

高压纳秒脉冲电场的细胞器生物电效应综述

郭雨怡 石富坤 王群 季振宇 庄杰

A review on bioelectrical effects of cellular organelles by high voltage nanosecond pulsed electric fields

Guo Yu-Yi Shi Fu-Kun Wang Qun Ji Zhen-Yu Zhuang Jie

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 71, 068701 (2022) DOI: 10.7498/aps.71.20211850

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211850>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于电致伸缩效应的水中纳秒脉冲放电起始机制

Initiation of nanosecond-pulsed discharge in water: Electrostriction effect

物理学报. 2021, 70(2): 024701 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201048>

窄线宽纳秒脉冲光纤拉曼放大器的理论模型和数值分析

Theoretical and numerical study on narrow-linewidth nanosecond pulsed Raman fiber amplifier

物理学报. 2018, 67(15): 154202 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20172679>

稳态强磁场的细胞生物学效应

Biological effects on cells in strong static magnetic field

物理学报. 2018, 67(14): 148701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180378>

脉冲强磁场下的电极化测量系统

A pulsed high magnetic field facility for electric polarization measurements

物理学报. 2020, 69(5): 057502 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20191520>

基于时域剪切干涉的纳秒脉冲相位测量技术

Phase retrieval of nanosecond laser pulses based on temporal shearing interferometry

物理学报. 2021, 70(18): 184202 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20202104>

红外及太赫兹辐照下细胞膜生物效应的研究进展

Research progress of biological effects of cell membrane under infrared and terahertz irradiation

物理学报. 2021, 70(24): 248707 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20212030>

综述

高压纳秒脉冲电场的细胞器生物电效应综述*

郭雨怡¹⁾²⁾ 石富坤²⁾ 王群²⁾ 季振宇³⁾ 庄杰^{2)†}

1) (中国科学技术大学生物医学工程学院 (苏州) 生命科学与医学部, 苏州 215000)

2) (中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 苏州 215000)

3) (空军军医大学军事生物医学工程学系, 西安 710032)

(2021 年 10 月 5 日收到; 2021 年 11 月 23 日收到修改稿)

纳秒级高压脉冲电场的生物医学应用是近年来新兴的交叉学科研究领域, 相比于微秒和毫秒级脉冲电场, 高压纳秒脉冲电场不仅能够导致细胞膜结构极化和介电击穿, 产生膜电穿孔, 还可以穿透至细胞内部, 引发诸如细胞骨架解聚、胞内钙离子释放及线粒体膜电位耗散等细胞器生物电效应, 吸引了学术界的广泛关注. 本文首先介绍高压纳秒脉冲电场及其细胞器生物电作用的物理模型; 然后对高压纳秒脉冲电场与细胞骨架、线粒体、内质网、细胞核等亚细胞结构的相互作用研究进行综述和总结; 强调高压纳秒脉冲电场的细胞器作用与细胞死亡、细胞间通信等生物效应之间的联系; 最后, 凝练当前高压纳秒脉冲电场在生物医学研究中的关键技术问题, 并对未来潜在的研究方向进行展望.

关键词: 纳秒脉冲电场, 电穿孔, 生物电效应, 细胞器**PACS:** 87.16.Tb, 82.39.Wj, 87.15.Pc**DOI:** 10.7498/aps.71.20211850

1 引言

高压脉冲电场 (pulsed electric fields, PEFs) 能够在毫秒到皮秒的时间尺度内以极高的瞬时功率 (可达百兆瓦量级) 将电场能量施加到生物细胞和组织上, 产生多种非线性生物效应, 其中最典型的是细胞膜对亲水性大分子的通透性显著增加, 即电穿孔 (electroporation, EP). 毫秒级和微秒级的 PEFs 已经被广泛应用于污水处理^[1,2]、食品保鲜^[3,4]、生物育种^[5,6]、肿瘤电化学治疗^[7-10] 和软组织非热消融^[11,12] 等领域. 脉冲宽度更窄、场强更高的高压纳秒脉冲电场 (nanosecond pulsed electric fields, nsPEFs) 不仅能够导致细胞膜穿孔, 还可以穿透细胞膜直接作用于细胞内部, 造成细胞器膜穿孔^[13]、细胞骨架解聚^[14]、胞内钙离子释放^[15]、DNA 损伤^[16] 等效应, 在诱导癌细胞凋亡^[17,18]、促进干细胞分

化^[19,20] 以及神经调控^[21-23] 等领域展现出广阔的应用前景.

20 世纪 50 年代, Stampfli^[24] 在实验中观察到高压电场作用后细胞膜对亲水性大分子的通透性显著增加. 1982 年, Neumann 等^[25] 将 PEFs 作用下细胞膜通透性增加的现象称为 EP. EP 的产生机理是 PEFs 对细胞膜充电, 导致跨膜电压超过磷脂双分子层介电击穿的阈值 (约 1 V), 细胞膜生成大量缺陷, 缺陷处的磷脂分子发生倒转, 从而在细胞膜上产生亲水性微孔^[26,27]. 图 1 为细胞膜 EP 的结构示意图, 其中磷脂分子亲水性的一端朝外, 亲油性的一端朝内.

依据细胞膜上的穿孔恢复与否可进一步将 EP 划分为可逆电穿孔 (reversible electroporation, RE) 和不可逆电穿孔 (irreversible electroporation, IRE)^[12,28]. RE 指 PEFs 作用后细胞膜上的微孔在细胞活性未受影响前闭合, 已用于药物分子和基因

* 国家重点研发计划 (批准号: 2019YFC0119102, 2019YFC0118004, 2020YFC0122301) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: jzhuang@sibet.ac.cn

导入^[29]; IRE 指 PEFs 作用后细胞膜上微孔无法闭合, 导致细胞内物质泄漏, 对细胞造成不可逆的伤害, 已被应用于实体肿瘤消融等领域^[30–32].

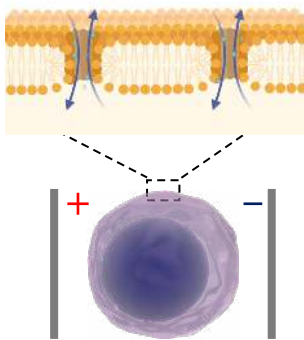


图 1 PEFs 导致的细胞膜 EP 示意图

Fig. 1. Schematic diagram of PEF-induced membrane electroporation.

为了研究 nsPEFs 与细胞膜和细胞内结构相互作用的电学机制, Schoenbach 等^[13]针对处于电极之间的真核细胞建立了如图 2 所示的等效电路模型. 该等效电路模型包含了最主要的细胞结构, 即细胞膜、细胞质和细胞核膜及细胞核质. 细胞质和细胞核质含有丰富的离子从而具有明显的电阻特性, 膜结构由于磷脂双分子层内部的疏水性而具有电容特性^[33]. 由于核膜是双层膜而细胞膜为单层膜, 可简化认为核膜电容量约为细胞膜电容的一半, 相应的核膜充电时间常数较细胞膜充电时间常数更大^[34]. 因此短于细胞膜充电时间常数的 nsPEFs 可能造成核膜^[35]等细胞器膜产生电穿孔, 导致线粒体^[36–38]、内质网^[39,40]、溶酶体^[41,42]等细胞器的结构和功能改变, 进一步引发钙离子浓度增加、活性氧产生、细胞凋亡机制激活等次级效应, 以上细胞器生物电效应也被称为细胞内电处理效应 (intracellular electromanipulation, IEM)^[43–45]. IEM 是 nsPEFs 与传统微秒、毫秒 PEFs 生物电效应的显著区别. 据本文作者调研, 目前尚未有专门针对 nsPEFs 的细胞器生物电效应的综述报道. 因此本文就 nsPEFs 影响细胞器的功能结构变化及作用机制的研究展开综述.

