

- [10] Rudig LL, Gercek E, Hessmann MH. The distally based sural neurocutaneous island flap for coverage of soft-tissue defects on the distal lower leg, ankle and heel[J]. *Oper Orthop Traumatol*, 2008, 20(3): 252-261.
- [11] 王海明, 姜佩珠, 范存义, 等. 腓肠神经逆行岛状筋膜皮瓣重建足远端部分缺损[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2007, 9(3): 36-38.
- [12] Jia XL, Zhang YF, Cheng GL, et al. Repair of skin defects of ankle and foot with modified reverse sural neurovascular island flap[J]. *Zhongguo Gu Shang*, 2009, 22(6): 464-465.
- [13] Chen SL, Chen TM, Wang HJ. The distally based sural fasciomusculocutaneous flap for foot reconstruction[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2006, 59(8): 846-855.
- [14] Mei ZF, Li PD, Duanmu QL, et al. Reversed sural neurovascular fasciocutaneous flap for reconstruction of soft tissue defects of lower limbs[J]. *Zhongguo Gu Shang*, 2010, 23(3): 172-174.
- [15] 何威, 冯永建, 邵新中, 等. 应用改良的腓肠神经营养血管顺行皮瓣修复胫骨中上段软组织缺损[J]. *河北医药*, 2008, 30(12): 1917-1918.
- [16] 吴农欣, 徐永清, 覃励明, 等. 足背外侧皮神经营养血管皮瓣的应用解剖学[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(2): 142-144.
- [17] Miao W, Liu Z, Xu C. Repair of forefoot skin and soft tissue defect with reverse lateral tarsal artery flap[J]. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue*, 2010, 24(1): 53-56.
- [18] 王鹏, 赵丽, 刘小伟, 等. 逆行足背外侧皮神经营养血管皮瓣修复足前端皮肤缺损[J]. *中华整形外科杂志*, 2009, 25(4): 299-300.
- [19] 周庆红, 蔡兴东, 刘晓雪, 等. 远端蒂足背中间皮神经营养血管皮瓣修复足背远端Ⅳ度创面[J]. *临床军医杂志*, 2009, 37(5): 934-935.
- [20] Song Y, Zhang F, Liu H. Application of new type distal based neurocutaneous flap in repair of limb wound[J]. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue*, 2009, 23(12): 1435-1439.
- [21] 魏在荣, 帅霞, 袁习平, 等. 足背中间皮神经营养血管皮瓣对足背动脉皮瓣供区的修复[J]. *中华显微外科杂志*, 2009, 32(4): 287-289.
- [22] Wu N, Xu Y, Li J. Anatomical studies and clinical applications of distally-based intermediate dorsal neurocutaneous flap on the foot[J]. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue*, 2007, 21(4): 363-366.
- [23] Xu YQ, Zhu YL, Wu NX, et al. Distal foot coverage with reverse dorsal pedal neurocutaneous flaps[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010, 63(1): 164-169.
- [24] 朱小平, 叶国强, 姚晓方, 等. 足背内侧皮神经营养血管皮瓣的应用[J]. *吉林医学*, 2009, 31(8): 1056-1057.
- [25] 厉孟, 刘旭东, 刘兴炎, 等. 逆行足背内侧皮神经营养血管皮瓣急诊修复前足缺损[J]. *中华显微外科杂志*, 2008, 31(5): 341-343.

(收稿日期: 2010-11-20 修回日期: 2011-02-02)

· 综 述 ·

## 脉冲电场诱导细胞凋亡机制及其在肿瘤治疗中应用前景展望\*

李好山<sup>1</sup>综述, 熊正爱<sup>1△</sup>, 姚陈果<sup>2</sup>审校

(1. 重庆医科大学附属第二医院妇产科 400010; 2. 重庆大学输配电装备及系统安全与新技术国家重点实验室 400030)

关键词: 凋亡; 脉冲电场; 肿瘤治疗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.20.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)20-2059-03

