

纳秒脉冲电场联合抗肿瘤药物对人黑色素瘤 A375 细胞活力的影响

钱泽仪¹, 况东东², 罗庆², 宋关斌²

1. 重庆两江育才中学, 重庆 410020; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030

【摘要】纳秒脉冲电场(Nanosecond Pulsed Electric Fields, nsPEFs)是一种有望应用于临床肿瘤治疗的新兴方法。前期研究表明,nsPEFs可抑制人黑色素瘤细胞A375的细胞活性和迁移,但与抗肿瘤药物联用是否有协同作用有待研究。本文采用CCK-8法考察nsPEFs与抗肿瘤药物达卡巴嗪和顺铂联合作用对A375细胞活力的影响。结果发现,nsPEFs联合达卡巴嗪协同作用不显著,但与顺铂联合作用则具有强协同作用,且与nsPEFs的输入能量正相关。该研究结果可为nsPEFs联合抗肿瘤药物更好应用于临床提供实验依据。

【关键词】纳秒脉冲电场;人黑色素瘤细胞;抗肿瘤药物;协同作用;细胞活力

【中图分类号】R312

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2018)06-0714-06

Effects of nanosecond pulsed electric fields combined with anti-tumor drugs on the cell viability of human melanoma cell line A375

QIAN Zeyi¹, KUANG Dongdong², LUO Qing², SONG Guanbin²

1. Liangjiang Yucai Middle School, Chongqing 410020, China; 2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China

Abstract: Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) are promising in the treatment for cancer in clinic. Our previous study proved that nsPEFs can inhibit the cell viability and migration of human melanoma cell line A375. However, whether there is a synergy between nsPEFs and anti-tumor drugs remains unknown. Herein CCK-8 assay is used to investigate the synergistic effect of nsPEFs and anti-tumor drugs, dacarbazine and cisplatin, on the cell viability of A375 cells. The results show that nsPEFs combined with dacarbazine has a trivial synergistic effect, while nsPEFs combined with cisplatin has significant synergistic effect which is positively correlated with the input power of nsPEFs. This study provides research data for the application of nsPEFs combined with anti-tumor drugs in clinic.

Keywords: nanosecond pulsed electric fields; human melanoma cell; anti-tumor drugs; synergistic effect; cell viability

前言

恶性肿瘤是由细胞周期紊乱引发细胞无限增殖而导致的一类恶性疾病,死亡率高。传统治疗方法包括手术、化疗和放疗等,目前尚无有效的治愈手段。近年来,一些新的治疗手段,如免疫疗法和分子靶向药物等已逐渐应用于临床,热疗法、超声疗法和电脉冲等治疗方法也正在研究和探索中。

电脉冲疗法是具有临床应用前景的肿瘤治疗手段,当电场作用于细胞时,细胞膜两侧电荷的不平衡

会引起磷脂双分子层移动,进而导致细胞膜穿孔现象^[1]。利用细胞膜的电穿孔特性,脉冲电场已被广泛应用于基因研究、药物转化和肿瘤治疗中^[2]。纳秒脉冲电场(Nanosecond Pulsed Electric Fields, nsPEFs)是一种脉宽为纳秒级的脉冲电场,能在短时间内释放出极高的能量。研究表明,nsPEFs可导致细胞内部的细胞器,如内质网、线粒体、细胞核等产生大量的微孔,诱导卵巢癌细胞、骨瘤细胞、腺样囊性癌细胞等发生凋亡^[3-5]。此外,nsPEFs与药物联合作用可增强肿瘤细胞对药物的敏感性,提高药物作用效率。已有研究表明,nsPEFs能促进平阳霉素^[5]、顺铂^[6]和吉西他滨^[7-8]等药物的抗肿瘤效果。

我们前期研究表明,低场强、高频 nsPEFs 可抑制人黑色素瘤细胞 A375 的细胞活力,但其与抗肿瘤药物联合作用可否提高药物的抗肿瘤效果还有待研

【收稿日期】2018-03-11

【基金项目】国家自然科学基金(11272365,51477022)

