

文章编号:1000-582X(2004)06-0032-04

陡脉冲不可逆性电击穿恶性肿瘤细胞的机理*

姚陈果,孙才新,熊兰,米彦,王士彬

(重庆大学高电压与电工新技术教育部重点实验室,重庆 400030)

摘要:电场的基本特性是对处于场中的物质有力的作用。在陡脉冲电场作用下,细胞膜内外表面有很强的电场分布,同时由于细胞膜的介电常数与细胞外液、细胞质的不同,从电磁场理论出发,必然有作用于细胞膜表面的电场应力。仿真计算结果表明,外加电场的作用使得细胞膜受到来自细胞外液与细胞质两个方向的压力,作用在恶性肿瘤细胞膜上的电场应力的数量级比正常细胞大1个数量级。因此,在陡脉冲电场的作用下,恶性肿瘤细胞比正常细胞具有更大的敏感性,这种电场应力的作用势必对恶性肿瘤细胞膜造成巨大的损伤,使得细胞的生存环境和遗传物质受到严重破坏,并导致细胞发生不可逆性电击穿而死亡。

关键词:陡脉冲;恶性肿瘤细胞;电场应力;不可逆性电击穿

中图分类号:Q64

文献标识码:A

G. A. Hofmann 等^[1]根据细胞的可逆性电击穿特性提出了癌症的电穿孔疗法(Electroporation Therapy, EPT),即采用电脉冲辅助化疗药物如博莱酶素(BLM)等治疗肿瘤。其治疗机理是一定剂量的短时电脉冲、导致肿瘤细胞膜电穿孔,使得细胞膜的电导率和粒子渗透作用剧增从而促进化疗药物的运送,这种方法只需相对较少剂量的化疗药物就能更高效、低毒性地杀死肿瘤细胞,提高了化疗药物的杀伤力。尽管电穿孔疗法增强了化疗药物的疗效,但是不能从根本上避免化疗药物对患者身体的危害。

随着电脉冲剂量的增加,细胞出现不可恢复的破裂导致细胞死亡,这种现象称作不可逆性电击穿(irreversible electrical breakdown, IREB)^[2]。在保证患者安全的前提下,将电脉冲引入到癌症组织中,使恶性肿瘤细胞发生不可逆性电击穿,这样就破坏了肿瘤的生存条件,达到了杀伤肿瘤细胞的目的。Karl H. Schoenbach 等^[3]发现不用化疗药物,单独使用电场强度为26~300 kV/cm、脉冲宽度为10~300 ns的脉冲电场可以导致肿瘤细胞程序性死亡(凋亡)并能有效抑制肿瘤的生长。作者开展了上升时间为ns级、电场强度为100 V/cm、脉冲宽度为25~37 μs的指数衰减

脉冲——陡脉冲对恶性肿瘤细胞不可逆性电击穿的细胞和动物实验研究^[4-6],发现陡脉冲能有效杀伤恶性肿瘤细胞,明显抑制了荷瘤动物恶性肿瘤的生长、增殖。

如何结合经典电磁场与生物电磁学等理论来解释陡脉冲对恶性肿瘤细胞造成不可逆性电击穿的治疗机理是实际应用的理论基础和关键所在,笔者将就陡脉冲的治疗机理作初步探讨。

1 介质和介质表面的电场应力

作用于连续、各向同性的线性介质单位体积上的力密度^[7]表达式为:

$$f = \rho E - \frac{1}{2} E^2 \nabla \epsilon + \frac{1}{2} \nabla (E^2 \tau \frac{\partial \epsilon}{\partial \tau}) \quad (1)$$

式中 ρ 、 E 、 ϵ 、 τ 分别代表介质内的自由电荷密度、电场强度、介电常数、质量密度。式(1)右边第1项表示由自由电荷密度产生的电场力,第2项表示由介质的不均匀性产生的电场力,第3项表示介质形变伴随质量密度改变产生的电场力。前两项称为显质力,该力对整个物体求和就是作用于物体上的净余力,这种力可

* 收稿日期:2004-02-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50077027)

