

鸡红细胞在弱的瞬态电磁脉冲作用下的电穿孔研究^{*}

Study on Electroporation under Weak Transient Electromagnetic Pulses on Chick's Red Blood Cells

张 弘 王保义 刘长军

(四川大学无线电系, 成都 610064)

王子淑 陈明福

(四川大学生物系, 成都 610064)

Zhang Hong, Wang Baoyi, Liu Changjun

(Department of Radio Electronics Sichuan University, Chengdu 610064)

Wang Zishu, Chen Mingfu

(Department of Biology Sichuan University, Chengdu 610064)

【摘要】 采用弱的瞬态电磁脉冲, 在超宽频带横电磁波传输室中对鸡红细胞进行照射, 通过扫描电镜观察, 发现在低强度电场(约 $20\text{V}/\text{cm}$) 的作用下, 鸡红细胞出现了电穿孔, 且孔的直径在 $100 \sim 700\text{nm}$ 。初步分析了形成电穿孔的机理。

关键词: 瞬态电磁脉冲, 电穿孔, 鸡红细胞

Abstract: Weak transient electromagnetic pulses (TEMP) are used for radiating on some chick's red blood cells in a broad band transverse EM-wave cell (BTEM Cell). A few pores can be observed on the red blood cell's membrane by scanning electron microscope (SEM) under low electric field (about $20\text{V}/\text{cm}$) irradiation. The diameter of these pores are $100 \sim 700\text{nm}$. The mechanism of electroporation is analysed preliminarily.

Key terms: Transient Electromagnetic Pulse (TEMP), Electroporation, Chick's red blood cell

一、引 言

过去几十年人们对电磁场的生物效应的研究大多集中于强电磁场对生物体致热生物效应的研究, 即生物体吸收电磁波能量后, 体温升高, 进而引起各种生物功能的变化。目前这方面的研究及其应用已趋完善。随着电子技术的迅速发展和广泛应用, 使生活空间的电磁环境日益复杂, 更多的时候生物体处在强度较弱的电磁场环境中, 因而电磁场的非热生物效应研究日益受到人们的重视。所谓非热生物效应是指能量密度较弱的电磁场作用于生物体, 产生与温度变化无关的效应。

电磁场的非热生物效应往往发生在细胞以及分子一级的水平上,因而我们的研究也针对细胞入手。从九十年代中期开始,我们实验室对弱电磁场的非热生物效应进行了较深入和系统的研究。采用低强度的瞬态电磁脉冲(WTEMP)对生物样品进行照射。这种瞬态电磁脉冲的电场强度为 $10\sim 20\text{V}/\text{cm}$,脉冲宽度 $2.4\text{nS}\sim 100\text{nS}$,脉冲前沿 1.2nS ,重复周期远大于脉冲宽度,其平均功率密度接近于零,而其频谱很宽,为 $\text{DC}\sim 1\text{GHz}$ 。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^[1]。家猪血细胞的染色体发生裂隙和断裂^[2]。因而,我们分析,在这样弱的瞬态脉冲电磁场的作用下,细胞会发生电穿孔,进而引起上述现象的发生。所谓电穿孔指在一定的电场作用下,细胞膜脂双层上形成孔的现象。本文采用鸡红细胞进行电穿孔的研究。

二、实验系统

由于瞬态电磁脉冲信号的频带很宽,需要一个超宽频带的测量系统。实验在我们自行研制的能屏蔽外界电磁干扰的超宽频带横电磁波传输室(BTEM Cell)中进行,其内传输的电磁波是各向同性的准平面波,频率范围 $\text{DC}\sim 17.0\text{GHz}$,传输系数大于 0.9 ,驻波比小于 2.0 。这样BTEM Cell即形成了对自由空间的模拟。

实验系统包括TEMP发生器,BTEM Cell,温控仪,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,输出脉冲幅度、宽度及重复频率均可调,这样可使样品处于不同的照射条件下。实验输出脉冲幅度 187V (样品所在处电场强度约 $20\text{V}/\text{cm}$),脉宽 100nS ,重复频率 300Hz 。样品在BTEM Cell中接受照射,温控仪将温度控制在 $37^\circ\text{C}\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