为了确保充足的参考文献, 本文的搜索基于以下电子数据库: PubMed (美国国家医学图书馆, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>); Scopus Elsevier (<http://www.scopus.com/>); 科学网 (Thomson Reuters, <http://apps.webofknowledge.com/>); Google Scholar (<https://scholar.google.com/>). 本文参

考文献主要包括从 2000 年起至今所发表的 nsPEFs 对细胞器作用的相关文献.

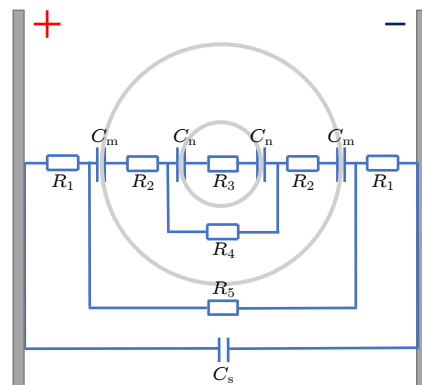


图 2 PEFs 中哺乳动物细胞等效电路模型

Fig. 2. Equivalent circuit model for the mammalian cells with the exposure to PEFs, where individual subcellular components are described by a combination of the resistor or capacitor.

图 3 给出了收集到的 nsPEFs 的细胞器生物电效应的发文量, 自 2000 年至今, 发文量随着时间呈现明显的上升趋势, 说明近年来 nsPEFs 的细胞器生物电效应的研究吸引了学者们更多的关注.

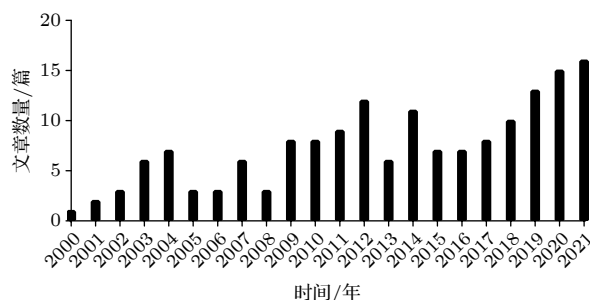


图 3 nsPEFs 细胞器效应的文献发表情况

Fig. 3. Literature research about the intracellular effects for cells exposed to nsPEFs.

文章具体检索包括关键词及其组合的中英文, 以及领域内重要研究者名单. 中文平台搜索关键词为: (nsPEF OR 纳秒脉冲电场 OR 超短脉冲电场 OR 陡脉冲电场 OR 亚微秒脉冲电场) AND (细胞器 OR 细胞内 OR 细胞骨架 OR 线粒体 OR 内质网 OR 囊泡 OR 液泡 OR 核膜 OR 细胞核 OR 溶酶体 OR DNA OR 钙离子 OR 蛋白质); 英文搜索关键词为: (nsPEF OR nanosecond OR ultra-short OR submicrosecond OR electrical pulse) AND (organelles OR intracellular OR cytoskeleton OR mitochondria OR endoplasmic reticulum OR vesicle OR vacuole OR nuclear OR

lysosome OR nucleus OR DNA OR calcium OR proteins) OR nanoelectroporation OR supraelectroporation. 为尽量减少遗漏业内重要研究者的研究, 在关键词检索搜集到的文章中, 找到本研究领域内引文量高的文章, 并对作者及同机构其他学者的文章再进行检索筛选; 最后, 在 Google Scholar 搜索引擎中对上述关键词再进行检索, 找到遗漏的文章. 通过以上的文献检索方法尽可能确保文献收集工作的准确性和完整性.

2 高压纳秒脉冲电场的细胞器生物电效应

如上节所述, 细胞膜、细胞核、细胞器等亚细胞结构有特定的介电性质, 从而可以建立细胞的等效电路模型以描述 nsPEFs 的细胞器生物电效应. 除了基于充电时间常数的描述, 米彦^[46]基于等效

电路和单细胞壳层介电模型仿真在频域分析细胞膜和核膜跨膜电位, 得到细胞的频率响应特性, 发现当 PEFs 携带频率超过 1 MHz 的分量时即可影响细胞核膜.

针对 nsPEFs 的细胞器生物电效应的相关研究采用了脉宽从几纳秒到几百纳秒, 场强从几 kV/cm 到几百 kV/cm 的 PEFs 参数, 作用对象包括来源于人和动物多种器官的癌细胞或正常细胞. 该脉宽范围包含了几 MHz 到几百 MHz 的频率分量, 从而可以影响细胞器. 相关研究文献所用 PEFs 参数和观察到的细胞器变化^[15–18,34,36,39–42,46–101]总结于表 1, 从表 1 可以看出大多数研究关注细胞骨架、线粒体、内质网、细胞核等亚细胞结构. 因此本文将依次分类阐述 nsPEFs 与上述各细胞器的相互作用, 最后综合讨论 nsPEFs 对其他亚细胞结构的效应.

表 1 nsPEFs 的细胞器生物电效应总结
Table 1. Summary of effects of nsPEFs on cell organelles.

细胞器	细胞类型	脉冲宽度/ns	电场强度/(kV·cm ⁻¹)	主要结果概述
细胞骨架	GH3, HeLa ^[47]	60	12	
	BY-2 ^[48]	10	33	
	Jurkat, HeLa, SV40 ^[49]	60	15, 60	
	CHO-K1 ^[50]	600	19.2	肌动蛋白丝变短、变细、碎片化、解聚、收缩、分离, 细胞弹性降低;
	Jurkat, U937, CHO-K1 ^[51]	10	150	微管屈曲、解聚、破碎;
	WB-F344 ^[52]	100	5–35	微管聚合速率和聚合数量发生变化;
	U87-MG ^[53]	10, 100	44	中间丝破坏;
	CHO ^[54]	600	16.2	细胞通透性改变;
	GUV ^[55]		3–10	细胞肿胀、起泡、细胞质颗粒化;
	tubulin ^[56]	10	20	细胞间通讯受抑制;
	U2OS ^[57]			细胞骨架的破坏受钙离子调控: 1) 高钙离子浓度溶液中, nsPEFs 处理会使微管解聚, 破坏肌动蛋白丝; 2) 低钙离子浓度溶液中, nsPEFs 处理后微管显示正常结构
	CHO-K1 ^[58]	10, 60	27.7, 150	
	HepG2 ^[59]	450	8	
	B16-F10 ^[60]	300	12, 18, 26, 40, 60	
	WB-F344, WB-Ras ^[61]	100	20	
线粒体	U-937 ^[62]	60	10	
	Jurkat ^[63]	60	0–60	线粒体膜通透性改变, 线粒体的通透性转换孔(MPTP)不可逆过度开放;
	N1-S1 ^[36]	600	0–80	线粒体膜电位损失;
	Jurkat, U-937 ^[46]	10	50, 150	线粒体肿胀;
	Jurkat ^[64]	600	0–60	线粒体膜蛋白受影响, 线粒体膜间隙蛋白 Cyt-C, AIF 释放入胞浆;
	HeLa S3 ^[65]	80	20	调控线粒体凋亡途径, Caspase-3 表达量增加, Bax 表达量增加;
	HCT116, NCM460 ^[66]	10, 600, 800	3, 4, 5	线粒体释放细胞色素 C;
	Jurkat, B10-2 ^[67]	10–300	≤ 300	影响线粒体信号传导途径;
	Jurkat, HL-60 ^[68]	10, 60, 300	150, 60, 25	ATP 消耗;
	Jurkat, HL-60 ^[34]	10–300	15–60	胞内 ROS 水平升高
	Hela ^[69]	10, 20, 30, 50	40, 45	

表 1 (续) nsPEFs 的细胞器生物电效应总结
Table 1 (continued). Summary of effects of nsPEFs on cell organelles.

