文章编号:1000-5404(2010)18-1941-04

论著

不可逆性电穿孔致 HeLa 细胞凋亡与坏死的作用研究

周 玮[1],熊正爱[1],刘 颖[1],李成祥[2],姚陈果[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科[1];400030 重庆,重庆大学输配电装备及系统安全与新技术国家重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 探讨脉冲电场不可逆性电穿孔处理 HeLa 细胞时,发生细胞膜电穿孔、细胞凋亡、细胞坏死与脉冲电场参数的关系。**方法** 采用固定脉宽 100 μs、频率 1 Hz、脉冲数 8 个,电场强度由 250 V/cm 逐级升至 2 500 V/cm 的脉冲电场处理 HeLa 细胞。利用 PI 示踪、流式细胞术检测研究 HeLa 细胞膜发生穿孔的阈值电场剂量;CCK-8(cell counting kit-8, CCK-8)法检测脉冲电场处理 HeLa 细胞的量效关系;Annexin V kit 染色、流式细胞术检测各组细胞的凋亡与坏死。**结果** HeLa 细胞膜发生可逆性穿孔的阈值场强为 750 V/cm,发生凋亡的阈值电压为 1 250 ~ 1 500 V/cm,坏死的阈值为1 750 V/cm。**结论** 不可逆性电穿孔杀灭 HeLa 细胞时细胞凋亡也发挥着重要作用,而且导致凋亡与坏死的电场范围相互重叠。

【关键词】 脉冲电场;HeLa 细胞;电穿孔;凋亡
【中图法分类号】 R454.1;R730.23;R737.33 **【文献标志码】** A

Apoptosis and necrosis of HeLa cells induced by irreversible electroporation

Zhou Wei[1], Xiong Zheng'ai[1], Liu Ying[1], Li Chengxiang[2], Yao Chenguo[2] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]State Key Laboratory of Power Transmission Equipment and System Security and New Technology, Chongqing University, Chongqing, 400030, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the impact of pulse electric fields (PEFs) on membrane breakdown, necrosis and apoptosis of HeLa cells when irreversible electroporation (IRE) was performed on it. **Methods** PEFs with a permanent duration of 100 μs, a frequency of 1 Hz and pulse of 8 pieces were performed on HeLa cells (2×10^6/ml). The electric field intensity was increased from 250 V/cm to 2 500 V/cm gradually with 250 V/cm for each time. Propidium Iodide (PI) was used to trace the breakdown of cell membrane with the aid of flow cytometry according to the manufacturer's protocol. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to examine survival of HeLa cells after treated with IRE. HeLa cells were double-stained with Annexin V kit then analyzed with flow cytometry for apoptosis and necrosis. **Results** The reversible electroporation threshold of HeLa cells was 750 V/cm. The apoptotic threshold ranged from 1 250 V/cm to 1 500 V/cm. The necrotic threshold was about 1 750V/cm. **Conclusion** Besides necrosis due to IRE, apoptosis also played an important role during IRE ablating HeLa cells. The areas of PEF parameters inducing apoptosis and necrosis are overlapped with each other.

【Key words】 pulse electric fields; HeLa cells; irreversible electroporation; apoptosis

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China(50637020) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BA5039).
Corresponding author: Xiong Zheng'ai, Tel: 86-23-63693503, E-mail: xiongzhengai61@21cn.com

一定参数的脉冲电场(pulse electric fields, PEFs)作用下细胞膜不可逆性穿孔(irreversible electroporation, IRE)是不可逆性电击穿治疗恶性肿瘤的理论基础[1]。既往的研究结果[2]认为,肿瘤细胞死亡的直接原因是细胞膜不可逆性亲水通道形成,胞外基质以及其他分子涌入细胞,导致肿瘤细胞崩解坏死,是一种对细胞的即刻破坏效应。但是在本课题组以及国外同行的前期实验[3,4]中都发现,不可逆性电穿孔治疗恶性肿瘤时也存在肿瘤细胞凋亡的痕迹。推测随着电场衰减,在一定的较低电场能量作用下肿瘤细胞并没有被直接杀灭,可能会通过特定途径启动肿瘤细胞的死亡程序,进而发生凋亡。本研究以人宫颈癌细胞系 HeLa 为研究对象,系统探讨 HeLa 细胞发生穿孔、凋亡以及坏死与不同脉冲电场剂量之间的关系,为 IRE 治疗宫颈癌提供初步依据。

