

# 纳秒脉冲电场对人卵巢癌顺铂敏感及耐药细胞的 凋亡诱导效应及机制研究

张顺泉 于廷和\*

(重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆 400010)

**摘要** 利用纳秒脉冲电场(nanosecond pulsed electric fields, nsPEFs)治疗肿瘤具有潜在优势。本研究探讨了纳秒脉冲电场对体外培养的人卵巢癌顺铂敏感细胞COC1及顺铂耐药细胞COC1/DDP的生长抑制、凋亡诱导效应及其机制。CCK-8法分析显示,纳秒脉冲电场降低COC1及COC1/DDP细胞存活率,而且抑制效应呈明显时间依赖效应。流式细胞术检测结果结合Hoechst 33342荧光染色结果表明,纳秒脉冲电场可诱导COC1及COC1/DDP细胞发生凋亡。JC-1荧光染色及caspase-3蛋白酶活性检测表明,纳秒脉冲电场处理可引起COC1及COC1/DDP细胞线粒体膜电位降低及caspase-3活性增强。流式细胞术检测细胞周期显示,纳秒脉冲电场可将COC1细胞周期阻滞于S期。以上研究结果揭示,纳秒脉冲电场可以抑制COC1及COC1/DDP细胞增殖,诱导细胞凋亡,线粒体途径凋亡为其可能机制。

**关键词** 纳秒脉冲电场;人卵巢癌细胞;化疗耐药;细胞凋亡;线粒体跨膜电位

## Effects and Potential Mechanisms of Nanosecond Pulsed Electric Fields on Apoptosis Induction of Cisplatin-sensitive and Cisplatin-resistant Human Ovarian Cancer Cells

Zhang Shunquan, Yu Tinghe\*

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract** Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) have emerged as a promising anticancer strategy. This study explored growth inhibition, apoptosis induction and potential mechanisms of nanosecond pulsed electric fields in human ovarian cancer cells COC1 (cisplatin-sensitive cell line) and COC1/DDP (cisplatin-resistant cell line) *in vitro*. Cell viability was determined with CCK-8 assay, and the results demonstrated that nsPEFs could remarkably decrease cell viability of both the two cells in time dependent manners. Apoptosis was evaluated by Hoechst 33342 fluorescence staining and flow cytometry quantitatively, both the two assays revealed that nsPEFs could significantly induce apoptosis in COC1 and COC1/DDP cells. In addition, with JC-1 assay and luminescent assay respectively, we found mitochondrial membrane potential decreased and caspase-3 activity increased in COC1 and COC1/DDP cells after treating them with nsPEFs. Furthermore, we observed cell cycle by flow cytometry and found that nsPEFs induced cell cycle arrest in S phase in COC1 cells. Together, these data indicated

收稿日期: 2015-03-21 接受日期: 2015-06-05

国家自然科学基金(批准号: 31470822)和高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20135503130002)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63893711, E-mail: yutinghe@hotmail.com

Received: March 21, 2015 Accepted: June 5, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31470822) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (Grant No.20135503130002)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63893711, E-mail: yutinghe@hotmail.com

网络出版时间: 2015-07-01 16:57 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150701.1657.002.html>

that nanosecond pulsed electric fields could inhibit proliferation and induce apoptosis of COC1 and COC1/DDP cells, and the potential apoptosis pathway may be mitochondria mediated.

**Keywords** nanosecond pulsed electric fields; human ovarian cancer cells; chemoresistance; apoptosis; mitochondrial transmembrane potential

卵巢癌为死亡率居首位的女性生殖器恶性肿瘤,目前其治疗方法以手术治疗为主,辅以铂类药物的联合化疗,约有80%患者在化疗后2~3年内会出现肿瘤复发,且复发后往往出现肿瘤细胞耐药,导致再次化疗失败风险增高。肿瘤细胞对化疗药物的耐药是卵巢癌治疗效果不理想的重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。因此,克服卵巢癌细胞耐药是卵巢癌治疗亟需解决的问题。

非药物治疗方法是目前国内外肿瘤治疗的突破方向之一。纳秒脉冲电场是高功率、低热量的新兴脉冲电场技术,由于纳秒电脉冲的持续时间比细胞膜的充电时间短,它可以产生细胞内电处理效应(intracellular electromanipulation, IEM),即细胞膜未出现明显的损伤,但亚细胞结构(细胞核、线粒体、内质网、细胞骨架等)会出现结构改变或损伤,并导致一系列细胞内信号转导的变化,最终引起一系列细胞生理、病理学过程(如细胞内离子流、死亡)<sup>[3-7]</sup>。纳秒脉冲电场因其特有的细胞内电处理效应及非热损伤特点,受到国内外生物工程领域和医学领域研究者们极大关注,大量研究表明,纳秒脉冲电场在肿瘤治疗上具有良好的应用前景<sup>[8-10]</sup>。