细胞器	细胞类型	脉冲宽度/ns	电场强度/(kV·cm ⁻¹)	主要结果概述
内质网	CT-26 tumor cells ^[70]	10	22	
	MCA205, McA-RH7777, JurkatE6-1 ^[71]	100	6—25	
	4T1 ^[72]	100	46—54	
	Jurkat ^[73]	7, 10, 30	25	
	Jurkat, HL-60 ^[74]	60, 300	15—60	
	Jurkat, HL-60 ^[75]	10, 60, 300	26, 40, 60, 150, 300 (10 ns); 16, 26, 40, 60 (60 ns); 40 (300 ns)	
	Newly outdated platelet ^[76]	300	0—30	
	Cardiac cells from rats ^[77]	4	10—80	
	Jurkat ^[15]	60	25, 50, 100	
	NG108-15 ^[78]	4	16.2	
	CHO-K1 ^[79]	60	3.7—30	内质网穿孔、损伤;
	U937, CHO-K1, BPAE ^[80]	300		钙离子释放, 引发胞内钙离子浓度升高;
	HeLa, HEK293T, C2C12 ^[40]	7, 10, 20	10—50	内质网应激响应;
	HeLa, HEK293, MEF ^[81]	14	10, 20, 25, 30, 40, 50	免疫原性细胞死亡;
	MG63 ^[82]	60	6.7, 13.3, 16.7, 20, 26.7, 33.3	肿瘤细胞内与内质网凋亡相关蛋白 Caspase-3的释放量增加;
	HeLa, MEF ^[83]	14, 70	80, 100 (14 ns), 30, 50, 70, 75 (70 ns)	内质网凋亡信号通路起作用
	Bovine chromaffin cells ^[84]	5	170	
	B16 F10, EL-4 ^[39]	200	7	
	Hela ^[85]	20, 500	100, 20	
	Murine secondary oocytes ^[86]	10	4—10	
	MEF ^[87]	60—300	30, 60	
	CHO-K1, NG108 ^[88]	300, 600	3.7, 7.4, 11, 1	
细胞核	HL-60 ^[89]	10, 60	65 (10 ns), 25 (60 ns)	
	B16 F10 ^[18,90,91]	300	40	
	Jurkat ^[92]	10	150	
	Jurkat, U-937 ^[93]	10, 300	2.25, 4.5, 150, 290	
	B16F10 ^[60]	300	0—60	
	E4 squamous cell ^[94]	300	0—60	
	Jurkat ^[16]	60	10, 15, 25	核膜穿孔;
	N1-S1 ^[17]	600	0—80	DNA双链破坏、DNA片段化;
	N1-S1 ^[95]	100	50	选择性降低DNA甲基化;
	CHO ^[58]	10, 600	18.2, 27.7, 16.7	核蛋白复合物改变, 抑制snRNA的生成, 改变亚核结构
	HEK 293 ^[96]	300	25.5	
	HL-60 ^[36]	80	20	
	K562, CT26, WT ^[97]	600	50	
	HL60, Jurkat, ALL ^[98]	10, 60, 300	26, 60, 150, 300	
	B10-2, HL-60 ^[99]	10, 50, 60, 300	26, 60, 75, 150	
溶酶体	CHO-K1 ^[41]	1, 20, 600	16.2	溶酶体去膜化、溶酶体损伤;
	CHO-K1 ^[42]	600	16.2	溶酶体运动受影响, 高钙离子浓度溶液下, 溶酶体迁移停止;
囊泡	Human eosinophils ^[100]	60	36, 53	囊泡穿孔;
	COS-7 ^[101]	50	20—300	诱导细胞外囊泡的释放

3 细胞骨架相关变化

3.1 NsPEFs 影响细胞骨架完整性

细胞骨架是一种由蛋白纤维组成的网状结构, 主要由肌动蛋白 (actin, AT)、微管 (microtubules, MT)、中间丝 (intermediate filaments, IFs) 等组成^[102]. 细胞骨架作为细胞形貌和力学性能的支撑结构, 与多种细胞结构和功能相关, 在细胞贴壁、增殖分化、信号传导、迁移和细胞存活等方面发挥重要作用^[103,104].

研究表明, nsPEFs 对 AT, MT 和 IFs 都会造成影响^[14,105]. Berghöfer 等^[48] 对烟草细胞 BY-2 施加 10 ns, 约 33 kV/cm 电脉冲后, 观察到肌动蛋白丝向细胞核收缩从而导致细胞核形态发生变化. Steuer 等^[61] 对大鼠肝上皮细胞 (WB-F344) 施加 20 个 100 ns, 20 kV/cm 的脉冲, 发现肌动蛋白纤维的完整性和有序性在脉冲电场刺激完 5—30 min 内遭到破坏, 随后逐步恢复. 该项研究同时观察到细胞间连接直接通信功能被抑制, 但由于使用的荧光标记方法耗时较长, 并且对低剂量刺激不敏感, 难以判断肌动蛋白变化的明确机理. Chafai 等^[56,57,106] 在 2019 和 2020 年的研究中指出, 使用超分辨平台观察到, nsPEFs 会改变 MT 蛋白的瞬时构象, 通过控制 nsPEFs 参数, 能够控制 MT 蛋白自组装的进行. 这种控制策略不仅对功能和结构生物学过程至关重要, 也为合成纳米材料提供了新的思路.

NsPEFs 导致的细胞骨架变化的机理目前尚未得到充分理解. 有研究显示在 nsPEFs 作用后, 细胞形态会发生变化, 表现为细胞肿胀、变圆、起泡、起皱、出现足小体等, 这些可能是导致细胞骨架破坏的原因^[107,108]. Pakhomov 等^[50] 对比了 4 个 600 ns, 19.2 kV/cm 的脉冲作用于不同电击液环境下的中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1, 结果表明细胞骨架的变化与 EP 导致的细胞肿胀有关. 该研究使用等渗透压蔗糖溶液抑制细胞在 EP 后的肿胀, 对比正常电击液下存在细胞肿胀的情况, 发现前者 AT 解体受到抑制, 表明细胞膜 EP 导致的细胞膜内外渗透压变化及细胞肿胀是细胞骨架完整性受到破坏的重要原因. 这项研究说明 nsPEFs 导致的细胞次级效应在 nsPEFs 与细胞器相互作用中扮演了重要角色.

