

低强度电磁脉冲对细胞膜穿孔的研究^{*}

陈明福 王喜忠 王子淑 陈文元 王珏 王荣

(四川大学生物系 成都610064)

王保义 张弘 李丰群 邹大华 刘长军

(四川大学无线电系 成都610064)

摘要 采用新型超宽频带横电磁传输室 BTEM Cell, 在低强度脉冲电场(WEMPF, 电压187V, 场强20V/cm, 频率300Hz, 脉宽50ns 或100ns)作用下, 鸡红细胞膜上出现直径0.1~0.9 μm 大小不等的孔洞, 被穿孔的细胞约占所观察细胞的1%, 细胞穿孔率与照射时间无明显相关。另外, 还观察到有1%的细胞虽未穿孔但有小泡从膜上凸出或出现凹陷; 台盼蓝能进入人红细胞, 红细胞体积都明显变大; WEMPF 能诱导枯草杆菌对卡那霉素产生抗性并稳定遗传, 能引起细胞融合的频率约为1%。

关键词 低强度脉冲电磁场(WEMPF), 电穿孔, 细胞膜

中图法分类号 O59 染241.Q689

电穿孔(electroporation)是在一定参数的电场作用下, 在细胞膜脂双层中形成孔洞的现象^[1]。1979年首次实现了细胞融合, 1980年成功地导入了质粒, 实现了细胞转化。电穿孔是一种物理技术, 具有普遍性, 可用于动植物和微生物等各类细胞, 而且电穿孔的操作具有效率高, 无残余毒性, 参数易控制等特点^[2,3]。对于低强度电磁脉冲(WEMPF)电穿孔及其相关现象和机理的研究, 还具有以下重要意义: 1. 通过对强电脉冲场与 WEMPF 对膜穿孔及其相关现象的比较研究, 不仅为探索电穿孔的分子机理开辟新的途径, 而且能为阐明电穿孔分子的机理提供依据。2. 为电磁脉冲在生物、医学中的广泛应用拓宽领域。有鉴于此, 我们进行了一系列的实验, 对 WEMPF 能否诱导电穿孔、电转化、电融合进行了研究, 并对其机理进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鸡血红细胞及人脐带血 采自成都市第七人民医院。

1.1.2 枯草杆菌(*B. Subtilis*) 卡那霉素敏感株 K_n ; 质粒 pUSL16(含卡那霉素抗性基因 Kan^r 6.0kb) 由四川大学分子生物学教研究室刘成君博士后提供。

1.1.3 WEMPF 系统 由四川大学无线电系提供。

1.1.4 阿氏液 等渗低电导液按文[4]方法配制。

收稿时间: 1998-09-08

^{*}国家自然科学基金资助项目
中国知网 <https://www.cnki.net>

1.2 方法

1.2.1 电穿孔的扫描电镜观察 将样品于1000r/min离心5min,去上清液后,先用D-Hank's洗一次,加入2mL同D-Hank's液后静置5min,吸去部分上清液,再在细胞样品中加入2mL等渗低电导液,摇匀,分装于6个5mL的玻璃小瓶中(每瓶0.1mL),利用电场分别处理20,40,60,80和100min,在处理即将结束时,于每瓶样品中加入少许的1%戊二醛以固定细胞,以下步骤同常规扫描电镜观察^[4].对照组样品不经电场处理.

1.2.2 人红细胞电穿孔的台盼蓝掺入实验 将5mL人脐带血样品转入离心管内,加入适量的D-Hank's液洗涤,1000r/min离心10min,去上清液,用等渗低电导液稀释至2mL.取5mL容积的小玻璃瓶6只,在每瓶中各加入上述样品200μL,分两组分别加入T_p染液,在电场中处理(37℃)20,40,60,80和100min(见表1),对照组不处理,放入37℃温箱内.按上述方法,用D-Hank's液洗样品三次,去上清液.在各瓶中,用1mL注射器(5号针头)滴加3滴小牛血清,于载玻片上滴加10μL样品推片,用甲醇固定,涂片用Giemsa-PBS(1:10)染液染色5min,漂洗干后使用显微镜观察.

1.2.3 质粒对枯草杆菌原生质体的电转染 取已高压灭菌的培养皿分组编号,制作DMP培养平板(按表2,卡那霉素为 100×10^{-6} g/mL培养基).将枯草杆菌接种到装有5mL LB液体培养基的试管内,37℃下通气摇床培养过夜.再转接1mL菌液于10mL LB液体培养基上培养至O.D为0.7~0.8.将培养物转入离心管,室温下4000r/min离心10min,去上清液,加入5mL SMMLBP悬浮.在菌液中加入0.5μL溶菌酶-SMMLBP溶液,37℃下轻摇脱壁1.5~2h至99%的细胞在相差显微镜下呈球形.用SMMLBP洗原生质体,去上清液后定容至5.0mL.取0.1mL经用SMMLBP稀释50倍后分装到Ⅱ1,Ⅱ3,Ⅳ1~5各小瓶中,每瓶500μL.在剩余样品中,加入 50×10^{-9} g/μL质粒50μL,混匀,分装到Ⅱ2,Ⅲ1~5各小瓶中,每瓶500μL.将Ⅲ1~5,Ⅳ1~5,Ⅳ1~5各小瓶放入电磁场中处理20,40,60,80和100min.然后将所有小瓶中的样品涂布于相应的平板上.所有平板在37℃下培养48h以上.