根据细胞生物学和电磁场理论,由于线粒体膜充电速度极快,纳秒脉冲电场将靶向作用于肿瘤细胞线粒体,最终导致线粒体跨膜电位(mitochondrial transmembrane potential,  $\Delta\Psi_m$ )下降甚至崩溃,从而启动线粒体介导的细胞凋亡进程<sup>[11]</sup>。本课题组前期实验采用等效电路模型研究分析COC1和COC1/DDP细胞各单元的电压,发现细胞质内电压已高于损伤阈值,提示位于胞质内线粒体可能受损;单细胞凝胶电泳实验证实,纳秒脉冲电场可直接引起COC1和COC1/DDP细胞DNA损伤<sup>[12]</sup>。纳秒脉冲电场诱导的线粒体或DNA损伤均有可能启动细胞线粒体途径凋亡。

本实验选择体外培养的人卵巢癌顺铂敏感细胞株COC1及耐药细胞亚株COC1/DDP为研究对象,研究纳秒脉冲电场对COC1及COC1/DDP细胞的生长抑制和凋亡诱导作用,并研究其对细胞线粒体膜电位、caspase-3蛋白活性、细胞周期等的影响,探

讨纳秒电脉冲物理因素转化为细胞生物效应的机制,以期纳秒脉冲电场对耐药肿瘤的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司, RPMI-1640培养基购自Gibco公司, CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所, JC-1线粒体膜电位检测试剂盒购自Invitrogen公司, Hoechst 33342购自Sigma公司, Caspase-Glo<sup>®</sup>3/7活性检测试剂盒购自Promega公司, 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期即时检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人卵巢癌顺铂敏感细胞株COC1及顺铂耐药细胞株COC1/DDP(均为本实验室保存)用含青霉素100 U/mL、链霉素100  $\mu\text{g/mL}$ 及10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度培养箱中培养。耐药株COC1/DDP培养基中加入0.5  $\mu\text{g/mL}$ 顺铂。待细胞生长至对数生长期时进行实验。实验前制备单细胞悬液,调整细胞密度为 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 。

**1.2.2 纳秒脉冲电场处理** 固定脉冲电场参数为脉宽32 ns,场强10 kV/cm,频率10 Hz,处理组脉冲作用时间为10 min。另设未施加电场的细胞悬液为对照组。

**1.2.3 CCK-8法检测细胞存活率** 脉冲处理后,处理组及对照组细胞分别接种于96孔板,96孔板每孔加入100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液,每组设置5个复孔,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵育至设定时间点。分别于处理后0.5, 6, 12, 24 h,按照CCK-8实验说明书检测光密度值( $D$ 值),同时设立空白对照组(即只加培养基及10  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂)。根据公式计算细胞的存活率,细胞存活率( $\%$ )= $(D_{\text{处理组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期** 细胞凋亡检测:经脉冲处理后的处理组及对照组细胞

孵育12 h后, 收集细胞, 磷酸盐缓冲液洗2次, 重悬于Binding buffer中, 加荧光标记的Annexin V和PI染液, 室温、避光孵育5 min。细胞周期的检测: 经脉冲处理后的处理组及对照组细胞孵育12 h, 收集细胞后, 按照细胞周期即时检测试剂盒说明书进行标记、染色并经流式细胞仪进行结果检测。

**1.2.5 荧光显微镜检测Hoechst 33342荧光** 经脉冲处理后的处理组及对照组细胞孵育12 h后, 加入Hoechst 33342染色液, 37 °C避光孵育20 min后, 弃去染色液, 用磷酸盐缓冲液洗3次, 在荧光显微镜下观察并拍照。正常细胞核膜完整规则, 着色为均匀蓝色, 凋亡细胞核边缘不规则, 核固缩, 染亮蓝色, 呈分叶状或致密斑块。

**1.2.6 JC-1检测线粒体跨膜电位** JC-1是一种广泛用于检测线粒体跨膜电位(mitochondrial transmembrane potential,  $\Delta\Psi_m$ )的阳离子荧光探针。在线粒体膜电位较高时, JC-1以聚合物形式聚集在线粒体的基质中, 产生均匀分布的颗粒状橘红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1以单体的形式存在于胞质内, 而产生弥散分布的绿色荧光。通过检测荧光颜色的转变来评价线粒体膜电位的变化, 并常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体膜电位下降的程度。经脉冲处理后的处理组及对照组细胞孵育12 h后, 收集细胞, 加入5  $\mu\text{g/mL}$  JC-1染液, 37 °C避光孵育20 min, 用荧光显微镜观察细胞荧光颜色并同时用多功能酶标仪记录红绿荧光的强度。多功能酶标仪激发光设置为485 nm, 检测JC-1单体时发射光设置为529 nm, 检测JC-1聚合物时发射光设置为590 nm。

