

大气压冷等离子体射流灭活子宫颈癌 HeLa 细胞*

黄骏^{1)a)†} 陈维^{1)a)} 李辉¹⁾ 王鹏业¹⁾ 杨思泽¹⁾²⁾

1) (中国科学院物理研究所, 软物质物理重点实验室, 北京凝聚态物理国家实验室, 北京 100190)

2) (厦门大学物理与机电工程学院, 福建省等离子体与磁共振研究重点实验室, 厦门 361005)

(2012年9月22日收到; 2012年11月8日收到修改稿)

研究了大气压冷等离子体射流对子宫颈癌 HeLa 细胞的灭活机制. 在倒置显微镜下观察不同等离子体处理条件下的细胞形态, 并通过中性红吸收测试定量测定各个条件下的细胞存活率. 将功率维持在 18 W, 在 900 mL/min 氩等离子体中添入氧气的百分含量分别为 1%, 2%, 4% 和 8% 的条件下处理 HeLa 细胞, 探讨活性气体氧气在惰性气体氩气中的百分含量对 HeLa 癌细胞灭活效率的影响, 发现添加 2% 氧气时, 氩/氧等离子体灭活效果最佳, 处理 180 s 后细胞存活率可降至 7%. 当继续添加氧超过 2% 时, 灭活效果逐渐减弱, 直至 8% 时, 其效果反而不如单纯氩等离子体. 通过测量等离子体发射光谱, 结果表明活性氧自由基在癌细胞灭活过程中可能起关键作用.

关键词: 大气压冷等离子体射流, HeLa 癌细胞, 存活率, 发射光谱

PACS: 52.50.Dg, 52.77.-j, 87.80.-y

DOI: 10.7498/aps.62.065201

1 引言

近几年来, 大气压冷等离子体射流及其在生物学方面的应用研究正获得越来越多的关注^[1-15], 尤其癌症治疗这个医学难题已成为等离子体医学领域一个持续的研究热点. 子宫颈癌是严重危害全球妇女健康的主要恶性肿瘤之一^[16], 发病率仅次于乳腺癌, 高居妇女恶性肿瘤的第二位, 每年全世界约有 50 万新发病例, 将近 29 万死亡病例^[17]. 其中, 约 80% 的宫颈癌患者在发展中国家^[18]. 我国是子宫颈癌的高发区, 每年新发病例约占全球新发病例总数的 1/3^[19], 其中约有 3 万人死于宫颈癌^[20]. 目前, 子宫颈癌常规的治疗方式中, 外科手术虽然是一种有效措施, 但绝大多数患者就诊时已是中晚期, 化疗成为最主要的治疗手段, 虽然在一定程度上能提高宫颈癌患者的缓解率^[21], 但其不具有针对性, 在杀灭恶性肿瘤细胞的同时, 也会无选择性地损害大量正常细胞, 对机体产生较大的毒副作用和耐药性, 导致仍有部分患者临床疗效难尽人意. 而利用大气压冷等离子体射流灭活癌细胞具有相

对靶向性强、操作灵活、疗效确切、毒副作用小等优点, 使其在癌症治疗的道路上成为一种潜在的新方法. 本文研究了大气压冷等离子体射流对子宫颈癌细胞的灭活作用, 探讨了活性气体氧气在惰性气体氩气中的百分含量对 HeLa 癌细胞灭活效率的影响, 并揭示了大气压冷等离子体射流对 HeLa 癌细胞的灭活机制.

2 实验

2.1 装置

本文使用的大气压冷等离子体射流装置的结构, 如图 1 所示. 等离子体射流装置主要由两个电极、聚四氟乙烯固定器、石英管 (内径 6 mm, 外径 8 mm) 和橡皮塞组成. 一根不锈钢细管 (内径 0.9 mm, 外径 1.6 mm) 作为内电极与电源高压端相连, 被橡皮塞和聚四氟乙烯固定器固定在石英管的中心. 铜箔 (宽度 5 mm) 作为外电极与地线连接, 包裹在石英管下部漏斗型喷嘴处 (内径从 6 mm 到 1 mm), 铜箔下端距离管口 5 mm. 工作气体氩气

* 国家自然科学基金 (批准号: 11275261, 11005151) 资助的课题.

a) 黄骏和陈维在此项工作中做出同等贡献.

