综 述

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000832

纳秒脉冲电场治疗黑色素瘤的机制

庞云清，张 莉，王 静
（兰州大学口腔医学院口腔内科，兰州 730000）

【摘 要】恶性黑色素瘤是最具侵袭性的皮肤癌，发病率高且临床治疗困难。研究表明纳秒脉冲电场（nanosecond pulsed electric fields，nsPEFs）可通过抑制肿瘤血供和诱导凋亡而抑制黑色素瘤的生长，并且 nsPEFs 能抑制黑色素瘤的转移并能激活机体对肿瘤的免疫反应。相比传统的手术治疗，nsPEFs 具有高度局限、非热能、几乎无瘢痕和无副作用等优势。近年来对 nsPEFs 治疗黑色素瘤的研究逐渐增多，本文对近年来 nsPEFs 治疗黑色素瘤的有效性、安全性和治疗机制等研究概况进行综述，以期为后续的实验研究和临床应用提供依据。

【关键字】nsPEFs；黑色素瘤；凋亡；免疫反应；转移
【中图分类号】R454.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-10-13

Research progress in the melanomas after nanosecond pulsed electric fields treatment

Pang Yunqing, Zhang Li, Wang Jing
(*Department of Oral Medicine, School of Stomatology, Lanzhou University*)

【Abstract】Malignant melanoma is the most aggressive form of skin cancer and it is difficult to treat. The incidence of melanoma has been continuously increasing. Studies have shown that melanoma growth was inhibited by nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) treatment by inducing apoptosis and suppressing angiogenesis. Furthermore, nsPEFs treatment can stimulate immune response and inhibit tumor metastasis. The advantages of nsPEFs therapy are non-thermal, high-limited, almost no scarring and even no side effect. In recent years, the studies about nsPEFs treatment of melanoma are increasing. Therefore, in order to provide more evidence for subsequent research and clinical application, the efficiency, safety and treatment mechanism of nsPEFs therapy are reviewed here.

【Key words】nsPEFs; melanoma; apoptosis; immune response; metastasis

恶性黑色素瘤是最具侵袭性的皮肤癌，其发生发展由遗传因素和环境因素共同所致[1]。在过去数十年里，黑色素瘤的发病率持续升高，尤其是在白种人群中[2]。世界卫生组织的数据表明，2013 年全球皮肤黑色素瘤的新增人数高达 232130 例[3]，给人类健康带来巨大威胁。手术切除辅以放化疗是黑色素瘤的常规治疗手段，但治疗后遗留瘢痕，且预后较差[4]，严重影响生活质量。另外还有电穿孔疗法，主要是电穿孔导入基因激活机体免疫对抗肿瘤的电基因疗法[5]，电穿孔导入药物的电化学疗法[6]和电穿孔导致细胞坏死的不可逆电穿孔法[7]；以及诱导细胞冷坏死的冷冻疗法和诱导细胞热坏死的射频消融法[8]，但均不是理想成熟的治疗手段。

Beebe 等[9]研究发现将电脉冲缩短至纳秒领域，单独使用即可使肿瘤细胞发生凋亡。2006 年，Nuccitelli 等[10]首次将 nsPEFs 用于治疗 SKH-1 鼠的 B16f10 移植黑色素瘤，单独使用即可显著抑制黑色素瘤生长。nsPEFs 作为新的治疗手段，在各方面均有独特的优势，其对黑色素瘤的治疗，可完全消除肿瘤且无明显瘢痕，还能抑制肿瘤转移并激活机体对肿瘤的免疫反应[11-13]。本文着重对近年来 nsPEFs 治疗黑色素瘤的有效性、安全性和治疗机制等研究概况进行综述，以期能为后续的实验研究和临床应用提供依据。

