

文章编号: 0490-6756(2001)04-0575-05

电磁脉冲各参数对 HeLa 细胞可逆穿孔影响的研究

杨孔¹, 王子淑¹, 郭聪¹, 邹方东¹, 王喜忠¹,
王保义², 张弘², 刘长军²

(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)

摘要: 通过对 HeLa 细胞进行电磁脉冲处理, 可以看到细胞膜电穿孔. 穿孔的几率及深度与脉冲的各参数有关. 细胞膜表面的微绒毛受到一定程度的损伤, 还可见到火山形的喷口和喷出物. 经实验研究, 得到了在离体条件下 HeLa 细胞电穿孔的最佳电脉冲参数.

关键词: HeLa 细胞; 电磁脉冲; 电穿孔; 电化学治疗

中图分类号: Q24

文献标识码: A

Weaver, Song 和 Zimmermann 等对强电场下电穿孔的机理作了详细的分析^[1~3]. 我们从 20 世纪 90 年代初起开始研究在电磁脉冲场下细胞的非热生物效应. 经过电场处理后, 观察到细胞的电穿孔现象. 为有效地运用电穿孔结合化学药物治疗人宫颈癌提供一种新的治疗手段, 我们对 HeLa 细胞(人的宫颈癌细胞)进行了电脉冲处理, 在处理过程中加入戊二醛固定, 有效地捕捉到穿孔的状态, 通过扫描电镜观察到膜上有电致孔洞, 这有力地证明了电磁脉冲场能够引起电穿孔, 并观察到一些细胞胞内的蛋白溢出了细胞和火山形的喷口. 通过改变电脉冲各参数观察比较, 获得了在离体条件下细胞电穿孔的最佳条件, 并对影响穿孔的因素作了初步的分析.

1 材料与方法

1.1 处理系统

LN-101 基因脉冲导入仪 系天津理工学院和天津飞龙电子仪器厂生产, 主要性能指标如下: 1. 电源 220V AC 50Hz; 2. 最大脉冲电压 100V~2500V 连续可调; 3. 最大脉冲电流 150A; 4. 电容范围 0.5~21.5 μ F, 间距 0.5 μ F 步进可调; 5. 数字显示 脉冲电压预置值、脉冲电压和时间常数实测值; 6. 尺寸 22cm $\times$ 40cm $\times$ 30cm; 7. 重量 15kg.

整机由微机控制, 工作安全可靠, 使用方便. 可由数字显示脉冲电压的预置值、脉冲电压和时间常数的实测值. 配有精密的高压组合电容(0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 4.0, 10 μ F), 可以任意组合使用. 仪器背面有高压脉冲引出线与反应小池连接.

1.2 材料

1.2.1 HeLa 细胞 由华西医科大学分子实验室提供, 并由我们传代到第十代对数生长期. 综合培养基为 DMEM 90%, 小牛血清 10%; 青霉素和链霉素的终浓度各为 100U/mL. 37 $^{\circ}$ C 下于培养箱中培养.

1.3 方法

先将对数生长期的细胞用胰酶从培养瓶上消化下来, 再用等渗低电导液洗两次, 处理时把细胞加入到基因脉冲导入仪的反应小池中处理, 具体处理的方法是: 固定脉冲数为 3 个、电容 10 μ F, 分别由 0V, 300V, 500V 和 700V 电压处理细胞. 再改变脉冲数为 4 个, 5 个和 6 个, 同样方法处理细胞. 在处理过程中加入 1% 戊二醛 0.2mL, 处理后再加 1% 戊二醛 0.2mL. 另外, 每一次处理设一组不处理, 再设一组处理但不滴加戊二

收稿日期: 2001-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(60071024)

作者简介: 杨孔, 男, 四川大学生命科学学院 1999 级硕士生.