NsPEFs 对细胞骨架破坏的机制包括: 直接破坏机制和由次级效应引起的细胞骨架破坏间接机制. 直接机制包括 nsPEFs 引起 AT 和 MT 等的构象变化, 使细胞弹性降低, 细胞膜通透性增加. 对于参与细胞内运输的 MT 的直接破坏, 会影响细胞内细胞器位置. 如溶酶体的运动受抑制. 细胞骨架破坏的间接机制存在多种情况: 细胞骨架参与维持细胞形态, nsPEFs 作用后, 细胞肿胀, 体积增大, 诱导细胞骨架破坏; 钙离子是调节 AT 和 MT 的信号分子, nsPEFs 作用后的钙离子浓度增加使 MT 解聚, 破坏细胞骨架; nsPEFs 作用后, 细胞内离子浓度变化, 为了恢复正常的胞内离子浓度会导致严重的 ATP 耗竭, 抑制相关蛋白的合成从而使细胞骨架破坏; 此外, nsPEFs 引起的脂质信号分子 PIP2 的耗竭和磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 活化也可能是导致细胞骨架破坏的间接机制之一.

3.2 细胞骨架相关亚细胞结构的变化

细胞骨架与细胞膜的连接决定了细胞形状, 与细胞间连接、细胞与基底间连接、溶酶体等相关. 因此 nsPEFs 不仅可以导致细胞骨架解聚, 也可能影响与细胞骨架相关的其他亚细胞结构. Thompson 等^[41] 在研究 20 个 600 ns, 16.2 kV/cm 的脉冲对中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1) 的影响中, 观察到 nsPEFs 作用完数秒钟后细胞膜起泡, 发生 MT 解聚、钙离子流入、溶酶体裂解等一系列细胞内变化.

细胞骨架的组成部分 AT 和 IFs 等可以跨膜建立起细胞-细胞、细胞-细胞外基质之间的连接, 这种连接是维持细胞及组织机械稳定性和实现相邻细胞间的信号传递和分子运输等生化功能的重要结构^[109].

紧密连接 (tight junction, TJs) 可以封闭细胞间缝隙, 进而调控分子从顶端向基底面移动, 维持组织内不同功能区域, 紧密连接还与细胞骨架紧密相连. Shi 等^[110–112] 利用电阻抗谱结合免疫荧光染色等实验方法观察到不同个数和场强的 100 ns 脉冲电场对老鼠肝上皮细胞 WB-F344 的紧密连接会产生影响, 并且观察到这种影响存在脉冲剂量关系. 图 4 给出了紧密生长的单层细胞在 nsPEFs 作用下通透性增加的 3 个主要通道, 即细胞膜穿孔、细胞间连接的破坏及细胞死亡后脱离导致的空隙.

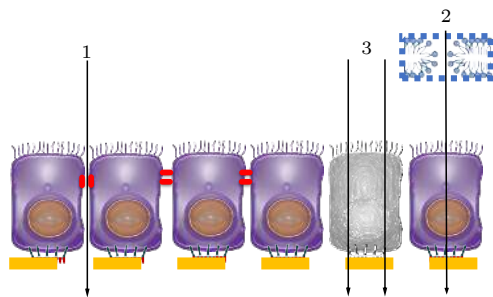


图4 nsPEFs对贴壁细胞的影响. 1, 破坏细胞与细胞间连接; 2, 细胞膜电穿孔; 3, 细胞脱落

Fig. 4. Effect of nsPEFs on adherent cells. 1, Disruption of the intercellular connections; 2, electroporation; 3, cell necrosis or shedding.

间隙连接 (gap junctions, GJs) 是细胞间膜上六簇连接蛋白组成的供亲水性小分子直接通过的通道, 存在于大多数正常细胞中, 负责细胞间直接通信, 与细胞的增殖、分化和凋亡等相关^[113]. Steuer等对大鼠肝上皮细胞施加 20 个 20 kV/cm, 100 ns 脉冲电场, 发现 nsPEFs 除了会导致细胞骨架解聚, 还观察到细胞膜上的连接蛋白堆积, 减少了与膜结合的连接蛋白, 从而干扰了间隙连接细胞间直接通信^[52]. 此外, 对单层细胞施加不同场强 (10, 15, 20 kV/cm)、不同脉冲数的脉冲电场, 结果表明 nsPEFs 对 GJs 的影响是一个剂量和场强相关的过程. 如表 1 所列, 脉宽从 10 ns 到 600 ns, 场强在 10 kV/cm 量级的脉冲电场都能对细胞骨架及相关亚细胞结构产生影响.

细胞骨架及其相关联的细胞连接也是导致 nsPEFs 对悬浮细胞和贴壁细胞不同影响程度的主要因素. Stacey 等^[98] 对 4 种不同细胞进行了不同参数的 nsPEFs 处理, 发现悬浮液中细胞活力大幅下降而贴壁细胞存活率下降相对较小.

4 内质网和线粒体相关变化

4.1 nsPEFs 引起的内质网膜电穿孔及相关效应

钙离子是细胞内的第二信使, 对于机体的各项生理活动不可缺少, 它可以维持细胞膜两侧的电位差, 参与细胞内的信号传导, 对细胞内蛋白质调控、细胞凋亡等都起到重要的作用. 钙离子广泛分布于内质网和线粒体内, 尤其内质网被称为细胞内的钙库^[114,115]. 胞内钙离子增加的途径主要是以下两个: 一是胞内释放, 即内质网等储存钙离子的细

胞器释放钙离子到细胞质中, 因此内质网膜穿孔可以显著提高胞内钙离子水平; 二是胞外流入, 即细胞外微环境中的钙离子通过细胞膜上的离子通道或者是 EP 后形成的“纳米孔”进入细胞内^[99].

Tolstykh 等^[116] 研究发现 nsPEFs 能够导致内质网膜穿孔, 导致钙离子释放到细胞质中, 从而增加细胞内钙离子的浓度. Beebe 等^[75] 探索了 10—300 ns 范围的脉冲电场对人类白血病细胞 (HL-60) 的结构和功能的影响. 他们发现在不引起细胞膜 EP 的 PEFs 作用下, 细胞内钙离子水平提高, 表明 nsPEFs 可以直接作用于内质网使其释放钙离子.

内质网在细胞内负责合成或折叠蛋白质, 这项功能受外界刺激而发生变化的现象叫做内质网应激. 内质网应激过强或者持续时间过久会导致细胞凋亡, 与糖尿病、肥胖症等有关^[117]. 而应激反应是生物体避免外界刺激出现的防卫措施. 德岛大学 Oyadomari 课题组^[40,81,83] 发现 nsPEFs 会激活内质网应激反应, 可能与内质网膜穿孔相关. Furumoto 等^[83] 对 Hela 细胞和鼠类胚胎成纤维细胞 (MEF) 施加 14 ns, 80, 100 kV/cm; 70 ns, 20, 30, 50 kV/cm 两种脉宽的脉冲电场, 发现内质网膜穿孔及胞内钙离子释放. 另外, nsPEFs 直接诱导真核起始因子 (eukaryotic initiation factor-2 α , eIF2 α) 磷酸化, 显示 nsPEFs 激活了内质网应激反应, 并且 70 ns 脉冲引起的应激反应强度较 14 ns 强. 这项研究表明携带有更高频率信息的短脉冲对内质网作用更加明显.

nsPEFs 导致的内质网应激可进一步诱导肿瘤细胞凋亡^[118]. Rossi 等^[39] 利用 200 ns, 7 kV/cm 的脉冲电场处理小鼠黑色素瘤细胞 (B16-F10) 和淋巴瘤细胞 (EL-4), 发现 nsPEFs 引起内质网应激, 并伴有免疫原性细胞死亡. 这些研究表明脉宽、电场强度是控制 nsPEFs 引起应激现象及连锁反应的重要因素.

