

电穿孔——解释生物体中非热生物效应的关键机理*

王保义 刘长军 郭庆功 李丰群 邹大华

(无线电电子学系)

徐润民 张弘 许虹 王子淑 王亚军 邹方东

(电子技术研究所)

(生物系)

摘要 介绍了细胞膜电穿孔的形成过程和基本应用,报道了瞬态电磁脉冲和生物细胞相互作用的一些重要实验结果.采用电穿孔机理解释了细胞膜破裂的原因.

关键词 电穿孔,非热生物效应,瞬态电磁脉冲,机理分析

中图法分类号 Q6-3

1 电穿孔及其应用

电穿孔(Electroporation)是由强电磁脉冲引起的一种重要的细胞或组织生物物理现象^[1,2].当双层膜(包括人工膜)的跨膜电位达到约0.5~1V并且持续数微秒至数毫秒,即可导致电穿孔效应.通常细胞膜双层膜的厚度约为5nm.如图1所示,中间的薄层(细胞膜)为低介电常数区,形成一个具有很高势垒的阻挡层(100kT数量级),对于离子和带电分子有很强的阻挡作用;电穿孔的产生会使细胞膜形成暂时的开口通道,离子可以穿过该通道实现跨膜运输,从而导致细胞膜的导电能力增加.

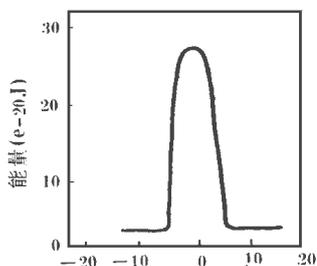


图1 细胞膜对离子和带电分子的势垒

细胞膜对分子运输能力的急剧增加会使极化分子通过细胞膜,可用在细胞膜上瞬时形成的亲水通道来描述电穿孔现象.电场脉冲作用于真实的生物细胞时,当细胞膜上的跨膜电位达到150~500mV(比人工膜的电压要低)时才形成开孔.但是,有一些对电压敏感的蛋白质通道会在跨膜电位达到击穿电压之前(约50mV)就形成开孔,这种开孔并不阻止细胞膜跨膜电位连续增长到双层膜的击穿电压.这种蛋白质通道一形成,就会引起更强的电流通过细胞膜,同时细胞膜内外渗透压的差别也将导致流过通道的液体增加,使通道扩大成与电穿孔类似的通道.

目前,对电穿孔生物物理现象研究分析,发现电穿孔有下列方面的应用.

- (1) 通过把质粒或外来基因导入细胞实现基因转染;
- (2) 实现细胞融合,为异核体和杂交胚胎做准备;
- (3) 把蛋白质嵌入细胞膜;
- (4) 提高药物进入细胞的能力,从而提高化疗治疗癌变细胞的效率;
- (5) 把人体细胞融入动物细胞组织,构造新的动物品种;
- (6) 激活细胞膜的传输因子,提高酶的活性;
- (7) 改变基因在生物体中的表达形式.

2 瞬态电磁脉冲的生物效应简介

瞬态电磁脉冲的生物效应是生物电磁学的一个崭新领域,它与连续波的生物效应有很大的区别^[3].在过去的半个世纪里,人们主要研究连续波对生物体的热效应和非热效应,而对瞬态电磁场与生物体之间的相互作用却很少涉及^[4].主要原因是:连续波引起的生物效应与照射波的频率、平均功率密度和作用时间相关.当入射的电磁波是很窄的电磁脉冲时,平均功率密度接近于零没有任何意义,此时的生物效应只与瞬态电磁脉冲的波形、幅度和脉冲宽度有关,相应的剂量标准和连续波是大不一样的.

瞬态电磁脉冲对生物体作用的效应是不稳定的,而且是非线性的.在生物体内激发电流持续的时间比连续波的要短得多,而且瞬态电磁脉冲有极宽的频谱(频率分量从直流到数千兆赫),所以在实验上要求超宽带的测量传输系统,不能直接使用连续波时的单频实验系统.

考虑到 ANSI C 95.1 1974 标准,可以计算瞬态电磁脉冲在细胞膜上形成的跨膜电位.该标准限制在 6min 内平均入射功率密度不能超过 $100\text{W}/\text{m}^2$.以此为标准,瞬态电磁脉冲允许的总能量密度为 $36000\text{J}/\text{m}^2$.

通过实验,我们发现上述标准没有考虑脉冲电磁场的非热生物效应.因为由瞬态电磁脉冲导致的跨膜电位要比连续波在生物体细胞膜引起的跨膜电位大两个数量级^[5],所以不仅应考虑热效应,而且应考虑非热效应.

实验是在一个超宽频带横电磁传输室(BTEM CELL)中进行的(如图2所示).

