

8 Xu C, Wei B, Liang J, et al. Structure and electrical resistivity of the Al-carbon nanotube composites. *Metals and Materials*, 1998, 4: 620

9 Ebhesen T W, Ajayan P M. Large scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature*, 1992, 358: 220

10 Rodriguez N M, Kim M S, Baker R T. Carbon nanofibers. A unique catalyst support medium. *Phys Chem*, 1994, 98: 13108~13111

11 Ajayan P M, Iijima S. Capillarity-induced filling of carbon nanotubes. *Nature*, 1993, 361: 334

12 Ajayan P M, Stephan O, Redlich P H, et al. Carbon nanotubes as removable templates for metal oxide nanocomposites and nanostructures. *Nature*, 1995, 375: 564~567

(1998-12-22 收稿, 1999-03-08 收修改稿)

低强度快速电磁脉冲导致细胞电穿孔的研究

刘长军^① 王保义^① 张 弘^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 采用宽频带横电磁传输室, 在实验中发现低强度快速电磁脉冲作用可以导致细胞产生电穿孔和电融合等现象, 并初步分析了机理和应用前景.

关键词 电磁脉冲(EMP) 电穿孔 电融合 机理初探

电穿孔(Electroporation)是指在脉冲电场作用下, 导致细胞膜或组织膜半透性丧失, 膜上出现穿孔的生物物理现象. 目前主要集中于研究单个或数个高强度脉冲电场作用下细胞膜或组织膜的穿孔现象, 其场强一般在 $10^5 \sim 10^6$ V/m 之间, 而脉冲时间一般为 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ s 量级. Weaver, Song 和 Zimmermann 等学者对高强度电脉冲导致电穿孔的机理和应用做了详细的分析^[1~3].

对于电穿孔现象, 通常场强小于 10^4 V/m 即为低强度, 只有少数研究者进行了低强度电场下相关生物效应的研究. 如 Song 等人采用场强为 $(5 \sim 20) \times 10^3$ V/m 的低频电场, 在 *E. coli* (JM105) 细胞与 DNA 的尺度比例为 50~75 的情况下, 成功地观察到质粒的电转染现象^[4], 其实验中使用了正弦波、方波和三角波等不同的电磁源, 频率为 $0.1 \sim 10^6$ Hz. Song 观察到了电转染现象, 并不能直接确定低强度电场会导致细胞电穿孔. 我们在研究瞬态电磁场生物效应的基础上^[5], 采用峰值场强为 2×10^3 V/m 的低强度脉冲电场(EMP)以 300 Hz 的重复频率照射动物血细胞. 实验中脉冲宽度为 10^{-7} s, 上升时间为 1.2×10^{-9} s, 由于脉冲宽度和上升时间均较短, 所以称为快速电磁脉冲. 辐射后, 通过扫描电镜直接观察到了细胞膜表面穿孔现象, 从而首次证实低强度快速电磁脉冲也可以导致细胞电穿孔.

1 材料与方法

脉冲电磁源选用 MFD-1A 型毫微秒脉冲发生器, 其脉冲波形近似为矩形. 实验中采用脉冲电压 187 V, 脉冲宽度为 10^{-7} s, 重复频率为 300 Hz. 使用自行研制的宽频带横电磁传输室(BTEM 室), 可以较好地模拟自由空间辐射条件. BTEM 室的性能和在瞬态电磁脉冲实验中应用, 具体可分别参考文献[5, 6]. 输入脉冲电压为 187 V 时, BTEM 室内生物样品处的峰值场强为 2×10^3 V/m.

本次实验系统中增加了恒温装置,使 BTEM 室内的温度稳定在 37℃. 每组实验重复 2 次,所有对照组和照射组均为 2 个样本.

1.1 电穿孔的扫描电子显微镜观察

取鸡血、阿氏液混合物 10 mL,以 D-Hanks 液洗 3 次,等渗低电导液洗 1 次. 分离后,将 5 滴鸡红血球稀释到 5 mL,分为 6 组各取 0.1 mL. 除对照组外,分别置于 BTEM 室中接受电磁脉冲照射 20, 40, 60, 80, 100 min;每次辐射结束后,加入 0.5 mL 的 1%戊二醛,并以 Formvar 膜支撑,戊二醛-锇酸双固定法固定;丙酮-醋酸异戊脂浓度梯度脱水(50%, 70%, 90%, 100%四级);再以二氧化碳临界点干燥,镀金,最后用扫描电子显微镜观察.

1.2 细胞电融合

取鸡血、兔血和阿氏液混合物,采用同样的方法处理后,除对照组外分别接受电磁照射 20, 40, 60, 80, 100 min.