4.2 nsPEFs 引起的线粒体膜穿孔及相关效应

图 5 给出了 nsPEFs 诱导细胞凋亡的一种主要途径. 线粒体包含触发细胞凋亡的关键调节因子, 是诱导肿瘤细胞凋亡的主要靶标^[68]. 细胞凋亡是指细胞为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主有序的死亡, 是细胞的主动死亡过程. 在凋亡信号触发后, 一些凋亡因子, 如细胞色素 C 从线粒体

释放进入细胞质中, 然后激活细胞凋亡蛋白酶 caspase, 诱导细胞凋亡. 线粒体凋亡途径中的很多关键事件, 包括线粒体信号传导途径的启动和完成, 都是由细胞中钙离子信号触发的. 因此钙离子不仅可以影响线粒体膜的通透性, 还可以通过触发细胞色素 C 的进一步释放来放大凋亡信号 [98,119].

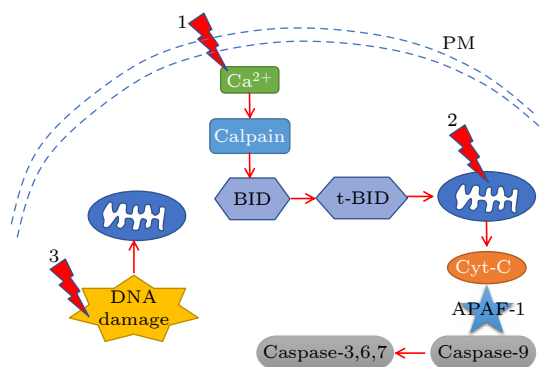


图 5 nsPEFs 诱导的细胞内凋亡途径

Fig. 5. Apoptosis pathways for cells after exposure to nsPEFs.

研究发现, nsPEFs 可引起线粒体膜电位耗散、线粒体肿胀等变化 [70,120,121]. 线粒体膜电位的耗散与细胞活力丧失之间存在密切的关系, 并且与细胞质中钙离子相关. Guerrero-Hernandez 等 [36] 对肝癌细胞施加场强最高达 80 kV/cm, 脉宽 600 ns, 上升下降沿时间分别为 15 和 150 ns 的多种强度脉冲电场. 发现 nsPEFs 作用后的肝癌细胞产生明显的线粒体膜电位耗散. 其中 nsPEFs 的上下沿, 即高频成分, 发挥了主要作用. nsPEFs 使线粒体电穿孔同内质网一样也会导致胞内钙离子释放, 并且往往伴随着 caspase 蛋白酶激活, 细胞活力丧失. 熊本大学的 Morotomi-Yano 等 [65] 对 HeLa S3 细胞施加 80 ns, 20 kV/cm, 1 Hz 的电脉冲, 结果显示 nsPEFs 诱导释放的钙离子参与了细胞内信号传导, 并且这些信号传导事件与细胞死亡和存活的调节相关. Muratori 等 [96] 对 HEK 293 细胞施加了 300 ns, 25.5 kV/cm 的脉冲电场, 发现 nsPEFs 激活了 TMEM16F 蛋白酶 (或 Anoctamin 6), 其中 TMEM16F 蛋白酶与钙离子和细胞凋亡有关. 如表 1 所列, 通过改变 nsPEFs 参数, 可以针对不同细胞调控其胞内钙离子浓度从而调节细胞功能, 如细胞凋亡 [122,123]. Nuccitelli 等 [71] 和 Guo 等 [72] 报道免疫原性细胞死亡的特征是释放危险相关分子模式 (danger-associated molecular patterns, DAMPs), ATP 是其中一种关键性 DAMPs. ATP 耗竭会迅

速导致细胞坏死, 研究表明 nsPEFs 处理后, 细胞内 ATP 被消耗. nsPEFs 还会引起细胞内的 ROS 增加, 众多研究发现, nsPEFs 引起胞内 ROS 水平显著增加, 产生的 ROS 可能导致细胞刺激和氧化性细胞损伤, 并通过凋亡、坏死或焦亡等信号通路导致细胞死亡 [60,94,124,125].

5 细胞核相关变化

细胞核是细胞遗传与代谢的调控中心, nsPEFs 引起的细胞核变化是多样的 [126]. Zhuang 等 [127] 利用单细胞介电壳层模型对比 100 ns 和 100 μ s 脉冲电场对 Jurkat 细胞膜、细胞质、细胞核等亚细胞结构的介电变化, 发现 nsPEFs 除了与 μ sPEFs 一样导致细胞膜 EP, 还会导致细胞核膜电导率增加, 表明 nsPEFs 可以导致细胞核膜电穿孔. Chen 等 [89] 采用实时荧光标记成像方法研究 10 ns, 65 kV/cm 和 60 ns, 25 kV/cm 两种脉宽、能量相同的脉冲电场对 HL-60 细胞核的影响, 结果表明 nsPEFs 可以导致细胞核电穿孔并影响核质. Chen 等 [92] 在 2007 年报道了 60 ns, 60 kV/cm 的脉冲电场会损伤 Jurkat 细胞和 HL-60 细胞的 DNA. 他们发现对核膜进行充电会导致核膜中形成纳米孔, 并且 nsPEFs 会通过抑制 snRNA 的生成改变亚核结构. 此研究首次表明 nsPEFs 改变了核蛋白复合物. Chen 等 [18] 对黑色素瘤细胞 (B16-F10) 施加 100 个 300 ns, 40 kV/cm 的电脉冲后, 发现 nsPEFs 诱导 DNA 双链断裂, 降低了血管内皮生长因子 (VEGF) 和血小板衍生的内皮细胞生长因子 (PD-ECGF) 蛋白的表达, 促进了细胞凋亡.

nsPEFs 引起的细胞核变化包括: 1) nsPEFs 可以导致核膜的电穿孔 [97]; 2) nsPEFs 可以影响核 RNA-蛋白质复合物及核斑点的变化 [92], 主要表现为核内亚结构数量和大小. 核 RNA-蛋白质复合物的变化反映了细胞转录机制的破坏. 此外, 由于 DNA 是带电物质因此易受电场的影响, nsPEFs 可以直接诱导 DNA 损伤从而使细胞死亡. 另一方面, 核被膜的穿孔也可以促进 DNA 质粒进入核内, 增强细胞的基因表达 [75].

6 其他亚细胞结构

除了上述提到的细胞器生物电效应, nsPEFs

影响溶酶体的运动,使溶酶体去膜化、损伤溶酶体等^[128].溶酶体可以降解损伤的细胞膜和细胞器,参与细胞自噬过程.2014年,Thompson等^[41]发现了溶酶体、钙离子和细胞骨架三者之间存在联系,研究发现在含钙离子的培养基中生长的细胞在施加高阈值剂量的 nsPEFs 后,MT 破坏,溶酶体迁移停止.2018年,Thompson等^[42]为了探究细胞内钙离子浓度是如何影响溶酶体运动,对中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1)施加了 600 ns, 16.2 kV/cm 的纳秒脉冲电场,研究发现在含钙离子的溶液中,施加 nsPEFs 会破坏细胞骨架结构,从而阻止溶酶体运动.他们分别拍摄了高钙离子浓度的溶液和不含钙离子的溶液中溶酶体运动图像,发现溶酶体运动情况也受细胞内钙离子浓度影响.高钙离子浓度的溶液中,细胞内溶酶体迁移停止,而在缺乏钙离子溶液中,一些溶酶体发生移位.Kielbik等^[129]研究发现钙离子与细胞骨架破坏之间存在相关性,通过共聚焦显微镜观察,钙离子浓度增加所引起细胞骨架破坏程度更加显著,这与 Thompson 等的研究一致.由于细胞骨架受到破坏,因此受细胞骨架牵引的溶酶体运动受到抑制.

