

文章编号: 0490-6756(2000)04-0586-04

# 低强度瞬态电磁场下动物细胞的电穿孔效应

彭勇<sup>1,\*</sup>, 王子淑<sup>1</sup>, 王小行<sup>1</sup>, 陈文元<sup>1</sup>, 吴致远<sup>1</sup>, 郭尚勤<sup>1</sup>  
王保义<sup>2</sup>, 张弘<sup>2</sup>, 刘长军<sup>2</sup>, 吕学斌<sup>3</sup>, 曾凯<sup>3</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 四川大学无线电系, 成都 610064; 3. 四川省畜牧研究所, 成都 610064)

**摘要:** 用低强度瞬态电磁场(Transient Electromagnetic Field, TEMF)处理动物细胞后, 一些胞内蛋白可以溢出细胞, 荧光标记抗体蛋白(IgG)可以进入细胞, 通过扫描电镜观察到红细胞膜上有电致孔洞, 证实了低强度瞬态电磁场作用能引起电穿孔。

**关键词:** 瞬态电磁场(TEMF); 荧光标记抗体蛋白(IgG); 电穿孔

**中图分类号:** Q 24

**文献标识码:** A

电穿孔(Electroporation)是指在脉冲电场作用下, 细胞膜的通透性发生改变, 膜上出现孔洞的生物物理现象。目前国外主要研究高强度电磁脉冲场(high electric magnetic pulse field, HEMP)下细胞的电穿孔效应, 其磁场强度一般大于  $10^5 \text{V/m}$ , 脉冲时间一般为  $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{s}$ 。Weaver, Song 和 Zimmermann 等对强电场下电穿孔的机理作了详细的分析<sup>[1~4]</sup>。

我们从 90 年代初就开始研究低电磁脉冲场下细胞的非热生物效应。对电穿孔而言, 场强小于  $10^4 \text{V/m}$  即叫低电场。我们采用超宽频带横电磁传输室(BTEM Cell), 对动物细胞进行了处理, 证明了低强度瞬态电磁场能够引起电穿孔。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 猪血、兔血均取自四川省畜牧研究所; 鸡血、鸭血买自成都市培根路菜市场。

### 1.2 实验方法

1.2.1 低强度瞬态电磁场作用下细胞内蛋白质溢出的试验 取 5mL 阿氏液保存的血细胞(试验中分别用了鸡血、鸭血、猪血), 用 0.85% NaCl 溶液离心(1000r/min, 8min)洗涤两次, 用 0.85% NaCl 溶液将沉淀稀释为 20mL 的细胞悬液, 再在 6 只 5mL 的玻璃瓶中各加入 3mL 细胞悬液, 其中 5 瓶放在 BTEM 室中用电场分别处理 10, 20, 40, 80min, 另外一瓶不做电场处理, 用于对照。将处理后的细胞悬液转入离心管离心(1000r/min, 8min), 取上清液。取对照组的上清液做空白对照, 用 752C 紫外分光光度计测各上清液在 280nm 处的 OD 值。

1.2.2 电穿孔后荧光标记抗体蛋白进入细胞 取 5mL 阿氏液保存的兔血细胞, 用 D-Hank's 液洗 2 次后, 再用适量 D-Hank's 液稀释。取 6 个 5mL 青霉素小瓶, 各分装 0.3mL 细胞悬液和

收稿日期: 1999-11-09

\* 四川大学在读硕士生  
中国知网 <https://www.cnki.net>

1滴荧光标记抗体溶液(用D-Hank's配制成 $1\text{mg}/\text{mL}$ )。以1瓶为对照,其余5瓶置于BTEM-CELL中分别处理10,20,40,60,80min。离心( $1000\text{r}/\text{min}$ ,8min)收集细胞,涂片,甲醇固定,OLYMPUS荧光显微镜观察(紫光激发)。

1.2.3 电穿孔的扫描电镜观察 洗涤分装兔红细胞,共5瓶,每瓶 $0.5\text{mL}$ 。以1瓶为对照,其余4瓶置于BTEM CELL中分别照射10,20,40,60min,在照射终止前每瓶加入1%的戊二醛 $0.4\text{mL}$ 。照射后补加1%的戊二醛 $0.4\text{mL}$ ,以FORMVAR膜支撑,戊二醛-锇酸双固定法固定,逐级脱水(50%,70%,90%的丙酮各一次,100%的丙酮二次,每次8min),以醋酸异戊酯代替丙酮再逐级脱水,用 $\text{CO}_2$ 临界点干燥仪干燥,再用金喷镀,扫描电镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 低强度电磁脉冲场作用下细胞内蛋白质溢出的试验