每次辐射结束后,加 1640 培养基培养 2 h,再制片,用 Giemsa 染色 10 min,显微镜观察. 通过细胞的大小和有无细胞核即可区分鸡和兔的血细胞. 详细的实验步骤和各试剂的配方可参考文献[7].

2 结果与讨论

2.1 细胞电穿孔

通过扫描电子显微镜,可以直接观察到细胞膜上的穿孔. 细胞的电穿孔发生率大于 2%,穿孔的直径为 20~500 nm 不等. 在不同的照射时间 20~100 min 之间,均可观察到穿孔现象,但穿孔率和剂量之间没有明显的关系,其中在 100 min 穿孔率最高可达 3%左右. 图 1 为扫描电子显微镜拍摄到的电穿孔照片,在对照组中,没有发现电穿孔现象.

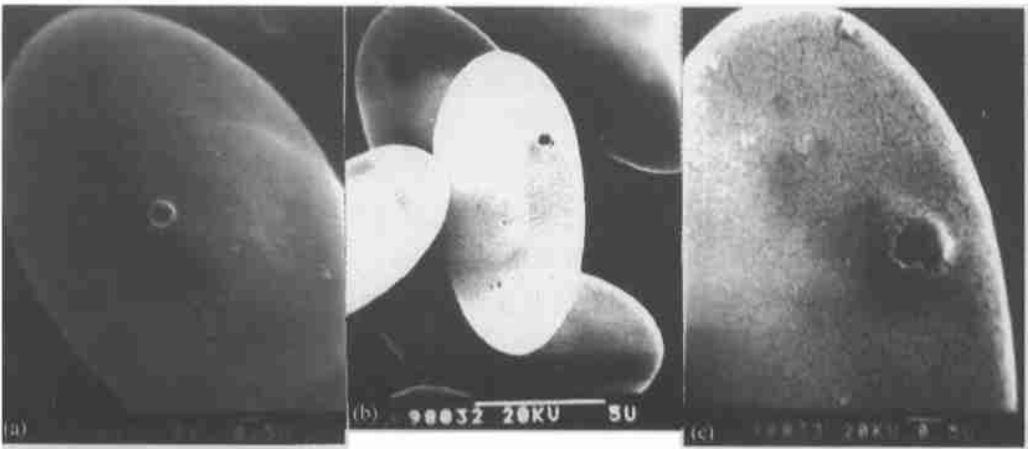


图 1 细胞电穿孔照片

图 2 中照片显示了穿孔中的一些过程. 从图 2(a)可以看到细胞膜上出现穿孔之前,细胞质外溢形成向外的突起;图 2(b)是细胞质喷出,从侧面看到细胞膜向外张开,形成穿孔的情况;图 2(c)是细胞膜愈合时,形成向内的凹陷.

2.2 细胞电融合

相对于电穿孔,电融合的比率相当低,小于 5%. 我们可以观察到鸡和鸡血细胞、鸡和兔

血细胞、兔和兔血细胞之间的电融合现象. 图 3 为鸡和兔血细胞电融合的照片(只选了一张照片作代表).

