

脉冲电磁场对细胞模型特异性作用机理研究^{*}

刘长军¹ 王保义¹ 张 弘¹ 李丰群² 邹大华²

1(四川联合大学 无线电电子学系,成都 610064)

2(四川联合大学电子技术研究所,成都 610064)

内容摘要 采用简化的细胞电学模型分析脉冲电磁场对细胞膜跨膜电位的影响,证明在低强度电磁脉冲对细胞的作用,跨膜电位的直接影响不是主要的,而细胞膜上的“微孔”,在电磁脉冲的刺激下逐步扩大,形成让离子通过的穿膜通道才是主要的作用过程,并应用电穿孔效应解释瞬态电磁脉冲对细胞的作用。

关键词 电磁脉冲 细胞膜 电穿孔 生物效应

Mechanism of Specific Effects of Transient Electromagnetic Pulses on Cell Model

Liu Changjun¹ Wang Baoyi¹ Zhang Hong² Li Fengqun² Zou Dahua²

1(Department of Radio-Electronics Sichuan Union University, Chengdu 610064)

2(Institute of Electronics Technology, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

Abstract In this paper, a facilitated cell model has been built to analyze the electromagnetic pulses(EMP) induced transmembrane potentials. The analysis shows that the athermal biological effects are caused by micropores on the membrane, not directly by transmembrane potentials. These micropores are enlarged by weak transient EMP and finally lead to membrane openings to make ions cross. The electroporation effects are used to explain the specific response of biological cells to transient EMP.

Key words Electromagnetic pulse Cell membrane Electroporation Biological effect

1 简介

脉冲电磁场(又称电磁脉冲,或简称为EMP)对细胞的特异性作用已经有一些报道,主要集中在EMP对细胞膜及细胞核的作用^[1],包括理论计算和实验观测。实验中发现 Gauss 脉冲对细胞膜和细胞核的作用比连续波更强,对细胞核甚至有破坏性作用。实验中使用的脉冲电磁场的场强很低(数十伏/厘米)。所以

在解释脉冲电磁场对细胞膜和细胞核的强烈作用时遇到很多困难,至今未见有关解释机理的详细报道,只有文献[1]做过一些定性的分析和解释。

本文建立简化的细胞电学模型,计算了脉冲电磁场对细胞膜跨膜电位的影响,说明EMP对细胞的破坏不是由于EMP激发的跨膜电位直接造成的。应用弱电磁脉冲产生的电穿孔效应(Electroporation effects)能比较好地解释电磁脉冲对细胞的作用。

^{*} 国家自然科学基金资助项目:编号 69771020

2 实验结果及细胞模型

文献[1]的实验系统中采用的 Gauss 脉冲幅度为 100 V, 上升时间为 1.2 ns, 脉冲宽度为 2.4 ns, 照射持续时间一般在 1.0 h 以上。当样品放在超宽频带传输室(BETM Cell)接受辐射时, 样品所在点的峰值场强约为 25 V/cm。

实验中发现, 长时间照射后人外周血淋巴细胞核严重受损, 出现微细胞、多微核和核破裂; T-淋巴细胞膜上的受体蛋白结合绵羊红细胞的能力显著下降, 红细胞膜的耐低渗能力下降; 家猪血细胞的染色体发生裂隙和断裂^[2]。可见低强度的 Gauss 脉冲长时间辐射会对细胞膜形态和膜内蛋白产生显著作用, 导致细胞膜脆性增加, T-淋巴细胞膜上的受体蛋白也受到影响, 以及对细胞核产生显著的影响。另外, 发现对小白鼠组织内某些酶也有影响。目前正在准备研究瞬态电磁脉冲对细胞质内细胞器的作用, 以及完成验证细胞膜结构变化的进一步实验。

细胞形态众多, 为估算其跨膜电位我们采用简化的细胞电学模型, 如图 1 所示, 即把样品细胞都粗略看作半径为 10 μm 的球形, 细胞膜的厚度 $d=5\text{nm}$ 。显然对细胞的形状过于简化, 所以这种电学模型有一定的局限性, 但其计算的跨膜电位等电学性质, 其它形状的细胞完全可以参考。

