



文章编号:1000-582x(2000)04-0076-04

76-79

细胞膜电穿孔的机理及应用前景的初步探讨

熊 兰¹, 孙才新¹, 廖瑞金¹, 胡丽娜², 李大强²

(1 重庆大学 电气工程学院, 重庆 400044; 2 重庆医科大学 第二附属医院, 重庆 400010)

摘 要:近年来,国内外众多学者就适当强度的脉冲电磁场作用下细胞膜发生电穿孔的现象展开了机理研究与应用实践。文中介绍了细胞膜电穿孔现象产生的前提条件,并且从细胞膜的电特性和机械特性变化、分子结构的变化以及对微粒和离子的跨膜运输能力的影响这三个角度展开对细胞膜电穿孔特性的机理研究。同时,还介绍了目前细胞膜电穿孔特性在生物技术和临床医学等领域的广泛应用以及对其进行机理研究的重要意义,展示了电穿孔特性良好的应用前景。

关键词:细胞膜;电穿孔;微孔;跨膜电位

中图分类号:Q 735

文献标识码:A

Q26

早在50年代,电穿孔现象就已为人所知,但真正得到研究却只有20来年的历史。Weaver等学者研究发现:电场强度为kV/cm,持续时间为 μs —ms级的电脉冲刺激会使细胞膜发生电穿孔现象,即:细胞膜结构重组、出现微孔,电导率改变,暂时丧失屏障功能等,从而引起离子的流出,代谢物的排泄,细胞对药剂及DNA等大分子的吸收量增加^[1]。电穿孔现象反映了细胞膜基本的生物电化学特性,对于研究细胞膜的结构和功能非常有意义,在生物技术和医学领域的应用前景非常广阔,有必要对其机理作深入研究,从而得到理想的临床治疗效果。为此,笔者根据现有的研究结果,对细胞膜电穿孔的机理及应用前景进行了初步探讨。

1 细胞膜的电穿孔现象

在正常的生理机能状况下,细胞膜能较好地阻碍离子和亲水分子的传输。但是,当施加强度为kV/cm,持续时间为 μs —ms级的电脉冲刺激于细胞膜时,细胞膜会出现微孔,同时电导率发生改变,例如:通常状态下,细胞膜对 Na^+ 和 K^+ 的电导率 G_m 不大于 $10^{-3}\text{S}/\text{cm}^2$;当增大外加电场,使施加在细胞膜上的跨膜电场超过膜的绝缘强度时,电导率 G_m 将激增,能够在ms时间内达到 $1\text{S}/\text{cm}^2$,导致细胞膜阻碍微粒渗透

能力的降低^[2]。

经过人们不断的研究发现:细胞膜的绝缘强度与所加脉冲电场的幅值和持续时间有关。细胞膜的击穿电压值在0.5~1.5V左右,即:假定细胞膜的厚度为5nm,当采用 μs —ms级的电脉冲时,电场强度应该在1~3kV/cm左右。通常,幅值较低、持续时间较短的脉冲刺激仅导致细胞膜充电,其时间常数取决于膜电容和充电通路的等效电阻。电穿孔现象发生后,膜电导率 $G(t)$ 增大,跨膜电流增加至nA数量级。如果在电流陡增前撤去外电场或者处于两脉冲的间隔时期,则跨膜电位 $U(t)$ 快速衰减,细胞膜放电,膜屏障功能恢复,则称此现象为可逆性电击穿(REB);否则微孔数量增加或者孔径激增,以至于膜组织断裂,细胞死亡,称此现象为不可逆性电击穿(IREB)^[3]。目前,由于多种因素的影响,人们还无法确定可逆性电击穿和不可逆性电击穿之间的界限。

2 电穿孔引起的膜结构变化

目前,生物体内通过细胞膜的分子运输机理还不能确定,但人们在理解细胞膜的电特性(电压、电导和膜电容等)、机械特性(膜的损伤或修复等)和分子运输能力(透过膜的微粒数量等)等方面已经取得了较大的进步。