脉冲电场以其独特的生物电效应在肿瘤治疗等领域展示出良好的发展前景, 并在国际上掀起了一股研究热潮。Weaver 等<sup>[1-2]</sup>发现在场强为 1 kV/cm 级、脉宽为 100 μs 级的陡脉冲作用下, 细胞膜出现微孔的同时电导率发生改变, 当施加在细胞膜上的跨膜电位超过膜的绝缘强度时, 电导率将激增, 导致细胞膜阻碍微粒渗透能力降低, 膜上出现亲水性孔道; 当脉冲取消后, 大多数情况下微孔会关闭而不会对细胞造成任何影响, 这种细胞膜出现暂时微孔的物理过程称为电穿孔效应。Okino 等<sup>[3]</sup>首次将其与化疗药物相结合治疗肿瘤, 创立了电化疗法。进一步研究<sup>[4-5]</sup>发现, 当场强升高到 100 kV/cm 级同时脉宽降低至 10 ns 级, 细胞出现核膜可逆性穿孔, 微核产生, 基因表达增强; 线粒体膜可逆性穿孔并导致胞内钙离子释放;

抑制荷瘤动物肿瘤组织的生长; 诱导细胞周期发生改变等。相对于细胞电穿孔效应, 这种现象称为胞内电处理效应。尽管上述生物电效应的机制尚不十分清楚, 但陡脉冲以其独特的电穿孔效应和胞内电处理效应等重要特征已在国内外掀起研究热潮。Schoenbach 于 2004 年在《Nature》预言陡脉冲将在近几年内可望实现临床试验并逐步得到应用, 这种方法不需要毒性药物的辅助作用就能达到良好的杀灭肿瘤细胞的效果, 可以避免炎症、溃疡和化学药物等导致的不良反应。研究者们对电穿孔效应和胞内电处理效应研究的实质是陡脉冲的可逆性电击穿效应在肿瘤治疗中的应用。另有研究成果<sup>[6-7]</sup>表明陡脉冲不但能够诱导肿瘤细胞发生可逆性电击穿, 即电穿孔和胞内电处理效应, 而且在保证患者安全的前提下, 将恰当参数组合的陡脉

冲引入到肿瘤组织中,使细胞发生不可逆性电击穿效应,并诱导细胞凋亡效应,可以达到杀伤肿瘤细胞的目的,同时还可诱发机体抗血管和淋巴转移效应、免疫效应等,破坏肿瘤的生长条件,有效地减少了肿瘤细胞转移到其他部位的可能性并改善患者的生存质量,从而提高了治疗的有效性和安全性。

### 1 凋亡诱导与肿瘤治疗

细胞凋亡,又叫细胞程序性死亡,是指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡。细胞凋亡有利他性,使周围的细胞长得更好,或是满足发育过程和免疫功能的需要。通过对细胞凋亡及其机制的研究将有助于揭示免疫效应、细胞恶变等重大生物学和医学奥秘,从而借助细胞凋亡清除有害细胞,如恶性转化与病毒感染的细胞,成为治疗肿瘤的突破口。

肿瘤的发生是因细胞增殖与死亡的速度平衡失调而造成,失控的程度决定肿瘤是否发生,也决定着肿瘤的生长速度。正常的机体可通过凋亡机制清除体内受损而不予修复的细胞,也可清除那些癌前病变、基因改变的细胞。当上述细胞不能通过凋亡机制予以清除时,将促进肿瘤的产生。普遍认为,肿瘤的生长速度取决于癌细胞的增殖与死亡之比,因此,治疗癌症的机制常见于抑制癌细胞的生长与增殖。但研究发现,许多肿瘤细胞增殖速度甚至比正常细胞慢,这些肿瘤能够持续生长是因为癌细胞的寿命延长。因此,抑制癌细胞的增殖只能延缓肿瘤的进展而不能达到治愈的目的。诱导癌细胞的凋亡能使瘤组织缩小甚至消失,故研究如何诱导细胞凋亡对治疗癌症有极其重要的意义。以往的化疗、放疗都是通过抑制肿瘤细胞的增殖来达到治疗的目的,而细胞凋亡学说的建立使诱导细胞凋亡来治疗肿瘤,为肿瘤治疗开辟了一个新的领域。