细胞膜由双磷脂层镶嵌多种蛋白质构成, 其表面结合了一定量的水分子。同时由于热运动引起的瞬态微孔的出现, 使细胞膜内水分含量增加而导致细胞膜相对介电常数的增加。考虑实验和理论结果, 平均取模型的细胞膜相对介电常数为 $K_{\text{mem}}=2$, 则单位面积电容近似为 $C_{\text{mem}}=0.6\text{fF}/\text{cm}^2$ ^[3], 细胞内外液体的相对介电常数为 $K_w=80$, 和实验中细胞所处的培养液的电学特性相近, 也接近水的相对介电常数。纯净的人工膜几乎不导电, 实验的细胞膜则存在一定的电阻率, 平均取单位厚度细胞膜的电阻

率为 $\rho_m=3500\Omega\text{cm}^2/d_{\text{mem}}$ (d_{mem} 为细胞膜的厚度) $=3.5\times 108\Omega\text{cm}$, 细胞内外液体的电阻率 $\rho_{\text{in}}=\rho_{\text{out}}=230\Omega\text{cm}$ 。这些参数的选择都有典型的代表意义, 可以体现一般细胞的电学特性。

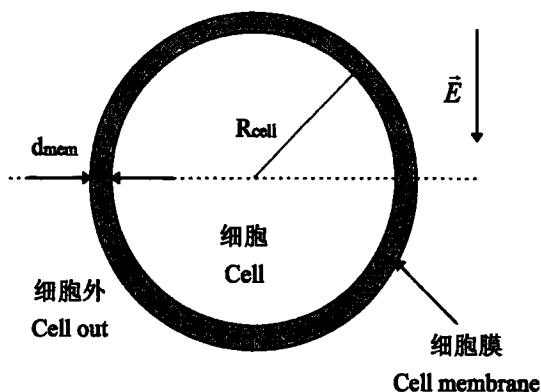


图 1 简化细胞模型图

Fig 1 A facilitated cell model

3 等效静电场作用下细胞最大跨膜电位和内场的计算

假设电磁脉冲的宽度为无限大, 即等效于把细胞放在场强为 E_{out} 的静电场中, 静电平衡后细胞膜将达到此情况下的最大跨膜电位, 即脉冲电磁场对细胞膜充电所能达到的最高跨膜电位。求解此静电问题^[4], 可以得到跨膜电位的最大值表达式。

$$V_m = 1.5E_{\text{out}} \times R_{\text{cell}} \quad (1)$$

代入数据 $E_{\text{out}}=25\text{V}/\text{cm}$ 和细胞膜的半径 $R_{\text{cell}}=10\mu\text{m}$, 得到此情况下的跨膜电位的最大值 $V_m=37.5\text{mV}$ 。

求解的同时可以计算出细胞内的电场强度为

$$E_{\text{in}} = 1.5\sqrt{2} \cdot \frac{\rho_{\text{in}} \cdot R_{\text{mem}}}{\rho_{\text{mem}} \cdot R_{\text{cell}}} \cdot E_{\text{out}} \quad (2)$$

式中: E_{in} 为细胞内的电场强度; E_{out} 为细胞外的电场强度, 代入电阻率和细胞模型的有关数据得到

$$E_{\text{in}} \approx 10^{-4} E_{\text{out}} = 2.5\text{mV}/\text{cm} \quad (3)$$

可看出,静电平衡后细胞内的电场非常弱,不可能对细胞内的细胞核、细胞器等产生明显的影响。可见,在低强度电磁脉冲作用下,新增加的跨膜电位不是影响和破坏细胞功能的主要原因。

由 E_{out} 导致的细胞外的传导电流密度为 $j = E_{\text{out}} / \rho_{\text{out}} = 0.1 \text{ A/cm}^2$, 由于正常情况下,细胞膜的电阻率很高,可近似认为是不导电。所以细胞膜阻挡了传导电流的通过,只有在对细胞膜进行充放电时才有一定的电流流过细胞内部。