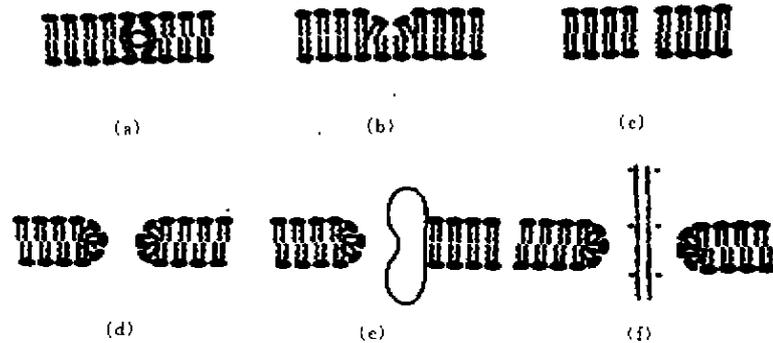
· 收稿日期:1999-10-08

基金项目:重庆市卫生局资助项目(99-2002)

作者简介:熊兰(1972-),女,四川仁寿人,重庆大学讲师,硕士。从事高电压脉冲功率技术及应用研究。

定性地说,电穿孔现象是由电能(因跨膜电位提高而产生的决定性能量)和“KT 能量”(因热波动而产生的随机性能量)共同作用而引起的。大量的观察发现:电穿孔的发生主要是一种物理现象,同时也会引起细胞膜某些化学性质的变化,应该建立细胞膜出现微孔的物理模型来解释细胞膜的机械特性、电特性和分子运输行为。自从上个世纪后期以来,人们对细胞膜的

结构提出了多种模型,例如:单位膜模型、液态镶嵌模型、晶格镶嵌模型、板块镶嵌模型等。目前人们普遍接受了如图 1(a)的液态镶嵌模型,即生物膜是嵌有球形蛋白质的脂类二维排列的液态体^[4]。基于大量的电学、光学、机械学和分子传输实验结果,图 1 基本反映了电穿孔过程中细胞膜结构的变化。



(a) 自由态时膜结构的随机变化; (b) 似水的波动; (c) 憎水微孔; (d) 亲水微孔; (e) 一个或多个蛋白质渗透于膜微孔中的合成结构; (f) 被运输的或者附着于细胞的宏分子渗透于膜微孔中的合成结构

图 1 电穿孔过程中细胞膜结构的变化

在电能和“KT 能量”的作用下,初期微孔的出现是随机的而且尺寸不定。其中,不参与分子运输的微孔称为憎水微孔;影响细胞膜的电特性,参与分子运输的微孔称为亲水微孔。亲水微孔的半径为 nm 数量级,而憎水微孔的尺寸相对更小。由于微孔尺寸小而且状态不稳定,人们无法用现有的显微镜对其进行观察,只能通过离子和分子的运输特性来推测微孔的结构。从原理上讲,微孔由碳氢化合物链(通道蛋白)构成,跨越膜磷脂双层。当增加跨膜电位时,微孔模型结构发生变化有两种可能:1) 图 1(a)→图 1(b)→图 1(c);2) 图 1(a)→图 1(b)→图 1(d)。实验证明,憎水微孔被水填充,存在时间短;亲水微孔的存在时间相对较长(>1 s)。

电穿孔现象发生的标志是膜电导激增,究其原因则是通过膜微孔的离子数量的增加。Parsegian 发现,微孔形成于细胞膜介电常数较低的部位;微孔内离子的能量大大高于电解液中离子的能量;微孔的电导率低于电解液的电导率(微孔直径越小,电导率越低),而外电场的作用有助于提高微孔的电导率,因此部分离子能够克服阻力通过细胞膜微孔。

图 1(e)表示:蛋白质这类形状较长的分子进入微孔后,由于膜内介电常数相对较低,同时分子与亲水微孔内已充电的碳氢化合物团相互作用而引起的静电斥力有相当重要的影响。当发生电穿孔时,憎水域(被两个亲水域所分隔)中的一个分子进入微孔,则微孔会收

缩到憎水域。当跨膜电位显著提高并且维持在较高值时,输入宏分子可能形成如图 1(f)所示的合成结构,形成原因有几种可能:电泳、电渗透、扩散和细胞溶解。

电穿孔特性要受到多种因素的影响,即使施加相同的外电场,不同大小、形状和结构的细胞反应也有所不同。同时,要想更好地了解电穿孔特性并加以利用,掌握分子的大小、形状和电量以及分子运输的数量非常重要,但目前国内外对分子运输的定量分析和研究结果并不多。