醛·处理后的细胞用戊二醛、锇酸双固定,再用丙酮和醋酸异戊酯梯度脱水,然后临界点干燥,镀膜,扫描电镜观察,记录不同电压和脉冲数处理细胞的穿孔情况·

用电压 500V 和脉冲数为 5 个的条件下,分别由 0,4μF,6μF,8μF 和 10μF 电容处理细胞·电压为 700V 时,由同样方法再重复作一次·处理后的细胞用戊二醛、锇酸双固定,再用丙酮和醋酸异戊酯梯度脱水,然后临界点干燥,镀膜,扫描电镜观察,记录不同电压和电容处理细胞的穿孔情况·

处理前在含细胞的等渗低电导液中加入一滴台盼蓝,然后再处理细胞,并设对照组,处理后离心洗涤细胞两次洗去溶液中的台盼蓝,离心收集细胞并滴于载玻片上用甲醇固定,OLYMPUS 显微镜观察台盼蓝进入细胞的位置,并用 OLYMPUS 显微镜摄影仪摄影·同时通过计数计算台盼蓝进入细胞的几率·

2 实验结果

2.1 电压对细胞穿孔的影响

首先,我们固定电容、脉冲个数,然后逐步改变电压以考察它对穿孔的影响·如图 1 所示,当固定电容为 10μF、脉冲个数为 3 个时,电压分别为 0,300V,500V 和 700V 时的结果表明,在 0,300V 时没有穿孔发生;而 500 V,700 V 时有穿孔发生,孔的个数多为 1~3 个;500V 时穿孔的几率为 24%;700 V 时穿孔的几率较大,为 31%·固定脉冲个数为 4 个、电容为 10μF 时,0V,300V,500V 和 700V 时的穿孔几率分别为 0,44%,70%和 75%·固定脉冲个数为 5 个、电容为 10μF 时,0V,300V,500V 和 700V 时的穿孔几率分别为 0,60%,81%和 78%·固定脉冲个数为 6 个,电容为 10μF 时,0V,300V,500V 和 700V 时的穿孔几率分别为 0,63%,79%和 76%·从以上结果可以看出,当脉冲个数和电容不变时,随着电压的升高,电穿孔的几率增大,在 5 个脉冲和 500 V 时为最大,可达到 81%·

2.2 脉冲个数对细胞穿孔的影响

固定电压、电容,然后逐步改变脉冲个数以考察它对穿孔的影响·如图 2 所示·先将电压固定为 300 V,电容固定为 10μF,使脉冲数分别为 0,3 个,4 个,5 个和 6 个,其穿孔几率分别为 0,0,44%,60%和 63%·固定电压为 500V、电容 10μF,使脉冲数为 0,3 个,4 个,5 个和 6 个,其穿孔几率分别为 0,24%,70%,81%和 79%·固定电压为 700V,电容 10μF,使脉冲数为 0,3 个,4 个,5 个和 6 个,其穿孔几率分别为 0,31%,75%,78%和 76%·以上结果表明,在电压、电容不变时,穿孔的几率与脉冲个数成正相关,在 5 个脉冲时达到最大·

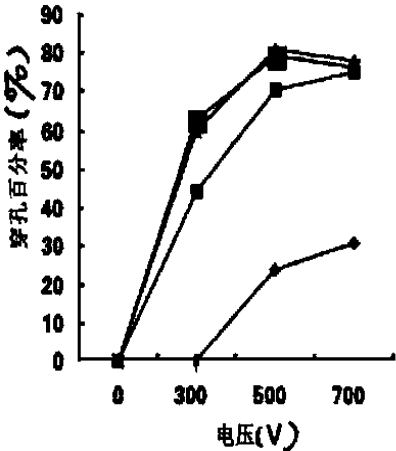


图 1 电压对穿孔几率的的影响
(3,4,5,6 表示脉冲的个数)

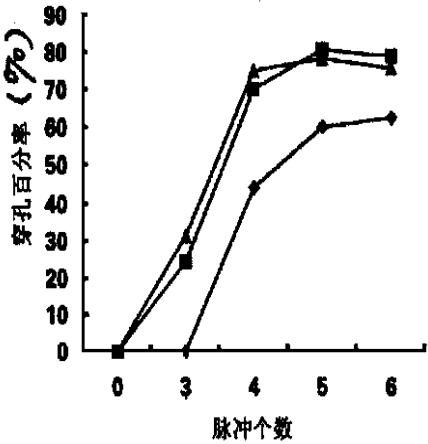


图 2 脉冲个数对穿孔几率的影响
(300V,500V,700V 分别代表电压)

2.3 电容对穿孔的影响

固定电压和脉冲个数,改变电容考察其对穿孔的影响.如图3所示,固定电压为500V、脉冲个数为5个,使电容分别为0,4,6,8和10 μF ,其穿孔几率分别为0,58%,72%,86%和81%.固定电压为700V、脉冲个数为5个,电容为0,4,6,8,10 μF 的结果分别为0,66%,74%,85%和78%.以上结果表明,在电压和脉冲数一定时,穿孔的几率随电容的增大而增大,在8 μF 为最大,可达到86%.

