论著

文章编号:1000-5404(2014)23-2372-05

皮秒脉冲电场治疗宫颈癌动物模型的体内效应研究

秦 琴[1], 熊正爱[1], 贾 佳[1],姚成果[2],赵晓震[2], 王智亮[1] (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** 探讨皮秒脉冲电场(picosecond pulse electric field,psPEF)治疗裸鼠宫颈癌动物模型的体内效应及机制。**方法** 将36只裸鼠宫颈癌动物模型编号后随机抽取24只分为对照组、脉冲治疗后6 h组、脉冲治疗后12 h组、脉冲治疗后24 h组,每组6只。治疗组给予固定脉冲参数(脉冲个数2 000个,脉宽800 ps,电压70 kV,频率3 Hz)的脉冲电场处理,对照组不予脉冲电场处理。取肿瘤组织,采用HE染色、透射电镜观察肿瘤组织形态学变化。TUNEL试剂盒检测肿瘤组织凋亡程度。JC-1染色激光共聚焦显微镜下检测肿瘤组织线粒体跨膜电位。应用蛋白活性测定试剂盒检测Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12蛋白活性。其余12只动物模型随机抽取分为治疗组和对照组,脉冲电场处理后每隔3 d测量肿瘤体积,计算相对肿瘤增殖率T/C(%)。**结果** 治疗后肿瘤组织发生不同程度的坏死,以治疗后24 h最重,电镜下可见凋亡小体,以治疗后12 h组多见。各治疗组肿瘤组织凋亡率均高于对照组($P<0.01$),12 h组凋亡率明显高于其余两个治疗组和对照组($P<0.01$)。脉冲治疗后随时间的延长线粒体膜电位逐渐降低。Caspase-3、Caspase-12蛋白活性检测结果均显示12 h组明显高于其他治疗组和对照组($P<0.01$)。Caspase-8、Caspase-9蛋白活性各组之间无明显差异。治疗后3、6、9 d两组肿瘤体积有统计学差异,处理组相对肿瘤增殖率分别为76.87%、71%、68.87%。**结论** psPEF可以作用于宫颈癌动物模型的肿瘤部位,导致肿瘤组织发生坏死及凋亡,早期对肿瘤的生长有一定的抑制作用。

[关键词] 皮秒脉冲电场;宫颈癌;动物模型;坏死;凋亡

[中图法分类号] R-332; R454.1; R737.33 [文献标志码] A

In vivo effects of picosecond pulse electric field on nude rat model of cervical cancer

Qin Qin[1], Xiong Zheng'ai[1], Jia Jia[1], Yao Chengguo[2], Zhao Xiaozhen[2], Wang Zhiliang[1] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]State Key Laboratory of Power Transmission Equipment & System Security and New Technology, Chongqing University, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the damaging effect of picosecond pulse electric field (psPEF) on the nude mice model of cervical cancer and investigate the underlying possible mechanism. **Methods** Nude rat xenograft model of cervical cancer was established by implanting HeLa cells in the back of the animals. Among the 36 rats with tumor mass over 1 cm in size, 24 were randomly chosen and then divided into control group, and groups in 6, 12 and 24 h after treatment. Treatment group were treated under a psPEF of pulse number 2 000, pulse width 800 ps, voltage 70 kV, and frequency 3 Hz, and control group received no such treatment. After the tumor mass were harvested at the corresponding time points, tumor morphology was observed by using HE staining and transmission electron microscopy (TEM), cell apoptosis was determined by TUNEL. Mitochondrial transmembrane potential was assessed by Jc-1 staining on laser scanning confocal microscopy (LSCM). The activity of caspase-3, 8, 9 and 12 were detected by activity assay kit. Another 12 animal model were randomly divided into the treatment group and control group, the tumor volume we measured every 3 days after psPEF treatment and the relative tumor proliferation rate was calculated. **Results** Tumor tissue occurred necrosis at different degrees after treatment, and the tissue from 24 h after treatment was heaviest. Electron microscopy showed apoptotic bodies in the tumor cells, most commonly in the cells from 12 h after treatment. The apoptotic rate was significantly higher in all the treatment groups than the control group, and the 12 h group was significantly greater than the other groups ($P<0.01$). Mitochondrial membrane potential was decreased with the extension of treatment time. The activities of proteins caspase-3 and -12 was