1.2.4 细胞的电融合 将鸡血转入离心管,以1000r/min离心5min,去上清液.用D-Hank's液洗两次.再用等渗低电导液洗一次,1000r/min离心10min,去上清液.将样品装入6个小瓶内,各100μL.再各加入500μL等渗低电导液.分组,在电场中按0,20,40,60,80,100min处理.处理后加2mL培养基(1640+小牛血清=4),37℃下温育3h,吸去上清液.每瓶加5滴牛血清,混匀,取10μL涂片.甲醇固定.Giemsa染液染色5min.漂洗,晾干,光学显微镜观察.

2 结果与分析

2.1 电穿孔的扫描电镜观察

电镜扫描观察的结果如图1.由图1可见,在红细胞上出现直径为0.1~0.9μm的孔洞,有的甚至达1.8μm,还观察到有小泡从膜上凸起或在膜上出现凹陷,各约为1%.

小泡、孔洞、凹陷这些形态仅是加入戊二醛固定瞬间的形态,这正好说明在电场照射下,其膜经历了丰富的形态变化过程.可能是由于电磁脉冲对细胞骨架产生影响的结果.也可能是电穿孔可逆过程的形态学证据.根据Zimmerman的理论,球形细胞暴露于外电场 E 中,所引起的膜电压为 $V = 1.5qE \cos \theta$, q 为细胞半径, E 为电场强度, θ 为给定膜与电场方向的夹角.当 V 大于一定数值时(通常为1~2V)会导致可逆电击穿,由此可计算出所需外加的电场强度约为几kV/cm^[6].

我们所用的电场强度仅为 $20\text{V}/\text{cm}$,仍可引起电穿孔,这是 Zimmerman 理论所不能解释的.击穿电压的巨大差别表明,强电场与弱电场的电穿孔可能有着不同的作用机制.在上述实验条件下,穿孔的原因可能为:1. WEMPF 对膜上许多较为敏感的压控型离子通道具有作用,微小的电压变化就可以开启细胞内外离子的对流,从而导致膜结构发生变化形成电穿孔. 2. 实验所用电场为重复周期信号,这种周期性的策动力可能对细胞膜结构产生某种谐振,或是同步蛋白质的构象振荡,从而形成电穿孔. 3. 以一种机械冲击力的形式将膜击穿.

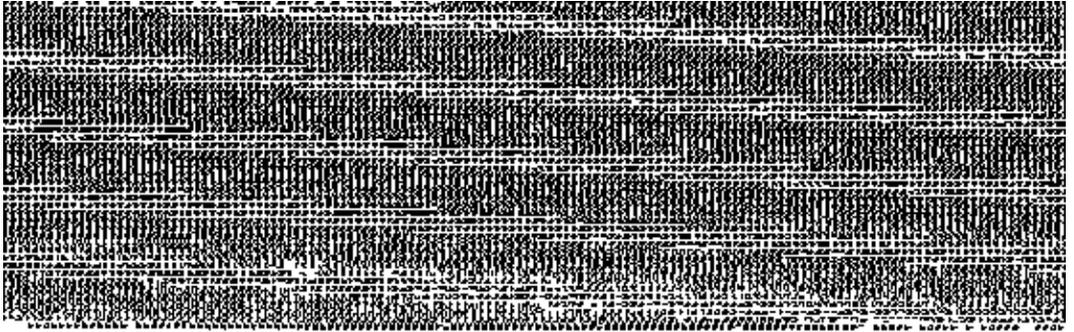


图1 细胞扫描电镜图谱

从左至右分别为:a.正常细胞;b.穿孔细胞;c.凹陷细胞;d.示小泡

2.2 人红细胞电穿孔的台盼蓝掺入实验

在正常情况下活细胞对台盼蓝是拒染的,但在电场作用下却能渗入细胞,且细胞被染成兰色,和对照组相比,经电场处理后的细胞体积普遍明显变大(见表1和图2).电场处理 20min 时,其透入率最高, 60min 时最低.其余各组无显著差别.

