论著

文章编号:1000-5404(2012)16-1604-04

亚致死剂量脉冲电场对 HeLa 细胞恶性生物学行为的影响

周 玮[1],熊正爱[1],刘 颖[2],张 琴[1],李成祥[3],姚陈果[3] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院妇产科[2];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[3])

[摘要] **目的** 研究亚致死剂量脉冲电场(pulse electric fields, PEFs)作用后 HeLa 细胞恶性生物学行为变化,探讨不可逆性电穿孔消融治疗是否有促进残留肿瘤细胞增殖、侵袭、转移的潜在可能。**方法** 利用电场强度为 500、750、1 000 V/cm的亚致死剂量 PEFs 分别作用于 HeLa 细胞,取正常野生株 HeLa 细胞作为对照。采取 CCK8 比色法检测细胞活性反映 HeLa 细胞增殖能力;基质胶黏附实验、Transwell 小室体外侵袭实验和细胞迁移实验分别检测电场作用后 HeLa 细胞对基质的黏附能力、体外侵袭能力和细胞迁移能力的改变。**结果** 不同场强亚致死剂量 PEFs 作用后 12、24、48、72 h,HeLa细胞的增殖与对照组比较无显著改变。场强为 500、750、1 000 V/cm 的 PEFs 作用后,对 HeLa 细胞黏附抑制率分别为 9.38%、30.21% 和 42.70%。对照组、500 V/cm 组、750 V/cm 组和 1 000 V/cm 组:体外侵袭穿透基质胶的细胞数分别为(104.17±4.59)、(101.82±5.76)、(78.39±6.18)、(67.91±5.94),其中 750 V/cm 组、1 000 V/cm 组明显少于对照组($P<0.05$);细胞划痕修复率分别为(53.46±8.07)%、(48.75±9.13)%、(36.49±7.36)%、(30.58±5.91)%,对照组显著高于 750 V/cm 组和 1 000 V/cm 组($P<0.05$)。亚致死剂量 PEFs 对细胞的黏附、侵袭和迁移能力均呈现不同程度的抑制作用,其抑制效应和电场强度呈剂量依赖关系。**结论** 体外实验中亚致死剂量 PEFs 对 HeLa 细胞的增殖无显著影响,但能够对 HeLa 细胞的侵袭和转移能力产生不同程度的抑制作用。提示不可逆性电穿孔在体外即使不能一次性彻底消融 HeLa 细胞,短期内也不会促进残留细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 亚致死剂量;脉冲电场;生物学行为

[中图法分类号] R454.15; R730.23; R737.33 [文献标志码] A

Effect of sublethal dosage of pulse electric fields on malignant biological behavior of HeLa cells

Zhou Wei[1], Xiong Zheng'ai[1], Liu Ying[2], Zhang Qin[1], Li Chengxiang[3], Yao Chenguo[3] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]State Key Laboratory of Power Transmission Equipment and System Security and New Technology, Chongqing University, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the malignant biological behavior of HeLa cells treated with sublethal dosage of pulse electric fields (PEFs), and to explore the possibilities of the proliferation, metastasis and invasion of residual malignant cells promoted by irreversible electroporation ablation. **Methods** HeLa cells were treated with sublethal dosage of PEFs (500, 750 and 1 000 V/cm, respectively), and normal HeLa cells were used as control. The viability of HeLa cells was detected by cell counting kit-8 (CCK8). Matrigel adhesion experiment, Transwell chamber and scratch wound assay were used to detect the adhesive ability, invasion and migration of HeLa cells after treated with the sublethal dosages of PEFs, respectively. **Results** The proliferation of HeLa cells was the same as that of the control cells at 12, 24, 48 and 72 h after ablation by varied sublethal dosages of PEFs. With sublethal dosage of PEFs (500, 750 and 1 000 V/cm), the rates of inhibition on HeLa cell adhesion were 9.38%, 30.21% and 42.70%, respectively. From the control group to the three experimental groups, the numbers of HeLa cells invaded through the matrigel were 104.17±4.59, 101.82±5.76, 78.39±6.18 and 67.91±5.94, respectively, and the wound healing rates were (53.46±8.07)%, (48.75±9.13)%, (36.49±7.36)% and (30.58±5.91)%, respectively. The number of HeLa cells invaded through the matrigel in the 750 V/cm group and 1 000 V/cm group was significantly less than that in the

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(50637020),重庆市卫生局医学科研计划项目(2011-2-155)

[通信作者] 熊正爱,电话:(023)63693503,E-mail: xiongzhengai@126.com

control group ($P<0.05$), and the wound healing rate of the control group was significantly greater than those of the 750 V/cm group and 1 000 V/cm group. The sublethal dosage of PEFs could inhibit the adhesion, invasion and migration of HeLa cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** Sublethal dosage of PEFs does not affect HeLa cell proliferation, but can inhibit HeLa cell invasion and metastasis *in vitro*. It suggests that even though irreversible electroporation can not completely ablate HeLa cells in one time *in vitro*, it does not promote the malignant biological behavior of residual HeLa cells in a short term.