† 通讯作者. E-mail: hjflower@aphy.iphy.ac.cn

从石英管侧壁通入, 而活性气体氧气从不锈钢细管顶端注入. 如图 2 所示, 为大气压冷等离子体射流处理 HeLa 癌细胞的实物图. 用峰值电压为 30 kV, 频率变化范围在 8—40 kHz 的交流电源 (CTP2000) 产生等离子体射流, 作用于接种在 96 孔板底部的 HeLa 细胞.

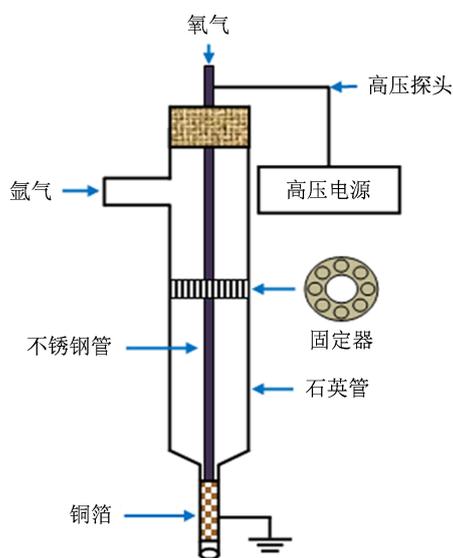


图 1 大气压冷等离子体射流装置结构示意图



图 2 大气压冷等离子体射流处理 HeLa 癌细胞的实物图

2.2 样品制备

将 HeLa 细胞用含 10% 胎牛清和密理博高糖培养基 (DMEM) 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 待细胞生长至近融合状态, 消化细胞, 将细胞浓度调整为 4000 个/孔, 把培养好的 HeLa 细胞株接种到微量滴定 96 孔板中, 随后加入 2 mm 厚度 DMEM 继续培养待细胞完全贴壁后进行等离子体处理.

2.3 实验方法

对培养后的子宫颈癌 HeLa 细胞株样品先进行等离子体处理, 随后利用中性红检测其活性. 实验前打开紫外灯灭菌 20—30 min. 处理时保持氩气流量在 900 mL/min, 维持功率在 18 W, 将等离子体射流装置插入 96 孔板对应孔中, 让喷嘴口与 DMEM 培养基液面距离保持 1 mm, 打开电源进行放电处理. 该参数条件下的等离子体按处理时间梯度 30, 60, 90, 120, 150, 180 s 和添加的氧气含量梯度 9, 18, 36, 72 mL/min 分别进行处理, 对照组仅用氩/氧气流不开电源进行处理, 同一组参数对应三个样品. 处理后封口, 在相同条件下继续培养 24 h 后, 观察不同等离子体处理条件下的 HeLa 细胞形态. 随后吸走 DMEM 培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗细胞三次, 轻柔拍打孔板, 去除冲洗溶液. 每孔加入中性红的培养液, 在 37 °C, 5% CO₂ 和湿度适宜的环境下培养细胞 3 h. 去除中性红的培养液, 每孔用 PBS 冲洗细胞一次, 轻轻倒出并吸干全部的 PBS, 加入中性红的裂解液. 在微量滴定平板振荡器上快速震荡微量滴定 96 孔板 10 min, 直至中性红从细胞内被提取出来, 并形成均匀溶液. 用酶标仪测定溶液在 540 nm 波长处的光密度, 用空白孔作为参考对照.