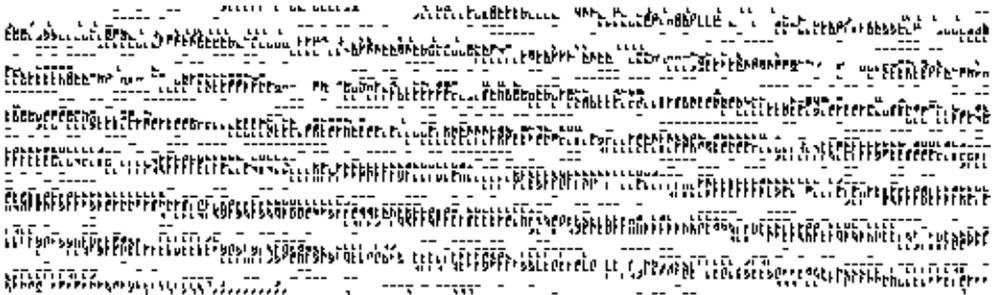


图2 台盼蓝分子进入细胞

图3 细胞融合

经电场处理的红细胞,其体积都明显变大,这是由于在电场作用下,细胞膜渗透性改变,等渗低电导液中的蔗糖分子(分子量340)、 MgCl_2 经电致孔洞进入细胞,从而导致细胞渗透压降低,使水进入细胞并膨胀,造成细胞膜变薄.这就从另一角度证实低电脉冲的电穿孔作用.利用 WEMPF 的电穿孔作用与 www.cnki.net 用快速冰冻法观察到的直径在 $20\sim 110\text{nm}$ 的孔洞相比,我们所

观察到的孔洞直径达 μm 级.这是由于所用处理方法(电击源、电击液、固定液)不同还是由于材料的不同,有待进一步研究.

表1 细胞膜电穿孔的 T_p 小分子透入实验

处理时间(min)	20	40	60	80	100
计数总数	1153	1080	1139	1122	1100
透入总数	296	187	159	170	195
透入率(%)	25.67	17.31	13.96	15.15	17.73

2.3 质粒对细菌原生质体的电转染(表2)

DMP 不处理 II 1用于检测原生质的生长情况; II 2用于检测质粒的自发转染率; III 3用于检测原生质体的本底突变.结果表明,原生质生长良好,无自发转染率及本底突变. DMP 处理检测组 III 及对对照组 IV 分别用于检测在处理后的质粒转染率及突变率.结果表明,两组均有抗卡那霉素的菌落存在,扩大培养后用碱裂解法提取质粒,再用电泳分析,没有发现质粒的 DNA 带.说明抗菌菌落并非电转染所致.综上所述我们认为,抗菌菌落是由电磁脉冲诱发的.

枯草杆菌电转染实验失败的原因可能是:1. 菌膜的特殊性,在该条件下不能穿孔;2. 穿孔太大引起杆菌死亡;3. DNA 被 WEMPF 破坏,即使进入也不能表达;4. 实验程序不合理, DNA 还来不及表达细菌即被杀死.我们将进行进一步的研究.将菌落重新转接在含同样浓度的卡那霉素培养基上,连续3次,可继续生长.具有遗传稳定性.该实验为 WEMPF 的诱变作用提供了证据,至于诱导的机理有待进一步研究.

表2 电转染分组实验及结果*

分组情况	DMP 不处理				DMP 处理检测组					DMP 处理对照组			
	IV 5	II 1	II 2	II 3	III 1	III 2	III 3	III 4	III 5	IV 1	IV 2	IV 3	IV 4
处理时间 (min)	0	0	0	20	40	60	80	100	20	40	60	80	100
原生质体	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
卡那霉素	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
质粒	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
菌落数	4000	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	2	-

* +:表示存在; -:表示不存在

2.4 细胞的电融合

可以观察到细胞发生融合.但频率较低.约为1%(图3).

参 考 文 献

- 1 Astumin D. *Bioelectrochem and Bioenergetics*, 1991, 25:455
- 2 Tsong T Y. *Biophys J*, 1991, 60:297~306
- 3 汪和睦,汪军. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 21(4):323
- 4 王子淑. *人体及动物细胞遗传学实验技术*. 成都:四川大学出版社, 1987
- 5 Chang D C, Reese T S. *Biophys. J*, 1990, 58:1~12
- 6 Zimmermann U, et al. *Biophys. J*, 1994, 14:881~899

STUDY ON ELECTROPORION OF CELL MEMBRANE INDUCED BY WEAK PULSED ELETROMAGNETIC FIELDS

Chen Mingfu Wang Xizhong Wang Zhishu Chen Wenyuan

Wang Jue Wang Rong

(Department of Biology, Sichuan University Chengdu 610064)

Wang Baoyi Zhang Hong Li Fengqun Zou Dahua Liu Changjun

(Department of Radio-Electronic, Sichuan University Chengdu 610064)

Abstract Four experiments have been sep up to study whether the WEMPF elicits effects of electroporation, electrotrasfection and eletrofusion or not. 1. Fixatation by glutaraldehyde before finishing exposure and then directly observ the surface of the chicken erythrocyte through SEM. 2. By tracing Trypan blue as an indicator to observe whether small molecular enter the human erythrocyte. 3. Bacilluse Subtibis eletrotrasfection. 4. Chicken erythrocyte eletrofusion. It ' s found that: 1. After exposure, proes(0. 1~0. 9 μm , esp. 1. 8 μm), bubbles or concave are observed in the membrane surface, which is 1% and have no apparent relation to time of exposure. 2. Trypan blue enter human erythrocyte while all of them become large obviously. 3. WEMPF fail to result in eletrotrasfection in this condition but unexpectedly induce Kan-resistance which has genetic stability. 4. WEMPF can induce eletrofusion, however, probability is low, about 1%.

Key words weak pulsed eletromagnetic fidds (WEMPF), erythrocyte, electroporation