**1.2.7 化学发光法检测caspase-3蛋白酶活性** 该检测方法利用荧光素酶标记的含DEVD氨基酸序列的caspase-3特异性水解底物, caspase-3蛋白酶水解该底物后, 通过化学发光法检测荧光素酶释放出的辉光型光信号, 该光信号强度与caspase-3蛋白活性呈正比。经脉冲处理后的处理组细胞及对照组细胞孵育12 h后, 收集细胞, 分别接种于白色384孔酶标板, 每组设六个复孔, 按照说明书加入底物, 混匀, 室温孵育30 min后经多功能酶标仪进行检测。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件进行数据处理, 数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 形式表示, 进行多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两组间比较采用 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

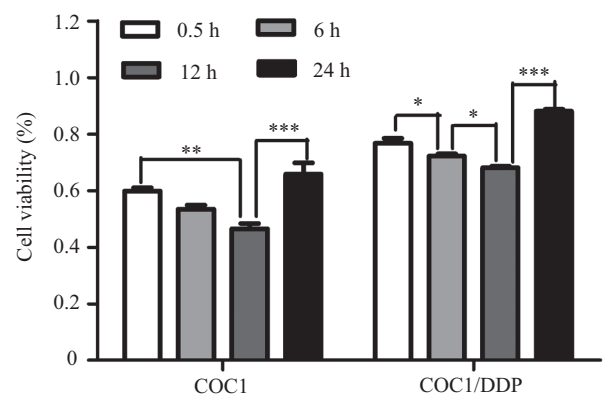
### 2.1 纳秒脉冲电场降低COC1及COC1/DDP细胞存活率

采用CCK-8法检测了纳秒脉冲电场处理0.5, 6, 12, 24 h后, COC1及COC1/DDP细胞存活率。结果表明, 纳秒脉冲电场作用0.5, 6, 12, 24 h后, 各时间点COC1细胞存活率分别为(59.85 $\pm$ 2.15)%、(53.40 $\pm$ 2.68)%、(46.53 $\pm$ 3.20)%和(65.84 $\pm$ 6.73)%, 与对照组存活率(100%)相比均减低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。COC1/DDP细胞于纳秒脉冲电场作用0.5, 6, 12, 24 h后, 各时间点存活率分别为(76.79 $\pm$ 2.85)%、(72.11 $\pm$ 1.45)%、(68.07 $\pm$ 0.93)%、(88.10 $\pm$ 1.13)%, 与对照组存活率100%相比均减低, 统计学差异极显著( $P<0.001$ )。纳秒脉冲电场对COC1及COC1/DDP细胞存活率降低效应呈现明显时间依赖性, 两种细胞在纳秒脉冲电场作用12 h后细胞存活率均最低(图1)。根据以上结果, 后续实验中纳秒脉冲电场处理后细胞培养时间均为12 h。

纳秒脉冲电场作用0.5, 6, 12, 24 h后, 与COC1细胞相比, 各时间点COC1/DDP细胞存活率较高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.2 纳秒脉冲电场诱导COC1及COC1/DDP细胞凋亡

COC1及COC1/DDP细胞经纳秒脉冲作用12 h后, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果如图2A所示, COC1细胞对照组早期凋亡率为(2.44 $\pm$ 0.33)%, 晚期凋亡率为(0.73 $\pm$ 0.06)%, 处理组早期凋亡率为



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图1 纳秒脉冲电场处理0.5, 6, 12, 24 h后, COC1及COC1/DDP细胞存活率

Fig.1 Cell viability at indicated time points (0.5, 6, 12, 24 h) after treating COC1 and COC1/DDP cells with nanosecond pulsed electric fields