三、材料和方法

3.1 材料:鸡血

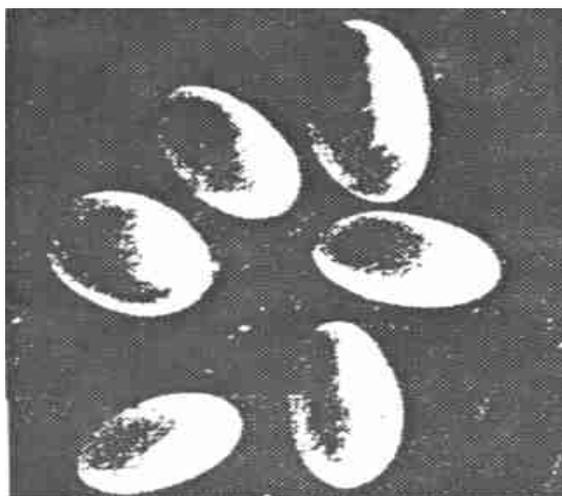
3.2 试剂:

阿氏液,PBS缓冲液,等渗低电导液($3\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, $1\text{mmol}/\text{L}$ MgCl₂, 10% 蔗糖,pH=7.4),D-Hank's液与戊二醛的配制参见参考文献[3]。

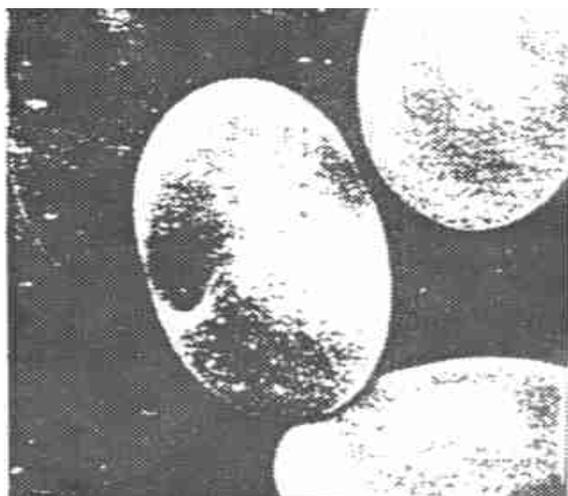
3.3 实验步骤

取鸡血与阿氏液的混合物(1:1)10ml,用D-Hank's液洗3次,等渗低电导液洗1次, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心10分钟。取5滴鸡压积红血球稀释到5ml,取18个小瓶,各加0.1ml。3瓶作对照,其余15瓶置于BTEM Cell中照射,照射时间分为20,40,60,80,100分钟共五组,每组取三个样品,在照射结束前加入1%戊二醛0.5ml以固定细胞形态。样品取出后以聚乙烯醇甲醛(Formaor)膜支撑,静置10分钟,吸去多余样品。随后将小玻片放入小称量瓶底,沿瓶壁加入1%戊二醛浸没,10分钟后用D-Hank's液洗,再加适量1%的OsO₄,一小时后用D-Hank's液洗,然后用不同浓度梯度的丙酮-醋酸异戊酯(50%,70%,90%,100%四级)逐级脱水,二氧化碳临界点干燥,镀金,最后用扫描电镜观察。