2.4 穿孔的性质

从图版4-A,-B,-C可以看出,穿孔的深度与电压有关,火山形的喷口和喷出物如图版4-D,-E所示.电压对单个细胞穿孔的影响如图版4-F,-G,-H,-I所示.单个细胞被穿孔的多少随电压的增大而增多.

由以上实验结果可见,当脉冲电压为500V,电容为8 μF ,脉冲个数为5时,穿孔的几率为最大.

3 讨论

由图1,2,3可知,脉冲电压、个数、电容对穿孔的影响曲线有着相近之处.随着脉冲电压、个数、电容的增强,穿孔的几率随之增大.这一结果与郑强^[5]、汪和睦^[6]、Gunter A. Hofmann^[7]等的结果相一致.Chang^[4]认为,电穿孔作用是触发细胞电通透性增大的原初作用,在几秒内形成直径为20~40nm的电致穿孔.接着,由于胞内物质外喷的次级作用形成火山口形的孔洞,该过程在 $20 \times 10^{-3}\text{s}$ 内实现,孔洞直径扩大至20~100nm,即扩大至细胞膜骨架网孔大小时便趋于稳定.上述以细胞膜骨架网孔为边界的孔洞在数秒内几乎保持不变;最终由于类脂分子的重新排列成有序结构,膜孔洞的结构自发地变小,直至重新封闭复原.孔洞出现的几率与最低的脉冲电压有关,只有达到一定的电压才能使细胞出现穿孔,而且即使电压达到了,还需要有一定的处理时间,这是由于较长脉冲时程的外电场延长了电致穿孔的寿命,有利于引发孔洞扩大的次级过程.

脉冲的个数直接影响处理的时间,如果两个脉冲之间间隔的时间小于孔洞恢复的时间,效果更加明显.电压增强、脉冲个数增多,使单一细胞的穿孔亦增多,而且比较明显,但对孔的大小影响不大,这可能与膜骨架网孔有关.在电场处理过程中未加戊二醛固定的细胞,在扫描电镜下未观察到穿孔,从而证明电穿孔是可逆的.无论受到多大的脉冲电场处理,细胞表面的微绒毛均受到损伤.

实验中还发现,电穿孔几率同细胞的活性有关,如果细胞处于活跃的对数生长期,则穿孔就比较容易.郑强^[5]等的实验证明,溶液中的 Ca^{2+} , Mg^{2+} 离子也影响穿孔的几率.

通过台盼蓝实验,穿孔的深度与上述参数也有关,从我们的实验中发现,一般穿孔仅达到细胞质,但在500V和700V时发现,有些到达细胞核.

孔洞形成时细胞内溶物有喷出的现象,并形成火山形口,如图版4-G,-D和-E中的孔洞、火山喷出物,火山形口.细胞内溶物喷出是一个非常快的过程,所以,在有的照片中就未能观察到上述现象.

理论界认为,细胞膜是电磁场作用的原发位点.在正常的生理条件下,细胞膜的双脂层对离子和亲水性分子是一很好的阻挡层,但细胞膜的通透性很容易受跨膜电位影响.当膜电压达200mV时,细胞膜就具通透性和可融合性.构成膜的脂分子和蛋白质分子除了本身的热运动外,在外加电场的作用下也可以重新取向和排列.由于细胞膜是一种处于亚稳定的系统,它具有晶态和液晶态两种状态,这就使细胞膜上存在着很多瞬