1 nsPEFs 抑制黑色素瘤生长

体外研究表明 nsPEFs 可降低 B16f10 黑色素瘤细胞的

作者介绍：庞云清，Email：pangyunqing@126.com，研究方向：肿瘤的物理治疗。
通信作者：王 静，Email：lzukqwj@126.com。

基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81372893）；兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目（编号：lzujbky-2014-159）；甘肃省自然科学基金资助项目（编号：1208RJZA193）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.1728.008.html (2016-01-09)

活性[14-15]。动物实验研究采用绿荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)转染的 B16f10 鼠移植瘤模型[10-12,16]和紫外线(ultraviolet,UA)诱导的自生性模型[13],通过透照法和形态学分析肿瘤的体积和重量,结果表明 nsPEFs 处理后抑制了黑色素瘤的生长,最终使肿瘤完全消除。Guo 等[17]建立 BALB/c 裸鼠的 A375 移植黑色素瘤模型并引进体内成像技术进行研究,结果同样显示 nsPEFs 可抑制黑色素瘤生长。

2 nsPEFs 抑制黑色素瘤生长的机制

2.1 nsPEFs 抑制黑色素瘤血供

肿瘤的生长依靠新血管的形成以及其提供的氧气和营养,nsPEFs 治疗黑色素瘤的主要机制就是抑制血管形成导致肿瘤坏死。nsPEFs 处理后,治疗区域内出现出血现象且血管数目显著下降,表明 nsPEFs 可破坏肿瘤的血管,降低肿瘤血供[16]。免疫组织化学法检测微脉管密度(micro vessel density,MVD)的标记物 CD31、CD34 和 CD105,经 nsPEFs 处理后均显著下降[12,18]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和血管内皮因子的趋化因子(platelet derived endothelial cell growth factor,PD-ECGF)等促血管生成因子水平的下降进一步证实了 nsPEFs 可抑制肿瘤血管的形成[17-18]。

肿瘤血管的形成是一个非常复杂的过程,取决于促血管生成因子、抑血管生成因子、粘附因子等的动态平衡[19-20]。而 nsPEFs 抑制黑色素瘤血管形成的机制并不清楚。血管内皮细胞、肿瘤细胞、肿瘤间质细胞和炎症浸润细胞均可产生促血管生成因子刺激血管形成[21]。由于 nsPEFs 对细胞类型的非选择特性[12,22],对上述细胞均造成损害,这种直接作用可能是 nsPEFs 抑制肿瘤血管形成的机制。

2.2 nsPEFs 诱导黑色素瘤细胞凋亡

体外研究和动物实验表明 nsPEFs 处理后,黑色素瘤细胞表现为细胞核固缩,核浆比例增大,DNA 碎片,细胞膜完整性破坏,线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,$\Delta\Psi m$)的下降以及 caspase 活化,这些均是细胞凋亡的标志[10,13,15-16,18]。细胞对凋亡刺激的敏感性依靠促凋亡蛋白(Bad,Bax 或 Bid)和抑凋亡蛋白(Bcl-2 或 Bcl-XL)的平衡。Nuccitelli 等[16]研究表明 nsPEFs 处理 SKH-1 鼠模型 B16f10 黑色素瘤后,Bcl-2 减少 74%而 Bad 增加 320%。Guo 等[17]研究表明 nsPEFs 处理 BALB/c 裸鼠模型 A375 黑色素瘤后,Bcl-2 减少 57.6%而 Bax 增加 247.8%。进一步证实 nsPEFs 能诱导黑色素瘤细胞凋亡。nsPEFs 诱导黑色素瘤细胞凋亡的途径包括细胞内 Ca^{2+}诱导的途径,caspase 相关途径,caspase 非依赖途径及其他凋亡途径。