正常情况下,胞内蛋白不能溢出细胞,电场处理后,如果细胞膜发生了穿孔,一些胞内蛋白就能溢出细胞,用752C紫外分光光度计测上清液 $280\text{nm}$ 处的OD值就可以反映胞内蛋白质的溢出情况。试验结果见表1

表1 细胞内蛋白质溢出情况

照射时间(min)	细胞类型				
细胞类型	10	20	40	60	80
鸡红细胞	0.054	0.074	0.077	0.175	0.240
鸭红细胞	0.002	0.080	0.036	0.033	0.096
猪红细胞	0.033	0.196	0.078	0.090	0.145

### 2.2 电穿孔后荧光标记抗体蛋白进入细胞

在正常生理情况下,外源蛋白质是不能进入细胞的,而细胞经过低强度瞬态电磁场作用后,如果细胞膜发生了穿孔,荧光标记抗体蛋白就可以通过电致孔洞进入细胞。在OLYMPUS荧光显微镜(紫光激发)下观察,发现部分细胞内部有不均匀荧光区域,另有部分细胞整个细胞区都发出明亮荧光,见图1。但在对照组中并未观察到这种现象,因此可以确定低强度瞬态电

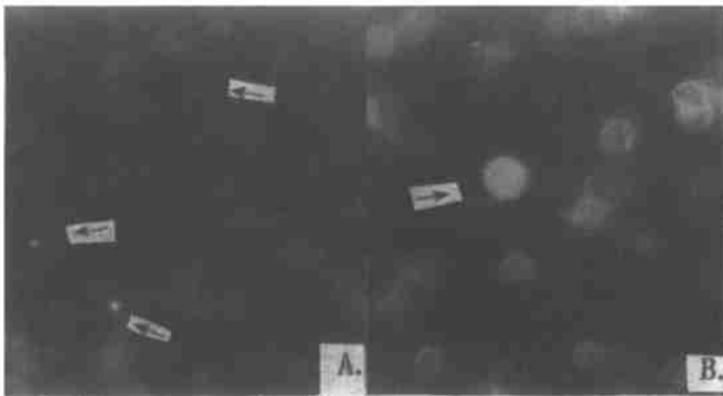


图1 荧光标记抗体蛋白进入细胞

A图箭头处示明亮的荧光斑点;B图箭头示整个细胞发出强烈的荧光

磁场作用导致了细胞膜穿孔,而且孔洞直径大到允许荧光标记抗体蛋白进入细胞内部的程度.我们还观察到几乎所有的细胞边缘都有微弱的荧光,这可能是红细胞固有的成分受紫光激发而产生的或是由细胞折光引起的.

### 2.3 电穿孔的扫描电镜观察

通过扫描电镜观察发现,红细胞的形态良好,只有极个别的细胞发生了变形.我们在电场照射 20min 的样品上观察到了电致孔洞,频率约为 2%,孔洞的直径约为  $2\mu\text{m}$ .只在细胞的凹陷处观察到孔洞,洞口比较圆滑,有小部分孔洞的边缘有大的不规则的缺口,这种孔洞约占整个细胞质膜表面的 30%.试验结果见图 2.

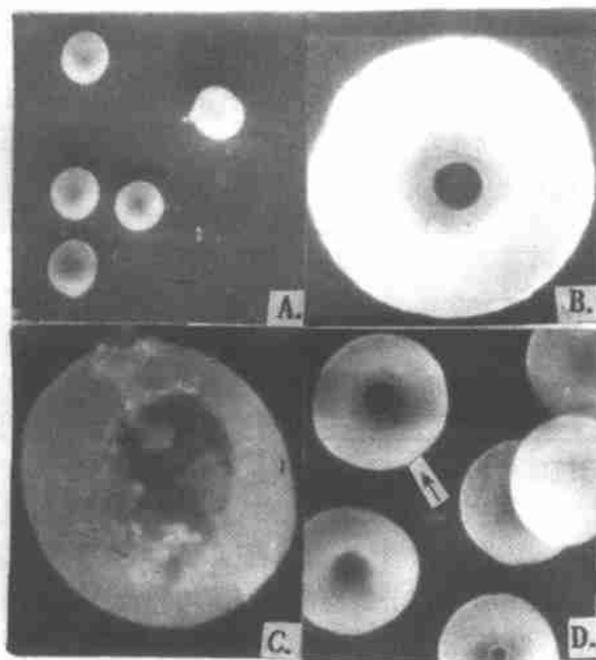


图 2 兔血红细胞电穿孔扫描电镜照片(低电场照射 20min)