【作者简介】钱泽仪,主要研究方向:生物物理学,E-mail: song9973@126.com

com

究。因此,本文研究了 nsPEFs 与黑色素瘤化疗药物达卡巴嗪 (Dacarbazine, DTIC) 和顺铂 (Cisplatin, DDP) 联合作用对 A375 细胞活力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 nsPEFs 发生器 采用课题组自制的 nsPEFs 发生装置,该装置包括高频纳秒发生器、现场可编程门

阵列(Field-Programmable Gate Array, FPGA)模块、卡钳电极、PC 上位机、示波器、高压探头、皮尔森线圈等。nsPEFs 发生器装置采用电容充放电结构,由高压电源通过充电电阻对储能电容充电,利用开关的迅速开断在负载产生高频纳秒脉冲,工作电路如图 1 所示。文中仪器的开关采用金氧半场效晶体管串联以承受较高电压,其开断由 FPGA 控制,以产生高频率。

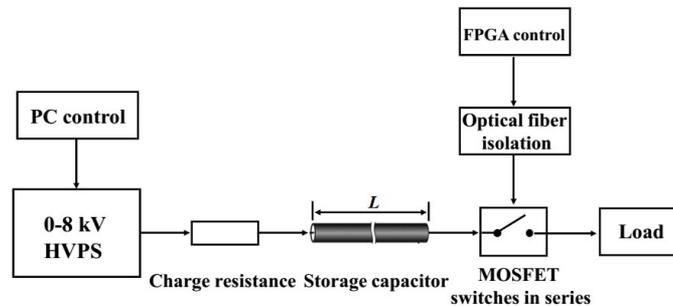


图1 nsPEFs发生装置原理图

Fig.1 Schematic diagram of nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) generation system

1.1.2 细胞 人黑色素瘤细胞株 A375 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.3 主要试剂及耗材 电击杯购自 Bio-Rad 公司。H-DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 TBD 公司。顺铂购自 Sigma 公司,达卡巴嗪购自 Medchem Express 公司。CCK-8 试剂盒购自碧云天公司。STM 脉冲缓冲液:参考 Silve 等^[9]的方法配制。红外温度传感器购自 Keyence 公司。

1.2 方法

1.2.1 nsPEFs 参数设计及评估 基于前期研究结果,我们设定 4 组参数用于本研究(表 1)。nsPEFs 作用时溶液的输入能量可通过公式 $Q=E^2t\sigma$ 计算^[10],其中 E 为场强, t 为高电平时间, σ 为缓冲液电导率。STM 缓冲液电导率为 0.1 S/m ^[9]。采用红外温度传感器测量 nsPEFs 作用前后溶液的实时温度,两者的差值为溶液的温升值。

1.2.2 A375 细胞电脉冲加载 A375 细胞生长到 90% 以上融合后,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化,制成浓度为 2×10^6 个/mL 的单细胞悬液。将 400 μL 细胞悬液加入间距为 2 mm 电击杯中,用 nsPEFs 刺激细胞。

1.2.3 nsPEFs 联合抗肿瘤药物对 A375 细胞活力的影响 本研究设 4 个实验组,分别为对照组(正常培养的 A375 细胞)、nsPEFs 处理组、抗肿瘤药物处理组和 nsPEFs 与抗肿瘤药物联合处理组。收集正常培养的 A375 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,对照组不加入抗肿瘤

药物,抗肿瘤药物处理组加入达卡巴嗪或顺铂,最终浓度分别为 50 nmol/mL 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。另外,收集经 nsPEFs 处理的 A375 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,nsPEFs 处理组不加入抗肿瘤药物,nsPEFs 与抗肿瘤药物联合处理组加入达卡巴嗪或顺铂,最终浓度分别为 50 nmol/mL 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。继续培养 24、48 或 72 h 后,弃上清液,每培养孔中加入 100 μL 无血清 H-DMEM 培养基和 10 μL CCK-8 溶液,避光孵育 2 h。于酶标仪上测量每孔的吸光值(OD 值),测量波长为 450 nm。各实验组设 3 个平行孔,取其均值与对照组的比值为各实验组的相对细胞活力。