NsPEFs 作用下,囊泡的脂质双分子层形成瞬时孔隙,囊泡膜的通透性增加^[130].Qian等^[131]在研究 nsPEFs 介导的抗肿瘤免疫反应机制时发现,nsPEFs 诱导了细胞外囊泡的释放.

细胞各亚结构相互联系紧密,因此 nsPEFs 与细胞的相互作用往往会存在多种细胞器的物理结构和生化功能的变化,及其他次级效应.除了上述主要的细胞器结构及相关的细胞间连接、溶酶体、囊泡等,有文章报道 nsPEFs 对细胞内的酶也会产生影响^[132].Della Valle等^[133]通过分子动力学仿真 100 ns 脉冲电场对超氧化物歧化酶结构的影响,表明 10^3 kV/cm 以上的 nsPEFs 可以直接影响酶活性部位的静电场,从而导致酶结构发生变化.Guo等^[134]测量了电场 5—30 kV/cm, 100 和 300 ns 脉冲电场作用于小鼠口腔癌后,口腔癌细胞内 NOS 的变化,预示一氧化氮合成酶可能受到影响.

7 结 论

本文基于 nsPEFs 的细胞器生物电效应的研究发展简史及不同细胞器结构和功能变化等展开叙述,总结了 2000 年以来 nsPEFs 的细胞器生物

电效应相关文献,尤其是近五年的研究.通过表 1 所列的总结数据可以看出,对于施加同一种脉冲参数,不同细胞类型在 nsPEFs 处理后的细胞器生物电效应存在显著差异.对于同一种细胞,仅仅改变 nsPEFs 参数的其中一项指标,比如脉宽、电场强度、脉冲个数、脉冲极性等,细胞器效应的表现也会产生明显变化.因此在研究 nsPEFs 的细胞器效应时,需要结合特定的脉冲参数及细胞类型进行讨论.根据现有的研究综述,作者提出若干未来研究中值得加强关切的问题:

1) 已有的研究多聚焦于 nsPEFs 对悬浮细胞的细胞器生物电效应,悬浮状态下的细胞以单一个体的形式存在,而实际应用往往在组织层面进行,未来的研究应更多考虑在多细胞体系或生物组织中发挥重要作用的细胞间连接,细胞与外基质间连接的影响.

2) 传统的基于荧光等标记物的观察手段,以及扫描电子显微镜等都会对被测物产生不可逆伤害,而且往往难以观察到脉冲电场生物电效应的快速响应.一些物理技术,比如生物介电谱方法,具有非侵入性、实时、原位观测的优势,因此可以用生物介电谱技术研究 nsPEFs 的细胞器生物电效应.

3) 超分辨光学显微成像技术除了具有非侵入性、实时原位观察的优势,还具有较高的空间分辨率,可达几十纳米.超分辨成像可以为进一步深入理解 nsPEFs 的细胞器生物电效应及相应机理提供更多新信息,促进 nsPEFs 技术在生物医学领域的进一步发展与应用.

4) 大量研究表明 nsPEFs 可以抑制肿瘤生长和诱导抗肿瘤免疫反应,nsPEFs 诱导癌细胞凋亡涉及的靶点较多,且基本都与细胞器相关.因此,加强 nsPEFs 的细胞器生物电效应的研究有助于发现癌细胞凋亡靶点,开发新的肿瘤免疫疗法.

5) 近年的研究和临床试验表明,μsPEFs 可作为一种新型物理能量用于心肌组织消融,治疗房颤等心脏疾病.相比 μsPEFs, nsPEFs 引起的肌肉收缩更弱、气泡更少、消融更均匀,有望成为更好的脉冲电场心肌消融技术.此外,房颤发生与心肌细胞间连接等细胞器紧密相关,未来可加强 nsPEFs 对心肌细胞及其细胞器的相关研究.