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(50637020);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2009BA5039)
【通信作者】 熊正爱,电话:(023)63693503,E-mail:xiongzhengai61@21cn.com

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂

人宫颈癌 HeLa 细胞株由重庆医科大学超声工程研究所提供；RPMI1640 培养液、PBS 平衡液、新生小牛血清均购自 HyClone 公司；CCK-8 kit 购自碧云天公司；PI 购自 Sigma 公司；Annexin V kit 购自美国 BD 公司。

1.2 仪器

脉冲电场肿瘤治疗仪(重庆大学输配电装备及系统安全与新技术国家重点实验室研制，专利号：ZL200710078282.7)；电击小室(Bio-Rad 公司，电极板间距 4 mm)；示波器(Tektronix TDS3032B, USA)，流式细胞仪 FACSVantage SE(美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人宫颈癌细胞系 HeLa 利用含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养，细胞均贴壁生长，2 ~ 3 d 传代 1 次。

1.3.2 PI 示踪穿孔 取对数生长期 HeLa 细胞，0.25% 胰酶消化后离心，PBS 液清洗、离心、重悬，调整细胞浓度为 2×10^6/ml。向细胞悬液中加入 PI 染液，使终浓度为 20 μg/ml。实验组每组均取 760 μl 混有 PI 的细胞悬液加入电击小室，分别施加以脉冲电场处理(脉宽 100 μs，频率 1 Hz，脉冲 8 个)，电压值由 100 V 起，以 100 V 为梯度逐级增加至 1 000 V 共 10 组。本实验中应用的电击小室电极板间距为 4 mm，根据公式(电场强度 = 电压/距离)，100 V 电压对应的电场强度为 250 V/cm，根据电场强度分组：250、500、750、1 000、1 250、1 500、1 750、2 000、2 250、2 500 V/cm 共 10 组。未施加电场的细胞悬液为对照组。脉冲电场处理后的细胞立即上流式细胞仪检测，计算 HeLa 细胞 PI 阳性染色率。

1.3.3 CCK-8 检测 分组同 1.3.2。向 96 孔板中加入 80 μl 培养液，电场处理后的细胞悬液每组取 20 μl 加入含有培养液的孔板中，调零组仅加入培养液，37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 24 h。向各孔内分别加入 10 μl 的 CCK-8，培养箱内继续孵育 2 h，酶标仪测定各孔在 450 nm 波长的光密度值 $D(450)$。细胞存活率 = [电场处理组 $D(450)$ 值 − 调零组 $D(450)$ 值]/[对照组 $D(450)$ 值 − 调零组 $D(450)$ 值] × 100%，每组设 5 个复孔，单独重复 4 次。

1.3.4 流式细胞术检测凋亡 以 CCK-8 检测结果为依据，围绕细胞存活率发生显著变化的电场参数，选取 750、1 000、1 250、1 500、1 750、2 000、2 250 V/cm 7 个处理组以及仅置于电击小室中 8 s，而不施与电场作用的对照组共 8 组，分别于电场处理后 2、24 h 利用 Annexin V-FITC/PI 根据试剂盒说明染色，流式细胞仪检测[5]。

1.4 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，实验数据用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 PI 示踪穿孔

在场强 500、750、1 000 V/cm 组，阳性细胞百分比分别为 (8.38 ± 3.97)%、(18.29 ± 0.13)% 和 (61.46 ± 12.54)%，1 000 V/cm 组与其他 2 组比较差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。在电压达到 600 V 时，即场强为 1 500 V/cm 时达到饱和剂量，阳性细胞接近 100%。