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172123)

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

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140930.1158.014.html (2014-09-30)

significantly higher in the 12 h group than the other groups, and those of caspase-8 and -9 had no significant difference among the treatment groups and control group. There were significant differences in tumor volume between the control group and the groups in 3, 6 and 9 d after psPEF treatment, and the relative tumor growth rate was 76.87%, 71.00%, and 68.87% respectively for the above 3 time points. **Conclusion** PsPEF can be used on cervical cancer xenograft model, and leads to necrosis and cell apoptosis in tumor tissue, showing inhibitory effect on tumor early growth.

[**Key words**] picosecond pulse electric field; cervical cancer; animal model; apoptosis; necrosis

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81172123). Corresponding author: Xiong Zheng'ai, Tel: 86-23-63693503, E-mail: Xiongzhengai@126.com

脉冲电场(pulsed electric fields,PEF)对肿瘤细胞的生物学效应近几年已成为治疗肿瘤的热点之一[1-3]。国内外研究者已对毫秒、微秒、纳秒脉冲电场做了大量研究,证实了其治疗肿瘤的有效性,并相继开展了临床实验,应用于皮肤癌、肝癌等[4-6]。而毫秒、微妙、纳秒脉冲电场都需借助于有创或微创的电极针到达肿瘤部位,从而在一定程度上限制了其临床应用。寻求一种无创手段将脉冲电场引致体内肿瘤部位成为解决问题的关键所在。

皮秒脉冲电场(picosecond pulse electric field,psPEF)具有高时间分辨率、高空间分辨率、在传播过程中保持输入脉冲的冲击特性、在靶点区域具有很高的分辨率[7],可以通过匹配超宽带冲击脉冲辐射天线聚焦于特定的组织,这些特点使得psPEF实现无创治疗肿瘤成为可能[8]。本课题组前期体外细胞实验已证实了皮秒脉冲电场对宫颈癌细胞的诱导凋亡作用[9-10]。本研究以宫颈癌动物模型作为研究对象,以前期细胞实验为基础,初步探讨皮秒脉冲电场治疗裸鼠宫颈癌模型的机制,为皮秒脉冲电场临床治疗宫颈癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人宫颈癌HeLa细胞株由重庆医科大学超声工程研究所提供,36只4~6周龄的BALB/c雌性裸小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,RPMI1640培养基(Gibco USA),胎牛血清(Gibco USA),TUNEL检测试剂盒(瑞士Roche公司),组织线粒体分离试剂盒、线粒体跨膜电位检测试剂盒(jc-1)(碧云天公司),Caspase-3活性检测试剂盒、Caspase-8活性检测试剂盒、Caspase-9活性检测试剂盒(碧云天公司),Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司),Caspase-12活性检测试剂盒(杰美基因公司)。

1.2 细胞培养

HeLa细胞培养于含有10%新生小牛血清的RPMI1640培养基中,37 ℃、5% CO_2培养箱内生长,待细胞铺满达80%~90%时消化离心,无血清培养基重悬,调整细胞浓度为2×10^7/mL备用。

1.3 动物模型

裸鼠(雌性)饲养于无特殊病原菌动物房,4~6周龄。0.2 mL上述细胞悬液注射于裸鼠背部皮下,待肿瘤最大直径达0.5~0.8 cm,取裸鼠肿瘤组织做移植瘤模型,约2周皮下移植瘤最大直径达1 cm左右,将36只裸鼠移植瘤模型编号后随机抽取24只随机将裸鼠移植瘤模型分为4组:对照组、治疗后6 h组、治疗后12 h组、治疗后24 h组,每组6只。治疗组给予脉冲处理。

