文章编号：1000-5404(2008)13-1249-03

论著

高强度电脉冲诱导卵巢癌线粒体凋亡及其机制

李 聪[1]，胡丽娜[1,2]，董晓静[1]，孙才新[3]，米 彦[3]（[1]重庆医科大学附属第二医院妇产科，重庆 400010；[2]四川大学华西第二医院妇产科，成都 610041；[3]重庆大学高电压与电工新技术教育部重点实验室，重庆 400044）

摘 要：目的 通过对调控线粒体凋亡信号通路上相关分子表达的检测，了解高强度电脉冲诱导卵巢癌组织凋亡可能的线粒体途径。**方法** 人卵巢囊腺癌 $SKOV_3$ 细胞接种于裸鼠皮下建立肿瘤模型，待成瘤直径达 1 cm，将 20 只裸鼠用随机数字表法分为实验组和对照组，每组 10 只，能量可控脉冲治疗仪用于实验组卵巢癌移植瘤，免疫荧光法检测电压依赖阴离子通道（voltage dependent anion channel，VDAC）的变化，Fluo-3/AM 探针标记后激光共聚焦显微镜定位细胞内外 Ca^{2+} 分布及其含量，RT-PCR 测定 Bcl-2 的 mRNA 水平。**结果** 高强度电脉冲作用后，实验组卵巢癌细胞 VDAC 表达与对照组相比显著下降（$P=0.025$）；Ca^{2+} 向线粒体流动，其含量比对照组明显增加（$P=0.042$）；Bcl-2 在高强度电脉冲作用后 mRNA显著低于对照组（$P=0.038$）。**结论** 高强度电脉冲作为一种强的外界刺激信号，作用于线粒体外膜 VDAC，使凋亡信号的细胞传导和发生效应增强，从而导致卵巢癌组织凋亡。

关键词：电脉冲；卵巢癌；凋亡；线粒体；离子通道
中图法分类号：R454.1；R459.9；R737.31 **文献标识码：**A

Ovarian cancer cell apoptosis by high intensity electric pulses: mitochondrial mechanism

LI Cong[1], HU Li-na[1,2], DONG Xiao-jing[1], SUN Cai-xin[3], MI Yan[3] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610081; [3]Key Laboratory of High Voltage and New Electrical Techniques of Ministry of Education, College of Electrical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To investigate the possible mitochondrial apoptotic signaling pathway in ovarian cancer cells induced by high intensity electric pulses. Methods Human ovarian cancer models were established in nude mice by transplanting $SKOV_3$ cells, and then the tumors were exposed to high intensity electric pulses (through 2 electrodes, with voltage 1 kV, frequency 1 kHz, pulse width 250 ns for 1 min). The mice were sacrificed immediately after the exposure, then the mass was taken out for mitochondria extraction. The expression of cytochrome C in voltage dependant anion channel (VDAC) was detected by immuofluorescence assay. Confocal microscope were used to detect Ca^{2+} flowing with the aid of Fluo-3/AM staining, and RT-PCR for Bcl-2 mRNA expression. Results In experiment group, VDAC was lowered, significantly different with control group ($P<0.05$), Ca^{2+} flowed to mitochondria distinctly ($P<0.05$), mRNA expression of Bcl-2 fell to (0.15 ± 0.09), much lower than the control group ($P<0.05$). Conclusion High intensity electric pulses can act on mitochondrial membrane, especially on VDAC, and result in the membrane potential falling and transmit intracellular signals, thus leads to the apoptosis of ovarian cancer cells.

Key words: electric pulse; ovarian cancer; apoptosis; mitochondria; anion channel

自闭合电路学说提出后，脉冲电场在肿瘤治疗领域得到了广泛的发展。近年来不少学者将电脉冲对细胞的影响聚焦到细胞内结构和功能的改变[1,2]，以电化学疗法和电融合为代表的技术立足于细胞膜的电穿孔[3]，Stephen 等[4]用纳米级电场处理后得到细胞的凋亡，同时发现这种凋亡的发生为线粒体依赖而非细胞

基金项目：国家自然科学基金(30371619)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371619)
作者简介：李 聪，女，四川省自贡市人，博士研究生，主要从事妇科肿瘤方面的研究。电话：13594134505，E-mail：cxmm@online.cq.cn
通信作者：胡丽娜，电话：13881896666，E-mail：cxmm@yahoo.com.cn
收稿日期：2007-11-12；修回日期：2007-12-14