作者简介:姚陈果(1975-),男,四川南充人,重庆大学讲师,博士,从事电工新技术在生物医学工程中应用的研究。

导致介质的宏观运动或作用于其它物体;第 3 项称为电致伸缩力,是内应力,这种力可导致物体自身的形变或破裂。

显然,对于不带电的线性、均匀各向同性介质而言,电场力密度为零,然而对于两种不同介质的界面而言情况将大不一样。如图 1 所示,因为两种介质的界面实际上并非性质突变的几何面,而是一个过渡性的分界层,在过渡层中介电常数是逐渐、连续变化的。这种变化产生了如式(1)所示的力密度,而力密度又

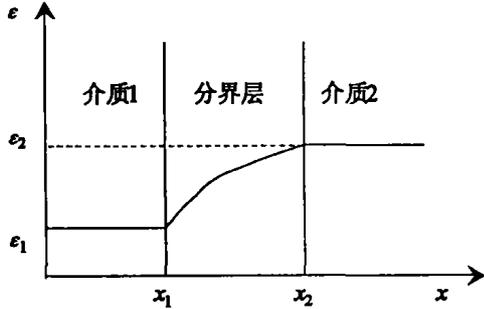


图 1 介质分界面模型

可用压强的梯度表示,即

$$f = -\nabla p \quad (2)$$

如果把界面的法向选为直角坐标系中的 x 轴(见图 1),那么对电场力的讨论便简化为一维问题,这时作用在单位面积上的净余力即应力为:

$$\Delta p = p_1 - p_2 = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{2} E^2 d\varepsilon - \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{2} d(E^2 \tau \frac{\partial \varepsilon}{\partial \tau}) \quad (3)$$

式中 E 是 ε 的函数。根据边界条件,在边界上电场强度 E 的切向分量 E_t 连续,电位移矢量 D 的法向分量 D_n 连续可知,无论过渡层中 ε 如何变化均有:

$$\begin{aligned} E_t &= \text{常数} \\ D_n &= \varepsilon E_n = \text{常数} \\ E^2 &= E_t^2 + E_n^2 \\ D^2 &= D_t^2 + D_n^2 \end{aligned}$$

因而式(1)可写成:

$$\begin{aligned} p_n &= \frac{1}{2}(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(E_t^2 + \frac{D_n^2}{\varepsilon_1 \varepsilon_2}) + \\ &\frac{1}{2}(E_1^2 \tau_1 \frac{\partial \varepsilon_1}{\partial \tau_1} - E_2^2 \tau_2 \frac{\partial \varepsilon_2}{\partial \tau_2}) \end{aligned} \quad (4)$$

式(4)中右第 1 项均表示过渡层中介电常数沿法向变化而引起的电场应力,是显质力;式右第 2 项均表示伴随形变导致质量密度变化而引起的电场应力,是内应力(电致伸缩力)。

对于一般介质而言,要确定介电常数 ε 与质量密度 τ 之间的函数关系无论在理论上还是实验上均未完美解决,但对于液体介质^[8](细胞质、细胞膜、细胞外

液、细胞核等在设计宏观电参量 ε 时可作为液体对待),有

$$\frac{\varepsilon_r - 1}{\varepsilon_0 + 2} = C\tau \quad (5)$$

式中 $\varepsilon_r = \varepsilon/\varepsilon_0$ 为相对介电常数, ε_0 为真空中的介电常数, C 是与液体性质有关的常数。由式(5)得:

$$\frac{\partial \varepsilon_r}{\partial \tau} = \frac{(\varepsilon_r + 2)(\varepsilon_r - 1)}{3\tau} \quad (6)$$

代入式(4)得:

$$\begin{aligned} p_n &= \frac{1}{2}(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(E_t^2 + \frac{D_n^2}{\varepsilon_1 \varepsilon_2}) + \\ &\frac{\varepsilon_0}{6}[E_1^2(\varepsilon_{r1} + 2)(\varepsilon_{r1} - 1) - E_2^2(\varepsilon_{r2} + 2)(\varepsilon_{r2} - 1)] \end{aligned} \quad (7)$$