3 电穿孔特性的应用前景

目前利用电穿孔特性的主要趋势是:根据电穿孔时细胞膜天然屏障功能的减弱或丧失,导致离子和亲水性分子极易渗透过膜的特性,向细胞中导入微粒,其应用领域包括以下 5 个方面:

3.1 DNA 的电转染

将 DNA 电转染进入活细胞以改善活细胞的特性,这是目前电穿孔特性较广泛应用的领域。胸(腺嘧啶脱氧核)苷激酶(thymidine kinase)简称 tk 基因, Wong 和 Neumann 等人通过电穿孔方法,率先成功地将 tk 基因转移到培养小鼠的 L-细胞(tk 基因有缺陷)中,并且证实了被转移基因的表现^[5]。细胞膜的微孔半径在 nm 数量级,而 DNA 宏分子半径比之大得多,目前还不能充分解释 DNA 宏分子通过微孔进入细胞的原因,推测脉冲场的电泳力起着重要作用。

3.2 细胞膜蛋白质的电导入

通过脉冲场的作用,可以将复制后的细胞膜蛋白质导入细胞膜。Mouneimne 等人采用此项技术,将人的血型糖蛋白(glycophorin)导入老鼠的红细胞膜,再将重组后的 CD4 受体导入人和鼠的红细胞。这里的 gp120 是一种被 HIV 病毒感染过的蛋白质,而 CD4 是 gp120 的受体^[6]。电导入除了应用于临床,还能有效地应用于膜蛋白质与细胞膜的重组,该方法为细胞膜生物化学特性的研究开创了美好的前景。

3.3 电穿孔促进药物的运送

近年来,Mir 等人在对癌组织的化疗过程中,利用电穿孔特性提高化疗药物如博来霉素(bleomycin)渗入肿瘤细胞的数量,药物毒性增加了 650 000 倍,大大加强了 bleomycin 对癌细胞的杀伤力。实验发现:在电穿孔状态下,bleomycin 抑制了实验小鼠肿瘤组织的生长,最终导致肿瘤的完全消失^[7]。

3.4 电穿孔促进细胞融合

细胞融合就是将多个细胞合并形成一个细胞,也称为细胞杂交。目前有专家通过脉冲电场的作用,融合人细胞和动物组织以构建动物模型。

3.5 电穿孔促进皮肤的药物传递

芬太尼(Fentanyl)是一种吗啡类物质,是用于强烈镇痛和麻醉的药物,通常注射入静脉。Rita Vanbever 等人将高压电脉冲施加到未加任何处理的无毛鼠皮上,发现:电脉冲刺激能显著提高皮肤对芬太尼的传递速率,分子流量提高了 10 000 倍;电脉冲的波形、幅值、持续时间和脉冲数量均影响药物的渗透量^[8]。目前国内也有相关课题的研究和报道:沈阳药科大学的郝劲松等人对电穿孔法透皮给药的机制、影响因素(电压、脉冲数、脉冲时间、波形等)和技术要求(电屏蔽、电源选择)等方面提供了初步研究结果^[9]。赵力等人用自行设计的透皮给药电渗透仪进行临床实验,对该仪器产生的复合渗透电场与普遍采用的直流场和脉冲场加以比较,并且分析了复合电场透皮给药高效率的原因,为电穿孔法在该领域的应用提供了新思路^[10]。

由此可见,电穿孔特性导致细胞膜的屏障作用丧失,离子和溶解性微粒的渗透量增加,从而使细胞对药物、抗体和 DNA 等微粒的摄入量加大,有着可观的临床应用前景。

除此以外,利用电脉冲刺激下细胞膜的不可逆性电击穿(IREB)特性可以实现在低能量状态下杀死细胞。目前国内外在脉冲强电磁场对肿瘤细胞的抑制和杀伤效应方面开展着广泛而深入的研究。胡大为等人将脉冲强磁场作用于多只接种 Louis 肺癌瘤株的昆明

小鼠,证明了交变脉冲强磁场对正常细胞和组织没有损伤,而对肿瘤组织具有选择性杀伤作用和抑制肿瘤生长的作用,可延长实验组荷瘤鼠的生存期,为将脉冲强磁场应用于临床治疗恶性肿瘤提供了实验依据^[11]。