1.4 脉冲处理

本课题组前期预实验结果显示当固定参数为脉宽800 ps、频率3 Hz、电压70 kV、脉冲个数2 000个时,脉冲的抑瘤效应最明显,后续实验以此参数进行处理。将裸鼠麻醉后(10%水合氯醛),使裸鼠皮下移植瘤置于两电极之间,按上述参数进行脉冲处理。对照组不给予脉冲处理。分别于脉冲处理后6、12、24 h取处理组及对照组肿瘤组织做后续实验。

1.5 肿瘤组织细胞形态学检测

分别用HE染色和透射电镜观察肿瘤形态学变化。取肿瘤组织固定于10%甲醛溶液中,石蜡包埋切片,常规HE染色,光镜下查看组织形态。将肿瘤组织固定于4%戊二醛溶液中,将标本交电镜室进行后续固定、脱水、包埋、修块、超薄切片及铅-铀双重染色,透射电镜下观察对照组及各处理组细胞的超微结构。

1.6 TUNEL检测肿瘤组织凋亡程度

肿瘤组织固定于10%甲醛溶液中,常规石蜡包埋切片,脱蜡水化后依照TUNEL试剂盒说明书进行后续处理。蛋白酶K通透细胞,新鲜配制的TUNEL标记缓冲液中标记,链菌素辣根过氧化物酶溶液中进行酶标反应,3,3-二氨基苯联胺(DAB)显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜检查并拍照,阳性细胞呈棕黄色。

1.7 诱导凋亡可能机制的检测

1.7.1 激光共聚焦显微镜下检测肿瘤组织线粒体跨膜电位

取肿瘤组织于冰上匀浆后加入线粒体分离试剂A,600×g、4 ℃离心5 min。取上清液11 000×g,4 ℃离心10 min,沉淀即为线粒体。经线粒体膜电位特异性探针JC-1染色5~10 min,处理后的样品置于激光共聚焦显微镜下检测线粒体跨膜电位变化:绿色荧光表明线粒体膜电位下降,该细胞很可能处于细胞凋亡早期;红色荧光表明线粒体膜电位比较正常,细胞的状态较正常。

1.7.2 Caspase凋亡相关蛋白活性检测

取肿瘤组织于冰上匀浆裂解,4 ℃、16 000×g离心10~15 min后收集上清液。少量样品用于Bradford蛋白浓度测定,其余样品按照试剂盒说明书进行蛋白活性检测。根据样品中的蛋白浓度,分别计算出每个样品单位重量蛋白中所含的Caspase-3,Caspase-8,Caspase-9、Caspase-12的酶活力单位。

1.8 相对肿瘤增殖率T/C(%)的测定

其余12只裸鼠移植瘤模型随机抽取分为对照组和处理

组,每组各6只。脉冲电场治疗后每隔3 d分别测量治疗组和对照组的肿瘤体积。即用游标卡尺测量肿瘤的长径和宽径,V(肿瘤体积)=1/2 长×宽^2。据肿瘤体积计算相对肿瘤体积(relative tumor volume,RTV),RTV = Vt / V0,其中V0为治疗前测量所得肿瘤体积,Vt为每次测量时的肿瘤体积。相对肿瘤增殖率(T/C) = TRTV / CRTV × 100%。(TRTV:治疗组RTV;CRTV:对照组RTV)。

1.9 统计学分析

计量资料用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件处理,进行重复测量方差分析和独立样本t检验。