这就是液体介质界面上的应力表达式。显然,应力与两种介质内的电场强度及它们各自的介电常数有关。

2 陡脉冲作用下细胞的电场分布

陡脉冲作用下的细胞电场计算模型如图 2 所示。这是一个典型的电流场计算问题,图中 E 是细胞承受的外加电场强度; d_c 、 d_n 分别是细胞膜和细胞核膜厚度; R_c 、 R_n 分别是细胞和细胞核半径; $(\gamma_{nc}, \varepsilon_{nc})$ 、 $(\gamma_{nm}, \varepsilon_{nm})$ 、 $(\gamma_c, \varepsilon_c)$ 、 $(\gamma_m, \varepsilon_m)$ 、 $(\gamma_o, \varepsilon_o)$ 分别是细胞核、核膜、细胞质、细胞膜、细胞外液的电导率和介电常数。

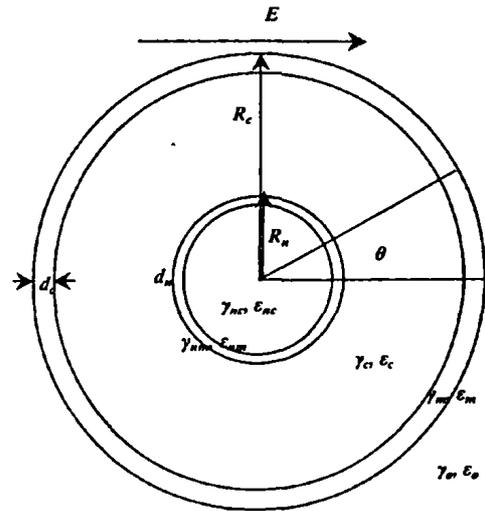


图 2 陡脉冲作用下细胞的电场计算模型
建立球坐标系,根据拉普拉斯方程^[7]有:

$$\begin{aligned} \nabla^2 \phi &= \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \frac{\partial \phi}{\partial r}) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} (\sin \theta \frac{\partial \phi}{\partial \theta}) + \\ &\frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 \phi}{\partial \alpha^2} = 0 \end{aligned} \quad (8)$$

设圆心处电位为 0,当 $r \rightarrow \infty$ 时,有 $\phi_0 = -Er \cos \theta$,细胞实验采用的陡脉冲峰值电压一般在 100 V 左右,由于

细胞尺寸(10 μm)远小于电极间距(1 cm),可近似视为细胞处于均匀场中,因此设电场强度峰值为 $E_m = 100/0.01 = 10^4 \text{ V/m}$ 。表1所示为正常细胞和恶性肿瘤细胞的计算参数,根据边界条件即可解该方程。

表1 正常细胞和恶性肿瘤细胞计算参数值

参数名称	标准值	
	正常细胞	肿瘤细胞
膜厚度/nm	5	5
核膜厚度/nm	5	5
细胞半径/ μm	10	10
核半径/ μm	2	5
核电导率/ $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$	2.0×10^{-1}	5.0×10^{-1}
核介电常数 $\epsilon_0/\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$	136	250
核膜电导率/ $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$	5.0×10^{-7}	1.0×10^{-6}
核膜介电常数 $\epsilon_0/\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$	10	50
质电导率/ $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$	2.0×10^{-1}	5.0×10^{-1}
质介电常数 $\epsilon_0/\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$	136	250
膜电导率/ $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$	5.0×10^{-7}	1.0×10^{-6}
膜介电常数 $\epsilon_0/\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$	10	50
外液电导率/ $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$	2.0×10^{-1}	5.0×10^{-1}
外液介电常数 $\epsilon_0/\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$	136	250