2.2 CCK-8 检测脉冲电场对 HeLa 细胞的抑制作用

从 CCK-8 检测计算得出电场处理后 24 h 各组细胞的存活率，反应不同强度脉冲电场对 HeLa 细胞的杀伤作用。从 750、1 000、1 250 V/cm 直至 2 500 V/cm 组，HeLa 细胞存活率分别为 (97.20 ± 0.53)%、(95.00 ± 1.51)%、(89.70 ± 0.90)%、(73.60 ± 3.00)%、(77.20 ± 0.25)%、(71.70 ± 1.30)%、(62.20 ± 1.25)% 和 (60.50 ± 1.50)%，1 250 V/cm 组与对照组和前面 3 组比较差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

依据 CCK-8 检测脉冲电场对 HeLa 细胞的抑制作用，细胞抑制的阈值在 750 ~ 1 000 V/cm 之间，而在 2 250 V/cm 时作用基本达到最大。因此在流式细胞术检测时，选取对照组以及 750、1 000、1 250、1 500、1 750、2 000、2 250 V/cm 7 组进行分析。结果显示各处理组细胞处理后 2 h 发生的早期凋亡呈剂量依赖关系(表 1)，但是从 1 250 V/cm 组起，凋亡率与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)，1 500 V/cm 时，凋亡率与对照组和 750、1 000 V/cm 组比较均有统计学差异($P < 0.05$)。与此同时，当场强达到 1 750 V/cm 时，细胞发生急性坏死的比率显著增高，与1 000 V/cm 组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

电场处理后 24 h 的早期凋亡检测结果显示，各处理组与对照组均无显著性差异，说明脉冲电场对 HeLa 细胞的作用并无明显的延后效应。而对于处理后 24 h 的晚期凋亡和坏死细胞检测结果提示 1 250 V/cm 组开始，死亡细胞逐渐增多，1 500 V/cm组与对照组和 750、1 000 V/cm 组比较均有显著性差异。

表 1 不同强度脉冲电场致 HeLa 细胞凋亡与坏死 (%，$\bar{x} \pm s$)

组别	2 h		24 h	
	早期凋亡	晚期凋亡与坏死	早期凋亡	晚期凋亡与坏死
对照组	2.19 ± 2.23	3.73 ± 2.21	6.38 ± 1.98	6.69 ± 2.01
750 V/cm 组	3.22 ± 2.16	5.53 ± 2.35	6.77 ± 3.32	5.59 ± 1.66
1 000 V/cm 组	3.78 ± 3.22	6.61 ± 2.12	6.42 ± 2.57	6.28 ± 1.93
1 250 V/cm 组	8.57 ± 2.76[a]	6.56 ± 2.89	5.77 ± 3.04	10.52 ± 2.97
1 500 V/cm 组	12.41 ± 4.24[bc]	7.73 ± 2.72[a]	6.74 ± 3.17	16.86 ± 3.32[bc]
1 750 V/cm 组	13.94 ± 3.54[b]	10.10 ± 2.36[bc]	6.83 ± 2.74	22.04 ± 5.17[b]
2 000 V/cm 组	17.54 ± 5.11[b]	11.25 ± 3.43[b]	6.56 ± 2.85	22.69 ± 4.63[b]
2 250 V/cm 组	22.82 ± 3.37[b]	13.38 ± 2.98[b]	7.32 ± 3.76	32.29 ± 5.83[b]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与对照组比较；c：$P < 0.05$，与 750、1 000 V/cm 组比较

3 讨论

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一。随着宫颈癌发病年轻化使得越来越多的年轻宫颈癌患者在接受了传统手术治疗后，生殖道完整性遭到破坏，甚至失去生育能力[6]。IRE 治疗肿瘤是通过特定参数的脉冲电场作用，直接导致肿瘤细胞膜发生不可逆性电穿孔而死