2 结果

2.1 psPEF导致宫颈癌动物模型肿瘤组织发生坏死

HE染色显示皮秒脉冲电场治疗后,各治疗组肿瘤组织均发生不同程度坏死,出现均质红染无结构物质,核染色质消失,并随治疗后时间的延长,肿瘤组织坏死区域增加,治疗后24 h组呈大片状坏死,坏死程度最重(图1)。而电镜观察超微结构显示各处理组均有轻度的线粒体肿胀。其中6 h组坏死较轻,胞膜及核膜较完整,细胞轮廓尚在。12 h组坏死加重并出现较多的凋亡小体。24 h组出现严重坏死,胞膜和核膜崩解,核染色质呈无规律状(图2)。

2.2 psPEF可诱导肿瘤模型发生凋亡

治疗后12 h组出现较多呈棕黄色的凋亡细胞,而治疗后6 h组和24 h组较12 h组少,对照组偶见凋亡细胞(图3)。对照组、6、12 h和24 h组凋亡率分别为(16.33 ± 5.03)%、(53.33 ± 7.57)%、(77.33 ± 6.66)%、(54.33 ± 3.05)%。各处理组凋亡率均高于对照组($P<0.01$),12 h组凋亡率明显高于其余两个处理组($P<0.01$)。

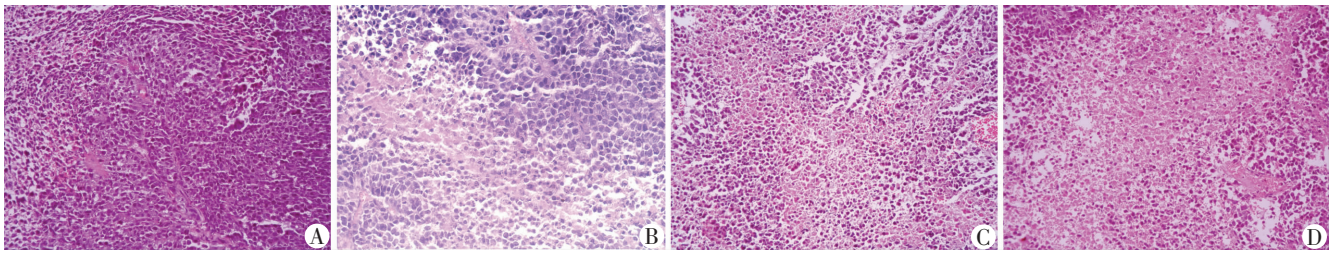
2.3 凋亡相关机制

2.3.1 脉冲治疗后线粒体跨膜电位随时间的延长逐渐降低

从对照组到处理后6、12 h组,红色荧光逐渐降低,绿色荧光逐渐增强。而处理后24 h组与其余两个处理组相比,两种荧光均有所减弱(图4)。

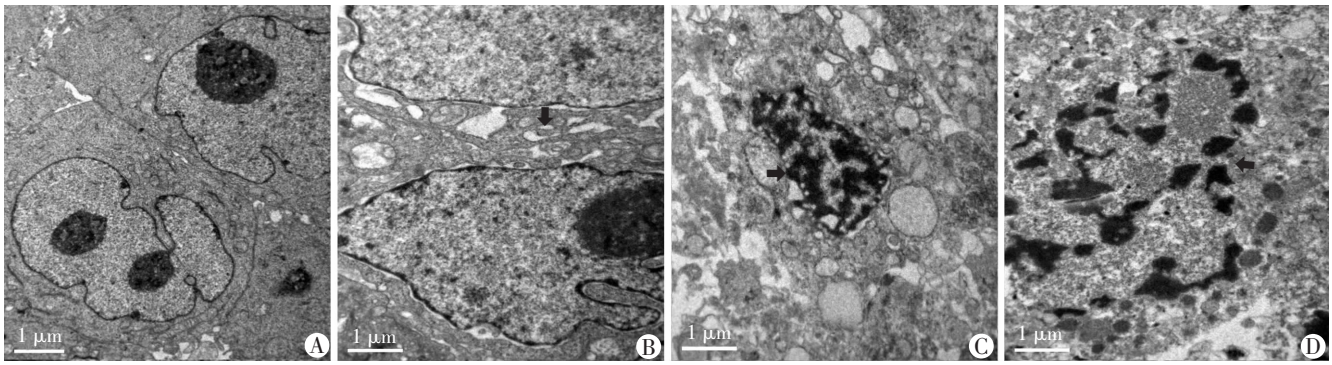
2.3.2 内质网凋亡途径相关的Caspase-12、Caspase-3蛋白活性升高

