

低强度瞬态电磁脉冲对细胞膜的电穿孔效应及机理研究^{*}

张 弘¹ 王保义¹ 刘长军¹ 李丰群¹ 邹大华¹ 王子淑² 陈明福²

¹ (四川大学 无线电系, 成都 610064)

² (四川大学 生物系, 成都 610064)

摘要 采用低强度的瞬态电磁脉冲在超宽频带横电磁波传输室(BTEM Cell)中对生物样品进行辐射,结果表明,在弱电场的情况下,细胞膜也会发生电穿孔,初步分析了形成电穿孔的机理。

关键词 瞬态电磁脉冲(TEMP) 细胞膜 电穿孔

Electroporation and its Mechanism due to Low Amplitude Transient Electromagnetic Pulsess on Cell Membranes

Zhang Hong¹ Wang Baoyi¹ Liu Changjun¹ Li Fengqun¹ Zou Dahua¹
Wang Zishu² Chen Mingfu²

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

²(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract Low amplitude transient electromagnetic pulses (TEMP) were used to radiate some cells in the broad band transverse EM-wave cell (BTEM Cell). It has been shown that electroporations have been formed on the cell membranes under weak electromagnetic irradiation. The mechanism of electroporation has been analysed preliminarily.

Key words Transient electromagnetic pulse Cell membrane Electroporation

1 引言

细胞电穿孔的研究始于70年代。所谓电穿孔(Electroporation)即是在外加短时强电脉冲时,在细胞膜双脂层上形成瞬时微孔,使细胞膜的通透性增强,离子,亲水分子,病毒颗粒,DNA,蛋白质以及染料颗粒等正常情况下不能通过细胞膜的分子得以进出细胞的一个生物物

理过程。目前,电穿孔技术已广泛用于生物技术,基因工程,临床医学等许多领域。利用电穿孔可实现基因转染,细胞融合,以及将外源蛋白质分子插入细胞膜或导入细胞,激活细胞膜的传输因子,提高酶的活性,并可提高药物进入细胞的能力,增强癌症的化疗效果。

早期 Zimmermann^[1]等系统地研究了脉冲电场作用下,红血球等的膜的通透性或膜的电导率瞬时性增大,在脉冲持续时间为几 μ s~几十 μ s内形成可逆电击穿,发现膜的击穿阈值

约为 1V, 并利用电穿孔实现了细胞的电融合。Shivarova^[2] 等在原核生物腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的原生质体上完成了电转染。很多研究者进行了利用电穿孔增加肿瘤细胞对药物的摄入, 从而减少化疗药物剂量的研究^[3,4], 证明电通透与化疗联用法是一种行之有效的办法。上述研究以及我国汪和陆^[5,6] 等在对电穿孔及其应用研究中, 采用的电脉冲信号的电场强度通常在数 kV/cm ~ 数十 kV/cm, 脉冲宽度在 μs ~ mS 量级。

最近几年, 我们在弱电磁场的非热生物效应研究中, 采用低强度瞬态电磁脉冲对生物样品进行照射。这种瞬态电磁脉冲的电场强度为数十 V/cm, 脉冲宽度几 nS ~ 几十 nS, 重复周期远大于脉宽, 其平均功率密度接近于零, 而其频谱从直流到上千兆赫兹。通过实验发现, 人外周血淋巴细胞核在弱的脉冲场作用下严重受损, 出现了多微核, 核破裂以及核异常, 同时发现经过照射后的 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, 细胞的免疫功能受损, 耐低渗能力下降^[7]。家猪血细胞的染色体发生裂隙和断裂^[8]。初步判断细胞膜即使受到低于电穿孔的跨膜电位 (约 0.5 ~ 1.0V) 的作用, 也能扩大膜上的微孔, 形成电穿孔, 从而

导致细胞发生明显的生物学变化。但该结论还需作进一步的验证。最近, 我们针对弱电磁脉冲的电穿孔研究进行了一系列新的实验。证实了在低强度快速电磁脉冲作用下, 动物细胞确可形成电穿孔现象。

2 实验系统

由于瞬态电磁脉冲信号 (TEMP) 的频带很宽, 从直流到上千兆赫兹, 因此实验要求采用超宽频带的测量传输系统。实验在我们自行研制的一个超宽频带横电磁波传输室 (BTEM Cell) 中进行。BTEM Cell 中传输的电磁波是各向同性的准平面波, 其频率范围 DC ~ 17.0 GHz, 传输系数大于 0.9, 驻波系数小于 2.0。这样 BTEM Cell 即形成了对自由空间的模拟。