亡,为摆脱化疗药物限制,单独利用电场治疗恶性肿瘤开辟了新的领域[7,8]。以色列希伯来大学的 Onik 和美国加州大学的 Rubinsky 等[9]已经将 IRE 应用于前列腺癌患者的治疗中,取得了满意效果。IRE 必须要以电极针作为载体,适合应用于体表肿瘤。宫颈虽然不在体表,但是女性生殖道特殊的解剖结构使其能够通过简单的器械操作而充分暴露,非常适合电极针的排布,所以认为宫颈癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤中最适宜进行 IRE 治疗的。

虽然利用电极针排布方式的改变可以来达到对瘤体的覆盖和保护周围正常组织的目的[10,11]。但是宫颈癌作为一种恶性肿瘤,其固有的侵袭性使得治疗范围很难精确判定,范围偏小可能会有癌细胞残留,范围偏大则容易造成生殖道局部大面积组织破坏,影响患者生育功能。针对这一难题,本课题组提出两种可能的解决方案:①利用周边细胞发生可逆性电穿孔的特性,在治疗同时联合目的基因转染,达到杀灭残留病灶细胞的作用[12];②宫颈癌 HeLa 细胞是一种恶性肿瘤细胞株,恶性肿瘤细胞细胞质内水、钠含量和电导率要高于正常组织细胞[13]。所以理论上讲 HeLa 细胞对脉冲电场的敏感性会较正常宫颈组织细胞更强。在 IRE 治疗时,采用特定的参数组合,尽可能多的使瘤体与正常交接区域肿瘤细胞发生凋亡,减少对正常细胞的破坏。

本研究利用荧光染料 PI 为示踪分子,研究 HeLa 细胞膜穿孔的电场参数,电场作用后立即行流式细胞术检测,该方法较荧光光度计检测更为准确[14]。结果显示在场强达到 750 V/cm 时,PI 阳性的细胞开始增多,说明细胞膜上一定直径的微孔已经开放。而在同样场强作用下 CCK-8 检测细胞抑制与对照组没有显著差异,流式细胞检测结果也没有明确的凋亡或坏死发生,提示此时细胞膜仅仅发生了一过性的可逆性穿孔,并没有对细胞的存活和增殖有明显影响。当电压升高至 400 V,即场强达到 1 000 V/cm 时,由于细胞膜穿孔增加,细胞 PI 阳性染色率进一步升高,而 CCK-8 和流式细胞术检测结果仍然没有明显变化。由此推测在脉宽、频率、脉冲数固定的条件下,750 ~ 1 000 V/cm 就是 HeLa 细胞发生可逆性穿孔的电场强度的阈值,细胞生存不受影响。

与药物作用的持续性不同,脉冲电场作为一种物理治疗方法,其作用是一过性的,本实验中所有组别的脉冲电场处理时间均为 8 s,过程非常短暂。而且在前期的实验当中对“时间-效应”曲线的研究也发现,IRE 作用于细胞后的最大抑制效应均在 24 h 以内,因此本实验选取电场处理后 2、24 h 分别作为 IRE 对 HeLa 细胞杀伤效应的检测时间点,探讨 IRE 作用于细胞所产生的早期效应以及可能由早期效应诱发的“级联反应”。从 24 h 存活率来看,在场强 1 250 V/cm 组开始发生细胞抑制,说明已经存在细胞的死亡。但是用流式细胞术检测电场作用后 2 h 的细胞发现,场强1 250 V/cm 组的 HeLa 细胞的坏死率仅为 6.56% 左右,与前面更低电压组和对照组没有明显差别,但是同时早期凋亡细胞的比率较对照组升高,而且呈剂量电场依赖关系。当脉冲电场场强达到 1 750 V/cm,电场作用后 2 h 的坏死细胞开始显著增加,同样也呈现“剂量-效应”正相关性。通过这一系列实验数据分析判断,HeLa 在参数为“脉宽 100 μs,频率 1 Hz,脉冲 8 个”的脉冲电场作用下发生凋亡的阈值场强为 1 250 ~ 1 500 V/cm,发生不可逆性电穿孔而早期坏死的阈值场强为 1 750 V/cm。证实了 IRE 治疗肿瘤时的确存在一个“凋亡窗口”,该窗口参数介于细胞发生可逆性穿孔的相对较低能量参数和细胞坏死的高能量参数之间。