Caspase-3蛋白活性治疗后12 h组(19.40 ± 1.86)与未处理组(13.29 ± 1.55)和6 h组(14.22 ± 1.63)相比显著升高($P<0.01$),并高于24 h组(16.01 ± 2.47)($P<0.05$)。Caspase-12蛋白活性12 h组(20.60 ± 3.48)与对照组(10.75 ± 1.93)、6 h组(11.47 ± 1.40)、24 h组(14.89 ± 1.73)相比显著升高($P<0.01$)。Caspase-8、Caspase-9蛋白活性各组之间无明显差异。



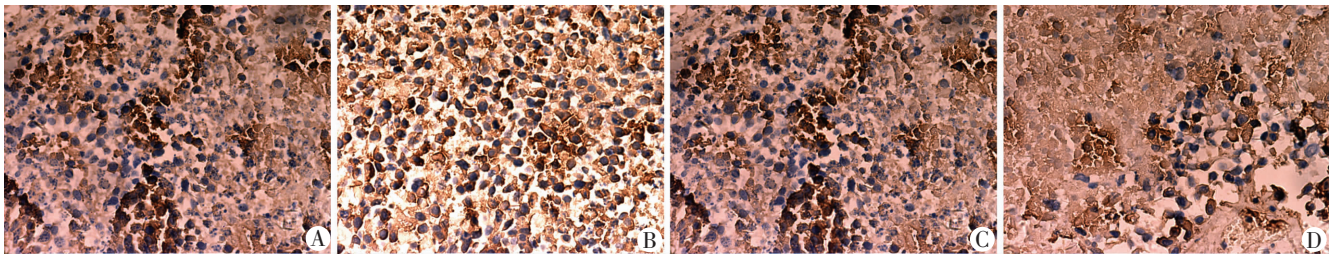
A:对照组;B:处理后6 h组;C:处理后12 h组;D:处理后24 h组

图1 光镜观察宫颈癌动物模型肿瘤细胞的坏死程度 (HE ×200)



A:对照组;B:处理后6 h组 ↑:示内质网扩张;C:处理后12 h组 ↑:示凋亡细胞;D:处理后24 h组 ↑:示坏死细胞

图2 透射电子显微镜观察宫颈癌动物模型肿瘤细胞的超微结构变化



A:对照组;B:处理后6 h组;C:处理后12 h组;D:处理后24 h组

图3 TUNEL法观察各组肿瘤细胞凋亡 (苏木精 ×400)