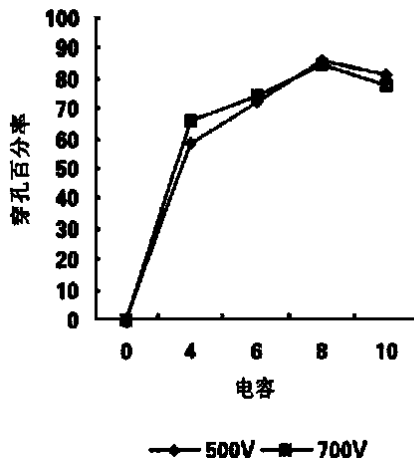


图3 电容对穿孔的影响

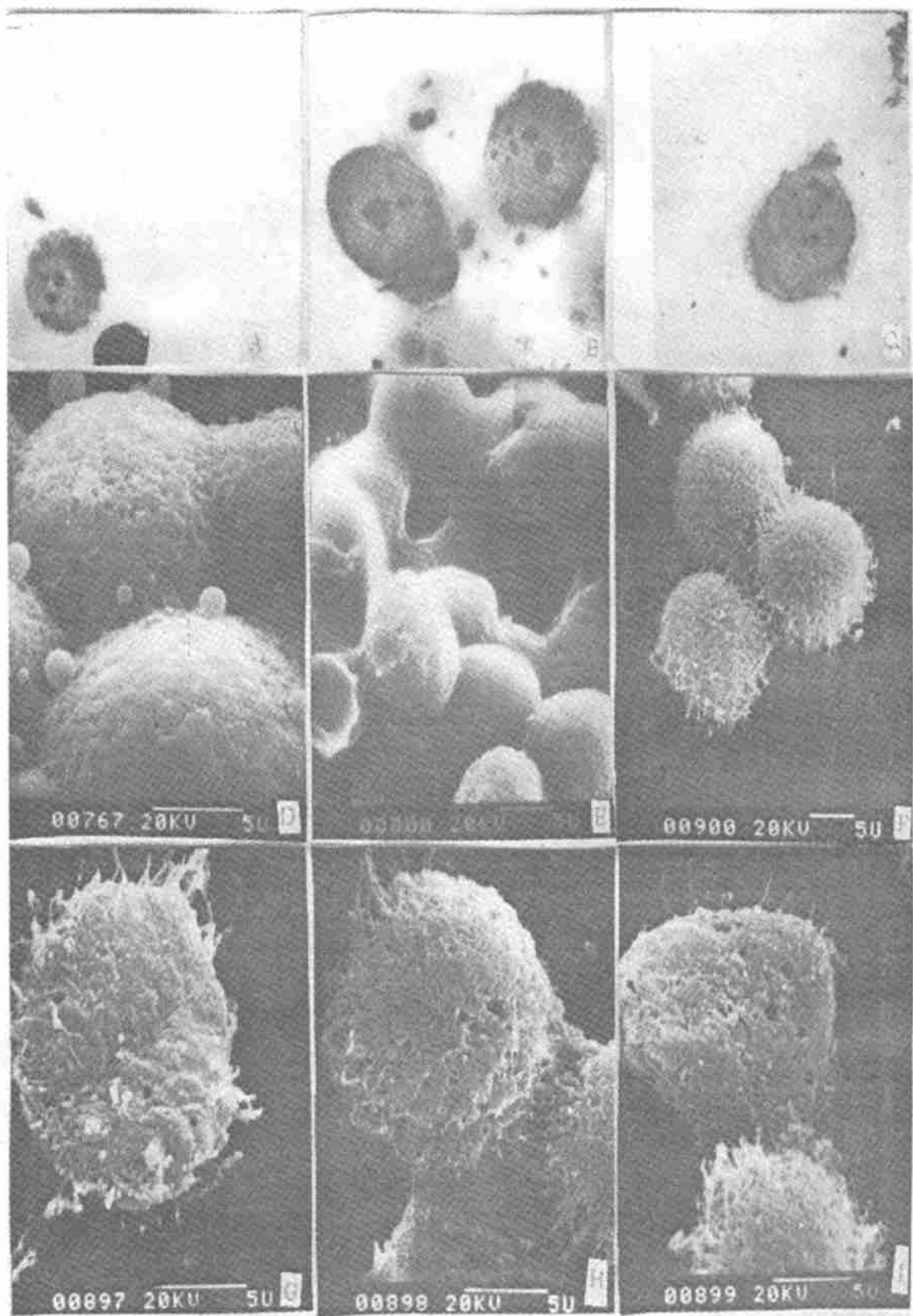


图 4 图版说明

A 是 300V,5 脉冲,10 μ F 的穿孔深度,中间两个黑色的小圆点是核仁,周围的黑色是进入的台盼蓝;B,C 所示的核仁周围有黑色的台盼蓝小点,表明台盼蓝进入了细胞核;从 D 可以看到喷出物;从 E 可以看到火山形口;F 是对照组,绒毛很多;G, H,I 分别是 5 脉冲,10 μ F 时,300V,500V 和 700V 单个细胞的穿孔,可以看出穿孔增多,而且使绒毛损伤. A,B,C 的放大倍数为 400 倍