膜途径，线粒体发生凋亡的机制在于线粒体膜上一种叫 PT 通道（permeability transition pore）的形成。研究表明 PT 结构上的电压依从性离子通道（voltage dependent anion channel，VDAC）与细胞色素 C 从线粒体释放有关[5]。Bcl-2 家族通过调控线粒体外膜的通透性来诱导凋亡的发生。本实验通过对线粒体凋亡信号途径各种因子的检测，分析高强度电脉冲作用后卵巢癌组织发生凋亡的可能机制，为其临床运用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

卵巢浆液性囊腺癌细胞株 $SKOV_3$ 为重庆医科大学超研所惠赠。将处于对数生长期贴壁生长的细胞 $SKOV_3$ 胰酶消化后，校正细胞数至 1×10^7 ml^{-1}。Trizol 试剂、逆转录试剂盒由美国 Gibco 公司提供，Bcl-2 和 β-actin 的引物由上海生工合成。能量可控电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 ns 级，脉宽 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。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立　采用鼠龄（4 ~ 6 周）、体质量相近（17 ~ 19 g）的雌性裸鼠 20 只，购于中国科学院上海实验动物中心，重庆医科大学实验动物中心购买、喂养。所有裸鼠在相同的饲养间喂养，其生活条件（温度、湿度、光照、空气流通等）均相同。将 $SKOV_3$ 细胞悬液对裸鼠接种，皮下注射于右腋下，2 周后瘤块长至直径约 1 cm 大小，表面无红肿溃烂，此时按随机数字表法将动物分成实验组和对照组，每组 10 只。

1.2.2 电脉冲治疗　裸鼠乙醚麻醉，在实验组卵巢癌组织中插入电极针（两针电极）并施于脉冲电场，对照组插入电极针但不施加电场。电场参数：电压 1 000 V，频率 1 000 Hz，脉宽 250 ns，作用时间 1 min。在每只裸鼠卵巢癌组织上选取 3 点重复处理，每点给予相同的脉冲电场。高强度电脉冲处理后立即处死裸鼠，取出脉冲作用区域组织，置于液氮冻存备用。

1.2.3 卵巢癌线粒体的提取　用冷分离液（蔗糖 250 mmol/L，Tris-HC1 50 mmol/L）冲洗卵巢癌组织，剪碎，反复匀浆、过滤，最终沉淀物即为卵巢癌线粒体。整个分离过程在 0 ℃ 进行。

1.2.4 卵巢癌线粒体内 Ca^{2+} 的测定　分别向 2 组线粒体悬液中加入终浓度为 10 μmol/L 的 Fluo-3/AM，根据荧光强度和数量分析线粒体膜电位改变，寻求影响线粒体膜电位的最大电场参数。

1.2.5 RT-PCR 测定 Bcl-2 的表达　采用 Trizol 试剂提取卵巢癌组织总 RNA，逆转录后行 PCR。Bcl-2 和 β-actin 的引物序列如下。Bcl-2 正义链：5′-CGCCTCGAGATGTCTCAGAG-3′，反义链：5′- GCGTCTAGATCATTTCCGAC-3′，大小为 312 bp；β-actin 正义链：5′-AGCCATGAGAG-3′，反义链：5′-GTCCATG-CAGTT-3′，大小为 640 bp。0.1% 琼脂糖凝胶电泳，以 β-actin 为内对照，计算电泳条带的平均灰度值表示 Bcl-2 mRNA 表达量。

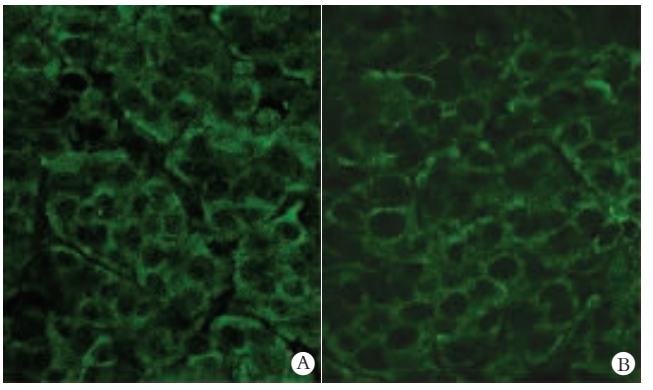
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件，对实验组和对照组 VDAC 蛋白表达、Ca^{2+} 含量、Bcl-2 mRNA 表达的比较行 t 检验。