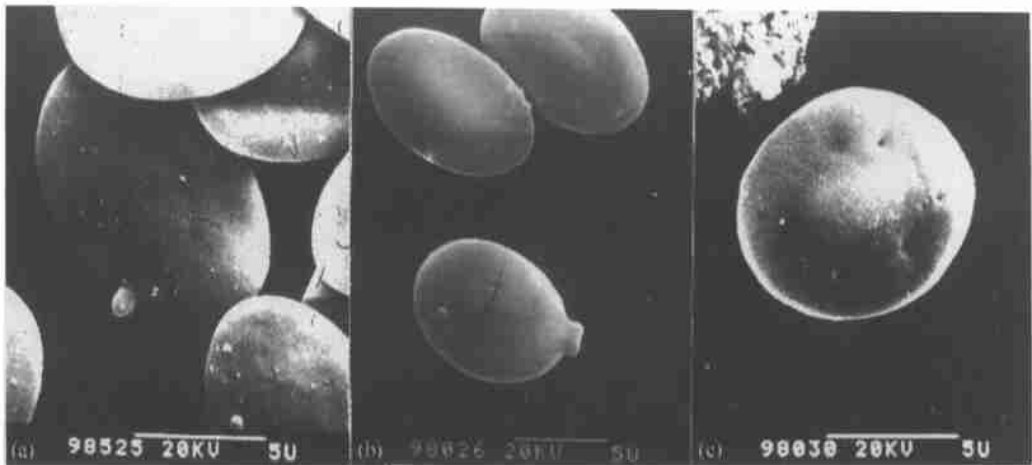


图 2 电穿孔过程

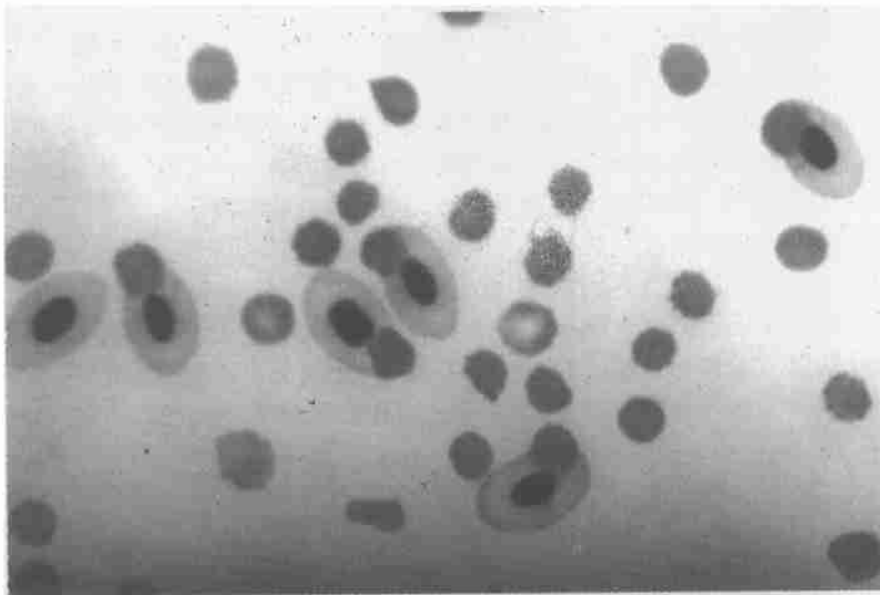


图 3 细胞电融合

2.3 讨论及展望

在 BTEM 室中,生物样品处的峰值场强为 $2\times 10^3\text{ V/m}$. 根据简化的球形细胞电学模型,可以估算电场脉冲所激发的细胞跨膜电位^[8].

正弦电场在球形细胞产生的最大跨膜电位可由式(1)计算:

$$\Delta \Psi_m = \frac{1.5RE}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}}, \tag{1}$$

其中

$$\tau = \frac{RC_m}{r_i + r_e/2}, \tag{2}$$

式中 R 为细胞的半径, E 为电场强度, ω 为角频率, τ 为细胞膜时间常数, C_m 为细胞膜单位面积电容, r_i 和 r_e 分别为细胞质和细胞外溶液的电阻率. 对于低频情况, 当 $\omega\tau \ll 1$ 式(1)可简化为

$$\Delta\Psi_m = 1.5RE. \tag{3}$$

此式也可用于频率较高时细胞跨膜电位极限值的估算. 由于本实验中使用电磁脉冲, 故通过频谱分析可由式(1)计算脉冲电场产生的细胞跨膜电位. 取细胞半径 $R=10^{-5}\text{m}$ 可得脉冲产生的跨膜电位为 18 mV, 远达不到 500 mV 的电击穿跨膜电位阈值, 所以低强度脉冲电场不可能通过电击穿直接导致细胞膜的穿孔. 可见低强度脉冲电场电穿孔的机理与高场强是不同的.

由于热运动的作用, 细胞膜上存在瞬态微孔, 自发产生并且自行愈合. 瞬态微孔的半径一般很小, 只允许无机小分子等通过. 由于细胞膜对离子或带电分子的势垒作用, 使离子不能直接穿过细胞膜. 根据 Weaver 建立的电场与细胞膜作用的模型^[9, 10], 跨膜电位的增加会使细胞膜上的微孔半径趋于增大. 在脉冲电场的重复作用下, 导致瞬态微孔半径趋于增大. 而根据我们的计算, 当细胞膜上的微孔增大后, 会使细胞膜对离子的势垒大幅度下降^[11]. 所以当微孔半径增加到一定程度时, 由于渗透压的原因使小分子和离子大量进入细胞内, 导致细胞膨胀. 细胞的膨胀使细胞膜的表面积增加, 表面张力使微孔半径继续趋于增大, 直至出现穿孔, 细胞质外溢. 由于细胞内容物减少, 所以细胞膜愈合时会形成向内的凹陷.

电融合的比率很低, 可能是由于产生的机理与电穿孔有些区别.

