

电穿孔疗法用于肿瘤治疗的研究进展*

姚陈果¹ 孙才新¹ 熊 兰¹ 米 彦¹ 综述 胡丽娜² 审校

¹(重庆大学 高电压与电工新技术教育部重点实验室,重庆 400044)

²(重庆医科大学 第二附属医院,重庆 400010)

摘要 近年来,电工技术已广泛用于生物医学工程研究中,而将脉冲电场用于肿瘤治疗的研究横跨生物工程、电工新技术、计算机技术和微电子技术等领域,是一门新兴的边缘学科。国内外的专家对在脉冲电场作用下细胞膜发生电穿孔的现象进行了深入的研究与临床试验,研究结果表明细胞膜电穿孔能促进化疗药物的运送,从而有效地提高了化疗药物的杀伤力。研究者们还大胆地探索了高电场强度的陡脉冲促使肿瘤细胞发生不可逆性电击穿(IREB)而最终死亡等现象的研究。

关键词 电穿孔 肿瘤治疗 细胞膜 不可逆性电击穿

The Research Progress of Using Electroporation Therapy in Treatment of Tumor

Yao Chenguo¹ Sun Caixin¹ Xiong Lan¹ Mi Yan¹ Hu Lina²

¹ (College of Electrical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044)

² (Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010)

Abstract In these years, the electrical technology is widely applied in the study of biomedical engineering. Using electroporation therapy (EPT) to treat tumor is associated with biomedical engineering, electrical new technology, computer technology and microelectronic technology, which is a new marginal subject. Many experts have studied the mechanism and clinical treatment of the cell membrane electroporation phenomenon under electrical fields. These researches have shown that the membrane electroporation can stimulate the transport and intake of various drugs, which improves the tumoricidal effect of these drugs. The researchers have also been exploring the phenomenon that irreversible electrical breakdown (IREB) of cell membrane under high electrical fields and steep pulses leads to the death of tumor.

Key words Electroporation Tumor therapy Cell membrane Irreversible electrical breakdown

1 引言

根据世界卫生组织的统计,全世界每年死于癌症的有数百万人,恶性肿瘤已成为威胁人类生命健康的主要疾患。虽然人们提出了包括手术治疗、放射治疗、化疗和超声聚焦等在内的多种治疗方法,但是由于受到其适应症、禁忌症和副作用等因素的限制,它们对恶性肿瘤的治疗疗效仍不够理想。

实验发现给细胞施加电场将导致细胞膜出现微孔现象,当电场取消后,在大多数情况下微孔会关闭而不会对细胞造成任何影响,这个现象便称之为电穿孔。电穿孔现象反映了细胞膜的生物电化学特性,

它对于研究电场作用下细胞的结构和功能特性有重大的意义。此后研究者们将电穿孔技术用于肿瘤治疗中并获得了成功。到目前为止电穿孔技术的试验研究和临床应用远远领先于机理研究。

本文针对电穿孔疗法用于肿瘤治疗的发展历史、目前的研究进展和发展趋势作了较详细的综述并对其应用前景进行了初步探讨。

2 电穿孔疗法的发展历史

电穿孔是在短时电脉冲作用下细胞膜出现暂时微孔的物理过程。细胞膜电穿孔的结果是细胞内外分子交换有显著的增加。细胞膜渗透程度取决于各种电、物理、化学和生物参数。这些参数包括脉冲电

* 国家自然科学基金资助项目(50077027)

场强度和持续时间、目标细胞的尺寸大小和细胞膜两侧的化学特性。这种短时可逆的膜渗透性为我们提供了一种治疗的有效手段。

早在 20 世纪 50 年代,电穿孔现象已为人所知,但真正的研究却只有 20 来年的时间。Sale 等^[1]在 1967 年首次提出电场会导致细胞死亡或减少的观点。进一步的研究表明合理控制电脉冲能暂时、可逆地解决细胞膜渗透性障碍^[2~4]。Weaver 等^[5]学者经过长期的研究发现: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 $\mu\text{s}\sim\text{ms}$ 级的电脉冲刺激细胞膜时,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 $10^{-3}/\text{cm}^2$;当增大电场,使施加在细胞膜上的跨膜电位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,导致细胞膜阻碍微粒渗透能力降低。这种由电脉冲产生的细胞膜渗透性(通常称之为电穿孔)被解释为细胞膜暂时通透性结构或微孔的形成。

细胞膜的渗透性增强有利于细胞吸收各种药物、基因物质、蛋白质、其它大分子和脂质体。这项技术现在已用于生物医学领域^[6]中,例如:电穿孔疗法、药物运送和电基因疗法等。