2.2.1 Ca^{2+}诱导途径 Ford 等[15]使用 Fluo-3 荧光强度检测 B16f10 细胞内 Ca^{2+}浓度,结果提示 nsPEFs 可诱导 B16f10 细胞内 Ca^{2+}浓度的增加,细胞内 Ca^{2+}浓度的增加是触发凋亡的关键[23]。姚陈果等[24]研究认为 nsPEFs 诱导胞内 Ca^{2+}浓度升高,从而破坏内质网内 Ca^{2+}的稳态,进一步促发内质网发生未折叠蛋白反应,最终导致肿瘤细胞凋亡。并且,Ca^{2+}作为第二信使可参与介导细胞凋亡,细胞内 Ca^{2+}的增加持续几分钟就能启动代谢级联反应导致细胞的死亡和 DNA 断裂[25-26]。但是使用螯合剂完全螯合细胞内 Ca^{2+}并不能完全消除细胞凋亡的发生,这就提示存在与 Ca^{2+}无关的凋亡信号通路。Ford 等[15]研究证实 nsPEFs 引起的 caspase 活化无 Ca^{2+}依赖性,亦证实了上述观点。

2.2.2 caspase 相关途径 nsPEFs 可诱导启动和执行 caspase 活化[15-16,18],参与细胞的凋亡。Chen 等[18]用纳秒脉冲处理黑色素瘤细胞和小鼠皮下黑色素肿瘤结果发现,处理的细胞出现 caspase 活化、TUNEL 阳性率增高并伴随组蛋白磷酸化以及 DNA 大片段形成,这就提示:caspase 相关凋亡的诱导似乎是一种早期的 nsPEFs 诱导机制,通过诱导执行 caspase 的活化促进肿瘤凋亡,但是这种凋亡并不完全。可能的原因是微血管破坏致使能量不足以完成凋亡,这就使 caspase 大量累积,导致后期肿瘤迅速死亡。内源性的凋亡机制无法及时清除凋亡的肿瘤细胞,这就会导致二次坏死的发生[27],进一步对肿瘤产生杀伤作用。

2.2.3 caspase 非依赖途径 B16f10 细胞经 nsPEFs 处理后,核固缩、染色体凝集、组蛋白 2AX 磷酸化(Histone 2AX phosphorylation,γH2AX)和 TUNEL 阳性细胞在 caspase 活化达到峰值时就存在[18],证实 nsPEFs 诱导 B16f10 细胞的凋亡存在 caspase 非依赖机制。再者,DNA 损害的机制之一就是由于 LEI/LEI 衍生 DNase Ⅱ的活化导致的其他蛋白活化的 caspase 非依赖性凋亡[28]。但 nsPEFs 诱导黑色素瘤细胞的 caspase 非依赖性凋亡的机制仍需进一步研究。

2.2.4 其他途径 nsPEFs 作用于细胞使细胞膜和细胞内膜均形成大量的纳米孔,纳米孔的形成可促进细胞死亡[29],并且纳米孔的形成以及 nsPEFs 对离子通道的影响可能引起细胞体积的缩小,细胞体积的缩小是凋亡的通用标志,这都表明纳米孔在 nsPEFs 诱导细胞凋亡中起重要作用[30]。再者,B16f10 细胞经 nsPEFs 处理后无细胞色素 C 的释放也无活性氧(reactive oxygen species,ROS)的释放[14-15],这就表明nsPEFs 治疗 B16f10 肿瘤似乎存在外在的凋亡途径,可能是通过细胞膜死亡受体诱导细胞凋亡[31]。

3 nsPEFs 可激活机体的免疫反应

与外科手术治疗相比,nsPEFs 治疗鼠 B16f10 肿瘤后,可激活机体较强的免疫反应,凭此可显著抑制二次移植肿瘤的生长[13]。在 nsPEFs 治疗的肿瘤和未治疗的二次肿瘤中均可检测到 $CD4^+$-T 细胞[13],进一步证实 nsPEFs 可激活机体对肿瘤的免疫反应。可能的机制是,机体不能迅速清除 nsPEFs 诱导的早期凋亡细胞,这会导致未清除的凋亡细胞二次坏死,使得这些细胞被抗原提呈细胞识别,激活机体的免疫反应[18]。