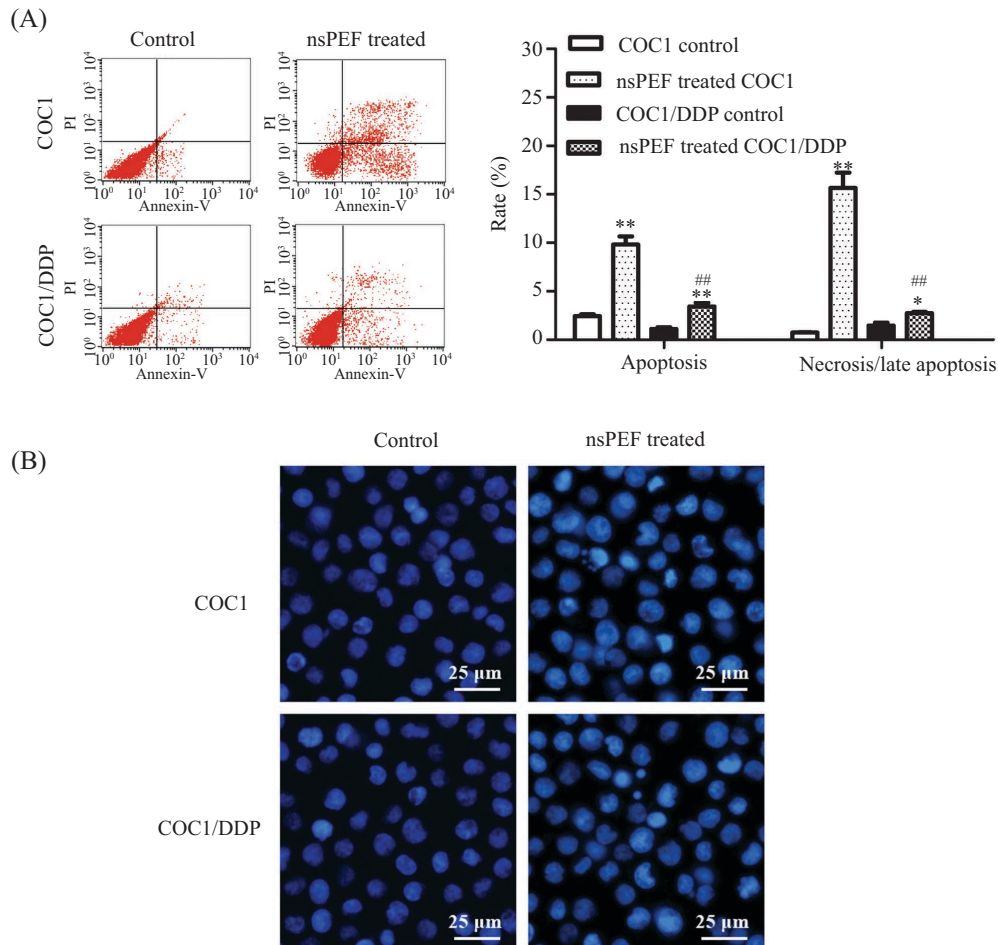
( $9.81 \pm 1.48$ )%, 晚期凋亡率为( $15.67 \pm 2.70$ )%, 后者早期及晚期凋亡率均高于前者, 两组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ); COC1/DDP细胞对照组早期凋亡率为( $1.11 \pm 0.31$ )%, 晚期凋亡率为( $1.45 \pm 0.53$ )%, 实验组早期凋亡率为( $3.43 \pm 0.65$ )%, 晚期凋亡率为( $2.75 \pm 0.20$ )%, 实验组早期及晚期凋亡率均高于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与顺铂敏感细胞COC1处理组相比, 顺铂耐药细胞COC1/DDP处理组早期及晚期凋亡率均较低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

在荧光显微镜下观察Hoechst 33342染色(图2B), COC1及COC1/DDP细胞处理组中均可以很明显的看到凋亡小体和呈亮蓝色致密浓染的颗粒块状荧光, 两者对照组荧光较淡, 细胞核呈均匀的蓝

色荧光。

### 2.3 纳秒脉冲电场对COC1及COC1/DDP细胞线粒体膜电位及caspase-3蛋白酶活性的影响

荧光显微镜下观察细胞内JC-1荧光颜色, COC1及COC1/DDP对照组细胞大多呈颗粒状橘红色荧光, 而COC1/DDP处理组细胞出现较多橘黄色或弥散分布的绿色荧光, COC1处理组细胞则大多呈弥散分布的绿色荧光(图3A)。同时, 采用多功能酶标仪定量检测各组细胞红/绿荧光比值, 结果显示, COC1细胞处理组及COC1/DDP细胞处理组JC-1红/绿荧光比值与对照组相比均降低( $14.87 \pm 0.73$  vs  $10.48 \pm 0.49$ ;  $11.09 \pm 0.09$  vs  $9.01 \pm 0.47$ ), 统计学差异极显著( $P < 0.01$ )。以上结果表明, 纳秒脉冲电场处理可诱导COC1及COC1/DDP细胞线粒体膜电位降低(图3B)。



A: 左图为流式细胞仪检测细胞凋亡散点图, 右图为独立重复3次实验细胞凋亡率分析, 数据以mean±S.D.形式表示; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与相应对照组相比; ## $P < 0.01$ , 与COC1处理组相比; B: 荧光显微镜下观察Hoechst 33342染色。

A: the left panel indicated a representative scatter plot detecting apoptosis by flow cytometric analysis. The right panel indicated a graphical representation of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs nsPEF treated COC1 group; B: Hoechst 33342 staining observed under fluorescence microscopy.