[**Key words**] sublethal dosage; pulse electric fields; biological behavior

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (50637020) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-2-155). Corresponding author: Xiong Zhengai, Tel: 86-23-63693503, E-mail: Xiongzhengai@126.com

利用脉宽100 μs,场强kV/cm级别的脉冲电场作用于活体组织或细胞,能够造成细胞脂质双分子膜上不可恢复的微孔形成,进而导致组织细胞死亡,这一现象被称为不可逆性电穿孔(irreversible electroporation, IRE)。IRE作用于恶性肿瘤细胞,可以直接引起肿瘤细胞肿胀破裂,还能通过诱导凋亡、自噬等细胞程序性死亡,达到杀灭肿瘤细胞、治疗肿瘤的目的[1]。由于电场的分布能够事先根据组织的电导率进行仿真计算,IRE的可控性较一般的热消融技术更为精确。国内外研究者进行的大量离体和在体实验均展示出IRE技术在人体恶性肿瘤的治疗中具有良好的应用前景[2-4]。

利用物理方法治疗恶性肿瘤时,值得担忧的问题之一就是治疗本身可能会促进残留肿瘤细胞生长、浸润以及转移。因为大多数肿瘤细胞具有很强的侵袭性,在IRE治疗中尚无确切的方法判定治疗范围是否完全覆盖病变区域,难免会有病变残留并且需要进一步治疗。但是这些由于脉冲电场有效剂量不足而得以继续存活的肿瘤细胞,是否会因为其恶性生物学行为改变加速肿瘤的生长、侵袭、转移,对预后产生不良影响,目前还不清楚。本实验以人宫颈癌HeLa细胞为对象,利用亚致死剂量的脉冲电场作用于HeLa细胞,研究对比作用前后细胞增殖、黏附、侵袭、迁移能力的改变,初步探讨体外实验中IRE治疗后残留的恶性细胞是否会对预后产生不良影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人宫颈癌HeLa细胞株由重庆医科大学超声工程研究所提供。HeLa细胞培养于含有10%新生小牛血清(杭州四季青公司)的RPMI1640(Hyclone,USA)培养瓶中,细胞贴壁生长,当细胞达到指数生长期时进行传代培养。选取指数生长期细胞用0.25%胰蛋白酶(Gibco,USA)消化,PBS(Gibco,USA)重悬制成浓度为2×10^6/ml的细胞悬液备用。

1.2 仪器设备和试剂

脉冲电场肿瘤治疗系统作为脉冲输出装备,电击小室(Bio-Rad, USA)作为处理容器,示波器(Tektronix TDS3032B USA)检测脉冲波形[5]。

CCK8细胞活性检测试剂盒为日本同仁化学研究所(Dojindo)产品,基质胶(Matrigel)为美国Sigma公司产品,Transwell小室、6孔板和96孔板为美国Coring公司产品,ELX800通用酶标仪为美国Biotek公司产品。

1.3 脉冲电场作用

根据前期的实验结果[5],在固定脉宽100 μs、频率1 Hz、脉冲数8个等参数的前提下,不同场强的电脉冲作用于HeLa细胞后,750 V/cm是细胞发生可逆性电穿孔的阈值场强,当场强升高至1 250 V/cm时,脉冲电场开始对HeLa细胞产生明显的杀伤效应,因此本实验选取场强500、750、1 000 V/cm作为亚致死剂量的脉冲电场参数,未经电场作用的细胞悬液为对照组。

1.4 CCK8检测细胞增殖

取脉冲电场处理后的HeLa细胞以2×10^4/ml的密度接种在96孔板,每孔100 μl。培养12、24、48、72 h后分别向各孔内加入10 μl的CCK8,培养箱内继续孵育2 h,酶标仪测定各孔在450 nm波长的吸光度值[$D(450)$],调零孔仅加入培养液+PBS,未经电场作用的HeLa细胞为对照组。分别比较不同时间点各组细胞CCK8检测的$D(450)$值。