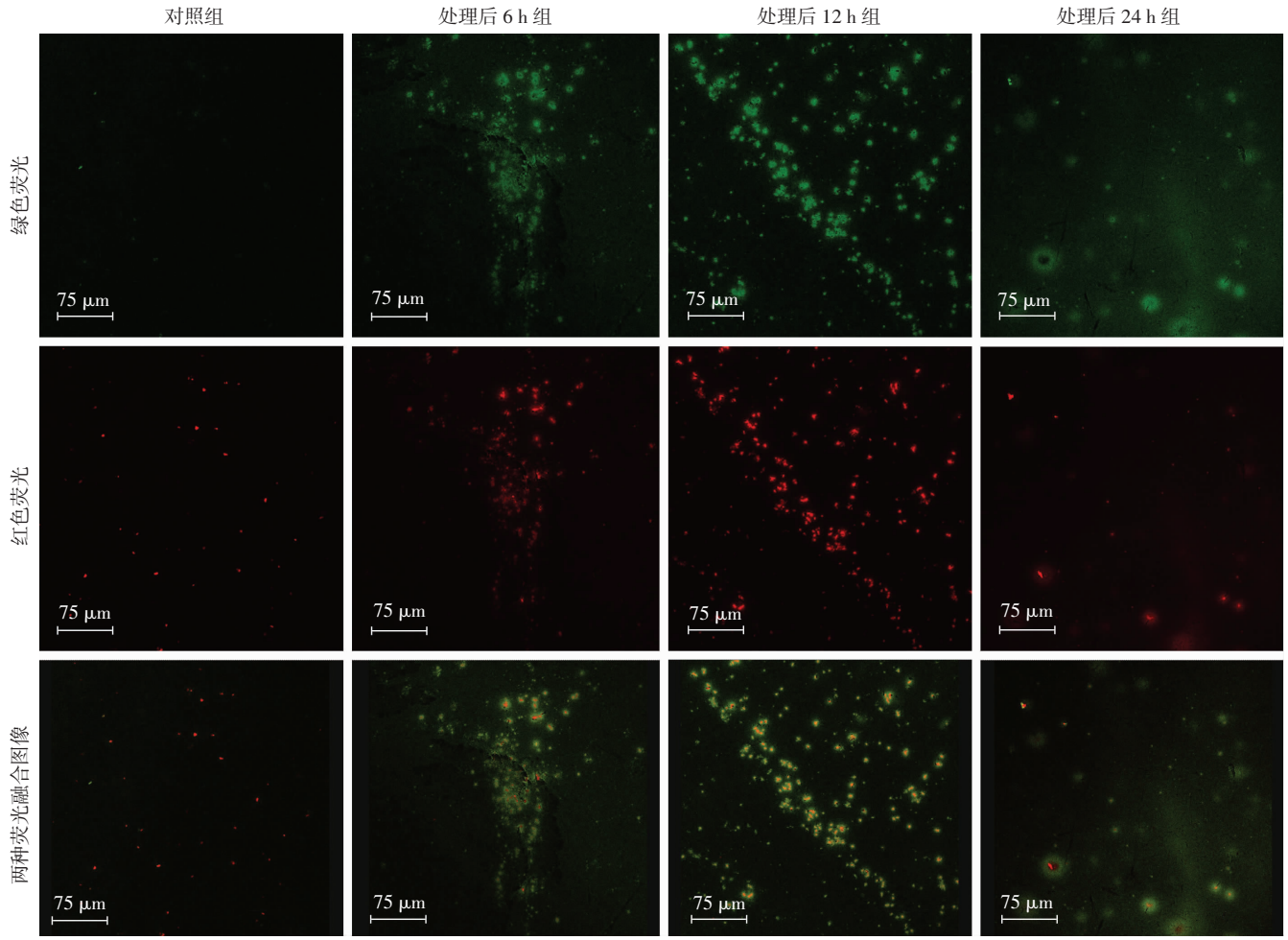


图 4　jc－1 染色观察宫颈癌动物模型肿瘤细胞线粒体膜电位的变化　（激光共聚焦显微镜）

2.4　psPEF 治疗后早期对肿瘤的生长有一定的抑制作用

psPEF 治疗后 3、6、9 d 治疗组和对照组肿瘤体积相比较有统计学差异，12 d 及以后差异无统计学意义（图 5）。治疗后 3、6、9 d 相对肿瘤增殖率分别为（76.87 ± 3.39）%、（71 ± 4.96）%、（68.87 ± 5.12）%，相比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