实验系统框图如图 1 所示。

TEMP 发生器输出信号为准矩形脉冲, 输出脉冲幅度, 宽度以及重复频率均可调。实验中采用的信号源参数为: 脉冲幅度 187 V, 脉宽 50 nS (实验 1, 2), 100 nS (实验 3), 重复频率 300 Hz。样品在 BTEM Cell 中接受照射, 照射时间从 20 min ~ 2 h 不等, 对动物细胞样品在照射时, 通常温度控制在 37°C。

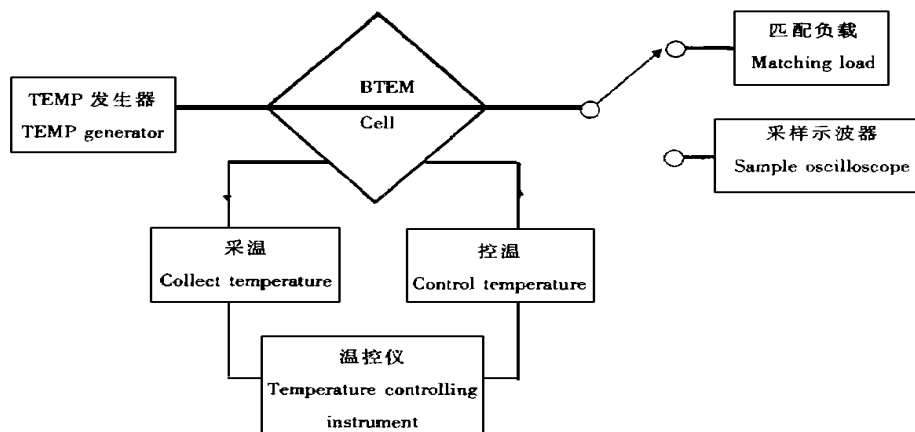


图1 实验系统

Fig 1 Experimental system

3 实验内容

3.1 细胞电融合实验

取兔血和鸡血与阿氏液等体积混合,用D-Hanks液洗两次,再用等渗低电导液洗一次,离心去上清。将样品分组,各组0.1 ml,再各加入0.5 ml的等渗低电导液,分组按20、40、60、80、100 min进行照射,之后加2 ml培养基(RP-MI1640;小牛血清=4:1),37℃培养30 min,离心去上清,各组加5d小牛血清,混匀涂片,用甲醇固定,晾干,染色,用光学显微镜观察。

3.2 小分子电穿孔实验

采用人血红细胞与台盼蓝,以及人血红细胞与³H标记的胸腺嘧啶核苷的混合液,分别进行处理。照射时间分别为20、40、60、80、100 min,照射后经处理,制成细胞涂片,显微观察。

台盼蓝是一种染料,在正常情况下,它对活细胞不着色,但可以通过电穿孔进入细胞内。因而根据台盼蓝的染色情况可以追踪电穿孔的情况。

实验中对³H标记的胸腺嘧啶核苷采用放射自显影的方法,利用³H所发出的β粒子,使底片感光来测定样品中³H的分布情况,通过这些被感光点(照片中为小黑点)来判断其位置。

3.3 电穿孔的扫描电镜观察

采用鸡血(悬于适量阿氏液中),经离心去上清,用D-Hanks液洗后静置5 min,去上清,再加入等渗低电导液摇匀,分组照射,各组0.1 ml,照射时间为20、40、60、80、100 min,在照射即将完成时,各组加入1%戊二醛0.5 ml以固定细胞形态。样品取出后滴一滴在覆有Formvar膜的小玻片上,静置10 min,吸去多余样品,将小玻片放入小称量瓶底,沿瓶壁加入1%戊二醛浸没,10 min后用D-Hanks液洗,再加适量1%的OsO₄,1 h后用D-Hanks液洗,然后用不同梯度的丙酮逐级脱水,再用不同梯度的醋酸异戊酯逐级取代丙酮,放入临界点干燥仪,干燥后用碳,金分别喷镀,最后用扫描电镜观察。

4 结果与分析

4.1 实验1中加入的PEG浓度为10%,在该浓度下对照组的融合几乎没有,而照射后细胞的融合率有明显的提高,出现了鸡-兔血细胞,兔-兔血细胞,鸡-鸡血细胞的融合,见图2(A、B、C)。由于细胞的融合必须在两个细胞中间形成沟道才能实现,故本实验间接证实了电穿孔的存在。