4 高斯型电磁脉冲激发的跨膜电位

当脉冲的宽度为 2.4 ns , 重复频率为 200 kHz , 即脉冲之间的时间间隔为 $5 \mu\text{s}$, 显然脉冲宽度远小于脉冲间隔。而且由于细胞内液和细胞外液的电阻率都较低,在下次脉冲充电作用之前细胞膜已经完成了放电过程,所以细胞膜上的电荷累积效应很难发生,故可以简化为只考虑单次充放电过程。

在电场对细胞膜的充电过程中,细胞膜的上下两部分(如图中虚线分开的部分)分别构成一个电容并且相串联。假定取最大电流密度进行充电,要达到最大跨膜电压 V_m , 所需的充电时间为

$$t = \frac{C_{\text{mem}} \cdot A \cdot V_m}{j \cdot A} \approx 2 \times 10^{-7} \text{ s} = 200 \text{ ns} \quad (4)$$

其中: A 为细胞膜总面积之半。而系统中 Gauss 脉冲的宽度仅为 2.4 ns , 显然不能对细胞膜进行完全充电使跨膜电位达到最大值。在脉冲宽度时间内充电所能达到的跨膜电压

$$V = \frac{V_m \times T}{t} = \frac{37.5 \text{ mV} \times 2.4 \text{ ns}}{200 \text{ ns}} \approx 0.5 \text{ mV} \quad (5)$$

即使考虑电荷分布的不均匀性,增大一个数量级也只有 5 mV , 和细胞本身维持正常生理功能所固有的 70 mV 跨膜电位相比,由上述参数的脉冲电场所引起的跨膜电位是非常小的,而且持续时间非常短,不足以对细胞的正常生理功能产生显著的影响。所以低幅度的脉冲电磁场

对细胞膜的作用并不是由于新产生的跨膜电位直接造成的,而是通过其它方式影响了细胞膜的正常生理功能。

5 应用微孔对离子穿膜能量变化的影响解释 EMP 电穿孔对细胞的破坏作用

电穿孔是近年来人们发现的一种在生物组织和细胞内的生物物理现象——通常由场强为 kV/cm 、持续时间为几微秒至几毫秒时电脉冲产生,使细胞膜的半渗透性暂时丧失,从而引起离子的流出、代谢物的排出、细胞对药剂及 DNA 大分子的吸取量增加。强电场脉冲可使细胞的跨膜电压达 0.51 V , 持续几微秒至几毫秒时,导致电穿孔的发生。电穿孔可以看作是在细胞膜双层脂层迅速形成的亲水性通路。由于细胞的结构非常复杂,对电穿孔的形成定性描述可参考文献[5]。

电穿孔现象对研究细胞膜的结构和功能都有重要意义,而且有着许多生物医学方面的应用,如基因转染、细胞融合、提高药物治癌的疗效、激活细胞膜的传输等,所以人们进行了大量的实验和理论研究。

在正常的生理条件下,双层磷脂细胞膜对离子和亲水性分子是很好的阻挡层。人工膜对 Na^+ 、 K^+ 离子的电导率数量级为 10^{-7} S/cm^2 , (单位面积上膜的电导率,膜的厚度为 310 nm), 实际上细胞膜的电导率会更高一些,但很少超过 10^{-3} S/cm^2 。这样细胞膜可以有效地保护细胞质、细胞核、减少外部离子浓度、电流刺激的影响。而当电穿孔发生时,细胞膜的电导率会在几微秒内急剧上升至 1 S/cm^2 。此时细胞膜具有很高的通透性,成为离子、分子等的通道,使电流可以穿透细胞膜直接和细胞质相互作用。

电穿孔要在跨膜电压接近细胞膜的击穿电压时才发生,几乎所有的研究者都把注意力集中于用单个的高场强的电脉冲上。只有很少的研究者采用了低场强时变信号进行实验,也成

功地观察到类似的现象。例如 T·D·Xie 使用峰值 50200 V/cm , 频率为 0.11 MHz 的不同波形的电磁波照射细胞, 持续时间为 1100 s , 在 DNA 和细胞的直径比为 5070 的条件下, 成功地观察到了 DNA 的转染现象^[6]。虽然机理还有待进一步探索, 但开辟了该研究的另一个领域, 就是低场强的多个电磁脉冲也可能导致电穿孔现象^[7]。