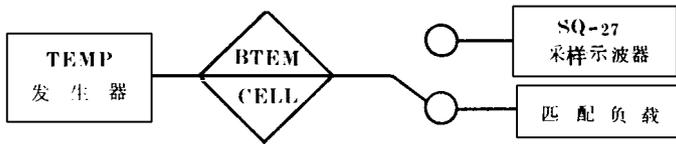


图2 实验系统示意图

超宽频带横电磁传输室内的电磁波是各向同性的准平面波.

实验系统的主要参数和生物样品是:BTEM CELL 频率范围 $\text{DC} \sim 17.0\text{GHz}$;传输系数 $T > 0.9$;驻波系数 $\rho < 2.0$;采样示波器 SQ-27 的频带宽度为 1000MHz ;瞬态电磁脉冲源为高斯型电磁脉冲,脉冲的上升时间为 1.2ns ,脉冲宽度为 2.4ns ,幅度为 $80 \sim 100\text{V}$;生物样品为婴儿脐带血、绵羊红细胞和 HeLa 细胞.

我们把生物样品放置于电磁传输室的不同位置,实现用不同的场强辐射样品.辐射的时间分别是 5h 、 2h 和 3h .

表 1 TEMP 对人体淋巴细胞的作用系数(‰)

辐射时间(h)	细胞核数	微细胞率	微核率	细胞核破碎率	核异常率
0	3000	0.33	0.33	0.00	2.67
1.0	3000	0.33	1.33	0.67	23.3*
1.5	3000	1.00	2.33	2.00	24.7*
2.0	3000	3.00	4.33	1.67	35.0*
3.0	3000	1.33	3.67	2.33	39.7*

* 表示 $P < 0.01$, 与对照组相比有明显差异

图 3 是一些细胞被辐射后的照片, 可以清楚地观察到脉冲电磁场对细胞的破坏作用。



(a) 微细胞

(b) 细胞核破碎

(c) 核异常

图 3 照射后的细胞形态

T 型淋巴细胞形成玫瑰花结的能力在照射后显著下降, 而且照射时间越长, 形成玫瑰花结的能力越低. 我们认为这是细胞的免疫能力被破坏的结果。

表 2 E- 玫瑰花结率

	通常	1.0h	1.5h	2.0h	3.0h
总 数	135	135	135	135	135
玫瑰花结数	97	73	50	30	18
百分比(%)	72	54	37	22	13
P^*	/	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

* $P < 0.01$ 表示与对照组相比有明显差异

低渗实验发现, 照射后红细胞防渗透能力明显下降, 尤其是当生理盐水的浓度为 0.35% ~ 0.55% 时, 下降最为显著。

3 细胞膜电穿孔的形成过程

现在为大家所接受的观点是, 电穿孔是细胞膜内部结构迅速重组的过程. 图 4 简单描绘了这个过程^[2]

图中, (a) 自由空间的起伏; (b) 液水状形成的凸凹结构; (c) 疏水通道的形成; (d) 亲水通

道(也被称为初级通道),离子和分子可以通过这个通道;(e)混合式的通道,在通道内边镶嵌着一个或多个蛋白质;(f)以亲水通道为主的混合式通道,带电的大分子镶入了这个亲水通道.

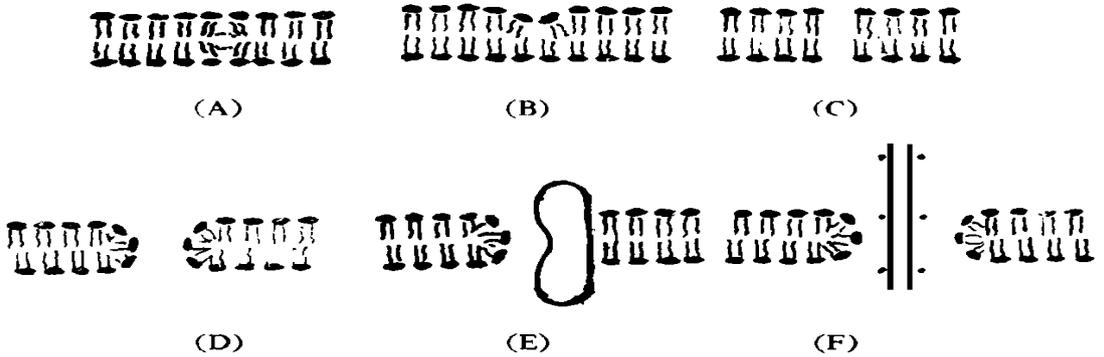


图4 与电穿孔形成有关的膜结构的变化

细胞膜表面随机产生的微孔是电场能量和热运动的能量共同作用而成的.热运动的能量是随机的,它与温度的涨落有关;电场能量是可以控制和确定的,直接与细胞膜跨膜电位相关,对细胞膜表面微孔的形成起决定性作用.电穿孔的形成过程可以用一简化的物理模型来模拟.该模型将水作为具有很大的介电常数的液体,细胞膜由较低的介电常数物质构成的,且细胞膜跨膜电位的增加有利于水通过细胞膜.该模型可较好地解释电穿孔的形成过程.细胞膜上蛋白质通道的打开和关闭取决于细胞膜的跨膜电位.多数细胞膜的阈值一般为 50mV 左右,明显小于双层膜的击穿电压($150 \sim 500\text{mV}$).这是因为电场脉冲作用时,许多对电压敏感的蛋白质通道在热起伏和电场作用下,跨膜电位未达到击穿电压就开通了,并导致较大的电流通过.