1.2.4 协同系数(Combined Index, CI)的计算 以 CI 作为衡量 nsPEFs 与抗肿瘤药物之间是否具有协同作用的量化参数。根据文献[11],CI 值按如下公式计算:

$$CI = \frac{\text{nsPEFs 与抗肿瘤药物联合处理组 OD 值}}{\text{nsPEFs 处理组 OD 值} \times \text{抗肿瘤药物处理组 OD 值}} \quad (1)$$

依据 CI 值判断两者之间为叠加作用($0.9 \leq CI \leq 1.1$)、低度协同作用($0.8 \leq CI < 0.9$)、中度协同作用($0.6 \leq CI < 0.8$)、高度协同作用($0.4 \leq CI < 0.6$)或强协同作用($0.2 \leq CI < 0.4$)。

1.3 统计学方法

实验数据用均数 \pm 标准差表示,采用 Student's t -test 分析两组数据之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 nsPEFs 参数评估

电脉冲刺激细胞时输入的能量会导致溶液温度升高,较大的温升会引发热致死效应。因此,为了评估 nsPEFs 对溶液温度的影响,我们计算了参数之于溶液的能量输入值。计算结果表明,4组参数中参数 D 输入能量最高(表1)。温升的实际测量结果显示,

参数 A、B、C 和 D 作用后溶液的实际温升为 0.60 °C、1.40 °C、1.33 °C 和 2.90 °C(表1),提示4组参数对溶液温升的影响均在 3°C 以内(表1),低于国际公认的 8 °C 阈值^[12],且 nsPEFs 对溶液温升的影响与输入能量的理论计算值相符合。结果表明,本研究所设定的4组实验条件满足 nsPEFs 作用于细胞的温升要求,可用于后续实验。

表1 参数设计及评估

Tab.1 nsPEFs parameter design and evaluation

Experimental parameter	Field strength/ kV · cm ⁻¹	Pulse duration/ns	Pulse number within strings/ unit · string ⁻¹	Pulse number/string · s ⁻¹	Frequency within strings/ kHz	Frequency outside strings/ Hz	Energy input/ kJ · m ⁻³	Temperature rise of STM buffer/°C
A	5	100	100	100	1 000	1	2.5×10 ⁴	0.60
B	8	100	100	100	1 000	1	6.4×10 ⁴	1.40
C	8	250	100	100	50	1	1.6×10 ⁵	1.33
D	8	250	100	200	50	1	3.2×10 ⁵	2.90

2.2 nsPEFs 联合达卡巴嗪对 A375 细胞活力的影响

我们首先考察 nsPEFs 联合达卡巴嗪作用 24、48 和 72 h 对 A375 细胞活力的影响(图2),结果表明 A、B、C 和 D 参数条件下,nsPEFs 与达卡巴嗪联合作用 72 h 对 A375 细胞活力的影响不具有协同作用;参数 C 在检测各时间点与达卡巴嗪均不具有协同作用;参数 A 和参数 D 与达卡巴嗪联合作用 48 h 对 A375 细胞活力的影响存在协同作用。结果提示,nsPEFs 联合达卡巴嗪对 A375 细胞活力的抑制具有一定的协同作用,并与作用时间、作用参数相关,但总体来说协同效应不显著。

2.3 nsPEFs 联合顺铂对 A375 细胞活力的影响

nsPEFs 联合顺铂作用 24、48 和 72 h 对 A375 细胞活力的影响如图 3 所示。结果显示,联合作用 24 h 后,参数 A 与顺铂在抑制 A375 细胞活力方面具有协同作用,并且随着联合作用时间的延长,协同作用效果变化不明显。参数 B、C 和 D 与顺铂联合作用 24 h 对 A375 细胞活力的抑制不具有协同作用,但在联合作用 48 h 后与顺铂表现出高度协同作用,且随着 nsPEFs 输入能量的增加,协同效应愈加明显。结果提示,在抑制 A375 细胞活力方面,nsPEFs 与顺铂联合作用的协同效应与输入能量相关。