说明:真空中介电常数 $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$

细胞的跨膜电位是维持细胞生理功能的极为重要的参数。在细胞电场计算分析中,须计算出细胞膜的跨膜电位和细胞核的跨膜电位。细胞膜的跨膜电位和细胞核的跨膜电位分别为:

$$\Delta\phi_m = \phi_o(r = R_c) - \phi_c(r = R_c - d_c) \quad (9)$$

$$\Delta\phi_{nm} = \phi_c(r = R_n) - \phi_{nc}(r = R_n - d_n) \quad (10)$$

将细胞参数代入解得:正常细胞膜的电场强度峰值近似为 $2.978 \times 10^7 \text{ V/m}$ 数量级,核膜的电场强度峰值近似为 $4.4978 \times 10^4 \text{ V/m}$ 数量级;恶性肿瘤细胞膜的电场强度峰值近似为 $2.98 \times 10^7 \text{ V/m}$ 数量级,核膜的电场强度峰值近似为 $1.02 \times 10^5 \text{ V/m}$ 数量级。

电场的基本特性是对处于场中的物质有力的作用。细胞膜和核膜内外表面有很强的电场分布,同时由于细胞膜的介电常数与细胞外液、细胞质的不同,核膜的介电常数与细胞质、核仁的不同,从电磁基本理论出发,必然有作用于细胞膜和核膜表面的电场力。

3 电场应力的不可逆性电击穿机理

可以看出细胞膜和核膜的介电常数远小于细胞外液、细胞质、细胞核的介电常数。假设细胞具有球对称结构,由式(7)可以估算出细胞膜和核膜表面的电场应力。

首先计算细胞膜表面的电场应力,设细胞膜内电场强度为 E_1 ,介电常数为 ϵ_1 ,注意到膜两极的表面电

场强度只有法向分量而无切向分量,即 $E_{t1} = 0$,电位移矢量的法向分量 $D_n = \epsilon_1 E_1$ 和 $\epsilon_2 \gg \epsilon_1$,则式(7)可简化为:

$$p_n = \frac{1}{2} \epsilon_1 E_1^2 + \frac{1}{3} (\epsilon_1 - 2\epsilon_0) E_1^2 \quad (11)$$

将正常细胞的细胞膜内电场强度峰值等相应值代入得 p_n 为 $6.02 \times 10^4 \text{ Pa}$,其中右边第1项的值为 $3.9261 \times 10^4 \text{ Pa}$ (显质力),右边第2项的值为 $2.0939 \times 10^4 \text{ Pa}$ (电致伸缩力,即内应力)。同理可计算出正常细胞的核膜表面的电场应力,将细胞核膜内电场强度峰值等相应值代入得 p_n 为 0.1374 Pa ,其中右边第1项的值为 0.0896 Pa (显质力),右边第2项的值为 0.0478 Pa (电致伸缩力,即内应力)。

将恶性肿瘤细胞的细胞膜内电场强度峰值等相应值代入得 p_n 为 $3.2237 \times 10^5 \text{ Pa}$,其中右边第1项的值为 $1.9657 \times 10^5 \text{ Pa}$ (显质力),右边第2项的值为 $1.258 \times 10^5 \text{ Pa}$ (电致伸缩力,即内应力)。将恶性肿瘤细胞核膜内电场强度峰值等相应值代入得 p_n 为 3.7768 Pa ,其中右边第1项的值为 2.3029 Pa (显质力),右边第2项的值为 1.4739 Pa (电致伸缩力,即内应力)。

计算结果表明,由于外加电场的作用使得细胞膜受到来自细胞外液与细胞质两个方向的压力,细胞核膜受到来自细胞质与细胞核两个方向的压力。作用在恶性肿瘤细胞膜上的电场应力的数量级比正常细胞大1个数量级;作用在恶性肿瘤细胞核膜上的电场应力的数量级比正常细胞大1个数量级。

对于生物膜结构,液态镶嵌模型^[9]是普遍接受的模型,该模型认为,生物膜以脂质双分子层为基质(约占膜总量的50%),其内镶嵌并在表面附着蛋白质分子(约占膜总量的40%)。作为膜结构骨架的双分子层大部分以轻油质般稠度的液态形式存在,具有流动性。从微观角度来看,由于膜的四周都是水,因而膜脂质分子的亲水端都朝向膜的外面,疏水端都朝向膜的中央,故能自动形成脂质双层。各个脂质分子疏水端之间的相互吸引主要靠疏水力和范德华力;亲水端和水分子之间的相互吸引主要靠氢键和静电引力作用。因为亲水端争相与水分子吸引而疏水端彼此以疏水力相吸引又尽量避免与水接触,结果便形成了亲水端向外,疏水端向内的脂质双层。氢键的键能与范德华力对于形成和维持膜结构起到了重要的作用,正常情况下细胞膜和核膜的受力处于平衡状态。