### 2 脉冲电场诱导细胞凋亡的实验研究

脉冲电场因其参数不同,作用细胞后细胞出现的变化也不同,诱导细胞凋亡被证实是脉冲电场的生物学效应之一,陡脉冲诱导凋亡机制已成为国内外研究的热点。熊兰等<sup>[8]</sup>用电压峰值 150 V,频率 100 Hz,脉宽 6.6 us,脉冲陡度为 138 ns,治疗时间为 30 min 的电脉冲处理接种 walker-256 瘤细胞的 wistar 大鼠后观察到典型的凋亡细胞并伴有 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值的降低。曹晓哲等<sup>[9]</sup>用参数为  $6 \times 10^4$  V/M,脉冲上升时间为 20 ns,脉宽为 30 us,以 2.5 次/min,辐照 2 min 的电磁场作用于肺癌 A549 细胞,发现死亡率为 15.07%,并且抑制凋亡蛋白 Bcl-2 较对照组表达下降,p53 蛋白则较对照组上升。赵梅兰等<sup>[10]</sup>用脉冲电场作用于小鼠成纤维细胞后同样发现 Bcl-2 蛋白表达的下调,并检测到 p53 蛋白表达上调。张文霞等<sup>[11]</sup>用陡脉冲作用于 B 细胞淋巴瘤组织,采用原位末端标记法和免疫组化 S-P 法检测到肿瘤细胞凋亡率显著高于对照组,p53、Bcl-2 在处理组表达分别为 80%、25%,对照组表达分别为 15%、90%,推测脉冲电场可诱导癌细胞凋亡。杨孝军等<sup>[12]</sup>用低能陡脉冲(电压 100 V、频率 75 Hz、脉宽 25 us)作用 SK-OV3 卵巢癌细胞后,DNA 片段化分析表明电击后胞核 DNA 断裂,出现梯状条带。Mi 等<sup>[13]</sup>发现陡脉冲电场作用于人肝癌细胞 SMMC-7721 使线粒体电位出现下降,电压为 600 V,脉宽为 100 us 时下降更明显,而且陡脉冲停止作用后还会继续下降。谢肇等<sup>[14]</sup>将脉冲电场作用于骨质疏松大鼠成骨细胞和破骨细胞也发现破骨细胞出现 Bax/Bcl-2 显著增高,同时 FasL 阳性增高。姚陈果等<sup>[15]</sup>采用场强为 10 kV/cm、脉宽为 100 ns、重复频率为 1 Hz 的纳秒级陡脉冲电场作用于 SKOV3 癌细胞,流式细胞术检测到癌细胞的早期死亡率为  $(22.21 \pm 2.71)\%$ ,明显高于对照组的  $(3.04 \pm 0.44)\%$  ( $P < 0.05$ ),扫描和透射电