3 讨论

脉冲电场在肿瘤治疗方面具有杀伤效果好、副作用小等特点,有望成为肿瘤治疗领域新兴的治疗手段,但相关研究开展时间不长,治疗参数仍有待优

化。本研究在前期研究的基础上,筛选了4组 nsPEFs 参数,考察其与抗肿瘤药物达卡巴嗪和顺铂联合作用对 A375 细胞活力的影响,研究发现 nsPEFs 与达卡巴嗪在抑制 A375 细胞活力方面协同作用不显著,与顺铂联用具有强协同作用。本研究研究结果可为 nsPEFs 的临床应用提供实验数据参考。

传统的电穿孔疗法多使用脉宽为微秒或毫秒的脉冲电场,在皮肤癌、胰腺癌、肝癌和乳腺癌等的治疗中具有较好的效果,并且能显著提高肿瘤细胞对化疗药物的吸收率,大大提高化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用^[2]。相对微秒或毫秒级的脉冲电场,nsPEFs 能在短时间内释放出极高的能量,但由于脉冲持续时间短,其释放的能量引起温度的变化较小,能在一定程度上避免组织热损伤和疤痕的形成^[2]。这一特性使得 nsPEFs 在肿瘤治疗方面具有更大的优势,也更受关注。

就针对黑色素瘤的研究而言,目前研究的 nsPEFs 多为高场强 (>10 kV/cm) 和低频率 (1 Hz)^[13-14]。高场强的 nsPEFs 更容易在细胞膜上形成穿孔,对肿瘤有较好的抑制效果,但高场强电场作用往往会引起肌肉收缩,并造成皮肤灼伤^[15]。采用低场强 (<10 kV/cm) 可有助于缓解这些问题。因此,本研究采用场强为 5 和 8 kV/cm 的 nsPEFs 作用于 A375 细胞。在进行细胞实验前,我们对脉冲处理过程中产生的热效应进行评估。有研究表明,当溶液温度高于 45 °C 时,正常细胞便会出现热致死现象^[12]。因此,考虑到人体正常体温为 37 °C