图2 纳秒脉冲电场(nsPEFs)诱导COC1及COC1/DDP细胞发生凋亡

Fig.2 Apoptosis in COC1 and COC1/DDP cells induced by nanosecond pulsed electric fields

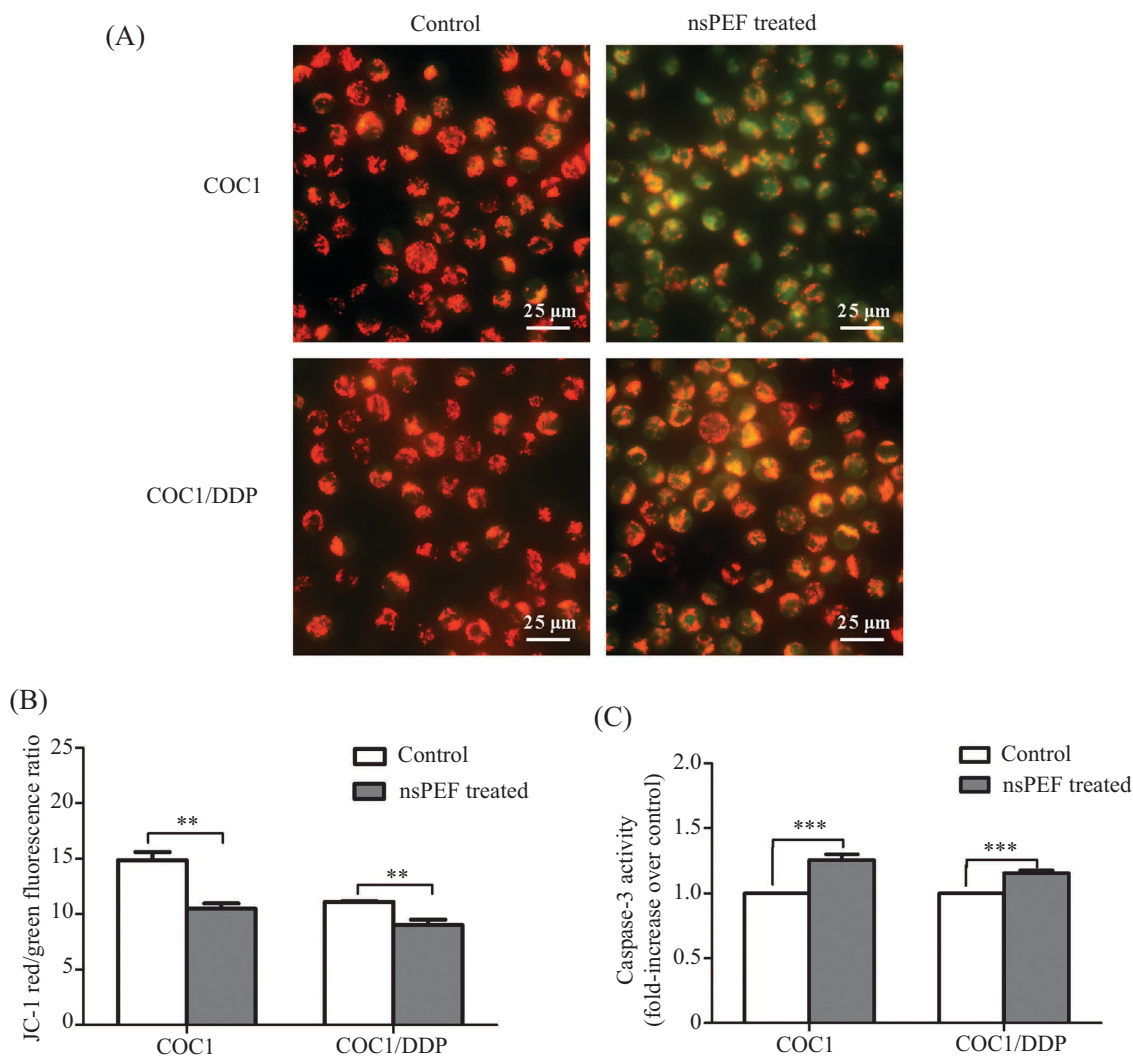
采用化学发光法检测caspase-3蛋白酶活性(图3C)。由于化学发光法检测的是相对光强度, 故将对照组光强度设为1, 处理组光强度以对照组倍数表示。COC1细胞处理组caspase-3活性为对照组 $1.26\pm 0.04$ 倍, COC1/DDP细胞处理组caspase-3活性为对照组 $1.16\pm 0.02$ 倍, 两者处理组caspase-3活性均比对照组增高, 差异有统计学意义( $P<0.001$ )。以上结果说明, 纳秒脉冲电场可增强COC1及COC1/DDP细胞caspase-3蛋白酶活性。