1.5 基质胶黏附实验

实验分组同前,在事前用基质胶铺设预处理的96孔板里加入HeLa细胞悬液培养2 h,PBS冲洗孔板,去处尚未黏附的细胞;通过细胞活性检测间接反映各组黏附的细胞数量,利用公式计算HeLa细胞黏附抑制率[6]。

1.6 Transwell小室侵袭实验

Transwell小室的侵袭实验能够通过体外实验的方法模拟细胞的体内侵袭行为。Transwell上室中的细胞穿越基质胶至滤膜下表面的数量反映了该细胞侵袭能力的大小。用50 mg/L人工基底膜凝胶(Matrigel)包被滤膜(孔径8 μm),处理好的滤膜置于Transwell上下小室之间。无血清RPMI1640重悬细胞,调整为2×10^5/ml的细胞悬液。下室加入含10%小牛血清培养基,各组分别取100 μl细胞悬液加入上室,培养24 h。用棉签去处基质胶和上室内的细胞,固定、染色,光镜下观察计数,利用公式计算HeLa细胞侵袭抑制率[6]。

1.7 细胞迁移实验

各组HeLa细胞取3×10^4个接种于6孔培养板,每组细胞设4个复孔,待长到单层60%~70%铺满后用无菌20 μl枪尖在单层细胞划痕,然后用PBS将脱壁的细胞洗掉,放入培养箱

继续培养24 h,显微镜下观察划痕的修复情况,测定划痕的宽度计算划痕修复率。划痕修复率=[(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度]×100%。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件处理,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。

2 结果

2.1 HeLa细胞增殖检测

不同场强的亚致死剂量脉冲电场作用后12、24、48、72 h,1 000 V/cm组的$D(450)$值在各个时间点均低于其他各组,但是经统计学分析,各组HeLa细胞生长同对照组细胞相比,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 脉冲电场作用后不同时间HeLa细胞增殖能力的变化[$D(450)$,$n=4$]

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.297±0.028	0.308±0.033	0.546±0.064	0.824±0.058
500 V/cm组	0.313±0.043	0.303±0.057	0.601±0.059	0.847±0.063
750 V/cm组	0.305±0.019	0.289±0.026	0.575±0.048	0.863±0.052
1 000 V/cm组	0.261±0.064	0.254±0.019	0.519±0.039	0.799±0.053

2.2 HeLa细胞基质胶黏附试验

Hela细胞经不同强度脉冲电场作用后,对基质胶的黏附能力均不同程度降低,其中750、1 000 V/cm组与对照组以及500 V/cm组之间的差异具有统计学意义($P<0.05$);750 V/cm和1 000 V/cm两组之间差异也有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 脉冲电场对HeLa细胞黏附能力的影响($n=4$)

组别	黏附细胞光密度值[$D(450)$]	黏附抑制率(%)
对照组	0.288±0.018	0
500 V/cm组	0.261±0.027	9.38%
750 V/cm组	0.201±0.015[a]	30.21%
1 000 V/cm组	0.165±0.016[ab]	42.70%

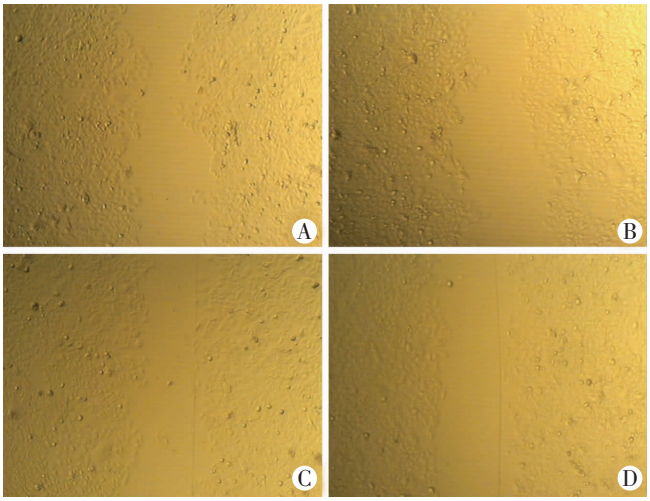
a:$P<0.05$,与对照组及500 V/cm组比较;b:$P<0.05$,与750 V/cm组比较