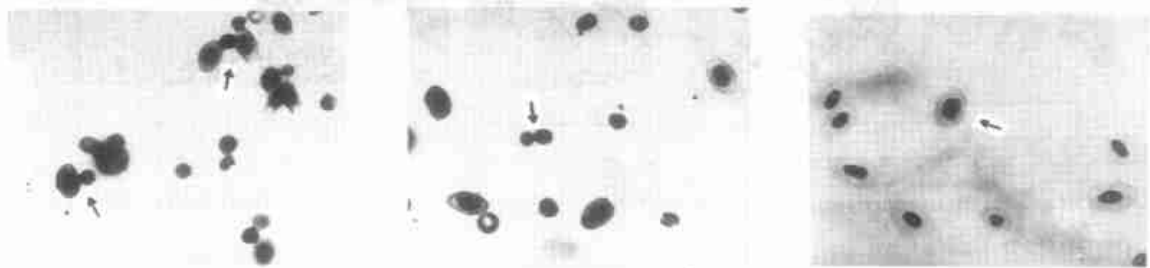


图2 A·鸡-兔血细胞融合 B·兔-兔血细胞融合 C·鸡-鸡血细胞融合

Fig 2 A·chick's and rabbit's blood cells fusion B·rabbit's blood cells fusion C·chick's blood cells fusion

4.2 从图3(A)中可以明显看出细胞被台盼蓝部分染色。在正常情况下活细胞无法被染色,死细胞则全被染成蓝色,可断定台盼蓝是通过细胞膜上的孔进入,细胞仍存活。实验发现台盼蓝

的透入率与处理时间成正比,平均为18%,而对照组只有2.5%。图3(B)中的黑色小颗粒是进入细胞内的³H发出的β射线使乳胶感光而成的。由于人血红细胞无核,细胞内不含DNA

物质,故可判断小颗粒是由电穿孔进入细胞的,而正常情况下它无法进入细胞。实验中还发现

照射组的细胞体积明显比对照组大,并有部分细胞变形,有刺突出现。

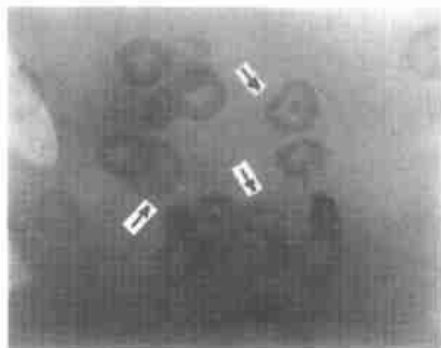
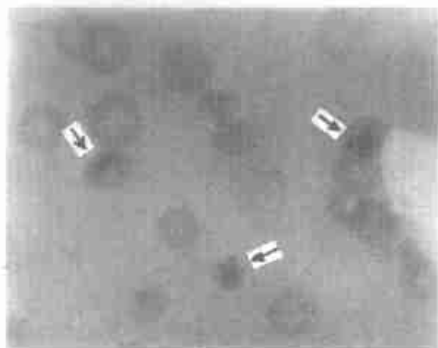


图3 A·细胞被台盼蓝部分染色 B· ^3H 标记的胸腺嘧啶核苷自显影

Fig 3 A·Human red blood cells are dyed partly by Trypan blue B· ^3H -TdR self develop in human red blood cells

4.3 用扫描电镜观察,直接证实了弱电磁脉冲的穿孔效应,见图4(A、B、C、D、E)。

从照片上可见,在低强度电磁脉冲作用下,细胞膜上先是形成凹陷,继而形成孔洞,造成细胞内物质外喷,使孔洞周围的细胞膜向外凸出。孔洞直径在 $100\sim 700\text{ nm}$,瞬时穿孔率在2%左右。在照射的各个时段,穿孔率差别不大。这是

由于电穿孔是个可逆过程,在照射过程中,细胞随时都会发生电穿孔,又随时可能自行修复。此穿孔过程与Chang^[9]用快速冰冻电子显微术揭示的细胞电穿孔的动力学特征极为相似。但我们所加的电场强度却低的多(约 20 V/cm),并且电穿孔的孔洞直径远大于Chang等的报道。