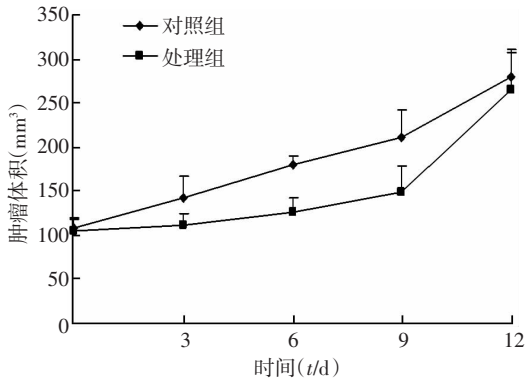


图 5　psPEF 治疗后对动物模型肿瘤体积的影响

3　讨论

宫颈癌是女性生殖道系统最常见的恶性肿瘤之一，近年来其发病呈年轻态趋势[9]，年轻患者则更注重于生育能力得以保留。现有的治疗方式已经比较成熟，然而都不同程度地影响了患者的生育能力。因此，保留患者生育能力、安全、有效及非侵入式治疗宫颈癌是目前医务工作者研究的当务之急。

脉冲电场作为一种新兴物理治疗方法应运而生，国内外研究者已对毫秒级、微秒级、纳秒级脉冲电场做了大量研究，并取得了较大进展，然而他们的有创性限制了其在临床上的应用。因此，我们的研究转向更低级脉宽电场。不同的脉冲电场参数可对细胞的结构功能和信号转导引发不同的效应[10－11]。从理论上讲，皮秒级脉冲电场作用靶点为内质网，线粒体等细胞器膜，而对细胞膜的影响不大。细胞内的线粒体和内质网等细胞器与细胞凋亡的发生密切相关，那我们可以推测皮秒脉冲电场可靶向作用于肿瘤细胞，导致肿瘤细胞内质网、线粒体等细胞器的结构及功能发生改变而诱导肿瘤细胞发生凋亡，从而产生杀灭肿瘤效应。细胞凋亡主要有线粒体途径，死亡受体途径和内质网应激途径。死亡受体途径主要由死亡受体和配体结合活化 Caspase-8 或 Caspase-10，线粒体途径活化 Caspase-9，

内质网应激途径活化 Caspase-12。3 条通路最终合并为同一途径：激活 caspase-3，进而诱导细胞凋亡。我们的前期实验结果已经证实：皮秒脉冲电场体外可诱导 HeLa 细胞发生凋亡，其可能的途径为降低线粒体膜电位及内质网应激途径活化 caspases（cysteine-containing aspartate-specific proteases，天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶类）依赖的细胞凋亡途径[12-14]。基于以上理论和实验研究基础，本研究以裸鼠宫颈癌模型作为研究对象，初步探讨皮秒脉冲电场治疗宫颈癌动物模型的在体效应。

本实验结果显示，皮秒脉冲电场可导致裸鼠宫颈癌皮下移植瘤模型发生凝固性坏死，随时间延长，坏死加重，处理后 24 h 组最明显。电镜下观察肿瘤组织细胞形态、TUNEL 法测定凋亡率、激光共聚焦显微镜下检测线粒体跨膜电位、Caspase-3 和 Caspse-12 蛋白活性测定这些结果表明，脉冲处理后 12 h 细胞发生凋亡最明显，而治疗后 24 h 凋亡程度反而下降。因此，我们推断细胞凋亡在 psPEF 处理裸鼠宫颈癌移植瘤后肿瘤细胞死亡中发挥重要作用，肿瘤细胞发生凋亡后死亡，最终被机体清除。Caspase-3 和 Caspse-12 蛋白活性明显升高，激光共聚焦显微镜下线粒体跨膜电位也明显下降，提示 psPEF 诱导宫颈癌动物模型的肿瘤组织细胞发生凋亡的可能机制与线粒体膜电位下降及内质网应激活化 Caspase 依赖的细胞凋亡途径相关。治疗后处理组相对肿瘤增殖率结果提示皮秒脉冲电场在治疗宫颈癌动物模型的早期对肿瘤有一定的抑瘤效应。而按照《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》评价标准，T/C(%) >40% 为无效[15]，提示皮秒脉冲电场对宫颈癌动物模型肿瘤的抑瘤效应还未达到有效治疗。