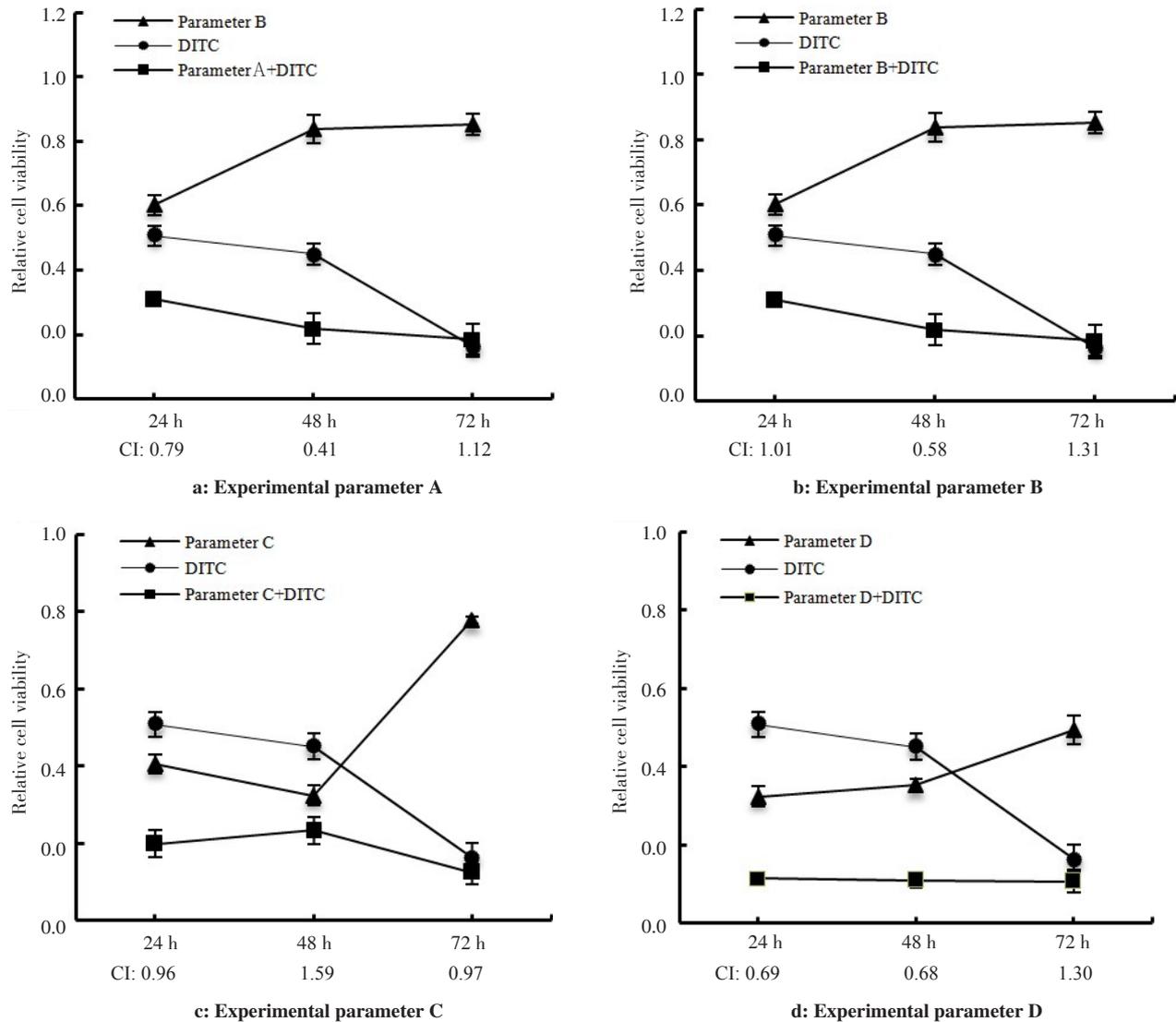


图2 纳秒脉冲与达卡巴嗪联合作用对A375细胞活力的影响

Fig.2 Effects of nsPEFs combined with DITC on the viability of A375 cells

DITC: Dacarbazine; CI: Combined index

左右,为避免热致死效应,nsPEFs所导致的温升必须小于 8°C 。经测算,本研究所用4组参数的温升均小于 3°C ,符合实验要求。

nsPEFs、达卡巴嗪和顺铂单独作用于A375细胞均能显著抑制其细胞活力(图2和图3)。对比A、B、C和D参数的作用效果发现,随着输入能量的增加,nsPEFs对A375细胞活力的抑制效果也愈加明显,但作用48和72h后相对作用24h,对细胞活力的抑制率有所回升,提示nsPEFs对细胞活力的抑制作用持续时间在48h以内,在临床应用中采用48h内重复刺激的治疗方案可能有助于改善对肿瘤的抑制效果。这一猜测有待于进一步的实验研究证实。

由于nsPEFs作用时在细胞膜两侧形成电位差会引发磷脂双分子层的位移,nsPEFs会在细胞膜上形成尺寸约1nm以下的可逆穿孔,且随着场强的增加,

纳米孔尺寸会有所增加^[16-18]。这些可逆电穿孔,为药物传递到细胞内提供了便利。这种方法可提高药物传输效率,增加胞内或胞器内部药物浓度,有助于降低药物的使用浓度,缓解药物的毒副作用。研究表明,nsPEFs可促进抗肿瘤药物吉西他滨进入乳腺癌细胞^[7]和口腔鳞癌细胞^[8],有助于提高肿瘤细胞对药物的敏感性。此外,nsPEFs与顺铂在治疗肝肿瘤方面^[6],与平阳霉素在治疗涎腺腺样囊性癌方面^[5]也具有协同作用。本研究研究表明,nsPEFs与顺铂联合作用可降低A375细胞的活力,提示nsPEFs可有助于黑色素瘤细胞对顺铂的吸收,提高顺铂的抑瘤效率。但是相对顺铂,nsPEFs与达卡巴嗪联合作用的协同效应却不甚明显,这可能是由于现有的脉冲条件不足以在细胞膜上产生适合达卡巴嗪进入细胞的孔隙所致,但这一猜测还需进一步的实验验证。