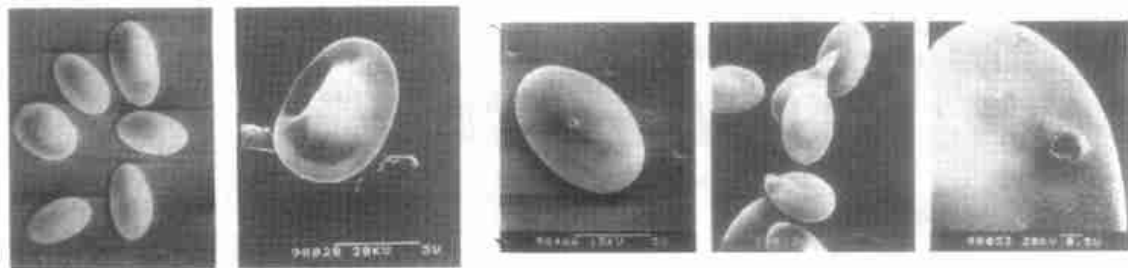


图4 A 对照组, B 细胞膜凹陷, C 细胞膜上形成电穿孔, D 胞内物质外喷, E 外凸的孔

Fig 4 A·Control group B·Concave surface of cell membrane C·Electroporation on cell membrane D·Cytoplasm ejection E·Convex pore.

5 讨论

以往在强电场下对细胞电穿孔机理的研究,得出膜的临界击穿电压为 $0.5\text{ V}\sim 1.0\text{ V}$,可逆电穿孔的脉冲宽度在数 $\mu\text{ s}\sim\text{ms}$ 量级,孔洞直径 $<100\text{ nm}$ 等主要结论。而我们所采用的输入瞬态脉冲幅度为 187 V ,样品所在处的电

场强度 $<20\text{ V/cm}$ 。理论表明,外电场 E_0 诱导的跨膜电位的最大值为 $V_{\text{max}} = 1.5 \times R \times E_0$,其中 R 为细胞半径。对鸡血细胞,长轴 $10\text{ }\mu\text{m}$,短轴 $6\text{ }\mu\text{m}$,故外加场作用于细胞膜上的跨膜电位小于 15 mV 。该电位远小于膜的临界击穿电压,而且脉宽只有 $50\text{ ns}\sim 100\text{ ns}$ 。可见,电穿孔并不

(下转第482页;Continued on Page 482)

参 考 文 献

- 1 Rumelhart DE, McClelland JL. Parallel Distributed Processing, MIT Press, 1986 : 1-2
- 2 焦李成. 神经网络系统理论. 西安:西安电子科技大学出

版社,1991 : 34-36

- 3 王 奇,谭芬来,梁伟雄等. 中医证候量化的临床汉行病学研究初探. 广州中医学院学报,1994;9(4) : 224
(收稿:1998-08-31)

(上接第470页;Continued from Page 470)

是由于跨膜电位达到击穿电压的直接作用而造成的。

我们初步认为,由于在电场能量和热运动能量共同作用下,细胞膜表面随机形成微孔,这些微孔在瞬态脉冲周期性地反复作用下,微孔会有所扩大,使离子穿过细胞膜所需能量大为减少^[10]。因此即使是外加毫伏级的跨膜电位,也能激活膜上的传输系统^[11],使离子很容易穿过细胞膜,导致细胞膨胀,细胞膜变薄,从而引起微孔迅速变大^[12]。由于细胞内外渗透压的不同,造成胞内物质外喷,从而形成电穿孔。而当胞内物质外喷使细胞膜内外压力相同后,膜上的孔洞就将逐渐修复。故在弱电磁脉冲作用下,细胞电穿孔是可逆的,并不造成细胞坏死,且与处理时间无明显关连。在这里,外加电场只是促进了微孔的扩大和离子的跨膜运输,进而引起电穿孔和电融合。

参 考 文 献

- 1 Zimmermann U, Vinken J. J Member Biol, 1982;67(2) : 158
- 2 Shivarova N *et al.* Stud Biophys, 1983;23(3) : 595
- 3 Langer R. Science, 1990;249(4976) : 1527
- 4 Heller R *et al.* Bioelectrochem, and Bioenergetics, 1995;36(1) : 83
- 5 汪和睦,李金慧. 微生物学通报, 1994;21(2) : 67
- 6 丁志山,蒋承俊,吴根福等. 生物技术, 1995;5(4) : 9
- 7 王保义,杨杰斌,郭庆功等. 中国科学(C辑), 1997;27(1) : 35
- 8 王子淑,邹方东,王喜忠等. 第五届全国畜禽遗传标记研讨会论文集, 1996;5(6) : 76
- 9 Chang DC, Reese TS. Biophysical J, 1990;58(1) : 1
- 10 刘长军,王保义,张 弘等. 四川大学学报, 1998;35(1) : 55
- 11 Xie TD, Tian Y, Tsong. Biophysical J, 1990;58(10) : 897
- 12 Weaver JC. Radio Science, 1995;30(1) : 205
(收稿:1998-09-01)