子显微镜均观察到典型的凋亡细胞形态,证实纳秒级陡脉冲电场能够有效诱导 SKOV3 癌细胞发生凋亡;同时纳秒级陡脉冲电场可明显升高细胞钙离子浓度,而与细胞外钙离子浓度无关。由于纳秒级陡脉冲电场的等值频率很高,容易穿透细胞膜,推测其诱导凋亡的机制之一可能是通过激活细胞内钙库(内质网、线粒体),引起细胞内钙离子升高,从而介导凋亡信号通路。刘欢等<sup>[16]</sup>用脉冲作用于肝癌细胞 SMMC-7721 和正常肝细胞 HL-7702 发现在细胞外无钙离子的情况下电压为 200 V 时胞内钙离子浓度出现下降,250 V 时下降更明显,而在胞外有钙离子情况下电压为 150~250 V 时胞内钙离子浓度变化不大,推测胞内钙离子浓度变化是陡脉冲诱导凋亡的机制之一。李聪等<sup>[17]</sup>用高强度电脉冲(参数为 1 kV、1 KHz、250 ns、1 min)作用人卵巢癌细胞 SKOV3 后,钙离子向线粒体流动,其含量比对照组明显增加;Bcl-2 在高强度电脉冲作用后 mRNA 显著低于对照组,提示高强度电脉冲作为一种强的外界刺激信号,作用于线粒体外膜,使凋亡信号的细胞传导和发生效应增强,从而导致卵巢癌组织凋亡。杨方黎等<sup>[18]</sup>采用纳秒级脉冲电场以参数为 300 ns,20 kV/cm, $f=1$  Hz 处理人黑色素瘤细胞裸鼠皮下移植瘤,也得出了脉冲电场能诱导凋亡的结论。Hofmann 等发现场强为 4.5~8.1 kV/cm,间期为 40 us 的脉冲电场使 Jurkat 细胞出现典型的凋亡形态,HL-60 细胞出现 DNA 片段化和核酸聚合酶的破坏,虽然凋亡与细胞内离子关联不明显,但是细胞悬液中含有一定浓度的离子是必需的。Beebe 等<sup>[19]</sup>研究发现高强度电场(场强达到 300 kV/cm)作用于人 Jurkat 和 HL-60 细胞脉冲到纳秒级(10~300 ns)观察到细胞内 Caspase 激活,细胞色素 C 释放,细胞内钙离子升高,由于 ns 级脉冲主要作用于胞内膜结构而非细胞膜,所以,凋亡的诱导与胞膜穿孔关系不明显。Hall 等<sup>[20]</sup>在研究 p53 基因在纳秒脉冲诱导凋亡作用时发现,纳秒脉冲在作用于人结肠癌细胞 HCT116 后只有 Bax 和 cytochrome C 水平升高的细胞出现胞膜皱缩,p53+/+和 p53-/-的细胞被诱导凋亡的机会是均等的,提示纳秒脉冲诱导凋亡是非特异性的,其途径或许是独立于线粒体途径的。Richard 等<sup>[21]</sup>用场强为 40 kV/cm,脉宽为 300 ns 的脉冲电场作用于鼠黑色素瘤,发现在细胞出现坏死的同时观察到细胞内钙离子浓度升高,DNA 片段化,肿瘤血供减少而诱发的凋亡。Kim 等<sup>[22]</sup>报道用参数为 60 Hz,14 us 的电磁场作用于 BALB/c 小鼠,原位末端标记法检测到睾丸生殖细胞出现较高的死亡率,电镜下发现退化的睾丸生殖细胞出现核染色质固缩。Noriaki 等<sup>[23]</sup>用低电压脉冲作用于鼠黑色素瘤 B16 细胞,当参数设置为电压场强为 7.5 V/mm,脉宽为 1 000 ms 时死亡达到了  $(10.5 \pm 1.6)\%$ ,对照组仅为  $(2.8 \pm 0.3)\%$ 。

### 3 陡脉冲诱导细胞凋亡机制及应用前景

从国内外的研究现状来看,尽管以可逆性电击穿(电穿孔、内处理)和不可逆性电击穿的方法做了大量的实验和理论研究工作,脉冲电场诱导细胞凋亡的机制推测有以下原因:(1)通电后,由于细胞膜通透性发生改变,质子和其他离子在电场内移动扩散,阴离子移向正极,阳离子移向负极,使阳极呈强酸性,阴极呈强碱性,局部强酸、强碱可诱发细胞凋亡。(2)陡脉冲作用过程中,不断有少量气泡自电极插入处冒出,推测阳极产生氧气、氯气,阴极产生氢气等气体。这些气体是强氧化剂或还原剂,具有杀伤肿瘤细胞,诱发细胞凋亡的作用。(3)陡脉冲剂量较小时,电激液几乎无升温,但当陡脉冲剂量较大时,处理组温度较对照组有明显升高。治疗过程中的局部高温除导致肿

瘤细胞坏死亦有诱发细胞凋亡的作用。(4)在电渗透作用下,水从阳极移向阴极,造成阳极凝固性坏死,阴极液化性坏死,并导致血管收缩、微血栓形成,肿瘤组织缺血缺氧也可诱发细胞凋亡。(5)变化的脉冲电场能引起细胞跨膜电位的变化,导致钙离子内流和细胞质内钙离子浓度升高,激活 DNA 内切酶,使逃离细胞凋亡程序的癌细胞凋亡。但是由于生物体本身的介电特性、阻抗特性和生物电效应的复杂性以及使用的研究方法和手段的局限性,有关陡脉冲应用于肿瘤治疗领域的细胞和动物实验研究很多,但对于陡脉冲电穿孔、内处理特别是不可逆性电击穿三者的窗口效应及规律,至今尚无统一理论能够正确地解释各自的作用机制,也就是说,陡脉冲在肿瘤治疗中的生物电效应作用机制等共性基础问题的研究则显得较为肤浅,上述陡脉冲诱导细胞凋亡的机制也不是都确切明了。然而众多实验研究确切地证实了陡脉冲作用后细胞发生凋亡的存在,而且鉴于细胞凋亡在肿瘤治疗中的巨大潜力,这些事实激发了国内外学者对其确切机制的研究兴趣,尽管陡脉冲诱导细胞凋亡研究过程中还有很长的路要走,相信不久的将来陡脉冲会给患者带来福音。