现有诊断技术的局限和人们对细胞和组织等生物体系本身理解的不足,使得 nsPEFs 的生物电效应尚未得到充分理解,本文聚焦 nsPEFs 的细胞

器生物电效应,旨在为 nsPEFs 肿瘤治疗、软组织消融等生物医学领域的研究和应用提供参考。

参考文献

- [1] Gao Y, Men Y K, Zhang J, Liu F J, Deng Y D, Wang Z 2016 *High Voltage Eng.* **42** 2675 (in Chinese) [高宇, 门业堃, 张建, 刘范嘉, 邓永迪, 王振 2016 高电压技术 **42** 2675]
- [2] Amr A G, Schoenbach K H 2000 *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28** 115
- [3] Sitzmann W, Vorobiev E, Lebovka N 2016 *Innovative Food Sci. Emerg.* **37** 302
- [4] Barbosa-Cánovas G V, Altunakar B 2006 *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications* (Boston: Springer US) pp3–26
- [5] Takaki K, Yoshida K, Saito T, Kusaka T, Yamaguchi R, Takahashi K, Sakamoto Y 2014 *Microorganisms* **2** 58
- [6] Takaki K, Yamazaki N, Mukaigawa S, Fujiwara T, Kofujita H, Takahashi K, Narimatsu M, Nagane K 2009 *Acta Phys. Pol. A* **115** 1062
- [7] Deore A B, Sapakal V D, Shikalgar T S, Jagtap M J, Bhinde C J 2017 *Innovative Pharm.* **5** 147
- [8] Heller R, Jaroszeski M J, Reintgen D S, Puleo C A, DeConti R C, Gilbert R A, Glass L F 1998 *Cancers* **83** 148
- [9] Heller R, Gilbert R, Jaroszeski M J 1999 *Adv. Drug Deliver. Rev.* **35** 119
- [10] Yao C G, Ning J Y, Liu H M, Zheng S, Dong S L 2020 *Trans. China Electrotech. Soc.* **35** 115 (in Chinese) [姚陈果, 宁郡怡, 刘红梅, 郑爽, 董守龙 2020 电工技术学报 **35** 115]
- [11] Golberg A, Broelsch G, Bohr S, Milhm M, Austen W, Albadawi H, Watkins M, Yarmush M 2013 *Technology* **1** 1
- [12] Golberg A, Yarmush M 2013 *IEEE Trans. Bio-Med. Eng.* **60** 707
- [13] Schoenbach K H, Joshi R P, Kolb J F, Nianying C, Stacey M, Blackmore P F, Buescher E S, Beebe S J 2004 *Proc. IEEE* **92** 1122
- [14] Graybill P M, Davalos R V 2020 *Cancers* **12** 1132
- [15] Scarlett S S, White J A, Blackmore P F, Schoenbach K H, Kolb J F 2009 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1788** 1168
- [16] Rubinsky B, Romeo S, Zeni L, Sarti M, Sannino A, Scarfi M R, Vernier P T, Zeni O 2011 *PLoS One* **6** e28419
- [17] Beebe S, Sain N, Ren W 2013 *Cells* **2** 136
- [18] Chen X, Kolb J F, Swanson R J, Schoenbach K H, Beebe S J 2010 *Pigm. Cell Melanoma R.* **23** 554
- [19] Vadlamani R A, Nie Y, Detwiler D A, Dhanabal A, Kraft A M, Kuang S, Gavin T P, Garner A L 2019 *J. R. Soc. Interface* **16** 20190079
- [20] Chen J, Huang Y, Yang J, Li K, Jiang Y, Heng B C, Cai Q, Zhang J, Ge Z 2020 *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **14** 1136
- [21] Kim V, Gudvangen E, Kondratiev O, Redondo L M, Xiao S, Pakhomov A 2021 *Int. J. Mol. Sci.* **22** 7051
- [22] Casciola M, Xiao S, Pakhomov A 2017 *Sci. Rep.* **7** 10453
- [23] Tolstykh G P, Valdez C M, Montgomery N D, Cantu J C, Sedelnikova A, Ibey B L 2021 *Bioelectrochemistry* **142** 107930
- [24] Stampfli R 1958 *An Acad. Brasil Ciens.* **30** 57
- [25] Neumann E, Schaefferidder M, Wang Y, Hofschneider P H 1982 *EMBO. J.* **1** 841
- [26] Weaver J C 1993 *J. Cell. Biochem.* **51** 426
- [27] Glaser R W, Leikin S L, Chernomordik L V, Pastushenko V F, Sokirko A I 1988 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **940** 275
- [28] Weaver J C, Chizmadzhev Y A 1996 *Bioelectrochemistry* **41** 135
- [29] Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick J J, Gilbert R A, Heller R, Jaroszeski M J, Malone R W 2000 *Mol. Ther.* **2** 178
- [30] Shi Q S, Du L F, Zhang Y F 2018 *Oncoradiology* **27** 242 (in Chinese) [史秋生, 杜联芳, 张焱锋 2018 肿瘤影像学 **27** 242]
- [31] Li X M, Wan L J, Wang X J, Xie H M, Lan J, Liu X Y 2017 *Prog. Mod. Biomed.* **17** 1190 (in Chinese) [李小曼, 万利杰, 王晓娟, 谢红梅, 兰建, 刘晓云 2017 现代生物医学进展 **17** 1190]
- [32] Deipolyi A R, Golberg A, Yarmush M L, Arellano R S, Oklu R 2014 *Diagn. Interv. Radiol.* **20** 147
- [33] Pang X F 2008 *Bioelectromagnetism* (Beijing: National Defense Industry Press) p101 (in Chinese) [庞小峰 2008 生物电磁学 (北京: 国防工业出版社) 第101页]
- [34] Buescher E S, Schoenbach K H 2003 *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* **10** 788
- [35] Koga T, Morotomi-Yano K, Sakugawa T, Saitoh H, Yano K I 2019 *Sci. Rep.* **9** 8451
- [36] Guerrero-Hernandez A, Beebe S J, Chen Y J, Sain N M, Schoenbach K H, Xiao S 2012 *PLoS One* **7** e51349
- [37] Napotnik T B, Wu Y H, Gundersen M A, Miklavčič D, Vernier P T 2012 *Bioelectromagnetism* **33** 257
- [38] Jansen E D, Thomas R J, Wilmink G J, Ibey B L, Estlack L E, Roth C C, Cerna C Z, Wilmink G J, Ibey B L 2014 *Proceedings of the SPIE San Francisco, California, USA, March 13, 2014* p89411S
- [39] Rossi A, Pakhomova O N, Mollica P A, Casciola M, Mangalanathan U, Pakhomov A G, Muratori C 2019 *Cancers* **11** 2034
- [40] Hirai H, Miyake M, Nagano A, Teranishi K, Shimomura N, Oyadomari S 2014 *IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC) Santa Fe, New Mexico, USA, June 1–5, 2014* p419
- [41] Thompson G L, Roth C C, Dalzell D R, Kuipers M A, Ibey B L 2014 *J. Biomed. Opt.* **19** 1
- [42] Thompson G, Beier H, Ibey B 2018 *Bioengineering* **5** 103
- [43] Schoenbach K H, Katsuki S, Stark R H, Buescher E S, Beebe S J 2002 *IEEE Trans. Plasma Sci.* **30** 293
- [44] Schoenbach K H 2018 *Bioelectromagnetism* **39** 257
- [45] Yao C G, Mo D B, Sun C X, Chen X, Xiong Z A 2008 *J. Biomed. Eng.* **25** 1206 (in Chinese) [姚陈果, 莫登斌, 孙才新, 陈新, 熊正爱 2008 生物医学工程杂志 **25** 1206]
- [46] Mi Y 2009 *Ph. D. Dissertation* (Chongqing: Chongqing University) (in Chinese) [米彦 2009 博士学位论文 (重庆: 重庆大学)]
- [47] Pakhomov A G, Shevin R, White J A, Kolb J F, Pakhomova O N, Joshi R P, Schoenbach K H 2007 *Arch. Biochem. Biophys.* **465** 109
- [48] Berghöfer T, Eing C, Flickinger B, Hohenberger P, Wegner L H, Frey W, Nick P 2009 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387** 590
- [49] Stacey M, Fox P, Buescher S, Kolb J 2011 *Bioelectrochemistry* **82** 131
- [50] Pakhomov A G, Xiao S, Pakhomova O N, Semenov I, Kuipers M A, Ibey B L 2014 *Bioelectrochemistry* **100** 88
- [51] Wilmink G J, Thompson G L, Roth C, Tolstykh G, Kuipers M, Ibey B L, Ibey B L 2013 *Proceedings of the SPIE San Francisco, California, USA, February 23, 2013* p85850T
- [52] Steuer A, Schmidt A, Labohá P, Babica P, Kolb J F 2016 *Bioelectrochemistry* **112** 33