此外，nsPEFs 诱导的磷脂酰丝氨酸外部化是刺激吞噬细胞吞噬肿瘤细胞的部分信号[32]。nsPEFs 治疗后激活机体免疫是该治疗手段的优势，需进一步明确该免疫机制，为增加机体免疫和临床治疗提供更多的证据。

4 nsPEFs 抑制黑色素瘤转移

Chen 等[12]通过组织芯片技术对经 nsPEFs 治疗后的 B16f10 黑色素瘤小鼠进行长达 5 个月的病理跟踪，结果表明无原位点复发且无肺部和脾脏转移，表明 nsPEFs 可能会抑制黑色素瘤的转移。再者，微血管在肿瘤转移中有关键作用[33]，nsPEFs 可破坏肿瘤的微血管，造成了对肿瘤转移的抑制。更为有趣的是，肿瘤细胞可逃避凋亡，这是肿瘤转移的关键[34]，nsPEFs 诱导细胞凋亡，进而抑制肿瘤转移。另外，nsPEFs 可激活机体对肿瘤的免疫反应，这可能也是抑制肿瘤转移的一种机制。

5 nsPEFs 治疗黑色素瘤的安全性

nsPEFs 治疗的一个优势是无热损伤性，nsPEFs 治疗后治疗区域温度的升高远低于过高热效应所需的温度[11,17,22]。Pliquett 等[35]利用焦耳热的理论模型法和直接测量法充分证实了 nsPEFs 的无热损伤性。nsPEFs 的另一大优势就是具有高度局限性，仅作用于肿瘤组织，而周围的正常组织表现为轻度出血水肿，并可迅速恢复[10-11]。nsPEFs 治疗 B16f10 黑色素瘤的研究表明短暂的皮肤损害可无疤痕修复。

6 nsPEFs 单次治疗黑色素瘤的参数优化

影响 nsPEFs 治疗效果的主要参数有：脉宽、场强，频率和脉冲数目。早期 nsPEFs 治疗黑色素的实验多选用 300 ns，40 kV/cm 的不同频率和数目的脉冲，常需要进行二次或三次脉冲处理才可使肿瘤完全消除[11-12,16]。为了临床治疗的方便和安全，Nuccitelli 等对 nsPEFs 参数进行优化，采用特殊的吸附电极，100 ns，30 kV/cm，5-7 Hz 的 2000 脉冲单次治疗即可完全消除黑色素瘤且进一步降低产生的焦耳热[22]。但是，nsPEFs 应用临床最大的困难就是高的电场强度，较高的电场可增加放电和对皮肤的损害，因此仍需进一步优化治疗参数，降低电场强度。Guo 等研究表明 20 kV/cm 的 nsPEFs 即可显著抑制 A375 黑色素瘤生长[17]。

值得注意的是，在治疗时可通过电子计算机断层扫描、超声及核磁共振等医学成像手段进行治疗范围定位、治疗实时监测和术后疗效观测等，使得 nsPEFs 治疗范围更加精确，最大限度地保护正常组织[36]。此外，影响 nsPEFs 疗效的另一因素是电极结构，Nuccitelli 等[37]探讨 3 种吸附式电极配置对 nsPEFs疗效的影响，结果显示：6 柱双重吸附电极配置的效果最佳，能量传递极佳且具有高度局限性。

7 展 望

nsPEFs 可通过抑制肿瘤血供和诱导凋亡显著抑制黑色素瘤的生长，且能抑制肿瘤转移并激活机体对肿瘤的免疫反应，但是 nsPEFs 抑制黑色素瘤的机制，尤其是其激活机体免疫和抑制转移的机制仍需进一步研究。nsPEFs 最大的缺点就是由于电极结构的限制，仅能治疗体积较小的肿瘤，这可能是限制 nsPEFs 应用于临床的原因之一，故需进一步优化治疗参数和电极结构，以期为应用临床提供更多的证据。

参 考 文 献

[1] Owens B. Melanoma[J]. Nature, 2014, 515(7527): S109.