4 细胞膜的破裂

图5简要描绘了电穿孔的发生和细胞膜重新缝合的主要过程^[1].

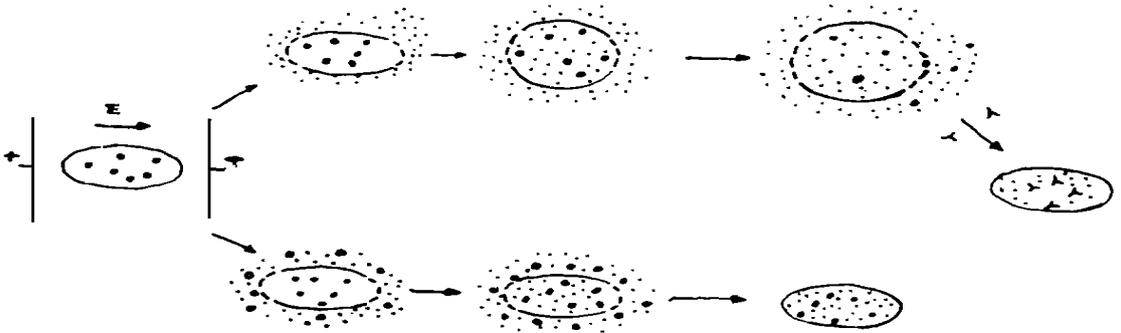


图5 电穿孔和细胞膜的缝合

两条路线分别描述了载入外部分子和细胞恢复的不同过程.上面一条路径是在电穿孔发生后,小体积的分子(图中小点)可以通过细胞膜,但是细胞质中的大分子(图中黑点)不能通过.这样细胞内外对大分子的渗透压是不一样的,导致细胞外的水和小的溶质进入细胞内.细

胞将不断地膨胀使细胞膜破裂引起细胞的融化.之后,细胞封住破裂开口或者是使空壳缩小慢慢重新缝合好.在细胞融化和缩小的过程中,大分子如酶和抗体可以进入细胞内.结果是细胞空壳装入了药剂或具有生物活性的大分子.

在下面的一条路径表明,比电穿孔孔径大的分子(小圆圈)附加到膜的周边以平衡细胞质大分子的渗透压.这样细胞就不会膨胀破裂也没有重新缝合过程,最终药剂分子载入了细胞.从图中可以清楚看到与未处理的细胞没有明显的区别.

电磁脉冲的作用使细胞膜表面瞬态微孔半径增大,在长时间的作用下,可以形成亲水通道.亲水通道的出现大大降低离子穿膜所需的能量,使大量离子可以较自由地穿过细胞膜.红细胞耐低渗的能力下降与这种离子通道的出现有很大关系,因为通道使在渗透压不平衡时穿膜离子增多最终导致细胞膨胀破裂.同样通道也改变了细胞膜的形态和细胞膜上蛋白质的分布,减低了玫瑰花结率.

瞬态电磁脉冲对细胞的作用要比连续波强得多.细胞膜起到了电场聚集器的作用,高强度的电磁脉冲会对细胞核和细胞膜产生不可逆的破坏.

通过借鉴细胞膜电穿孔的机理,较成功地解释了低强度瞬态电磁脉冲生物细胞实验中观察到的现象,从而揭示了解释瞬态电磁脉冲非热生物效应机理的关键所在.所以在这方面进一步的系统实验和深入的机理研究都有很大的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Tsong T Y. *Biophysical Journal*, 1991, 60:297
- 2 Weaver J C. *Radio Science*, 1995, 30(1):205
- 3 王保义,杨杰斌,徐润民等. *微波学报*, 1996, 12(1):71
- 4 Stuchly M A. *Radio Science*, 1995, 30(1):471
- 5 Aldrich T E. Preliminary findings, Oak Ridge National Laboratory Report 1988, ORNL/TM:1084

ELECTROPORATION—KEY MECHANISM TO EXPLAIN ATHERMAL BIOEFFECTS IN BIOLOGICAL BODY

Wang Baoyi Liu Changjun Guo Qinggong Li Fengqun Zou Dahua

(Department of Radio Electronics)

Xu Runmin Zhang Hong Xu Hong Wang Zishu Wang Yajun Zou Fangdong

(Institute of Electronic Technology)

(Department of Biology)

Abstract Basic applications and forming process of electroporation are briefly introduced in this paper. The interaction of transient EMP with biological cells and some important results are presented for the first time. Cell membrane rupture and related athermal experimental phenomena are successfully explained by electroporation analyses.

Key words EMP, electroporation, athermal biological effect, mechanism analysis