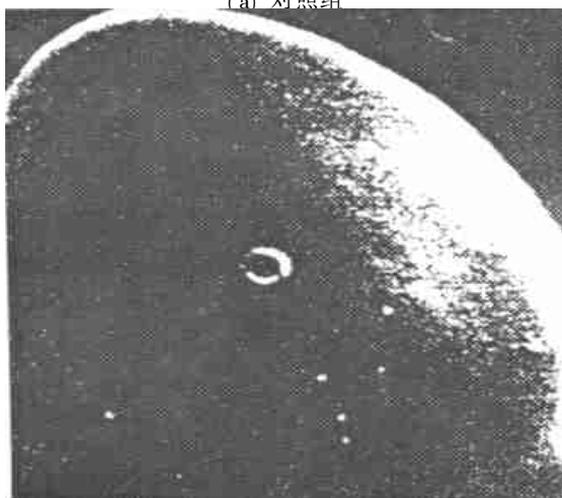
四、结果与分析



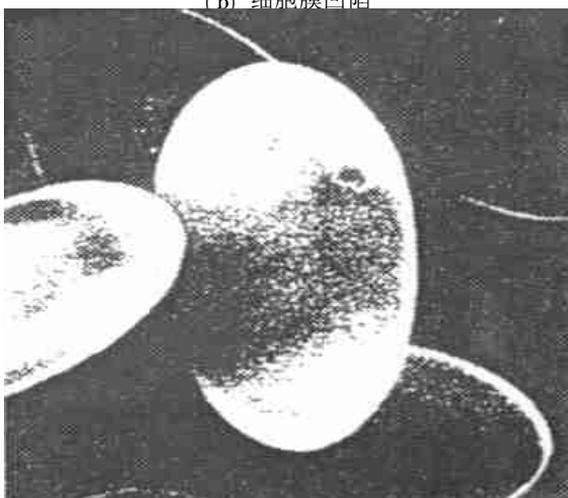
(a) 对照组



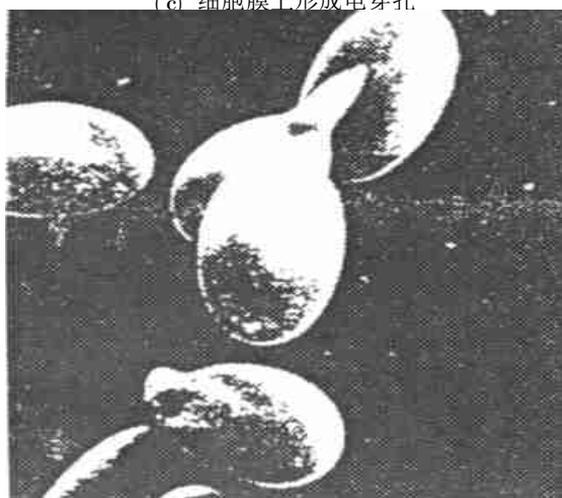
(b) 细胞膜凹陷



(c) 细胞膜上形成电穿孔



(d) 细胞膜上形成电穿孔



(e) 细胞质外喷



(f) 外凸的孔

图1 扫描电镜下观察到的细胞形态

实验重复三次,每次每组三个样品,实验的重复性较好。实验中,电场峰值保持不变。通过扫描电镜直接观察到了弱电磁脉冲的穿孔效应,见图 1(a, b, c, d, e, f)。

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,造成细胞质外喷,使孔洞周围的细胞膜向外凸出。孔洞直径在 $100\text{nm} \sim 700\text{nm}$,瞬时穿孔率在 $2 \sim 3\%$ 左右,而对照组则未观察到穿孔现象。实验发现,在照射的各个时段,均有电穿孔发生,穿孔率差别不大。初步分析,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。但细胞发生电穿孔的最小作用时间还有待进一步探索。穿孔过程与 Chang^[4]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,但我们采用的电场强度小得多,而孔洞直径却比所见报道大得多^[4,5]。

五、讨 论

以往对细胞电穿孔的研究,都是在强电场(大于 $1\text{kV}/\text{cm}$)条件下进行,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十 $\mu\text{s} \sim \text{ms}$ 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 187V ,样品所在处的电场强度 $< 20\text{V}/\text{cm}$ 。理论表明^[6],外电场 E_0 诱导的跨膜电位的最大值为 $V_{max} = 1.5 \times R \times E_0$,其中 R 为细胞半径。对鸡血细胞,长轴 $10\mu\text{m}$,短轴 $6\mu\text{m}$,故在我们的实验条件下,外加场作用于细胞膜上的跨膜电位小于 15mV 。该电位远小于膜的临界击穿电压,而且脉宽只有 100nS ,均远小于所见报道。可见,电穿孔并不是由于跨膜电位达到击穿电压的直接作用而造成的,有理由认为:低电场强度下与高电场强度下的电穿孔过程有着不同的机理。

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,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^[7]。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^[8],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^[9]。由于细胞内外渗透压的不同,造成细胞质外喷,形成电穿孔。而当细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。

参 考 文 献

- [1] 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. 中国科学(C辑), 1997; 27(1): 35~39.
- [2] 王子淑, 邹方东. 兰法拉斯猪脆性位点的初步研究. 第五届全国畜禽遗传标记研讨会论文集, 1996; 5(6): 76~79.
- [3] 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.
- [4] Chang D. C., T. S. Reese. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy.