随着脉冲电场强度逐步升高,电场作用后 HeLa 细胞的结局有可逆性穿孔(存活)、凋亡、坏死 3 种,这 3 种现象都是当电场强度达到特定阈值时被开启。然而当电场强度不断增高,可逆性穿孔(存活)的细胞将逐渐减少,直至消失。可以肯定,当电场强度进一步升高,凋亡细胞的比率也将逐渐降低,最终所有的细胞都会发生即刻坏死,三者的窗口参数逐级升高但又互有交集。

治疗最终要应用于临床,无限制的升高电压无论是考虑治疗的安全性还是在技术上都是不切实际的。要增加脉冲电场的能量,充分发挥其生物学效应,除了升高电压,还可以通过提高脉冲数量来实现。已经有研究[14]证实,相对于高电压脉冲电场,多个脉冲的低电压更容易诱导肿瘤细胞凋亡。IRE 治疗宫颈癌的过程中,如果能在保证完全杀灭癌细胞的前提下尽量提高凋亡细胞的比例,对于减少局部组织损伤和保持生殖道大体完整性有着重要的意义。因此,在进一步的工作中,我们将围绕着 HeLa 细胞凋亡的脉冲电场窗口参数深入研究,探索与凋亡发生关系最为密切的电场参数,优化组合,寻求 IRE 杀灭 HeLa 细胞的最佳参数组合,并且明晰该参数下细胞发生凋亡的具体途径和机制,然后进一步结合动物实验为 IRE 治疗宫颈癌提供前期的理论依据。

参考文献:

[1] Weaver J C. Electroporation of cells and tissues[J]. IEEE Trans Plasma Sci, 2000, 28(1):24 - 33
[2] 姚陈果, 孙才新, 米彦, 等. 陡脉冲对恶性肿瘤细胞不可逆性电击穿的实验研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2004, 23(1):92 - 97.
[3] Maor E, Ivorra A, Leor J, *et al*. The effect of irreversible electroporation on blood vessels[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(4):307 - 312.

[4] 刘晓云. 脉冲电场联合IL-21基因在宫颈癌治疗中的基础研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2010.
[5] 吕莹,张德禄,张宏,等. 细胞凋亡检测方法研究进展[J]. 西北师范大学学报:自然科学版,2007,43(2):82-87.
[6] 刘兰芳,苏丹,陈鲁,等. 人乳头状瘤病毒感染与宫颈癌年轻化的关系探讨[J]. 中国预防医学杂志,2008,9(12):1030-1034.
[7] Rubinsky B, Onik G, Mikus P. Irreversible electroporation:a new ablation modality—clinical implications[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(1):37-48.
[8] 姚陈果,李成祥,孙才新,等. 脉冲电场诱导细胞内外膜电穿孔模型与跨膜电位的仿真[J]. 中国电机工程学报,2006,26(13):123-128.
[9] Rubinsky B. Irreversible Electroporation[M]. Berlin:Springer-Verlag, 2010:235-247.
[10] Zupanic A, Corovic S, Miklavcic D. Optimization of electrode position and electric pulse amplitude in electrochemotherapy[J]. Radiol Oncol, 2008, 42(2):93-101.
[11] Corovic S, Zupanic A, Miklavcic D. Numerical modeling and optimization of electric field distribution in subcutaneous tumor treated with electrochemotherapy using needle electrodes[J]. IEEE Trans Plasma Sci, 2008, 36(4):1665-1672.
[12] 刘晓云,熊正爱,李好山. 白介素-21基因转导人宫颈癌细胞产生T细胞和NK细胞依赖的抗肿瘤作用[J]. 第三军医大学学报,2010,32(8):819-822.
[13] Ferlini C, Scambia G. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange[J]. Nat Protoc, 2007, 2(12):3111-3114.
[14] Matsuki N, Ishikawa T, Imai Y, *et al*. Low voltage pulses can induced apoptosis[J]. Cancer Lett, 2008, 269(1):93-100.