#### 2.4 纳秒脉冲电场对COC1及COC1/DDP细胞周期的影响

采用流式细胞仪检测了各组细胞周期分布

情况。结果显示, 与对照组相比, COC1处理组处于 $G_0/G_1$ 期细胞百分率明显减少 $[(45.10\pm 1.90)\% \text{ vs } (30.80\pm 3.00)\%]$ , 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 而COC1处理组处于S期的细胞百分率明显升高 $[(34.60\pm 2.40)\% \text{ vs } (52.30\pm 5.60)\%]$ , 差异有统计学意义( $P<0.01$ )(图4)。

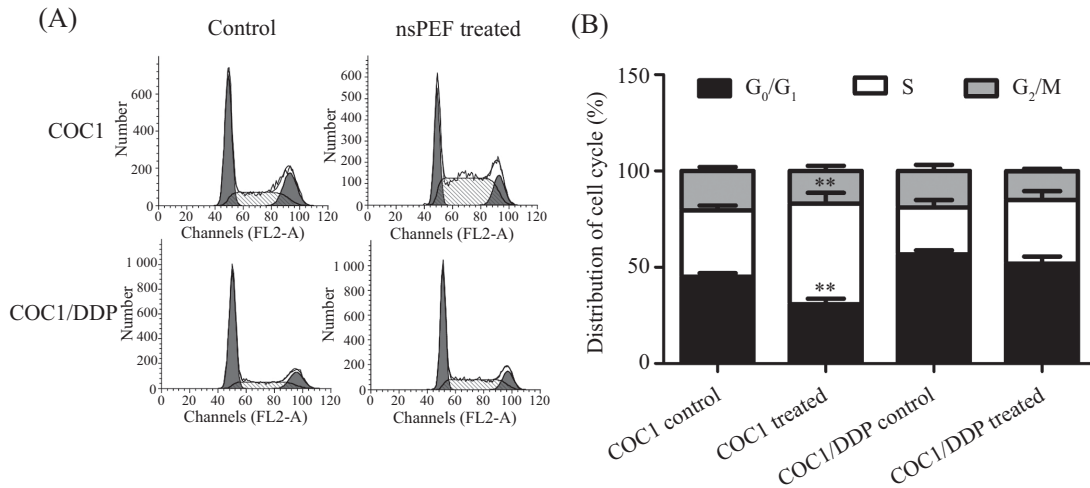
COC1/DDP细胞处于 $G_0/G_1$ 期百分率: 对照组 $(56.70\pm 2.20)\%$ , 处理组 $(51.90\pm 3.70)\%$ ; 处于S期百分率: 对照组 $(24.40\pm 3.80)\%$ , 处理组 $(33.00\pm 4.60)\%$ ; 处于 $G_2/M$ 百分率: 对照组 $(18.90\pm 3.20)\%$ , 处理组 $(15.10\pm 1.20)\%$ , 各组间均无明显差别( $P>0.05$ )。以上结果表明, 在本实验所设定的脉冲参数及脉冲时间的



A: 荧光显微镜下观察JC-1染色; B: 多功能酶标仪检测细胞内JC-1红/绿荧光比值; C: 化学发光法检测caspase-3蛋白酶活性。 \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。  
A: JC-1 staining observed under fluorescence microscopy; B: JC-1 red to green fluorescence ratio detected by fluorescent spectrophotometry; C: the caspase-3 activity detected by luminescent assay. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图3 纳秒脉冲电场(nsPEFs)对COC1及COC1/DDP细胞线粒体膜电位及caspase-3蛋白酶活性的影响

Fig.3 Effects of nanosecond pulsed electric fields on mitochondrial membrane potential and caspase-3 activity in COC1 and COC1/DDP cells



A: 流式细胞仪检测细胞周期直方图; B: 为独立重复3次实验细胞周期分布结果。 \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: shows representative histogram determining cell cycle by flow cytometry; B: represents a statistical graph of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$  vs COC1 control group.

图4 纳秒脉冲电场(nsPEFs)对COC1及COC1/DDP细胞周期的影响

Fig.4 Effects of nanosecond pulsed electric fields on the cell cycle of COC1 and COC1/DDP cells

纳秒脉冲电场作用下, COC1细胞出现S期阻滞, 而对COCl/DDP细胞周期无明显影响。

### 3 讨论

本实验检测了纳秒脉冲电场处理后不同时间点细胞存活率, 发现纳秒脉冲电场能有效抑制卵巢癌顺铂敏感细胞COC1和顺铂耐药细胞COC1/DDP的存活率, 且两种细胞株存活率在纳秒脉冲电场处理后24 h内均呈先降低后升高的趋势, 这与Ibey等<sup>[13]</sup>研究纳秒脉冲电场抑制Jurkat及U937细胞活性的时间效应结论一致。细胞存活率减低说明细胞增殖受到抑制, 细胞增殖是细胞凋亡、细胞坏死及细胞周期受影响等多种因素的综合效应, 纳秒脉冲电场作用后12 h, COC1及COC1/DDP细胞存活率降至最低, 说明以上各种效应在12 h时最为显著, 因此, 后续实验中纳秒脉冲电场处理后细胞培养时间均为12 h。本实验中选用的实验参数相对温和(场强为10 kV/cm、脉宽为32 ns), 一些细胞膜或亚细胞结构及功能上的改变在24 h内可获得逐渐修复, 这可能是细胞存活率在脉冲处理后24 h升高的原因。