电穿孔疗法(Electroporation therapy, EPT)是采用高场强的电脉冲辅助化疗药物如博莱酶素(BLM)等治疗肿瘤。其治疗机理是高强度的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,这种方法只需小剂量的药物就能高效、低毒性地杀死肿瘤细胞,大大提高了化疗药物的杀伤力。Okino^[7]于 1987 年发表电脉冲结合化疗药物用于治疗的应用文章,文中他们称之为电脉冲化疗法。随后电穿孔疗法用于肿瘤治疗的动物实验取得了令人鼓舞的成绩,为人类的临床研究铺平了道路^[8~10]。Hofmann 等^[11]于 1999 年发表文章总结了将电穿孔技术成功用于头颈癌治疗的经验,他们的研究成果已被美国 FDA 批准进入第二期临床治疗。这充分显示了电穿孔技术在治疗肿瘤方面的巨大潜力。

电穿孔疗法治疗肿瘤较之传统疗法有许多优点^[12],例如:采用相对较少的药物剂量就能达到治疗效果并将对人体的副作用降到最小;它适于那些不能切除的肿瘤从而保留重要的功能性组织;靠近关键器官(如心脏等)的肿瘤如采用手术治疗或放疗均会导致该器官永久性功能丧失;对传统的化疗、手

术或放疗后均无效的肿瘤细胞;它还能减少原位瘤治疗后复发的可能性等。因此,可以预见电穿孔技术治疗肿瘤这一前沿性的交叉课题具有良好的发展前景。

3 电穿孔疗法治疗肿瘤的试验研究

国内外的专家学者对电穿孔疗法治疗肿瘤进行了大量的动物试验和临床试验研究,积累了丰富的经验。张锦珠等^[13]对高强度脉冲电场下细胞内离子通透性的改变加以研究,发现细胞内 Na^+ 浓度随着电场强度的增加而呈非线性增加(快于指数增长趋势),而低强度脉冲电场能激活 Na^+ 、 K^+ 、ATPase,使肿瘤细胞内外离子分布异常,改变了肿瘤细胞的生存环境。根据 Mir 等^[14]的报道,电脉冲辅助 BLM 药物治疗能使 BLM 的毒性增至 650 000 倍。Cemazer 等^[15]发现将脉冲作用于移植了 SA-1 肿瘤的 A/J 鼠时,能增加肿瘤细胞内顺铂(Cisplatin)的含量,使顺铂的细胞毒性提高了 20 倍且肿瘤体积逐渐减。Okino 等^[16]在对皮下移植有 AH-109AY 肝细胞癌的 Donryu 小鼠注射 4 mg/kg BLM 后 30 min 给予高压脉冲发现:当脉冲电压峰值在 1~5 KV 范围时,抗癌效应(Effect, E)与电压(Voltage, V)平方成正比;脉冲持续时间(Duration, D)在 2.5~5.8 ms 范围时,抗癌效应与持续时间成正比,并总结出了抗癌效应与电压持续时间的关系为 $E = \gamma V^2 D$ 。Ramirez 等^[17]对移植了 VX2 肝癌的新西兰大白兔给予电场强度幅值 850 V/cm、持续时间 100 μs 、频率 1 Hz、剂量 8 个方波/次的脉冲,处理后发现作用 15~20 min 后呈现暂时性血管低灌注现象,电极作用区域有明显的 pH 值变化,同时由于血管低灌注和血凝作用,电极针插入肝实质深部不见出血。

Michel 等^[18]采用电脉冲对 8 例头颈部细胞癌进行了 I / II 期临床试验,8 名患者平均年龄 55 岁,共有 40 个肿瘤结节。对每个结节局部注射 BLM 10 mg/cm² 3.5 min 后,施与 100 μs 、1 300 KV/cm、1 Hz 的电脉冲刺激 4 或 8 次,试验结果阻止了结节的增长。在观察的 250 d 内 CR(结节完全消失)占 57%,PR(结节比治疗前至少缩小 50%)占 15%。在此实验中,治疗 1~2 h 后治疗区域有红斑和轻度水肿,但在 24 h 内即消退。第二天结节呈白色坏死状,几天后形成结痂。所有患者无全身性毒副作用,无任何意外事故发生。

4 电穿孔治疗仪的研制现状

电穿孔治疗仪的研制以 Genetronics 公司(网址为:www.genetronics.com)生产的 MedPulser[®]系统最为著名,该公司正在美国和加拿大对头颈癌、胰腺癌和肝癌患者进行第二期临床试验研究。

MedPulser[®]系统^[11]由电脉冲发生器(它产生固定电压和周期的方波电脉冲)和经消毒处理的针电极阵列组成。系统的治疗原理和步骤如下:

(1)向肿瘤组织注射博莱霉素;

(2)10 min 后,插入针电极阵列并启动 MedPulser[®],仪器将自动、有序地在不断变化的针电极对之间产生脉冲使得电场不断旋转。根据临床的需要,电极针的数目、长度、探头的直径和角度等都可以进行选择。