那么低幅度的快速电磁脉冲是如何在细胞膜上形成电穿孔的呢? (文献[1]即是低幅度的情况), 根据我们最新计算^[8]证明, 离子在细胞膜中的能量是随其半径 r 的增加而减小的, 而膜的厚度对离子穿膜时离子能量的变化影响不大。大家知道, 细胞膜上由于热运动, 经常会自发地形成“微孔”(其孔径约为 $0.350.8\text{ nm}$, 无外电场作用时“微孔”的形成是自发的, 随时可以形成, 随时可以自行修复。J·C·Weaver 成功地建立了瞬态亲水微孔模型, 计算出跨膜电位的增加会导致微孔半径的增大。当微孔半径大于临界值时, 细胞膜会趋于破裂。我们认为在双层脂类结构的细胞膜中, “微孔”在低强度多个电磁脉冲刺激下, 即使是小能量也可以逐步扩大这些“微孔”从而形成能让离子大量穿过细胞膜的“通道”^[7]。经过计算证明^[8], 这些细胞膜表面上扩大的微孔使离子穿过细胞膜所需的能量极大地减少, 例如 $T=25^{\circ}\text{C}$ 时, 半径 0.5 nm 的微孔, 使离子穿膜所需的能量由 65.6 kT 降为 11 kT , 仅为原值的 20% 。如果微孔半径扩大到 2 nm , 离子在细胞膜中的能量为 4.68 kT , 由于离子在水中的能量为 1.75 kT , 则穿膜所需能量为 2.93 kT , 已经和 $3/2\text{ kT}$ 的热运动能量相接近, 离子很容易穿过细胞膜, 初级电穿孔在细胞膜上形成孔的半径大于 1 nm , 最大可达 40 nm ,

所以电穿孔会导致大量离子通过细胞膜, 从而引起各种细胞破裂、细胞融合等生物物理现象。这对研究低强度的电磁脉冲产生的非热生物效应有很重要的意义。

6 结果讨论

瞬态场对细胞的特异性作用是一个很复杂的过程, 国内外很少报道, 只有本文作者进行了系统的实验和较为深入的研究, 计算证明, 在低强度电磁脉冲的长时间作用下, 细胞膜仍可形成电穿孔现象。以上只是初步的假设和分析, 需建立更精细的细胞模型和采用更严格的计算, 但是上述的初步结论是很有指导意义的。

参 考 文 献

- 1 王保义, 杨杰斌, 郭庆功等. 毫微秒电磁脉冲的生物效应实验研究和机理分析. 中国科学(C 辑), 1997; 27(1): 35
- 2 王子淑, 邹方东, 王喜忠等. 兰法拉斯猪脆性位点的初步研究. 见: 第五次全国畜禽遗传标记研讨会论文集, 1996; 5(6): 76
- 3 李缉熙, 牛中奇. 生物电磁学概论. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1990: 61
- 4 赵南明, 蒲慕明. 细胞膜组分原位电泳理论. 清华大学学报, 1983; 23(4): 47
- 5 Weaver JC. Electroporation in cells and tissues: A biophysics phenomenon due to electromagnetic fields. 1995; Radio Science, 30(1): 205
- 6 Xie TD, Tsong TY. Study of mechanisms of electric field induced DNA transfection; transfection by low amplitude, low frequency alternating electric fields. Biophysical Journal. 1990; 58(10): 897
- 7 Gailey PC, Easterly CE. Cell membrane Potentials induce during exposure to EMP fields. Electro-and Magnetobiology. 1994; 13(2): 159
- 8 王保义, 刘长军. 离子通过细胞膜过程中的能量变化分析与计算. 四川大学学报, 1998; 35(1): 55

(收稿: 1997-05-09 修回: 1997-11-24)