2.3 HeLa细胞体外侵袭实验

对照组侵袭穿过人工基底膜的细胞为(104.17±4.59)个,500、750、1 000 V/cm组分别为(101.82±5.76)、(78.39±6.18)、(67.91±5.94)个。场强达到750 V/cm时同对照组之间差异有统计学意义($P<0.05$),场强为1 000 V/cm时侵袭的细胞数进一步减少,但是和750 V/cm组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 HeLa细胞体外迁移实验

由对照组、500 V/cm组、750 V/cm组到1 000 V/cm组,HeLa细胞划痕修复率依次下降(图1),分别为(53.46±8.07)%、(48.75±9.13)%、(36.49±7.36)%、(30.58±5.91)%。统计学分析显示,750 V/cm组、1 000 V/cm组同对照组和500 V/cm组之间差异有统计学意义($P<0.05$),而750 V/cm组和1 000 V/cm组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。



A:对照组;B:500 V/cm组;C:700 V/cm组;D:1 000 V/cm组

图1 各组单层HeLa细胞划痕实验 (倒置显微镜 ×100)

3 讨论

脉冲电场IRE消融技术是近年来发展起来,有望用于人体恶性实体瘤治疗的一项新兴物理治疗手段。本课题组前期的实验证实,利用脉冲电场在体外细胞实验和动物的在体移植瘤中均能造成肿瘤细胞的不可逆性电穿孔,导致肿瘤细胞坏死或凋亡,瘤体被破坏[7-8],并且总结出IRE技术在肿瘤治疗中具有独特的优点:①通过调节电极针布阵和电场参数,使治疗范围可控,②治疗时间短,多在几分钟之内,③不依赖热效应,疗效不受血流的影响等,展现出令人振奋的应用前景。Rubinsky[9]用IRE消融技术进行了人体前列腺癌治疗的临床试验,Pech等[10]则将其应用于肾癌的人体试验性治疗,在短期内都取得了较好的效果,而且发现IRE消融对病灶区域和周边的血管、神经、结缔组织支架结构具有很好的保护作用。宫颈癌是女性生殖系统发病率最高的恶性肿瘤,目前每年很大一部分新发病例都出现在中国[11]。宫颈癌筛查技术的进步使很多患者在早期的"局灶性"病变时就能够得到确诊,而宫颈的特有解剖位置能够将病灶通过简单的器械充分暴露,这就为IRE消融技术在未来宫颈癌的治疗应用提供了必要的基础条件。

IRE作为一种物理消融方法,在应用于恶性肿瘤治疗时,残留肿瘤组织是我们不得不考虑的一个重要问题。以目前较为成熟的肿瘤物理治疗方法——RFA(radio frequency ablation)为例,有学者发现在肝癌的动物实验和临床治疗中,RFA有促进肝癌复发及残留癌细胞增殖的风险[12-13]。虽然目前研究证实了IRE对人体前列腺癌、肾癌确切的治疗效果,但是还缺乏对肿瘤复发、转移的长期随访观察。特别是在目前宫颈

癌的治疗中,现有的物理治疗方法(电刀、激光等)仅限于治疗宫颈上皮内瘤样病变或原位癌[14],而在浸润癌病变中均属于禁忌,其原因就是担心造成残留癌细胞的增殖、侵袭。那么IRE消融宫颈癌时,随着电场衰减,位于有效治疗范围以外受到亚致死剂量脉冲电场作用的残留的肿瘤细胞,它们的生物学行为会出现何种变化?是否也会出现类似RFA后促进残留癌组织增殖的情况?本研究就以人宫颈癌细胞株HeLa为对象,初步对此进行探讨。

首先,我们研究了不同场强脉冲电场作用于HeLa细胞后细胞增殖能力的改变,结果发现在各观察时间点实验组HeLa细胞的增殖情况同对照组均无显著差别,而且在场强达到1 000 V/cm时活细胞数量比未经电场作用的对照组还有一定程度下降。结合前期实验结果分析,场强1 250 V/cm是对HeLa细胞产生抑制效果的阈值剂量,由此可以推断在亚致死剂量脉冲电场作用范围内HeLa细胞受到的抑制效应随场强衰减而逐步减弱,但不会出现细胞增殖能力加强的现象。