3 结果和讨论

3.1 I-V 曲线

利用高压探头 (Tektronix P6015 A) 测量加在大气压冷等离子体射流装置上的电压, 利用电流探头 (Tektronix P6021) 实时测量通过反应器的电流, 输出信号由示波器 (Tektronix TDS 210) 收集. 图 3 是

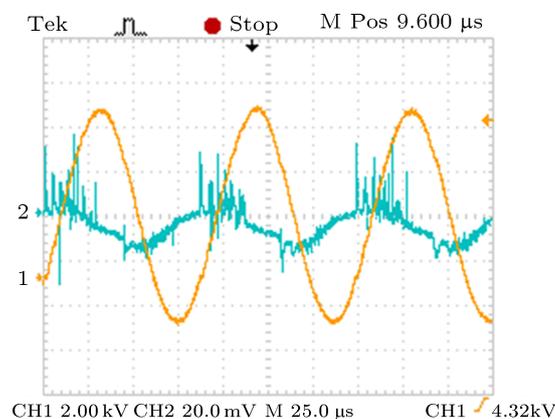


图 3 氩-氧等离子体射流装置放电电压-电流波形图 (氩气流量为 900 mL/min, 氧气流量为 18 mL/min; 1 为电压曲线, 2 为电流曲线)

氩/氧等离子体射流装置放电的电压 - 电流波形图. 从图可知, 电压是正弦曲线, 放电电流波形由准正弦的位移电流和众多窄脉冲的微放电电流叠加而成, 并且随着放电电压的波形呈现周期性变化, 这是典型的丝状放电模式.

3.2 细胞形态学变化

等离子体处理后 24 h, 在倒置显微镜下对各组细胞的生长特点及形态学进行观察, 如图 4 所示.

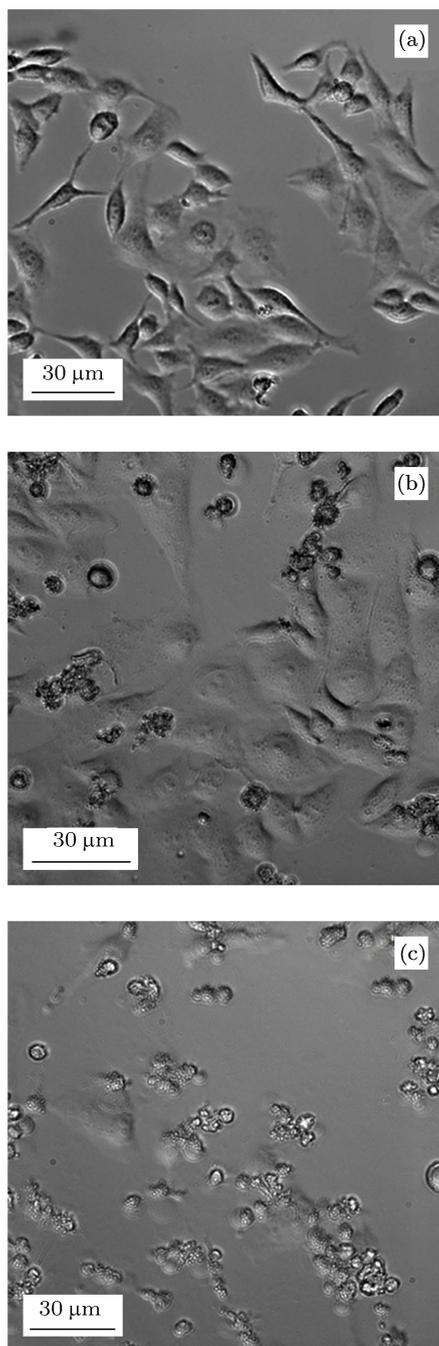


图 4 等离子体处理后 HeLa 细胞的形态学变化 (a) 对照组; (b) 900 mL/min 氩气; (c) 900 mL/min 氩气添加 18 mL/min 氧气