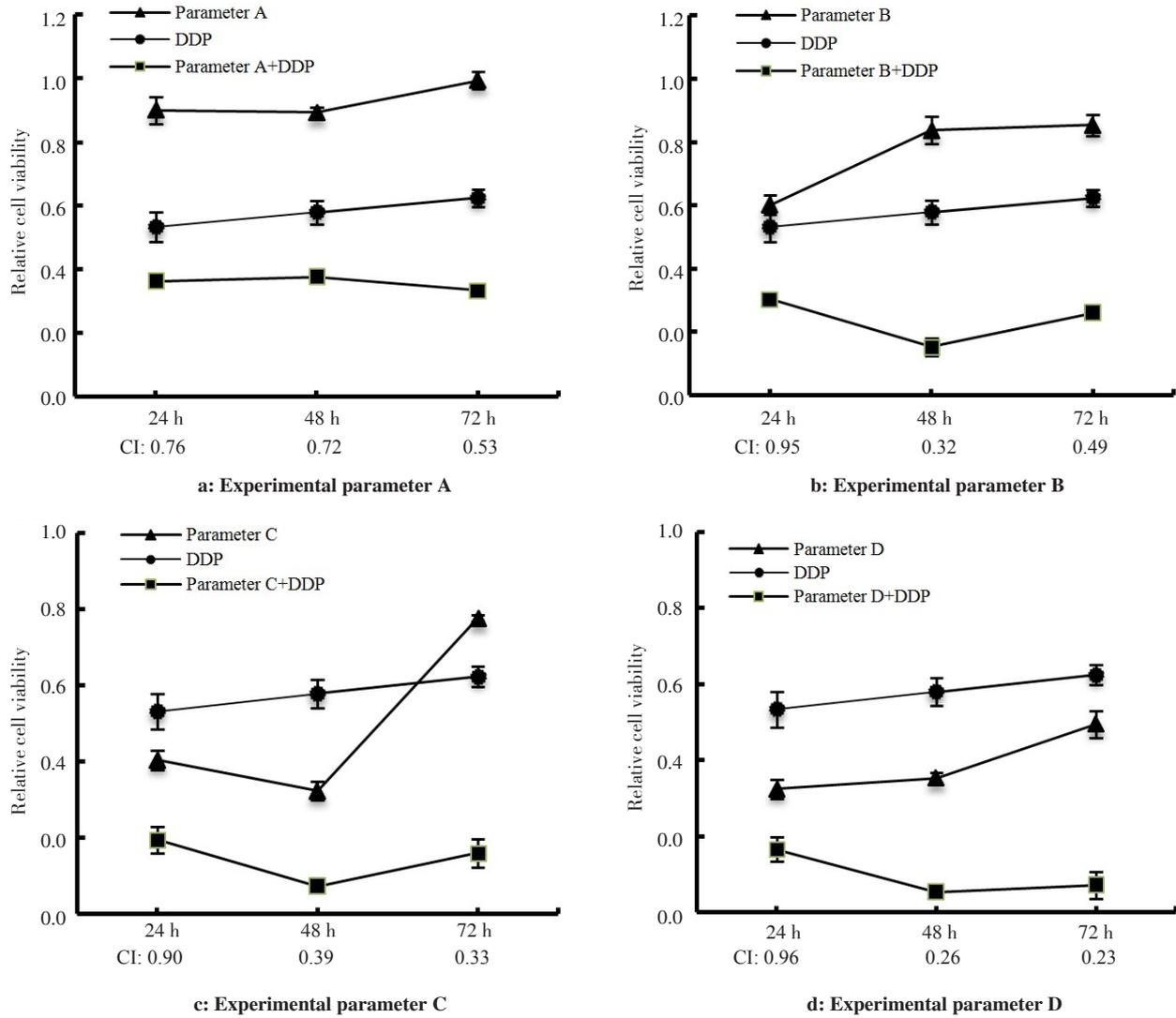


图3 纳秒脉冲与顺铂联合作用对A375细胞活力的影响

Fig.3 Effects of nsPEFs combined with cisplatin (DDP) on the viability of A375 cells

【参考文献】

[1] WEAVER J. Electroporation of cells and tissues [J]. IEEE Trans Plasma Sci, 2000, 28(1): 24-33.

[2] 岑超, 陈新华, 郑树森. 纳秒脉冲电场肿瘤电消融的分子生物学机制 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2015, 44(6): 678-683.
CEN C, CHEN X H, ZHENG S S. Mechanism of ablation with nanosecond pulsed electric field [J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2015, 44(6): 678-683.