目前关于皮秒脉冲电场治疗动物肿瘤模型的研究甚少，该课题在这方面得到了突破，验证了皮秒脉冲电场对宫颈癌动物模型具有在体杀伤效应。而其抑瘤效应不明显提示 psPEF 作为单一的物理治疗方法效果还不能令人满意。由于研究的时间有限，理论基础欠缺，该课题我们只对皮秒脉冲电场治疗宫颈癌动物模型进行了初步研究，下一步我们会改进仪器及综合其他治疗方式以期达到较为满意的抑瘤效应，以及对 psPEF 治疗动物模型更具体的作用机制以及分子信号通路进行深入研究。另外作为一种物理治疗方法，其最终目标是应用于临床治疗，因此，安全性方面的研究也必不可少。如果还能匹配超宽带冲击脉冲辐射天线，将脉冲辐射能量无创聚焦于深部组织，那么皮秒脉冲电场临床用于肿瘤无创治疗也就指日可待。

参考文献：

[1] Jose A, Sobrevals L, Ivorra A, *et al*. Irreversible electroporation shows efficacy against pancreatic carcinoma without systemic toxicity in mouse models[J]. Cancer Lett, 2012, 317(1): 16-23.

[2] Shankayi Z, Firoozabadi S M. Tumor growth inhibited by low-voltage amplitude and 5 kHz frequency electrochemotherapy[J]. J Membr Biol, 2011, 244(3): 121-128.

[3] Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer eletrogene therapy with interleukin-12[J]. Curr Gene Ther, 2010, 10(4): 300-311.

[4] Neal R E 2nd, Davalos R V. The feasibility of irreversible electroporation for the treatment of breast cancer and other heterogeneous systems [J]. Ann Biomed Eng, 2009, 37(12): 2615-2625.

[5] Heller L C, Heller R, Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma[J]. Curr Gene Ther, 2010, 10(4): 312-317.

[6] Horton H M, Lalor P A, Rolland A P. IL-2 plasmid electroporation: from preclinical studies to phase I clinical trial[J]. Methods Mol Biol, 2008, 423: 361-372.

[7] 龙再全，姚陈果，李成祥，等. 皮秒电场脉冲在肿瘤无创治疗中的聚焦特性[J]. 生物医学工程学杂志，2010，27(5)：1128-1132.

[8] Schoenbach K H, Hargrave B, Joshi R P, *et al*. Bioelectric effects of intense nanosecond pulses[J]. IEEE Trans Dielectr Electr Insul, 2007, 14(5): 1088-1109.

[9] Hua Y Y, Wang X S, Zhang Y, *et al*. Intense picosecond pulsed electric fields induce apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway in HeLa cells[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(4): 981-987.

[10] Chen W J, Xiong Z A, Zhang M, *et al*. Picosecond pulsed electric fields induce apoptosis in HeLa cells *via* the endoplasmic reticulum stress and caspase-dependent signaling pathways[J]. Int J Oncol, 2013, 42(3): 963-970.

[11] Bray F, Loos A H, McCarron P, *et al*. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(3): 677-686.

[12] Yao C, Mi Y, Li C, *et al*. Study of transmembrane potentials on cellular inner and outer membrane—frequency response model and its filter characteristic simulation[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2008, 55(7): 1792-1799.

[13] Yao C, Mo D, Li C, *et al*. Study of transmembrane potentials of inner and outer membranes induced by pulsed-electric-field model and simulation[J]. IEEE Trans Plasma Sci, 2007, 35(5): 1541-1549.

[14] 陈文娟. 皮秒脉冲电场诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡效应及机制的实验研究[D]. 重庆：重庆医科大学，2013.

[15] 国家食品药品监督管理局. 细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则[J]. 中国新药与临床杂志，2008，27(6)：462-465.

（**收稿**：2014-06-18；**修回**：2014-08-05）

（编辑　吴培红）