[2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1): 9-29.

[3] Globocan 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012[EB/OL]. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (2014-01-15).

[4] Hsiao YP, Yu CS, Yu CC, et al. Triggering apoptotic death of human malignant melanoma a375.s2 cells by bufalin: involvement of caspase cascade-dependent and independent mitochondrial signaling pathways[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012(2012): 591241.

[5] Sin JI, Park JB, Lee IH, et al. Intratumoral electroporation of IL-12 cDNA eradicates established melanomas by Trp2180 - 188-specific CD8+ CTLs in a perforin/granzyme-mediated and IFN-γ-dependent manner: application of Trp2180-188 peptides[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(10): 1671-1682.

[6] Gerlini G, Sestini S, Gennaro P, et al. Dendritic cells recruitment in melanoma metastasis treated by electrochemotherapy[J]. Clinical & Experimental Metastasis, 2013, 30(1): 37-45.

[7] Mandel Y, Laufer S, Belkin M, et al. Irreversible electroporation of human primary uveal melanoma in enucleated eyes[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e71789.

[8] Kechagias A, Delis S, Dervenis C, et al. Computed tomography-guided radiofrequency ablation for palliation of a painful supraclavicular soft-tissue metastasis invading the brachial plexus[J]. Oncol Lett, 2013, 6(5): 1521-1523.

[9] Beebe SJ, Fox P, Rec LJ, et al. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2002, 30(1): 286 - 292.

[10] Nuccitelli R, Pliquett U, Chen XH, et al. Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 343(2): 351-360.

[11] Chen XH, James Swanson R, Kolb JF, et al. Histopathology of nor-

mal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment[J]. Melanoma Research,2009,19(6):361-371.

[12] Chen XH,Chen XM,Swanson RJ,et al. Histopathological follow-up by tissue micro-array in a survival study after melanoma treated by nanosecond pulsed electric fields(nsPEF)[J]. Journal of Dermatological Treatment,2011,22(3):153-161.

[13] Nuccitelli R,Tran K,Lui K,et al. Non-thermal nanoelectroablation of UV-induced murine melanomas stimulates an immune response [J]. Pigment Cell & Melanoma Research,2012,25(5):618-629.

[14] Beebe SJ,Ford WE,Ren W,et al. Non-ionizing radiation with nanosecond pulsed electric fields as a cancer treatment:in vitro studies [C]. 2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society,2009,2009:6509-6512.

[15] Ford WE,Ren W,Blackmore PF,et al. Nanosecond pulsed electric fields stimulate apoptosis without release of pro-apoptotic factors from mitochondriain B16f10 melanoma[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2010,497(1):82-89.

[16] Nuccilli R,Chen XH,Pakhomoy AG,et al. A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete melanoma remission without recurrence[J]. International Journal of Cancer,2009,125(2):438-445.

[17] Guo F,Yao C,Li C,et al. In vivo evidences of Nanosecond pulsed electric fields for Melanoma malignancy treatment on tumor-bearing BALB/c nude mice[J]. Technology in Cancer Research and Treatment, 2014,13(4):337-344.

[18] Chen XH,Kolb JF,Swanson RJ,et al. Apoptosis initiation and angiogenesis inhibition:melanoma targets for nanosecond pulsed electic fields[J]. Pigment Cell & Melanoma Research,2010,23(4):554-563.

[19] Tong QY,Qing Y,Wu Y,et al. Dioscin inhibits colon tumor growth and tumor angiogenesis through regulating VEGFR2 and AKT/MAPK signaling pathways[J]. Toxicology and Applied Pharmacology,2014,281 (2):166-173.

[20] Kitazume S,Imamaki R,Ogawa K,et al. Sweet role of platelet endothelial cell adhesion molecule in understandingangiogenesis[J]. Glycobiology,2014,24(12):1260-1264.