4 结束语

电穿孔特性的研究目前在国内仍处于早期阶段,国外研究时间较早,但至今仍然有许多现象无法解释,而新的现象又不断地被报道。目前人们主要致力于以下 4 个领域的研究:1)跨膜电位的测量;2)电穿孔的动力学特性,微孔的大小、结构和数量等的测量;3)细胞膜的渗透性和电击穿原理;4)离子的种类和细胞生长状态等因素对电穿孔特性的影响。尤其可喜的是,国内学者已经看到电穿孔特性在生物和医学领域的广阔应用前景,并且对电穿孔法的临床应用研究日益广泛而深入,可以相信,电穿孔特性的研究和应用在我国将得到长足发展。

参考文献:

- [1] WEAVER J C. Electroporation: A dramatic, nonthermal electric field phenomenon [A]. In Proceedings of the First World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine [C]. Lake Buena Vista, Florida: Academic Press, 1992. 14-19.
- [2] WEAVER J C, BARNETT A. Progress towards a theoretical model of electroporation mechanism: Membrane electrical behavior and molecular transport [M]. Orlando, Florida: Academic Press, 1992. 91-117.
- [3] CHERNOMORDIK L V. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1987, 902: 360-373.
- [4] 罗深秋. 医用细胞生物学 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998.
- [5] WONG T K, NEUMANN E. Electric field mediated gene transfer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 107: 584-587.
- [6] MOUNEIMNE Y. Electroinsertion of full length recombinant CD4 into red blood cell membrane [J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1027: 53-58.
- [7] MIR L M. Electrochemotherapy: potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses [J]. Eur J Cancer, 1991, 27: 68-72.
- [8] RITA V. Transdermal Delivery of Fentanyl by Electroporation. I. Influence of electrical factors [J]. Pharm Res, 1996, 13(4): 559-565.
- [9] 郝劲松, 郑俊民. 电致孔法透皮给药的研究 [J]. 中国药

杂志,1998,(3):25-29
 [10] 赵力,熊良俭.经皮药物电渗透法的实验研究[J].中华
 手外科杂志,1998,14(3):13-17

[11] 胡大为,王群.脉冲强磁场对小鼠 Louis 肺癌杀伤作用的
 形态学研究[J].中华物理医学杂志,1998,(3):19-23.

Elementary Exploration of the Mechanism and Applicable Prospects of Membrane Electroporation

XIONG Lan¹, SUN Cai-xin¹, LIAO Rui-jin¹, HU Li-na², LI Da-qiang²

(1. College of Electrical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;
 2. Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Recently, more and more scholars join in the mechanism research and wide applications of membrane electroporation phenomenon. This paper introduces the electroporation precondition which leads to the numbers of pores in the membrane increased rapidly. It elaborates the mechanism research of membrane electroporation from three areas: namely the change of electric and mechanical characteristic of membrane, change of membrane molecular structure and the influence to ability of transmembrane transport of particles and ions. Moreover, this paper introduces the current wide applications of membrane electroporation characteristic in biologic technology and clinical medicine, emphasizes the significance of the mechanism research of membrane electroporation and lays out its favorable applicable prospects.

Key words: membrane; electroporation; pore; transmembrane potential

(责任编辑 李胜春)



(上接 75 页)

Mixed Finite Element Method for Dynamic Problems of Fluid-Saturated Biphase Porous Media

YAN Bo¹, LIU Zhang-fan¹, ZHANG Xiang-wei²

(1. College of Architectural Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;
 2. College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: Based on the fluid-saturated biphase porous media model deduced from mixture theory, a finite element formulation with u^S-u^F-p variables for dynamic response analysis is given out. This method overcomes the difficulty of choosing suitable penalty parameter in penalty finite element method, and the accuracy of pressure distribution obtained with the mixed finite element method is higher than the penalty finite element method. An iterative solution method is suggested to solve the system of equations whose coefficient matrices are non-positive definite. It is concluded from patch test that the order of interpolation function for pressure variables must be higher than that of displacement variables of solid phase.

Key words: biphase porous media; dynamic response; mixed finite element

(责任编辑 钟学恒)