，还能强烈抑制血管内皮细胞增殖，并且存在一定的剂量-效应关系。Cemazar 等[5]亦发现电化学治疗后，除了两电极周围组织发生病理改变从而引起肿瘤细胞的死亡与肿瘤血管的破坏以外，电化学疗法同时作用于肿瘤血管内皮细胞导致血管损害、血流中断从而增强对肿瘤细胞的毒性作用，发生抗血管效应。

陡脉冲上升时间短，能达到 ns 数量级且包含了从直流、低频到超高频的极宽频谱范围，故陡脉冲对脐静脉内皮细胞膜和细胞核等细胞器具有很强的、广泛的、无选择性的杀伤力。而内皮细胞的分裂和增殖是肿瘤血管生成的物质基础，内皮细胞在血管生成中起关键作用，肿瘤新生血管内皮细胞已成为肿瘤靶向治疗最重要的靶标，因此抑制内皮细胞增殖，特别是对肿瘤血管内皮细胞的有效破坏可抑制肿瘤血管的生成和肿瘤细胞的生长和转移。近来研究表明成熟的血管有利于将肿瘤从休眠状态激活从而导致肿瘤的发展转移[6]。本实验显示陡脉冲电场能明显抑制 HUVEC 的增殖，并呈剂量依赖性，从而进一步增强了陡脉冲对肿瘤组织的杀伤能力，减少肿瘤通过血管转移的可能性。

本研究中细胞增殖曲线显示，对照组和低剂量（10 V）组细胞均在接种后即见增殖，而高剂量（80 V）组则出现细胞数陡降，然后缓慢增殖，但增殖程度明显低于前两组，由于电磁场总是伴随着脉冲电场而存在的，已知陡脉冲的上升时间越短，其电磁场中包含的高频成分就越多，低剂量时，膜上的微孔多为可逆性电穿孔，对细胞的增殖能力影响不大；随着电压幅度的增加，电场透过细胞膜进入内部，从而对细胞核产生影响。在高剂量的 ECSP 作用下，其包含的丰富高频电场成分能直接穿过细胞膜而对细胞核等产生较强的破坏作用，导致大量细胞死亡，呈现急性损伤效应。可见高剂量组可导致血管内皮细胞较强的急性损伤效应，随 ECSP 剂量的增加，细胞增殖抑制效应越明显。

细胞周期有两个调控限制点：G_1/S 和 G_2/M 限制点。前者主要控制细胞从静止状态进入 DNA 合成期（S 期），后者为决定细胞一分为二的控制点。我们前期实验中通过 ECSP 对人卵巢癌细胞株 $SKOV_3$ 细胞周期分析结果表明，在所选剂量下，表现出 $G_0 \sim G_1$ 期阻滞现象。即 ECSP 可影响肿瘤细胞通过 G_1/S 期而抑制肿瘤细胞增殖。对体外培养的卵巢癌细胞 $SKOV_3$ 作用显示 ECSP 可改变肿瘤细胞生存环境[7]，本实验细胞周期分析结果显示，HUVEC 细胞周期有改变，但统计学分析差异无显著性意义。我们推测，肿瘤细胞与正常细胞相比其增殖速度要快得多，即其 DNA 复制速度快，而且，肿瘤组织的介电常数高于正常组织的介电常数，因此，肿瘤细胞对电场的敏感性高于正常组织和细胞。陡脉冲对体外培养的人脐静脉血管内皮细胞存在杀伤和抑制效应，主要是由于 ECSP 能引起细胞生存环境 pH 值的改变，造成强酸强碱环境，导致细胞膜上和细胞液中的各种蛋白质，特别是线粒体等细胞器膜上酶蛋白发生不可逆的失活变性，影响了细胞正常物质能量代谢地进行，从而诱发了细胞增殖能力的改变，表现为增殖能力减弱。而不是通过改变细胞周期即影响 DNA 合成和分裂，引起 DNA 的损伤所导致。

综上所述，本研究揭示陡脉冲对体外培养的人脐静脉血管内皮细胞存在杀伤和抑制效应，由于陡脉冲电场对其血管的杀伤作用，使肿瘤血运受阻，减少了血管对肿瘤组织的营养供应，降低其新陈代谢的速度，从而抑制肿瘤的生长，并可有效的减少治疗后的复发和局部残存的癌细胞通过血管途径转移。因此 ECSP 除了对肿瘤的杀伤效应以外，还可通过对血管内皮细胞的作用发挥抗肿瘤血管效应，是一种有效的肿瘤治疗新方法，但由于其尚处于起步阶段，仍需大量的研究和探讨，为进一步的临床试验提供理论依据。

参考文献：

[1] 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.

[2] 姚陈果，孙才新，熊　兰，等. 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.

[3] 温汉平，王小宁，孙华蕴，等. 肿瘤细胞体外药敏试验 MTT 分析法[J]. 中华肿瘤杂志，1993，15(6)：470-471.

[4] Scappaticci F A. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(18): 3906-3927.

[5] Cemazar M, Parkins C S, Holder A L, *et al*. Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy[J]. Br J Cancer, 2001, 84(4): 565-570.

[6] Gilead A, Meir G, Neeman M. The role of angiogenesis, vascular maturation, regression and stroma infiltration in dormancy and growth of implanted MLS ovarian carcinoma spheroids[J]. Int J Cancer, 2004, 108(4): 524-531.

[7] 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.

（编辑　栾　嘉）