[21] Riabov V,Gudima A,Wang N,et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. Frontiers in Physiology,2014(5):75.

[22] Nuccitelli R,Tran K,Sheikh S,et al. Optimized nanosecond pulsed electric field therapy can cause murine malignant melanomas to self-destruct with a single treatment[J]. International Journal of Cancer, 2010,127(7):1727-1736.

[23] Varghese E,Büsselberg D. Auranofin,an anti-rheumatic gold-compound,modulates apoptosis by elevating the intracellular calcium concentration([ca2+]I) in mcf-7 breast cancer cells[J]. Cancers(Basel), 2014,6(4):2243-2258.

[24] 姚陈果,郭 飞,王 建,等. 纳秒脉冲电场诱导肿瘤细胞凋亡的内质网信号通路分析[J]. 高电压技术,2012,38(5):1033-1038.

[25] 姚陈果,米 彦,李成祥,等. 纳秒级陡脉冲电场诱导癌细胞凋亡的实验及作用机理研究[J]. 中国生物医学工程学报,2008,27(5): 739-744.

[26] Yusuf J,Khan M,Cheema Y,et al. Disturbances in calcium metabolism and cardiomyocyte necrosis:the role of calcitropic hormones[J]. Progress in Cardiovascular Diseases,2012,55(1):77-86.

[27] Barna G,Sebestyén A,Dunai Z A,et al. Heparin can liberate high molecular weight DNA from secondary necrotic cells[J]. Cell Biology International,2012,36(12):1281-1286.

[28] Leprêtre C,Tchakarska G,Blibech H,et al. Apoptosis-inducing factor(AIF) and leukocyte elastase inhibitor/L-DNase Ⅱ (LEI/LDNase Ⅱ),can interact to conduct caspase-independent cell death[J]. Apoptosis,2013,18(9):1048-1059.

[29] Wang J,Guo JS,Wu S,et al. Synergistic effects of nanosecond pulsed electric fields combined with concentration of gemcitabine on human oral squamous cell carcinoma in vitro[J]. PloS One,2012,7(8): e43213.

[30] Beebe SJ,Sain NM,Ren W. Induction of cell death mechanisms and apoptosis by nanosecond pulsed electric fields(nsPEF)[J]. Cells, 2013,2(1):136-162.

[31] Koers Wunrau C,Wehmeyer C,Hillmann A,et al. Cell surface-bound TIMP3 induces apoptosis in mesenchymal Cal78 cells through ligand independent actinvation of death receptor signaling and blockade of survival pathways[J]. PLoS One,2013,8(7):e70709.

[32] Schutters K,Kusters DH,Chatrou ML,et al. Cell surface-expressed phosphatidylserine ad therapeutic target to enhance phagocytosis of apoptotic cells[J]. Cell Death & Differentiation,2013,20(1):49-56.

[33] Moserle L,Casanovas O. Anti-angiogenesis and metastasis:a tumour and stromal cell alliance[J]. Journal of Internal Medicine,2014, 273(2):128 - 137.

[34] Ye T,Xiong Y,Yan Y,et al. The anthelmintic drug niclosamide induces apoptosis,impairs,metastasis and reduces immunosuppressive cellsin breast cancer model[J]. PLoS One,2014,9(1):e85887.

[35] Pliquett U,Nuccitelli R. Measurement and simulation of Joule heating during treatment of B-16 melanoma tumors in mice with nanosecond pulsed electric fields[J]. Bioelectrochemistry,2014,100:62-68

[36] 董守龙,姚陈果,储贻道,等. 不可逆电穿孔对兔组织阻抗的影响[J]. 高电压技术,2015,41(4):1402-1408.

[37] Richard Nuccitelli,Kevin Tran,Brian Athos,et al. Nanoelectroablation therapy for murine basal cell carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun,2012,424(3):446-450.

（责任编辑：冉明会）