图 4(a) 是未经等离子体处理的对照组细胞, 细胞形态正常, 呈纺锤形或多角形, 轮廓清晰, 边界清楚, 透明度高, 立体感较强, 细胞紧密贴壁, 融合成片, 生长旺盛. 图 4(b) 为 900 mL/min 氩气等离子体处理 HeLa 细胞 90 s 后的照片. 部分细胞形态发生明显改变, 出现不同大小的圆形细胞, 且胞内开始出现颗粒. 图 4(c) 为 900 mL/min 氩气添加 18 mL/min 氧气等离子体处理 HeLa 细胞 90 s 后的照片, 绝大部分细胞轮廓趋于模糊, 立体感降低, 细胞体积明显缩小, 并且呈颗粒状崩解, 出现团聚现象.

3.3 中性红染色

图 5 为利用中性红吸收测试在氩/氧等离子体处理后 24 h 测定的 HeLa 细胞存活率曲线. 图中纵坐标为处理后 HeLa 细胞的光密度值 (OD 值) 的平均值 (在相同参数条件下, 处理三组细胞) 与对照组 OD₀ 值 (三组未经过处理的细胞) 平均值的比, 横坐标为等离子体处理 HeLa 癌细胞的时间. 如图 5 所示, 单纯用氩等离子体处理的效果不如氩/氧等离子体的处理效果, 在相同的处理时间下, 添加 2% 氧气的氩等离子体对 HeLa 细胞的灭活效果最好, 在 180 s 处理时间后, HeLa 细胞存活率已降低至 7%. 然而, 当氧气含量持续增加超过 2% 时, 灭活 HeLa 细胞的效果会有所减弱, 直至增加到 8% 时, 其效率甚至不如单独的氩气等离子体.

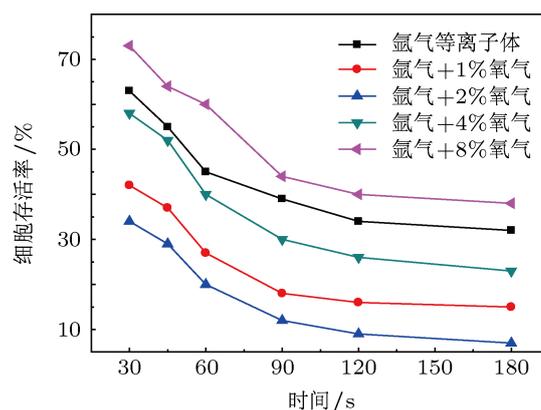


图 5 氧气含量与处理时间对 HeLa 细胞存活率的影响

3.4 发射光谱测量

图 6 为 OH (309 nm), Ar (774 nm), O (844 nm) 发射光谱相对发射强度分布与氧气含量的关系. 在输入功率为 18 W, 氩气流量为 900 mL/min 的情况下, 随着氧气含量的增加, OH (309 nm) 和 Ar (774 nm) 的谱线强度逐渐减小. 比较图 5 和图 6 可