侵袭和转移是肿瘤细胞恶性生物学行为重要的特征,也是导致恶性肿瘤难以治愈而易于复发的主要原因之一。恶性肿瘤细胞的侵袭过程首先要借助黏附分子附着于细胞外基质(extracellular matrixc, ECM),然后通过分泌包括基质金属蛋白酶在内的蛋白水解酶破坏ECM的完整性,最后依赖肿瘤细胞的迁移能力突破基底膜,形成局部侵袭。如果肿瘤细胞侵入脉管或体腔,直接种植,或被血液、淋巴液带到其他器官或部位继续生长则会形成转移瘤病灶。Matrigel主要含有层粘连蛋白和Ⅳ型胶原,能够体外模拟ECM,因此用Matrigel包被的滤膜穿透实验就能在一定程度上反应肿瘤细胞侵袭能力。在本实验中,分别利用基质胶黏附实验、Transwell小室侵袭实验和划痕修复实验探讨不同强度的亚致死剂量脉冲电场作用后HeLa细胞发生周边侵袭以及转移的能力变化,了解IRE消融后是否会促进残留癌细胞的扩散和转移。结果显示,HeLa细胞黏附能力、体外侵袭能力以及细胞迁移能力均随着脉冲电场场强剂量的增高受到不同程度的抑制,并且相对高剂量的750 V/cm组和1 000 V/cm组,其侵袭和转移的相关指标下降和对照组比较都有显著差异。由此推断,至少在体外细胞实验中,IRE即使不能一次完全消融肿瘤细胞,残留的细胞在亚致死剂量脉冲电场作用下侵袭转移能力不但不会增加,相反还会受到一定程度抑制。

总之,本研究初步证实了亚致死剂量脉冲电场在体外不会增强宫颈癌HeLa细胞的增殖、侵袭和转移能力,而且对其侵袭、转移有一定的抑制作用。提示在利用IRE消融宫颈癌病灶时,残留病灶潜在的转移扩散可能会被暂时抑制,为再次消融或后续的治疗提供了机会。当然,在体的肿瘤组织生物学行为和体外实验所用的细胞株还存在很大差异,仅凭单一的体外细胞实验并不能得出IRE不会促进残留肿瘤复发转移的结论,后续的工作中还需要在多种肿瘤动物模型基础上做更进一步的研究和印证,并对其机制进行系统的探讨。

参考文献:

[1] Lee E W, Chen C, Prieto V E, *et al*. Advanced hepatic ablation technique for creating complete cell death: irreversible electroporation[J]. Radiology, 2010, 255(2): 426-433.

[2] Charpentier K P, Wolf F, Noble L, *et al*. Irreversible electroporation of the pancreas in swine: a pilot study[J]. HPB (Oxford), 2010, 12(5): 348-351.

[3] Deodhar A, Monette S, Single G W Jr, *et al*. Renal tissue ablation with irreversible electroporation: preliminary results in a porcine model[J]. Urology, 2011, 77(3): 754-760.

[4] Rubinsky J, Onik G, Mikus P, *et al*. Optimal parameters for the destruction of prostate cancer using irreversible electroporation[J]. J Urol, 2008, 180(6): 2668-2674.

[5] 周玮, 熊正爱, 刘颖, 等. 不可逆性电穿孔致Hela细胞凋亡与坏死的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(18): 1941-1944.

[6] 张琴. 脉冲电场对人宫颈癌Hela细胞侵袭转移能力影响的体外实验研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2011.

[7] 杨晓燕,熊正爱,李成祥,等.陡脉冲不可逆性电击穿治疗兔肝脏肿瘤研究[J].西南大学学报:自然科学版, 2009, 31(4): 120-125.

[8] 刘颖, 周玮, 熊正爱, 等. 不可逆性电穿孔致山羊肝脏组织凋亡与坏死的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(4): 356-360.

[9] Rubinsky B. Irreversible Electroporation [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010: 235-247.

[10] Pech M, Janitzky A, Wendler J J, *et al*. Irreversible electroporation of renal cell carcinoma: a first-in-man phase I clinical study[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2011, 34(1): 132-138.

[11] 章文华. 子宫颈癌防治展望[J]. 癌症进展, 2010, 8(2): 105-108.

[12] von-Breitenbuch P, Kohl G, Guba M, *et al*. Thermoablation of colorectal liver metastases promotes proliferation of residual intrahepatic neoplastic cells[J]. Surgery, 2005, 138(5): 882-887.

[13] Ruzzenente A, Manzoni G D, Molfetta M, *et al*. Rapid progression of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8): 1137-1140.

[14] 李楠, 章文华. 重视子宫颈癌前病变的规范化诊治[J]. 中华全科医师杂志, 2009, 8(8): 525-528.

(**收稿**:2012-02-08;**修回**:2012-04-06)

(编辑 汪勤俭)