Biophysical J, 1990; 58(1): 1~12.

- [5] 汪和睦, 李金慧. 细胞电穿孔导入 DNA 的动态特征. 微生物学通报, 1994; 21(2): 67~71.
- [6] Zimmermann U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1982; 694: 227~277.
- [7] 刘长军等. 离子通过细胞膜过程中的能量变化与分析. 四川大学学报, 1998; 35(1): 55~60.
- [8] Xie T. D., Tian Y. T. Song. Study of mechanisms of electric field induced DNA transfection: transfection by low amplitude, low frequency alternating electric fields. *Biophysical J*, 1990; 58(10): 897~903.

难,但对系统的容差仍有一定要求。本文给出的校正法可大大降低这方面的要求,从而为阵列加权获取口径幅相分布这一方案的实用化创造了条件。

参 考 文 献

- [1] 方大纲,孙锦涛,王颖,盛卫星.由阵列相位加权实现雷达横向距离分辨.电波科学学报,1995;第10卷:1~3.
- [2] 方大纲,孙锦涛,张文梅,王颖.一种微波相位测试的新方法.微波学报,1995;11(1):14~18.

方大纲 1966年北京邮电学院无线电系研究生毕

(上接第95页)

- [9] Weaver J C. Electroporation in cells and tissues: A biophysical phenomenon due to electromagnetic field. *Radio Science*, 1995; 30(1):205~221.

张弘 女,1989年毕业于四川大学无线电系,获硕士学位,现在四川大学无线电系工作,主要从事瞬态电磁场理论及应用以及生物电磁学方面的研究。

刘长军 1997年毕业于四川大学无线电系,获硕

(上接第98页)

参 考 文 献

- [1] R. Gedye, F. Smith, K. Westway, et al. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Letters*, 1986; 27(3):279~282.
- [2] 樊兴君,尤进茂,谭干祖等.微波促进有机化学研究进展.化学进展,1998;10(3):285~295.
- [3] [苏]Ю. Ю. 卢里耶著,雷世寰,汪晶,闫雷生译,段凤瑞校.《工业污水的化学分析》,北京:化学工业出版社,1989;121.
- [4] 曲荣君.天然高分子吸附剂的研究.应用化学,1996;13(2):22~25.
- [5] 潘学军,刘会洲,徐永源.微波辐射提取(MAE)

业.南京理工大学电光学院教授,东南大学兼职博士生导师.中国电子学会会士,IEEE高级会员,IEEE Trans. on MTT等多种杂志编委.主要研究方向为电磁场数值计算、微波成像等。

盛卫星 1991年毕业于南京理工大学,现为南京理工大学副教授.主要研究方向是阵列信号处理,雷达,人工神经网络等。

顾继慧 1982年华东工学院雷达系毕业,现为南京理工大学电光学院讲师.主要研究方向是阵列信号处理,数字波束形成等。

士学位,现攻读博士学位,主要从事生物电磁学, FDTD计算和微波化学研究。

王保义 教授,1962年毕业于四川大学无线电系,1981~1982年赴美国密西根大学电气工程系访问学者,长期从事生物电磁学、电磁场目标识别等方面的研究工作.主要著作有“电磁场在目标识别中的应用”、“电磁场在生物医学中的应用”,在国内外发表学术论文50余篇,中国电子学会高级会员。

研究进展.化学通报,1999;(5):7~14.

曹佐英 有机化学硕士,讲师,博士生.近年来在国内外刊物上发表论文十多篇.1997年起,师从赖声礼教授从事新兴交叉学科微波化学的学习和研究工作,研究微波辐射技术在高分子材料改性中的应用。

葛华才 物理化学博士,副教授,硕士生导师.长期从事化学动力学、计算机化学方面的研究,在国内外刊物上发表论文二十多篇,主持广东省自然科学基金资助项目一项,现从事微波化学和精细化学品化学等方面的研究。

赖声礼 见《微波学报》1998年第1期第54页。