态微孔,它们自发产生、自行闭合.瞬态微孔的直径一般极小,只允许无机小分子或离子通过.由 Weaver^[8]建立的电场与细胞膜作用的模型认为:当跨膜电位增加时,微孔的半径趋于增大.因此,在脉冲电场的重复作用下,微孔的半径逐渐增大,当微孔的半径增大到一定程度时,由于渗透压的缘故,细胞外的小分子和离子大量进入细胞,引起细胞膨大,因而细胞表面积增大,致使表面张力使微孔半径继续增大,直至出现穿孔.穿孔的出现使细胞内物质外溢,由于细胞内的物质减少了,因此当细胞膜愈合时,膜上会出现火山口形的凹陷.在扫描电镜照片上可以清晰地看到这种凹陷,这不仅直接证明了低强度瞬态电磁场能引起细胞膜穿孔,而且还有力地支持了上述推测.至由电穿孔对细胞其它结构的影响(比如骨架、活性、酶系统、代谢、生殖等)有待于进一步的研究.

现时治疗肿瘤方法之一的化学治疗,其副作用往往很大,有时因严重的不良反映而迫使终止化疗导致治疗失败;另外,肿瘤抗药性的产生则是影响化学治疗的瓶颈.有报道^[7]指出,细胞抗药性的产生与细胞膜通透性的改变有关.细胞膜作为外界物质进入细胞的屏障,提高其通透性无疑是很重要的,特别对于一些水溶性的药物更加重要,既可以提高药效,还可以减少药物剂量,从而降低副作用,减轻病人痛苦,减轻经济负担,提高经济效益.Gunter A. Hofmann^[7]等的实验证明,用同样剂量的博莱霉素,电化学治疗比单纯化学治疗的效果高 7 倍左右.因此,体外探索 HeLa 细胞电穿孔的最佳条件,对运用电化学治疗人的宫颈癌是必要的,既可为电化学治疗宫颈癌提供科学依据,同时也可为其其它电化学治疗提供相应的数据.

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): 297.
- [4] Donald C, Chang Biophys J. Biophysical Society, 1989, 56: 641—652.
- [5] 郑强, 赵南明. 中国科学 B 辑, 1988, (8): 825—832.
- [6] 汪和睦, 李金慧. 微生物学通报, 1994, 21(2): 67—71.
- [7] Gunter A, Hofmann, Sukhendu B Dev. Electrochemotherapy: Transition from Laboratory to the Clinic. IEEE Engineering in Medicine and Biology November/december, 1996. 124—131.
- [8] Weaver J C. Physics Letters, 1981, 86A: 57.

STUDY OF THE EFFECT OF REVERSIBLE PORATION OF HELA CELL HANDLED BY EMPF WITH VARIOUS PARAMETERS

YANG kong¹, WANG Zi-shu¹, GUO Cong¹, ZHOU Fang-dong¹, WANG Xi-zhong¹,
WANG Bao-yi², ZHANG Hong², LIU Chang-jun²

(¹. College of Life Science, Sichuan University 610064, China; ². Department of Radio Electronics, Sichuan University 610064, China)

Abstract: When HeLa cell handled by EMPF with various voltages, times, capacitance is contrast put in with unhandled cell, the handled cell is found to have been electropored. The frequency, pores number, depth of poration are relative to the EMPF parameters. At the same time, the microvilli is damaged. Moreover, the authors have also seen the pore like of volcanic vent and ejecta. The authors have found the best parameters of EMPF that handled HeLa cell. All above provides primary evidence for the electrochemotherapy of HeLa cell.

Key words: HeLa cell; EMPF; electroporation; electrochemotherapy