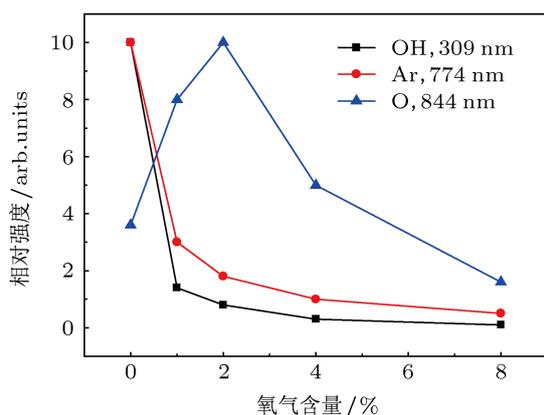


图6 OH (309 nm), Ar (774 nm), O (844 nm) 相对发射强度分布与氧气含量的关系

以发现, *Hela* 细胞的存活率与 O (844 nm) 的发射光谱强度成正比。当氧气流量为 18 mL/min 时, 即氧气占氩气的体积百分含量为 2% 时, 宫颈癌 *Hela* 细胞的存活率最低, 即等离子体的灭活效果最好, 说明 O (844 nm) 在大气压冷等离子体灭活过程中起着重要作用。添加活性气体氧气对 *Hela* 细胞存活率的影响在于: 原本氩气只能与大气和周围空气中水蒸气作用来产生氧自由基, 我们在内电极中通入氧气, 能够使其在等离子体射流装置的管口处与氩等离子体充分混合后再出去, 因此有效增加了氧自由基的含量。然而, 当氧气含量持续增加超过

2% 时, 灭活 *Hela* 细胞的效果会有所减弱, 直至增加到 8% 时, 其效率甚至不如单独的氩等离子体。这是由于随着氧含量的不断增加, 过量氧气可能会吸收大量电子, 使得气体总电离度随之降低, 从而导致等离子体内氧自由基含量减少, 影响了处理效果。

4 结论

本文设计了一种大气压冷等离子体射流装置处理宫颈癌 *Hela* 细胞。通过电流电压探针研究了等离子体放电特性, 发现氩/氧等离子体的放电模式为丝状放电。在氩气等离子体中添入不同百分含量的氧气处理宫颈癌 *Hela* 细胞, 发现添加 2% 氧气时, 氩/氧等离子体灭活效果最佳, 在 180 s 处理时间后, *Hela* 细胞存活率已降低至 7%。当继续添加氧气超过 2% 时, 灭活效果逐渐减弱, 直至 8% 时, 其效果反而不如单纯氩气等离子体。对等离子体发射光谱进行分析, 发现随着氧气含量的增加, OH (309 nm) 和 Ar (774 nm) 的谱线强度逐渐减小, 而 O (844 nm) 谱线强度先增加后减小。*Hela* 细胞的存活率与 O (844 nm) 的发射光谱强度成正比, 这说明在等离子体灭活 *Hela* 细胞过程中, 活性氧自由基 O (844 nm) 起关键作用。