近年的研究证实了细胞凋亡在纳秒脉冲引起的细胞死亡中发挥重要作用<sup>[14-18]</sup>。与这些研究一致的是, 本实验从定性和定量方面均证实了纳秒脉冲电场能有效地诱导卵巢癌细胞COC1及COC1/DDP发生凋亡。但是, 由于各实验所选择的脉宽、场强及脉冲个数等参数不同, 且不同的细胞株对纳秒脉

冲电场反应各异, 关于纳秒脉冲电场诱导凋亡的机制, 目前尚无统一论。可以肯定的是, 纳秒脉冲电场可以通过多种途径诱导细胞凋亡, 其中包括纳秒脉冲电场直接作用于线粒体而引起线粒体途径凋亡<sup>[19-20]</sup>。本课题组前期实验采用等效电路模型研究分析COC1和COC1/DDP细胞各单元的电压, 发现细胞质内电压已高于损伤阈值, 提示胞质内细胞器(线粒体、内质网等)可能受损<sup>[12]</sup>。如果线粒体受损, 将导致线粒体的通透性转换孔不可逆过度开放, 进而引起线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的下降甚至崩溃, 膜间隙凋亡相关蛋白如细胞色素C、凋亡诱导因子(apoptosis induced factor, AIF)等释放进入细胞质, 从而启动线粒体途径凋亡。线粒体膜电位的下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 它发生在细胞核凋亡特征(染色质浓缩、DNA断裂)出现之前, 一旦线粒体跨膜电位崩溃, 则细胞凋亡不可逆转<sup>[21]</sup>。Caspase-3位于caspase家族(半胱氨酸蛋白酶家族)级联反应的下游, 是多种凋亡通路最后的汇聚点, 被称为细胞凋亡的“执行者”, 它被激活后作用于细胞内的一些蛋白质, 引起细胞凋亡。因此, 本实验检测细胞内JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变从而了解线粒体膜电位的下降情况, 同时检测caspase-3蛋白酶活性变化。实验结果表明, 纳秒脉冲电场降低了COC1和COC1/DDP细胞的线粒体膜电位, 同时增加了两者caspase-3蛋白酶活性, 揭示在本实验条件下, 纳秒脉冲电场可能致COC1和COC1/DDP

细胞线粒体损伤, 从而诱导线粒体跨膜电位的下降并通过依赖caspase-3途径激发下游凋亡信号来诱导COC1和COC1/DDP细胞发生凋亡。

细胞周期检测结果表明, 纳秒脉冲电场可以明显阻滞COC1细胞周期于S期。双链DNA损伤和DNA复制阻滞均能启动DNA损伤应答通路, 激活细胞周期检测位点(check points), 导致细胞周期阻滞以修复受损的DNA<sup>[22]</sup>。本实验组前期已通过单细胞凝胶电泳实验证实, 纳秒脉冲电场作用后1~2 h可直接引起COC1和COC1/DDP细胞DNA单链断裂<sup>[20]</sup>。因此推测, 纳秒脉冲电场引起COC1细胞DNA单链断裂后, 部分未修复的DNA损伤启动DNA损伤应答通路, 通过激活细胞周期检测位点使细胞周期停滞在S期, 其生物学意义需要进一步研究。因顺铂耐药细胞COC1/DDP较敏感细胞COC1单链DNA损伤少, 故COC1/DDP细胞经本实验参数纳秒脉冲电场处理后未见明显S期阻滞。如果DNA损伤修复失败或者DNA损伤过多过重时, 细胞则会通过外源性死亡受体途径和(或)内源性线粒体途径启动细胞凋亡。目前实验尚不能明确纳秒脉冲电场引起的COC1细胞DNA损伤是否继发性引起了部分线粒体途径凋亡, 对DNA损伤应答通路中相关分子进行深入研究有利于阐明纳秒脉冲电场引起细胞DNA损伤与线粒体途径凋亡之间的关系等问题。