[3] 夏如氏, 唐均英, 赵雪, 等. 纳秒级陡脉冲诱导人卵巢癌细胞凋亡及对Fas介导的细胞凋亡通路的影响 [J]. 生物医学工程学杂志, 2012, 29(6): 1144-1149.
XIA R M, TANG J Y, ZHAO X, et al. Induction of apoptosis of ovarian cancer cells and influence on Fas-mediated apoptosis pathway by nanosecond pulsed electric fields [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2012, 29(6): 1144-1149.

[4] BRETON M, MIR L. Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments [J]. Bioelectromagnetics, 2012, 33(2): 106-123.

[5] WEI Q, JINSONG G, SHAN W, et al. Synergistic effect of nanosecond pulsed electric field combined with low-dose of pingyangmycin on salivary adenoid cystic carcinoma [J]. Oncol Rep, 2014, 31(5): 2220-2228.

[6] YIN S, CHEN X, XIE H, et al. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) enhance cytotoxicity of cisplatin to hepatocellular cells by microdomain disruption on plasma membrane [J]. Exp Cell Res, 2016, 346(2): 233-240.

[7] WU S, GUO J, WEI W, et al. Enhanced breast cancer therapy with nsPEFs and low concentrations of gemcitabine [J]. Cancer Cell Int, 2014, 14(1): 1-12.

[8] WANG J, GUO J, WU S, et al. Synergistic effects of nanosecond pulsed electric fields combined with low concentration of gemcitabine on human oral squamous cell carcinoma *in vitro* [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43213.

[9] SILVE A, LERAY I, LEGUÈBE M, et al. Cell membrane permeabilization by 12-ns electric pulses: not a purely dielectric, but a charge-dependent phenomenon [J]. Bioelectrochemistry, 2015, 106 (Pt B): 369-378.

[10] HAN Z, ZENG X A, FU N, et al. Effects of pulsed electric field treatments on some properties of tapioca starch [J]. Carbohydr Polym, 2012, 89(4): 1012-1017.

[11] 喻向春, 殷胜勇, 张蕙. 纳秒脉冲消融联合顺铂对宫颈癌细胞Hela生长的影响及机制 [J]. 现代妇产科进展, 2016, 25(6): 437-440.
YU X C, YIN S Y, ZHANG Y. Effect of nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) ablation combined with cisplatin on human

- cervical cancer HELA cell and the molecular mechanism investigation[J]. *Progress in Obstetrics and Gynecology*, 2016, 25(6): 437-440.
- [12] ZAIDI A, BAGEWADIKAR R, SUBRAMANIAN M, et al. Effect of whole body hyperthermia (39 °C, 1 h) on radiation-induced apoptosis in Swiss mice[J]. *J Therm Biol*, 2004, 29(1): 3-8.
- [13] ESTLACK L, ROTH C, THOMPSON G, et al. Nanosecond pulsed electric fields modulate the expression of Fas/CD95 death receptor pathway regulators in U937 and Jurkat cells[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(12): 1755-1768.
- [14] MOROTOMI-YANO K, AKJYAMA H, YANO K. Nanosecond pulsed electric fields activate AMP-activated protein kinase: implications for calcium-mediated activation of cellular signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(3): 371-375.
- [15] CHEN X, SWANSON R, KOLB J, et al. Histopathology of normal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment[J]. *Melanoma Res*, 2009, 19(6): 361-371.
- [16] 王同帅, 王超鹏, 周美娟. 紫外线对黑色素瘤细胞 A375 自噬与凋亡诱导效应[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(8): 1223-1227.
- WANG T S, WANG C P, ZHOU M J. The effect of autophagy and crosstalk with apoptosis induced by ultraviolet in A375 [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2017, 33(8): 1223-1227.
- [17] NESIN O, PAKHOMOVA O, XIAO S, et al. Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60- and 600-ns electric pulses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808(3): 792-801.
- [18] BEEBE S, SAIN N, REN W. Induction of cell death mechanisms and apoptosis by nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs)[J]. *Cells*, 2013, 2(1): 136-162.

(编辑:陈丽霞)