- [1] Sladek R E J, Stoffels E, Walraven R, Tielbeek P J A, Koolhoven R A 2004 *IEEE Trans. Plasma Sci.* **32** 1540
- [2] Zhang X H, Li M J, Zhou R L, Feng K C, Yang S Z 2008 *Appl. Phys. Lett.* **93** 021502
- [3] Lee H W, Kim G J, Kim J M, Park J K, Lee J K, Kim G C 2009 *Endod. J.* **35** 587
- [4] Chen W, Huang J, Li H, Lü G H, Wang X Q, Zhang G P, Wang P Y, Yang S Z 2012 *Acta Phys. Sin.* **61** 185203 (in Chinese) [陈维, 黄骏, 李辉, 吕国华, 王兴权, 张国平, 王鹏业, 杨思泽 2012 物理学报 **61** 185203]
- [5] Zhang X H, Huang J, Liu X D, Peng L, Sun Y, Chen W, Feng K C, Yang S Z 2009 *Acta Phys. Sin.* **58** 1595 (in Chinese) [张先徽, 黄骏, 刘筱娟, 彭磊, 孙岳, 陈维, 冯克成, 杨思泽 2009 物理学报 **58** 1595]
- [6] Xiong Z L, Cao Y G, Lu X P, Du T 2011 *IEEE Trans. Plasma Sci.* **39** 2968
- [7] Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R, Trink B 2011 *British Journal of Cancer* **105** 1295
- [8] Huang J, Chen W, Li H, Wang X Q, Lü G H, Latif Khosa M, Guo M, Feng K C, Wang P Y, Yang S Z 2011 *J. Appl. Phys.* **109** 053305
- [9] Huang J, Li H, Chen W, Lü G H, Wang X Q, Zhang G P, Ostrikov K, Wang P Y, Yang S Z 2011 *Appl. Phys. Lett.* **99** 253701
- [10] Iseki S, Nakamura K, Hayashi M, Tanaka H, Kondo H, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M 2012 *Appl. Phys. Lett.* **100** 113702
- [11] Chen W, Huang J, Du N, Liu X D, Wang X Q, Lü G H, Zhang G P, Guo L H, Yang S Z 2012 *J. Appl. Phys.* **112** 013304
- [12] Chen W, Huang J, Du N, Liu X D, Lü G H, Wang X Q, Zhang G P, Guo L H, Yang S Z 2012 *Chin. Phys. Lett.* **29** 075203
- [13] Zhang X H, Huang J, Liu X D, Peng L, Guo L H, Lü G H, Chen W, Feng K C, Yang S Z 2009 *J. Appl. Phys.* **105** 063302
- [14] Chen G L, Zheng X, Lü G H, Zhang Z X, Sylvain M, Wilson S, Michael T, Yang S Z 2012 *Chin. Phys. B* **21** 105201
- [15] Deng S X, Cheng C, Ni G H, Meng Y D, Chen H 2010 *Chin. Phys. B* **19** 105203
- [16] Valdespino V M, Valdespino V E 2006 *Curr. Opin. Obstet Gynecol.* **18** 35
- [17] Yang L, Parkin D M, Ferlay J, Ferlay J, Li L, Chen Y D 2005 *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **14** 243
- [18] Massad L S, Xie X, Darragh T M, Minkoff H, Levine A M, D'Souza G, Cajigas A, Colie C, Watts D H, Strickler H 2009 *Obstet Gynecol.* **114** 1063
- [19] Bondar L, Hoogeman M S, Vásquez Osorio E M, Heijmen B J 2010 *Med. Phys.* **37** 3760
- [20] Parkin D M, Bray F I, Devesa S S 2001 *Eur. J. Cancer* **37** S4
- [21] Domingues A P, Mota F, Durao M, Frutuoso C, Amaral N, de Oliveira C F 2010 *International Journal of Gynecological Cancer* **20** 294

Inactivation of Hela cancer cells by an atmospheric pressure cold plasma jet*

Huang Jun^{1)a)†} Chen Wei^{1)a)} Li Hui¹⁾ Wang Peng-Ye¹⁾ Yang Si-Ze¹⁾²⁾

1) (Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics,

Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China)

2) (Fujian Provincial Key Laboratory for Plasma and Magnetic Resonance, School of Physics and Mechanical and Electrical Engineering,

Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(Received 22 September 2012; revised manuscript received 8 November 2012)

Abstract

An inactivation mechanism study on Hela cancer cells by means of an atmospheric pressure cold plasma jet is presented. Cell morphology is observed under an inverted microscope after plasma treatment. The neutral red uptake assay provides quantitative evaluations of cell viability under different conditions. The effect of the inactivation efficiency of Hela cancer cells in the argon (900 mL/min) with addition of different amount of oxygen (1%, 2%, 4%, 8%) into atmospheric pressure cold plasma jet is discussed under the fixed power 18 W. Results show that 2% O₂ addition provides the best inactivation efficiency, and the survival rate can be reduced to 7% after 180 s treatment. When the oxygen addition exceeds 2%, the inactivation efficiency gradually weakens. The effect is not so good as that in pure argon plasma when the oxygen addition arrives at 8%. According to the emission spectrum of the plasmum, it is concluded that the reactive oxygen species in the plasma play a key role in cancer cell inactivation process.

Keywords: atmospheric pressure cold plasma jet, Hela cancer cells, survival rate, optical emission spectra

PACS: 52.50.Dg, 52.77.-j, 87.80.-y

DOI: 10.7498/aps.62.065201

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11275261, 11005151).

a)Huang Jun and Chen Wei contributed equally to this work.

† Corresponding author. E-mail: hjflower@aphy.iphy.ac.cn