在这种很强的电场应力作用下,细胞膜和核膜会出现电穿孔现象,膜微孔量增大,大量的离子通过膜的离子通道,打破了细胞内外的离子平衡,引起各种细胞

破裂等生物物理现象的发生;如前所述,单个脉冲作用结束后细胞会发生愈合,但完全恢复的时间需要20 s,由于在实验中采用的是周期性的陡脉冲而非单脉冲,增加了脉冲剂量,缩短了作用时间间隔,微孔难以愈合。可以预测当跨膜电位尚未还原至静息电位,尤其是微孔密度还没有大幅度降低的情况下,新一轮的脉冲作用又开始,这样极有可能引起微孔量滚雪球似的增加,对细胞膜和核膜的膜结构造成不可恢复性的破坏。光镜、电镜的观察结果充分证实了这种预测的正确性。

4 结 论

笔者以恶性肿瘤细胞为研究对象,通过对细胞内外电场的计算,首次从细胞的物质结构角度阐述了陡脉冲产生的电场应力对恶性肿瘤细胞不可逆性电击穿的机理。

参考文献:

- [1] HOFMANN G A, DEV S B, DIMMER S, et al. Electroporation Therapy: A New Approach for the Treatment of Head and Neck Cancer [J]. IEEE Trans on Biomedical Engineering, 1999, 46(6): 752 - 759.
- [2] KEKEZ M M, SAVIC P, JOHNSON B F. Contribution to the biophysics of lethal effects of electric field on microorganisms [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1278(1): 79 - 88.
- [3] BEEBE S J, FOX P M, REC L J, et al. Nanosecond Pulsed Electric Field (nsPEF) Effects on Cells and Tissues: Apoptosis Induction and Tumor Growth Inhibition [J]. IEEE Trans on Plasma Science, 2002, 30(1): 286 - 292.
- [4] SUN CAIXIN, YAO CHENGUO, MI YAN, et al. Experimental study on irreversible electrical breakdown of tumor cell under steep pulsed electric fields [A]. IEEE conference of EMBS & BMES [C]. Houston: IEEE, 2002. 1 675 - 1 676.
- [5] 孙才新, 姚陈果, 熊兰, 等. 陡脉冲电场对恶性肿瘤细胞杀伤效应的研究[J]. 生物物理学报, 2002, 18(4): 474 - 477.
- [6] 米彦, 孙才新, 姚陈果, 等. 陡脉冲肿瘤治疗仪的研制及应用[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2003, 26(2): 12 - 14.
- [7] 冯慈璋. 静态电磁场[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 1988.
- [8] 牛中奇. 细胞膜上的自电场应力[J]. 中国生物医学工程学报, 1994, 13(1): 90 - 95.
- [9] 徐光宪, 王祥云. 物质结构[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.

Irreversible Electrical Breakdown of Malignant Tumor Cell Under Steep Pulsed Electric Fields

YAO Chen-guo, SUN Cai-xin, XIONG Lan, MI Yan, WANG Shi-bin

(Key Laboratory of High Voltage Engineering and Electrical New Technology Under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: The basic characteristic of electric field is that the substance in the field is in operation by the stress. Under steep pulsed electric fields, there is strong distribution of electric fields on the inside and outside surfaces of cell membrane. In virtue of the difference of the permittivity among membrane, cytoplasm and extracellular medium, there must be the electric field stress on the surface of the membrane. The calculation results show that cell membrane is stressed from two directions of cytoplasm and extracellular medium under external electric fields. The stress on tumor cell membrane is greatly larger than normal cell membrane, so the tumor cell is more sensitive than normal cell. Tumor cell membrane certainly will be destroyed by electric field stress, then its survival environment and germ plasm will be injured and accordingly the cell will be damaged.

Key words: steep pulsed electric fields; malignant tumor cell; electric field stress; irreversible electrical breakdown