(收稿:2010-04-09 修回:2010-05-05)
(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)18-1944-01

桥小脑角区孤立性纤维瘤1例

刘 颖[1,2],陆 明[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院放射科[1];401320 重庆,重庆市巴南区人民医院放射科[2])

【关键词】 孤立性纤维瘤;桥小脑角
【中图法分类号】 R739.41 【文献标志码】 B

孤立性纤维瘤(solitary fibrous tumor, SFT)是一种少见的梭形细胞软组织肿瘤,最初由Klemperer等[1]于1931年报道,多发生于胸膜内,也可发生于胸膜外,发生于颅内的SFT更为罕见。现报告1例发生于颅内桥小脑角区的孤立性纤维瘤。

1 临床资料

患者,女性,43岁,因"头痛、头昏8年,右耳鸣4年余,加重3个月余"入西南医院神经外科。患者于8年前无明显诱因突发头痛、头昏,疼痛呈胀痛,以右颞枕部偏重,较剧烈,持续10 min后逐渐缓解。后上述症状间歇性发作,每个月1次,间歇期如常。4年前逐渐出现右侧耳鸣。3个月前上述症状逐渐加重,疼痛持续时间较前明显延长,耳鸣呈持续性发作,并逐渐出现右侧颜面部麻木。

入院查体:右侧颜面感觉减退,右耳听力减退,双眼视力、视野粗测正常,双眼睑闭合完全,露齿、鼓腮正常,右侧鼻唇沟稍变浅,伸舌居中。颈软。四肢肌力Ⅴ级,肌张力正常,指鼻、指指、跟胫膝试验协调性较好。双侧病理征阴性。

入院后CT检查:右侧桥小脑角区等密度软组织肿块,边界清楚,约3.4 cm×3.0 cm大小,密度略不均匀,其右后方可见较明显带状低密度水肿区,相邻脑干和第四脑室轻度受压变形;T_2WI肿块大部分仍呈稍低信号,其内可见小斑状明显高信号影,相邻右侧听神经形态正常。弥散成像显示肿块无限制性弥散。增强后肿块明显显著较均匀强化(图1)。入院诊断为脑膜瘤。

手术所见:肿瘤位置较深,包膜完整,完全实质性,质地较硬,血供十分丰富,舌下神经及三叉神经根部与肿瘤黏连紧密,术中病理活检示:听神经瘤,但大体改变符合脑膜瘤。

术后病理:送检及冰余组织内见瘤细胞呈梭形,细胞体积较小,呈索状排列,间质纤维组织丰富(图2)。免疫组化染色:CD34(+),CD99(+),EMA(-),S100(-),Bcl-2(+)。病理诊断报告:(右桥小脑角)孤立性纤维瘤。

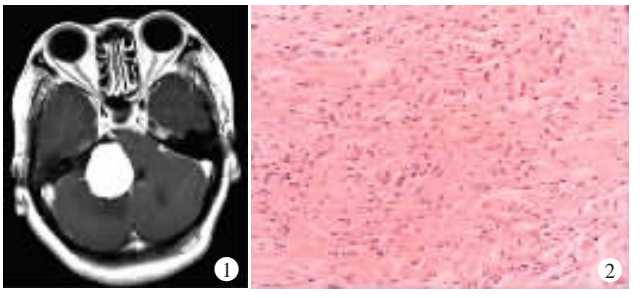


图1 桥小脑角区孤立性纤维瘤的MRI表现
图2 桥小脑角区孤立性纤维瘤的病理学观察 (HE ×100)

2 讨论

SFT是一种少见的间叶源性肿瘤,发生于颅内的SFT罕见,文献中基本上为散在个案报道。发生于颅内的SFT基本上起源于硬脑膜或与硬脑膜相连,发生于脑内的或脑室内的SFT

(下转1961页)

【通信作者】 刘 颖,E-mail:chenwei-1379@163.com