由于采用的电场强度很低有其独特的优势, 可以保证细胞 100% 的存活率. 对生物细胞非常安全, 有利于电穿孔在生物医学工程中的应用, 例如可用于基因转染和促进细胞对药物的吸收. 同时, 研究结果也可解释一些瞬态电磁场的生物效应^[12]. 最近的实验发现低强度电磁脉冲可以提高某类抗癌药物对癌细胞的毒性, 目前正在研究其机理是否与电穿孔相关.

低强度快速电磁脉冲导致细胞电穿孔的研究工作正在进行之中, 是一个较新的研究方向, 其机理不十分清楚, 有待进一步探讨.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:69771020)资助项目.

参 考 文 献

1 Weaver J C. Electroporation in cells and tissues: A biophysical phenomenon due to electromagnetic fields. *Radio Science*, 1995, 30 (1): 205
2 Zimmermann U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1982, 694: 227
3 Song T Y. Electroporation of cell membrane. *Biophysical Journal*, 1991, 60(8): 297
4 Song T Y. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection II. *Biophysical Journal*, 1990, 58(10): 897
5 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): 36
6 Kama Huang, Yongqing Liu. A simple method for calculating electric and magnetic field in GTEM cell. *IEEE Trans*, 1994, EMC 36 (4): 335

7 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. 332~357

8 Gailey P C, Easterly C E. 室 membrane potentials induced during exposure to EMP fields. *Electro-and Magnetobiology*, 1994, 13(2): 159~165

9 Powell K T, Weaver J C. Transient aqueous pores in bilayer membranes: a statistical theory. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1986, 15: 211~227

10 Weaver J C. Decreased bilayer stability due to transmembrane potentials. *Physics Letters*, 1981, 86A: 57

11 刘长军, 王保义, 张 弘. 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(自然科学版)*, 1998, 35(1): 55

12 王保义, 刘长军, 郭庆功, 等. 电穿孔——解释生物体非热生物效应的关键机理. *四川大学学报(自然科学版)*, 1997, 34(3): 310

(1999-01-04 收稿, 1999-03-25 收修稿)

药物分子与其受体的快速对接方法研究

陈健全 迟翰林

(中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 分子的快速对接方法是理性药物筛选的研究热点之一. AEDock 是在 AutoDock2.4 基础上开发的分子对接软件. 为改善构象搜索功能, 而采用退火进化算法代替 AutoDock2.4 软件中的模拟退火算法(simulated annealing algorithm, SA), 因为退火进化算法(annealing evolution algorithm, AEA)综合了模拟退火算法和遗传算法(genetic algorithm, GA)的优点. 已证明 AutoDock2.4 可预测多达 8 个旋转键的柔性配体与刚性大分子的结合构象. 采用体积较大的 HIV-1 蛋白酶抑制剂 XK263 分子和其他常用分子的测试结果表明, AEDock 可成功预测多达 10 个旋转键的柔性配体与刚性大分子的结合构象. 此外, 搜索所需的结合态与 SA 算法相比要少, 成功率却高.

关键词 药物设计 分子对接 遗传算法 模拟退火算法 退火进化算法

研究快速的分子对接方法是理性药物筛选的重要课题. 分子对接算法, 实际上可作为配体-受体复合物构象的预测问题, 或系统结合态能量极值的空间搜索问题来处理. 即便受体分子为刚性, 分子对接所涉及的搜索空间仍非常巨大, 解的数目仍很可观. Gehlhaar 等人^[1]曾以某柔性小分子为例, 粗略估计其搜索空间至少含 10^{30} 个解. 发展快速有效的搜索算法, 一直受到关注, 甚至被认为分子对接能否用于药物筛选的关键. 近年来, 分子对接搜索算法的研究已有很大进展, 除了 SA 与 GA 之外, 还有分子动力学法、Tabu 搜索及有限循迹搜索(limited back-track search)及遗传运筹算法等应用的报道^[1~4]. 其中, SA 算法是解决组合优化问题的经典算法. AutoDock2.4 便是在构象搜索中应用 SA 算法而由 Morris 等人^[2]开发出的, 其组成部分为 AutoDock, AutoGrid 及 AutoTors, 可有效地对接多达 8 个可旋转键的柔性配体. GA 作为一种启发式搜索算法而在随机数学中兴起, 也已成功地应用于分子对接.

本文拟用的 AEA, 综合了 GA 和 SA 算法的优点, 至今尚未见到在分子对接中应用的报道. SA 算法以单点迭代方式优化一个解, 而 AEA 通过“变异”与“选择”等类似生物进化的方式逐渐改善一个解的群体. 为此, 我们设想在 AutoDock2.4 程序中用 AEA 替代原 SA 算法, 期望提