A. 对照组;B. 在凹陷处发生穿孔的细胞;C. 穿孔很大而且孔洞形状不规则的细胞;D. 一个视野内的细胞,箭头处示发生了穿孔的细胞

## 3 讨论

在红细胞的内含物溢出的试验中,我们选用了 3 种不同动物(鸡、鸭、猪)的红细胞,虽然个别组的数据有异常值,但胞内物质溢出的总体趋势是随照射时间的增加而增加的,这种增加并不呈线性关系.分析试验数据时,我们发现照射 20min 的 OD 值较大.在其它试验参数不变时,20min 也许是低强度瞬态电磁场的最适照射时间.在做荧光标记和电穿孔的电镜观察实验时,照射 20min 时的现象也比较明显.因为随着照射时间的增加,形成膜孔的机会和实际次数会增加,胞内蛋白质溢出量也会增加,所以 OD 值随照射时间的增加其总体趋势也是增加的.同时随着胞外介质中血红蛋白和其它蛋白质浓度的增加,这种单纯依靠浓度梯度发生的蛋白质外

流速度减慢。胞内蛋白质溢出的试验证实了低强度瞬态电磁场能够导致电穿孔的发生。从溢出试验中光吸收值不大可以看出,虽然细胞膜发生了穿孔,但是由于细胞骨架并未受损,而胞内物质大多与骨架系统相结合,因而胞内物质溢出程度不大。

1990年Chang<sup>[5]</sup>用快速冰冻电子显微技术揭示了细胞电穿孔的动态过程。结果表明,电穿孔触发细胞通透性增大的原初过程在几个毫秒内实现,这时孔洞的直径为20~40nm,接着引发了胞内物质的外喷过程,在20ms内形成了火山口形的孔洞,其直径迅速扩大到以细胞骨架网孔为边界约20~100nm的大小,并在数秒内保持不变。而我们采用在停止电场处理前加入戊二醛即时固定,捕捉到了穿孔的状态,通过扫描电镜的观察,不仅证实了低强度瞬态电磁场作用下电穿孔的发生,而且还测量到电致孔洞的直径为0.5~1 $\mu$ m。从理论上讲,这种大小的孔洞能允许多种物质进入细胞,如一些小型蛋白质、部分质粒、荧光标记抗体,甚至一些动物细胞的微小染色体。

#### 参考文献:

- [1] Weaver J C. Radio Science, 1995, 30(1):205.
- [2] Zimmermann U. Biochemical et Biophysica Acta. 1982, 694:227.
- [3] Song T Y. Biophysical Journal, 1991, 60(8):29.7.
- [4] 王保义, 杨杰斌, 郭庆功, 等. 中国科学(C辑), 1997, 27(1):36.
- [5] Chang D C, Reese T S. Biophys J, 1990:58:1.

## THE ECECTROPORATION OF WEAK TRANSIENT ELECTROMAGNETIC FIELD ON ANIMAL CELL MEMBRANE

PENG Yong<sup>1</sup>, WANG Zi-shu<sup>1</sup>, WANG Xiao-xing<sup>1</sup>, CHENG Wen-yuan<sup>1</sup>  
 WU Zhi-yuan<sup>1</sup>, GUO Shang-qin<sup>1</sup>, WANG Bao-yi<sup>2</sup>, ZHANG Hong<sup>2</sup>  
 LIU Chang-jun<sup>2</sup>, LU Xue-bin<sup>3</sup>, ZHENG Kai<sup>3</sup>

(1. Life Science College, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Department of Radio-electronics, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 3. Sichuan Chuan Institute of Animal Science, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** The authors studied the effects of weak transient electromagnetic field on animal cell membrane. The authors found that after treating with WTEMF (weak electric magnetic pulse field), some cellular proteins could go out of cells, fluorescent antibody (IgG) could go into the cells. In addition, the rabbit red cell after the treatment was examined by scan electric microscope (SEM) to obtain morphological evidence that the cell membrane is really porated. The authors come to a conclusion that WTEMF can induce electroporation.

**Key words:** WTEMF; fluorescent antibody; electroporation