

家兔红血细胞电穿孔的特殊现象

张弘¹, 刘长军¹, 王保义¹, 王子淑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:采用低幅度瞬态电磁脉冲(峰值场强 $20\text{V}/\text{cm}$), 在超宽频带横电磁波传输室(BTEM Cell)中对家兔红血细胞进行照射. 通过扫描电镜观察, 发现低幅度瞬态电磁脉冲对家兔红血细胞的影响非常强烈, 照射后许多细胞发生了电穿孔, 穿孔率可达 60% 左右, 孔洞直径可达 $0.6\sim 1.3\mu\text{m}$, 且电穿孔都发生在细胞膜的中心凹陷处.

关键词:电穿孔; 瞬态电磁脉冲; 红血细胞

中图分类号: Q27

文献标识码: A

电穿孔(Electroporation)是指细胞膜在外加电场作用下, 在其双脂层上形成穿孔, 使细胞膜的通透性增强的一个生物物理过程. 目前, 电穿孔技术已广泛用于生物和医学等许多领域^[1,2]. 而对细胞膜的电穿孔及其应用的研究大多是采用单个或几个强电压脉冲作用于细胞, 其电场强度峰值为数 kV/cm 至数十 kV/cm , 脉宽在 $\mu\text{s}\sim\text{ms}$ 量级. 而我们在对弱电磁场生物效应研究的基础上^[3], 采用峰值场强为 $20\text{V}/\text{cm}$, 脉宽 100ns , 重复频率 300Hz 的瞬态电磁脉冲照射, 直接得到了鸡血红细胞电穿孔的形态学证据, 并利用电穿孔促进了细胞的融合以及抗癌药物进入癌细胞^[4,5], 从而增强药物疗效.

采用低强度电磁脉冲作电穿孔及应用的研究, 有便于控制, 对细胞损伤小的优点. 但由于细胞样品的多样性和复杂性, 相同的照射条件对不同种类的细胞的作用也不尽相同, 需要对不同种类的细胞进行广泛而深入的研究, 从而针对具体的细胞种类找到最佳的穿孔条件.

1 实验系统

实验采用周期性瞬态电磁脉冲(TEMP), 其频带很宽, 需要一个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, 其性能详见文献[3]. BTEM Cell 能够很好地屏蔽外界电磁干扰, 其内传输的电磁波是各向同性的准平面波, 其频率范围 $\text{DC}\sim 17.0\text{GHz}$, 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.

实验系统包括瞬态电磁脉冲(TEMP)信号发生器, 超宽频带横电磁波传输室(BTEM CELL), 匹配负载以及取样示波器.

本实验系统采用的 TEMP 信号发生器输出信号为高斯脉冲, 脉冲幅度 187V (样品处峰值

收稿日期: 1999-08-06

基金项目: 国家自然科学基金

中国知网 <https://www.cnki.net>

场强为 $20\text{V}/\text{cm}$), 脉冲宽度 100ns , 上升时间 1.2ns , 重复频率 300Hz , 样品在 BTEM Cell 中接受照射.

2 材料和方法

2.1 材料

家兔耳缘静脉血.

2.2 试剂

1%戊二醛, 1% OsO_4 , 阿氏液[100mL 溶液中含葡萄糖 2.05g , 柠檬酸钠($2\text{H}_2\text{O}$) 0.676g , 柠檬酸(H_2O) 0.055g , NaCl 0.42g], 等渗低电导液(3mmol/L tris, 1mmol/L MgCl_2 , 10%蔗糖, $\text{pH}7.4$), D-Hank's 液, 50%, 70%, 90%, 100%丙酮梯度, 50%, 70%, 90%, 100%醋酸异戊酯梯度.

2.3 方法

(1) 取兔血 1mL , 肝素抗凝, D-Hank's 液离心($1000\text{r}/\text{min}$, 8min)洗涤 3 次, 等渗低电导液洗 1 次, 取兔压积红血球稀释到 3.5mL .

(2) 取 6 个小瓶, 各加样 0.5mL , 1 瓶作对照, 其余 5 瓶置于 BTEM Cell 中进行照射, 照射时间分别为 20, 40, 60, 80, 100min .

(3) 在各组照射结束前 5min 加入 0.4mL 1%戊二醛, 照射后立即补 0.4mL 1%戊二醛, 离心收集细胞.