系统的整个治疗过程十分简单。仪器备有针对特定肿瘤尺寸和 CT 成像位置的最佳的电极阵列。仪器唯一的传感元件嵌于电极阵列之间,它能自动设置最佳的电参数和脉冲产生规则。在施行治疗前,系统将对治疗的电参数进行自检。治疗过程的图像资料将实时提供给医生以确定治疗效果。MedPulser[®]在每对电极间产生的电压和脉冲周期都经过了严格的理论电场计算和实验研究,它产生的脉冲电压和周期与使用的电极探头相对应,即每一种电极探头只能产生与之对应的电脉冲波形。目前这套系统已广泛应用于临床肿瘤治疗中。

5 结论与展望

人们在采用电穿孔疗法时多是结合化学药物一起治疗,而化疗药物无论剂量多少都有毒性,对人体总是有一定的损害,这就限制了该方法的应用。其实大量的研究都发现当施加的脉冲瞬时电场强度高于 1 KV/cm 时,细胞的分子渗透率会大大提高;随着脉冲电场强度的继续增加,将发生细胞膜的不可逆性电击穿(IREB),出现细胞膜机械断裂直至细胞全部死亡^[5,6]。人们在发现这一现象时提出了电击穿理论^[19]:(1)细胞膜的微孔出现断裂,导致“空洞”产生,破坏了细胞的结构;(2)“空洞”使微粒大量出入细胞膜,导致离子泄露、细胞膜内外的电学平衡被打破,使得细胞的生存环境发生剧变。电击穿理论能很好地解释 Lee 等^[20]发现的脉冲电场破坏细胞导致微生物死亡的原因。

基于上述原因,人们又提出了采用微创方式,用能量可控陡脉冲对肿瘤细胞的不可逆性电击穿直接

杀死肿瘤细胞,从而使病人免去手术、化疗和放疗的痛苦^[21]。这是应用电穿孔技术治疗肿瘤的一种新方法,目前还正处于机理研究和动物试验阶段。

综上所述,由于电穿孔技术治疗肿瘤是一项多学科交叉的、综合性的研究课题,因此这项技术还需要在实践中不断完善以造福人类。

参 考 文 献

- Sale AJH, Hamilton WA. Effects of electric fields on microorganisms I killing of bacteria and yeasts. *Biochim Biophys Acta*, 1967; 118 : 781
- Neumann E, Rosenheck K. Permeability changes induced by electrical pulse in vesicular membranes. *J Membr Biol*, 1972; 10 : 279
- Kinosita KJ, Tsong TY. Voltage includes formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1979; 471 : 227
- Hofmann GA, Evans G. Electronic genetic-physical and biological aspects of cellular electromanipulation. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 1986; 5(4) : 6
- Weaver JC. Electroporation: A dramatic, nonthermal electric field phenomenon. In: *Proceedings of the first world congress for electricity and magnetism in biology and medicine*. Lake Buena Vista, Florida; Academic Press, 1992 : 14
- Neumann E, Sowers AE, Jordan CA. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. New York: Plenum, 1989
- Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on growing tumors. *J Cancer Res*, 1987; 78 : 1319
- Salford LG. A new brain tumor therapy combining bleomycin with in vivo electroporation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; 194(2) : 938
- Dev SB. Effective electroporation therapy of human pancreatic tumors implanted in nude mice. *Drug Delivery*, 1997; 4(4) : 293
- Rudolf Z. Electrochemotherapy with bleomycin the first clinical experience in malignant melanoma patients. *Radial Oncol*, 1995; 29 : 229
- Hofmann GA, Dev SB, Dimmer S. Electroporation therapy: a new approach for treatment of head and neck cancer. *IEEE Trans on Biomedical Engineering*, 1999; 46(6) : 752
- Dr Dietmar Rabussay, Dr Stanley Kornhauser. Frequently asked questions about electroporation therapy. *American Journal of Electromedicine*, 1998; 4 : 64
- 张锦珠, 孙 彤, 陈 雅等. 脉冲电场引起的红血球内钠离子浓度变化的研究. *中国科学(C辑)*, 1997; 27(6) : 481
- Mir LM. Electrochemotherapy potentiation of anti-tumor effect of bleomycin by electric pulses. *Eur J Cancer*, 1991; 27(1) : 68
- Cemazer M. Increased platinum accumulation in tumor cells after in vivo electrochemotherapy with cisplatin. *Br J Cancer*, 1999; 79(9) : 1386
- Okino M. Optimal electric conditions in electrical impulse chemotherapy. *JPN J Cancer Res*, 1992; 83(10) : 1095
- Sersa G. Tumor blood flow change induced by application of electrical pulses. *Eur J Cancer*, 1999; 35(4) : 672
- Michel Belehraclek. Electrochemotherapy: a new anti-tumor treatment. *Cancer*, 1993; 72(12) : 3694
- James C Weaver. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cellular Biochemistry*, 1993; (51) : 426
- Lee RC. Electrical injury mechanisms: electrical breakdown of cell membranes. *Plast Reconstr Surg*, 1987; 80 : 672
- 熊 兰. 能量可控陡脉冲治疗肿瘤的离体试验与治疗机理的研究. 重庆大学硕士学位论文, 2000