纳秒脉冲电场作用下COC1细胞较COC1/DDP细胞存活率低, 凋亡率高, 说明在相同脉冲电场参数和作用时间下顺铂敏感细胞对纳秒脉冲电场的反应比顺铂耐药细胞更敏感, 导致两者差别的电学机制或生物学特性仍待研究。细胞存活率低于凋亡率, 说明在本实验条件下纳秒脉冲电场还可能引起了其他类型的细胞死亡(坏死、自噬或坏死性凋亡等)。另外, 由于脉冲电场存在“窗口效应”<sup>[4]</sup>, 随着脉冲电场参数的改变, 其作用靶点也会相应改变。为充分利用纳秒脉冲电场治疗恶性肿瘤的潜力, 深入以上问题的研究将有助于选择合适的参数最大程度杀伤耐药肿瘤细胞。

综上, 本实验的研究结果显示, 纳秒脉冲电场能有效诱导卵巢癌顺铂敏感细胞COC1及顺铂耐药细胞COC1/DDP发生凋亡, 可能机制为纳秒脉冲电场跨细胞膜直接损伤线粒体从而诱导线粒体途径凋亡。顺铂敏感细胞对纳秒脉冲电场的反应比顺铂耐

药细胞更敏感。

## 参考文献 (References)

- 1 Bookman MA. First-line chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2012; 55(1): 96-113.
- 2 Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31(15): 1869-83.
- 3 Weaver JC, Smith KC, Esser AT, Son RS, Gowrishankar TR. A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: A region where additional intracellular effects are expected. *Bioelectrochemistry* 2012; 87: 236-43.
- 4 Joshi RP, Schoenbach KH. Bioelectric effects of intense ultrashort pulses. *Crit Rev Biomed Eng* 2010; 38(3): 255-304.
- 5 Stacey M, Stickley J, Fox P, Statler V, Schoenbach K, Beebe SJ, *et al.* Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: Cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis. *Mutat Res* 2003; 542(1/2): 65-75.
- 6 Tekle E, Oubrahim H, Dzekunov SM, Kolb JF, Schoenbach KH, Chock PB. Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. *Biophys J* 2005; 89(1): 274-84.
- 7 Stacey M, Fox P, Buescher S, Kolb J. Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival. *Bioelectrochemistry* 2011; 82(2): 131-4.
- 8 Nuccitelli R, Tran K, Sheikh S, Athos B, Kreis M, Nuccitelli P. Optimized nanosecond pulsed electric field therapy can cause murine malignant melanomas to self-destruct with a single treatment. *Int J Cancer* 2010; 127(7): 1727-36.
- 9 Esser AT, Smith KC, Gowrishankar TR, Weaver JC. Towards solid tumor treatment by nanosecond pulsed electric fields. *Technol Cancer Res Treat* 2009; 8(4): 289-306.
- 10 Nuccitelli R, Chen X, Pakhomov AG, Baldwin WH, Sheikh S, Pomictier JL, *et al.* A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. *Int J Cancer* 2009; 125(2): 438-45.
- 11 Kotnik T, Miklavcic D. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophys J* 2006; 90: 480-91.
- 12 Linghu L, Tan Y, Lou Y, Hu L, Yang H, Yu T. Nanosecond electric pulses induce DNA breaks in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(2): 695-9.
- 13 Ibey BL, Pakhomov AG, Gregory BW, Khorokhorina VA, Roth CC, Rassokhin MA, *et al.* Selective cytotoxicity of intense nanosecond-duration electric pulses in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(11): 1210-9.
- 14 Ford WE, Ren W, Blackmore PF, Schoenbach KH, Beebe SJ. Nanosecond pulsed electric fields stimulate apoptosis without release of pro-apoptotic factors from mitochondria in B16f10 melanoma. *Arch Biochem Biophys* 2010; 497(1/2): 82-9.
- 15 Hall EH, Schoenbach KH, Beebe SJ. Nanosecond pulsed electric fields induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis* 2007; 12(9): 1721-31.
- 16 Ren W, Beebe SJ. An apoptosis targeted stimulus with

- nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) in E4 squamous cell carcinoma. *Apoptosis* 2011; 16(4): 382-93.
- 17 Ren W, Sain NM, Beebe SJ. Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) activate intrinsic caspase-dependent and caspase-independent cell death in Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421(4): 808-12.
- 18 Chen X, Kolb JF, Swanson RJ, Schoenbach KH, Beebe SJ. Apoptosis initiation and angiogenesis inhibition: Melanoma targets for nanosecond pulsed electric fields. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23(4): 554-63.
- 19 Batista Napotnik T, Wu YH, Gundersen MA, Miklavčič D, Vernier PT. Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics* 2012; 33(3): 257-64.
- 20 Beebe SJ, Chen YJ, Sain NM, Schoenbach KH, Xiao S. Transient features in nanosecond pulsed electric fields differentially modulate mitochondria and viability. *PLoS One* 2012; 7(12): e51349.
- 21 Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; 182(2): 367-77.
- 22 Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(10): 792-804.