(4) 以 Formvar 膜支撑, 戊二醛-饿酸双固定法固定.

(5) 丙酮-醋酸异戊酯浓度梯度逐级脱水(50%, 70%, 90%, 100%各 4 级).

(6) CD_2 临界点干燥、镀金、扫描电镜观察.

3 结果与分析

实验结果见图 1(1a, 1b, 1c).

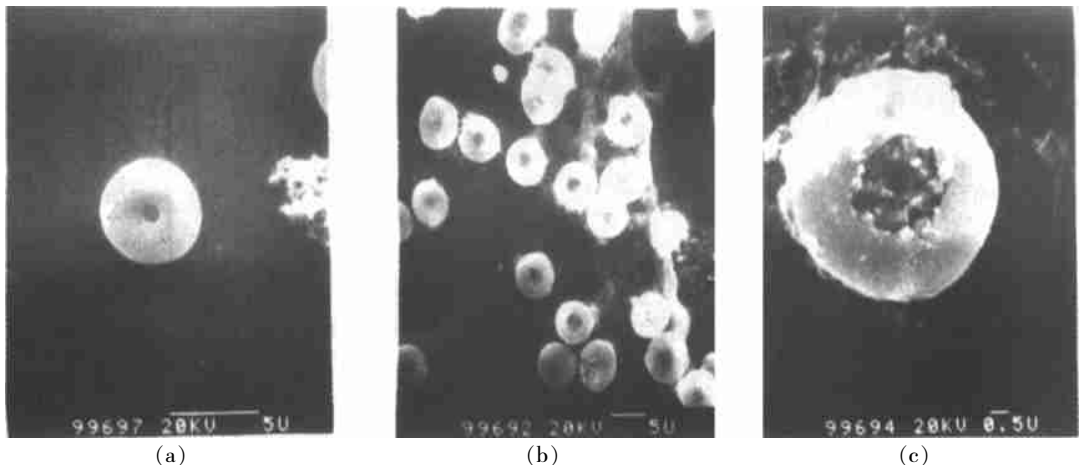


图 1 兔红血细胞膜电穿孔

中国知网 <https://www.cnki.net>

通过扫描电镜观察, 发现在低幅度瞬态电磁脉冲照射后, 兔红血细胞的形态良好, 而细胞

膜发生了明显的电穿孔,统计穿孔率可达 60%左右,且只在细胞膜的凹陷处观察到电致孔洞.孔洞近似于规则的圆形,孔洞直径在 $0.6\sim 1.3\mu\text{m}$,较小的孔洞边缘光滑,而较大的孔洞边缘则不光滑,并可见有细胞膜样的碎块.分析认为,对于较小的孔可能自行修复,即为可逆的,不会对细胞造成损伤,而对于较大的孔,则可能使细胞膜无法复原,甚至坏死,即为不可逆电击穿.

该实验重复做了 3 次,其重复一致性较好.在各照射时段均可以观察到电穿孔现象,穿孔率与照射时间之间没有明显的对应关系,对照组则没有观察到电穿孔现象.

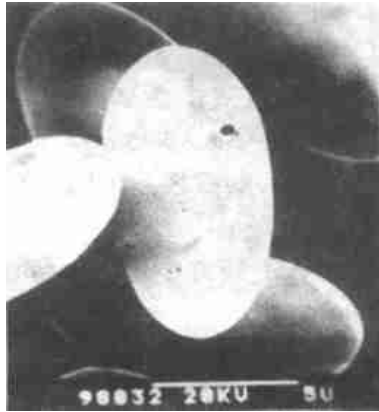


图 2 鸡红细胞膜电穿孔

4 讨论

我们在对鸡红血细胞膜的电穿孔扫描电镜观察中,采用的是与本实验相同的照射条件,发现鸡红血细胞膜的电致孔洞直径在 $20\sim 500\text{nm}$,瞬时穿孔率约为 2%,细胞膜上的孔洞位置是随机的,无规律可言,并且发生的电穿孔是可逆的.而在对兔红血细胞膜电穿孔的扫描电镜观察中,发现兔红血细胞膜的电致孔洞直径更大,为 $600\sim 1300\text{nm}$,穿孔率也更高,约为 60%,其孔洞都出现在细胞膜的中心凹陷处,而且为较规则的圆形,从其较大的孔洞可见细胞膜样的碎块,估计为不可逆电击穿.