#### 参考文献:

- [1] Weaver JC. Electroporation of cells and tissues[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, 28(1): 24-33.
- [2] Zimmermann U, Friedrich U, Mussauer H, et al. Electro-manipulation of mammalian cells: fundamentals and application[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, 28(1): 72-82.
- [3] Okino M, Mohri H. Optimal electric conditions in electrical impulse chemotherapy[J]. Japanese Journal of Cancer Research, 1992, 83(10): 1095-1101.
- [4] Schoenbach KH, Katsuki S, Stark RH, et al. Bioelectrics-new applications for pulsed power technology[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2002, 30(1): 293-300.
- [5] Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, et al. Nanosecond pulsed electric field(nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2002, 30(1): 286-291.
- [6] 姚陈果, 孙才新, 米彦, 等. 陡脉冲对恶性肿瘤细胞不可逆性电击穿的实验研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2004, 23(1): 92-97.
- [7] Yao CG, Sun CX, Mi Y. Experimental studies on killing and inhibiting effects of steep pulsed electric field(SPEF) to target cancer cells and solid tumor[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2004, 32(4): 1626-1633.
- [8] 熊兰, 孙才新, 姚陈果. Study of cellular experiment of electric pulse imposed on cancer cell[J]. 重庆大学学报: 英文版, 2002, 61(1): 53-55.
- [9] 曹晓哲, 赵梅兰, 王德文. 电磁脉冲诱导肺癌细胞株 A549 凋亡的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(3): 285-295.
- [10] 赵梅兰, 曹晓哲, 王德文, 等. 电磁脉冲辐射诱导小鼠成纤维细胞系 NIH/3T3 凋亡的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 546-548.
- [11] 张文霞, 王立新, 孙慧, 等. 电脉冲与恶性淋巴瘤细胞 p53 和 Bcl-2 基因表达[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(2): 239-259.
- [12] 杨孝军, 胡丽娜, 李均, 等. 低能陡脉冲致人卵巢癌 SK-OV3 细胞核 DNA 链断裂损伤的实验研究[J]. 实用妇产科杂志, 2004, 20(6): 343-344.
- [13] Mi Y, Sun C, Yao C, et al. Effects of steep pulsed electric fields (SPEF) on mitochondrial transmembrane potential of human liver cancer cell[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2007: 5815-5818.
- [14] 谢肇, 李起鸿, 许建中, 等. 脉冲电磁场对去卵巢骨质疏松症大鼠成骨细胞和破骨细胞凋亡的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29(1): 8-12.
- [15] 姚陈果, 米彦, 李成祥, 等. 纳秒级陡脉冲电场诱导癌细胞凋亡的实验及作用机制研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2008, 27(5): 739-744.
- [16] 刘欢, 唐丽灵, 孙才新, 等. 陡脉冲电场诱导肿瘤细胞凋亡及机制的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2008, 27(3): 637-641.
- [17] 李聪, 胡丽娜, 董晓静, 等. 高强度电脉冲诱导卵巢癌线粒体凋亡及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1249-1251.
- [18] 杨方黎, 唐均英, 米彦, 等. 纳秒级陡脉冲电场诱导人黑色素瘤细胞裸鼠皮下移植瘤凋亡作用及机制[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(13): 1227-1230.
- [19] Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, et al. Schoenbach: Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells[J]. FASEB J, 2003, 17(11): 1493-1495.
- [20] Hall EH, Schoenbach KH, Beebe SJ. Nanosecond pulsed electric elds induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells[J]. Apoptosis, 2007, 12: 1721-1731.
- [21] Richard N, Chen XH, Andrei G, et al. Schoenbach: A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence[J]. Int J Cancer, 2009, 125(2): 438-445.
- [22] Kim YW, Kim HS, Lee JS, et al. Effects of 60 Hz 14 T magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice[J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(1): 66-72.
- [23] Noriaki M, Motohiro T, Takuji I, et al. Activation of caspases and apoptosis in response to low-voltage electric pulses[J]. Oncology Reports, 2010, 23: 1425-1433.

(收稿日期: 2010-11-10 修回日期: 2011-02-23)