2 结果

2.1 卵巢癌组织中 VDAC 蛋白表达的比较

高强度电脉冲处理后，激光共聚焦显微镜下见对照组癌细胞形态完整，细胞质内绿色荧光物质强，细胞核大、深染，可见核分裂相（图 1A）；实验组癌细胞数量减少，细胞形态尚完整，细胞质内绿色荧光强度明显减弱（图 1B）。高强度电脉冲处理后，对照组 VDAC 的荧光强度为（15.96 ± 0.37），实验组荧光强度值（3.25 ± 1.24），显著低于对照组（$P=0.025$）。

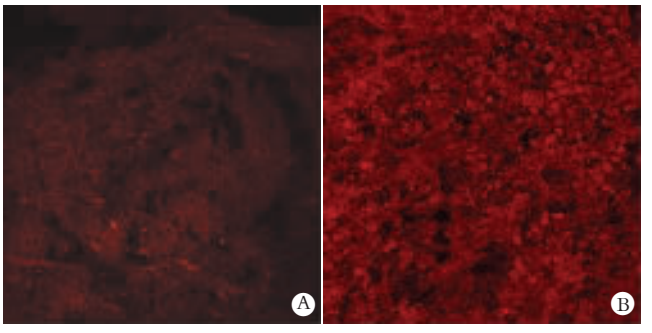


A：对照组；B：实验组

图 1　卵巢癌组织中 VDAC 蛋白的表达情况（激光共聚焦显微镜 ×400）

2.2 卵巢癌组织线粒体中 Ca^{2+} 的含量比较

高强度电脉冲处理后，提取线粒体悬液与 Fluo-3/AM 孵育，激光共聚焦显微镜下见对照组线粒体悬液内红色荧光强度弱（图 2A）；实验组线粒体悬液内大量红色荧光物质，荧光强度明显增加（图 2B）。对照组荧光强度为（8.32 ± 2.31），实验组荧光强度（25.20 ± 1.23），明显高于对照组（$P=0.042$）。结果表明经高强度电脉冲处理后，实验组 Ca^{2+} 含量明显增多。

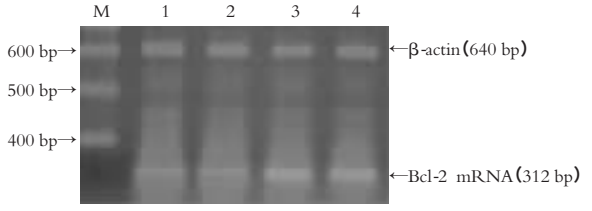


A：对照组；B：实验组

图 2　卵巢癌线粒体中 Ca^{2+} 含量的比较（激光共聚焦显微镜 ×800）

2.3　卵巢癌组织中 Bcl-2 mRNA 的表达比较

高强度电脉冲处理后,RT-PCR 测定电泳灰度值,在 312 bp 位置见 Bcl-2 mRNA 表达(图 3)。实验组 Bcl-2 的灰度相对值为(0.15 ± 0.09),显著低于对照组(0.48 ± 0.13),(P = 0.038)。



M:DNA 标准;1,2:实验组;3,4:对照组

图 3　RT-PCR 检测卵巢癌组织中 Bcl-2 mRNA 的表达

3　讨论

高强度电脉冲作用于肿瘤细胞,引起细胞的凋亡已得到大量实验证实[6]。Kotnik 等[7]通过比较脉冲上升和下降的时间,认为脉冲波形对穿孔影响不大,因为增加脉冲宽度和脉冲个数能降低使细胞电穿孔所需的脉冲强度最低值。当电场频率在 kHz 范围内时,对细胞电穿孔的影响不显著。Deng 等[8]通过对不同频率和电压的研究发现,亚微秒强脉冲作用后,细胞不会产生明显肿胀现象,细胞膜穿孔延迟,胞内结构提前产生作用,这种穿透性改变与可逆性电穿孔有明显区别。White 等[9]利用高强度电脉冲对细胞的作用,发现纳米级高能脉冲可以在保持细胞完整性的情况下,使线粒体膜电位下降,Ca^{2+} 在细胞内外重新分布,肿瘤细胞能量中心减弱、活性降低,微环境的改变,提示线粒体为区别于细胞膜的又一电脉冲作用位点。