对鸡血和兔血红细胞电穿孔现象的观察结果表明,即使是在相同的照射条件下,不同种类的细胞发生电穿孔的情况大为不同.这表明,电穿孔与细胞的种类、结构、形态及组成都有关系.

1990 年 Chang 用快速冰冻电子显微技术揭示了细胞膜电穿孔的动力学特征,表明电穿孔的直径是以细胞骨架网孔为边界,约 $20\sim 100\text{nm}$ ^[6]. Weaver 认为,由于分子热运动的作用,在细胞膜存在随机出现的微孔,这些微孔在外加电场的作用下会逐渐增大,最终导致电穿孔^[7]. Song 则认为,电穿孔首先出现在细胞膜的晶格缺陷上,因为该区分子与邻近分子间的相互作用较弱,活动最自由的^[8].对于许多细胞来说,膜上的微孔是随机出现的,故其电穿孔发生的位置也无规律,如近似于球形的鸡红血细胞电穿孔的情况就是随机的.而兔红血细胞的形状为单凸单凹形,其晶格缺陷是不是在中心凹陷处,而使其电穿孔都发生在该处?这还有待于对其结构作进一步深入的研究.

通过实验发现,峰值场为 $20\text{V}/\text{cm}$ 的低幅度周期性瞬态电磁脉冲对兔红血细胞的影响非

常大.由此,我们设想可以进一步降低瞬态电磁脉冲的幅度,从而在保证一定穿孔率的条件下,减少细胞的损伤.

由于低幅度瞬态电磁脉冲有便于控制,细胞存活率高的优点,在生物和医学领域具有广阔的应用前景.我们通过电穿孔,在细胞融合、将外源基因或蛋白质转入细胞以及将抗癌药物转入癌细胞,从而促进药物吸收方面做了许多有益的工作.目前,正在深入研究低幅度瞬态电磁脉冲对各类细胞电穿孔的最佳条件,以及电穿孔的机理,并对其应用作进一步的研究.

[参 考 文 献]

- [1] Zimmermann U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 694: 227~277.
- [2] Stephane O. *et al.* Transient electroporation of cells in culture; Increase of the cytotoxicity of anticancer drug[J]. *Biochemical pharmacology*, 1995, 37(24): 4727~4733.
- [3] 王保义等.毫微秒电磁脉冲的生物效应实验研究和机理分析[J]. *中国科学(C 辑)*, 1997, 27(1): 35~39.
- [4] 刘长军等.低强度快速电磁脉冲导致细胞电穿孔的研究[J]. *科学通报*, 1999, 44(11): 1157~1160.
- [5] 张弘等.利用弱电磁脉冲对细胞电穿孔提高抗癌药物疗效的研究[J]. *电波科学学报*, 1999, 44(增刊): 397~400.
- [6] Chang D C, Reese T S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy[J]. *Biophysical J*, 1990: 58(1): 1~12.
- [7] Weaver J C. Electroporation in cells and tissues: A biophysical phenomenon due to electromagnetic fields[J]. *Radio Science*, 1995, 30(1): 205~221.
- [8] Song T Y. Electroporation of cell membrane[J]. *Biophysical Journal*, 1991, 60(8): 297~306.

THE SPECIAL PHENOMENA OF ELECTROPORATION ON RABBIT ERYTHROCYTE

ZHANG Hong¹, LIU Chang-jun¹, WANG Bao-yi¹, WANG Zi-shu²

(1. Department of Radio Electronics Sichuan University, Chengdu 610064;

2. Department of Biology Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: Low amplitude transient electromagnetic pulses (peak value 20V/cm) are used to radiate some rabbit erythrocytes in the broad band transverse EM-wave cell (BTEM Cell). Many pores can be observed on the erythrocyte membrane by scanning electron microscope, and it is found by scanning electron microscope that, and the reaction of rabbit erythrocyte is very strong under low amplitude transient electromagnetic pulses irradiation electroporations take place on many erythrocytes. The electroporation rate is about 60%, the diameter of these pores are 0.6~1.3 μm , and the pore is in the center of convex surface.

Key words: electroporation; transient electromagnetic pulse; erythrocyte