PT 孔是跨越线粒体外膜和内膜的通道,是由蛋白质组成的复合体,包括位于线粒体外膜的 VDAC 和内膜的腺苷酸移位酶(adenine nucleotide translocase,ANT)等,当 VDAC 和 ANT 并置在线粒体内外膜的相应接触位点形成复合体时,导致 PT 孔开放。在本实验脉冲电场作用于卵巢癌组织后,VDAC 蛋白的表达显著下降,提示在高强度电脉冲作为一种强烈的外界刺激信号,可作用于卵巢癌线粒体,引起 VDAC 的构象改变,导致 PT 孔开放,细胞凋亡发生。细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加或 Ca^{2+} 稳态失衡与细胞凋亡密切相关。VDAC 的表面存在 Ca^{2+} 结合位点,结合 PT 孔上的金属结合位点,是 PT 孔开放的重要因素。Ca^{2+} 作用的发挥由线粒体内游离 Ca^{2+} 浓度决定,线粒体内钙超载是诱导 PT 孔开放的常见原因。本实验显示:高强度电脉冲作用卵巢癌组织后,其线粒体内 Ca^{2+} 显著增加,提示 Ca^{2+} 参与了细胞凋亡的发生。Bcl-2 家族蛋白可能参与 PT 孔的组成。免疫沉淀法等研究[10]发现 Bax 通过与线粒体外膜上 VDAC 的结合而发挥作用。在脂质体上重建的孔道结构显示 VDAC 中包含 Bax,当复合体与 Bcl-2 结合后,PT 孔的活性被阻断。本实验中检测到高强度电脉冲作用后 Bcl-2 下调,抑癌基因表达降低,他们有利于卵巢癌细胞凋亡的发生。

脉冲电场作用后 VDAC 的构象改变、Ca^{2+} 在线粒体中的增加、Bcl-2 表达的降低,提示有利于卵巢癌细胞凋亡的发生。其中以 VDAC 的改变最为重要,它既是 PT 孔的重要组成部分、Ca^{2+} 的结合位点,又是 Bcl-2 家族的功能靶点,还是脉冲电场作用于线粒体发挥效应的第一结构,诱导第二信号 Ca^{2+} 的分布改变。线粒体钙超负荷,导致细胞内各种凋亡相关蛋白释放,同时 Bcl-2 家族基因的调控加剧了凋亡信号的细胞内传导,导致凋亡的发生。研究结果表明高强度电脉冲是一种有效的新型肿瘤治疗手段,利用其对细胞内结构的破坏和凋亡的诱发,可作用于术后复发和无法手术的残余肿瘤病灶,抑制了肿瘤的生长和转移,起到有效的二线补充杀伤作用,为肿瘤的综合治疗带来希望。

参考文献:

[1] Tekle E, Oubrahim H, Dzekunov S M, *et al*. Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses [J]. Biophys J, 2005, 89(1): 274 – 284.

[2] 李　聪,胡丽娜,董晓静, 等. 高强度电脉冲对卵巢上皮性癌组织中基质金属蛋白酶 9 及其抑制物 1 蛋白表达的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42(8): 555 – 557.

[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] Beebe S J, Fox P M, Rec L J, Paula M F, Laura J R, *et al*. Nanosecond high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells[J]. FASEB J, 2003, 17(11): 1493 – 1495.

[5] Hetz C, Vitte P A, Bombrun A, *et al*. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia[J]. J Biol Chem, 2005, 280(52): 42960 – 42970.

[6] 王萍玲,胡丽娜,李　聪,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 490 – 493.

[7] Kotnik T, Miklavcic D. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields[J]. Biophys J, 2006, 90(2): 480 – 491.

[8] Deng J, Schoenback K H, Buescher E, S, *et al*. The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells [J]. Biophys J, 2003, 84(4): 2709 – 2714.

[9] White J A, Blackmore P F, Schoenbach K H, *et al*. Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields [J]. J Biol Chem, 2004, 279(22): 22964 – 22972.

[10] Dhyan C, Grace C, Peter T, *et al*. Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2 [J]. J Biol Chem, 2005, 280(19): 19051 – 19061.

(编辑　张　维)