- [53] Carr L, Bardet S M, Burke R C, Arnaud-Cormos D, Leveque P, O'Connor R P 2017 *Sci. Rep.* **7** 41267
- [54] Tolstykh G P, Thompson G L, Beier H T, Steelman Z A, Ibey B L 2017 *BB Reports* **9** 36
- [55] Perrier D L, Vahid A, Kathavi V, Stam L, Rems L, Mulla Y, Muralidharan A, Koenderink G H, Kreutzer M T, Boukany P E 2019 *Sci. Rep.* **9** 8151
- [56] Chafai D E, Sulimenko V, Havelka D, Kubínová L, Dráber P, Cifra M 2019 *Adv. Mater.* **31** 1903636
- [57] Chafai D E, Vostárek F, Dráberová E, Havelka D, Arnaud-Cormos D, Leveque P, Janáček J, Kubínová L, Cifra M, Dráber P 2020 *Adv. Biosyst.* **4** 2000070
- [58] Thompson G L, Roth C C, Kuipers M A, Tolstykh G P, Beier H T, Ibey B L 2016 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **470** 35
- [59] Xiao D, Tang L, Zeng C, Wang J, Luo X, Yao C, Sun C 2011 *Cell Biol. Int.* **35** 99
- [60] Ford W E, Ren W, Blackmore P F, Schoenbach K H, Beebe S J 2010 *Arch. Biochem. Biophys.* **497** 82
- [61] Steuer A, Wende K, Babica P, Kolb J F 2017 *Eur. Biophys. J. Biophys.* **46** 567
- [62] Rassokhin M A, Pakhomov A G 2012 *J. Membr. Biol.* **245** 521
- [63] Ren W, Sain N M, Beebe S J 2012 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421** 808
- [64] Beebe S J 2015 *Bioelectrochemistry* **103** 52
- [65] Morotomi-Yano K, Yano K I, Research B 2015 *Biochem. Biotechnol. Res.* **3** 51
- [66] Mao Z, Zhang Y, Lu N, Cheng S, Hong R, Liu Q H 2019 *Small* **16** 1904047
- [67] Nuccitelli R, Tran K, Sheikh S, Athos B, Kreis M, Nuccitelli P 2010 *Int. J. Cancer* **127** 1727
- [68] Beebe S J, Fox P M, Rec L J, Willis L K, Schoenbach K H 2003 *FASEB J.* **17** 1
- [69] Awasthi K, Nakabayashi T, Ohta N 2016 *ACS Omega* **1** 396
- [70] Taibi A, Perrin M L, Albouys J, Jacques J, Yardin C, Durand-Fontanier S, Bardet S M 2021 *Clin. Transl. Oncol.* **23** 1220
- [71] Nuccitelli R, McDaniel A, Anand S, Cha J, Mallon Z, Berridge J C, Uecker D 2017 *J. Immunother. Cancer* **5** 1
- [72] Guo S, Jing Y, Burcus N I, Lassiter B P, Tanaz R, Heller R, Beebe S J 2018 *Int. J. Cancer* **142** 629
- [73] Vernier P T, Sun Y, Marcu L, Salemi S, Craft C M, Gundersen M A 2003 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310** 286
- [74] Buescher E S, Smith R R, Schoenbach K H 2004 *IEEE Trans. Plasma Sci.* **32** 1563
- [75] Beebe S J, Blackmore P F, White J, Joshi R P, Schoenbach K H 2004 *Physiol. Meas.* **25** 1077
- [76] Zhang J, Blackmore P F, Hargrave B Y, Xiao S, Beebe S J, Schoenbach K H 2008 *Arch. Biochem. Biophys.* **471** 240
- [77] Wang S F, Chen J X, Chen M T, Vernier P T, Gundersen M A, Valderrabano M 2009 *Biophys. J.* **96** 1640
- [78] Beier H T, Roth C C, Tolstykh G P, Ibey B L 2012 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423** 863
- [79] Semenov I, Xiao S, Pakhomov A G 2013 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1828** 981
- [80] Pakhomova O N, Gregory B, Semenov I, Pakhomov A G 2014 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1838** 2547
- [81] Fukuda H, Miyake M, Hirai H, Teranishi K, Shimomura N, Oyadomari S 2015 *IEEE Pulsed Power Conference (PPC)* Austin, Texas, USA, May 31-June 4, 2015 p1
- [82] Zhou P, He F, Han Y, Liu B, Wei S 2018 *Bioelectrochemistry* **124** 7
- [83] Furumoto Y, Sato D, Teranishi K, Shimomura N, Hamada Y, Miyake M, Oyadomari S 2018 *IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC)* Jackson, Wyoming, USA, June 3-7, 2018 p456
- [84] Zaklit J, Chat Te Rjee I, Leblanc N, Craviso G L 2019 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1861** 1180
- [85] Ohnishi N, Fujiwara Y, Kamezaki T, Katsuki S 2019 *IEEE Trans. Bio-Med. Eng.* **66** 2259
- [86] Liu J, Lu Q, Liang R, Guo J, Wang K, Dong F, Wang J, Zhang J, Fang J 2019 *Phys. Rev. Appl.* **11** 024001
- [87] Jin D Y, Hamada Y, Furumoto Y, Izutani A, Taniuchi S, Miyake M, Oyadomari M, Teranishi K, Shimomura N, Oyadomari S 2020 *Plos One* **15** e0229948
- [88] Semenov I, Casciola M, Ibey B L, Xiao S, Pakhomov A G 2018 *Bioelectrochemistry* **121** 135
- [89] Chen N, Schoenbach K H, Kolb J F, James Swanson R, Garner A L, Yang J, Joshi R P, Beebe S J 2004 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317** 421
- [90] Nuccitelli R, Pliquett U, Chen X, Ford W, Swanson R, Beebe S, Kolb J, Schoenbach K 2006 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343** 351
- [91] Nuccitelli R, Chen X, Pakhomov A G, Baldwin W H, Sheikh S, Pomictier J L, Ren W, Osgood C, Swanson R J, Kolb J F, Beebe S J, Schoenbach K H 2009 *Int. J. Cancer* **125** 438
- [92] Chen N, Garner A L, Chen G, Jing Y, Deng Y, Swanson R J, Kolb J F, Beebe S J, Joshi R P, Schoenbach K H 2007 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364** 220
- [93] Ibey B L, Pakhomov A G, Gregory B W, Khorokhorina V A, Roth C C, Rassokhin M A, Bernhard J A, Wilmsink G J, Pakhomova O N 2010 *Biochim. Biophys. Acta General Subjects* **1800** 1210
- [94] Ren W, Beebe S J 2011 *Apoptosis* **16** 382
- [95] Beebe S J 2015 *J. Nanomed. Res.* **2** 00016
- [96] Muratori C, Pakhomov A G, Gianulis E, Meads J, Casciola M, Mollica P A, Pakhomova O N 2017 *J. Biol. Chem.* **292** 19381
- [97] Chang A Y, Liu X, Tian H, Hua L, Yang Z, Wang S 2020 *Sci. Rep.* **10** 1
- [98] Stacey M, Stickley J, Fox P, Statler V, Schoenbach K, Beebe S J, Buescher S 2003 *Mutat. Res-Gen. Tox. En.* **542** 65
- [99] Beebe S J, White J, Blackmore P F, Deng Y, Somers K, Schoenbach K H 2003 *DNA Cell Biol.* **22** 785
- [100] Schoenbach K H, Be Ebe S J, Buescher E S 2010 *Bioelectromagnetics* **22** 440
- [101] Tekle E, Oubrahim H, Dzekunov S M, Kolb J F, Schoenbach K H, Chock P B 2005 *Biophys. J.* **89** 274
- [102] Humphrey J D, Dufresne E R, Schwartz M A 2014 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** 802
- [103] Paszek M J, Zahir N, Johnson K R, Lakins J N, Rozenberg G I, Gefen A, Reinhart-King C A, Margulies S S, Dembo M, Boettiger D, Hammer D A, Weaver V M 2005 *Cancer Cell* **8** 241
- [104] Xiao Y, Cheng A L 2016 *Chin. J. Clin. Oncol.* **43** 1007 (in Chinese) [肖英, 程爱兰 2016 中国肿瘤临床 **43** 1007]
- [105] Haberkorn I, Siegenthaler L, Buchmann L, Neutsch L, Mathys A 2021 *Biotechnol. Adv.* **53** 107780
- [106] Havelka D, Chafai D E, Krivosudský O, Klebanovych A, Vostárek F, Kubínová L, Dráber P, Cifra M 2019 *Adv. Mater. Technol.* **5** 1900669
- [107] Chopinet L, Roduit C, Rols M P, Dague E 2013 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1828** 2223

- [108] Louise C, Etienne D, Marie-Pierre R 2014 *Cytoskeleton* **71** 587
- [109] Svitkina T 2018 *Csh. Perspect. Biol.* **10** a018267
- [110] Shi F, Steuer A, Zhuang J, Kolb J F 2019 *IEEE Trans. Bio-Med. Eng.* **66** 2010
- [111] Shi F, Zhuang J, Kolb J F 2019 *J. Phys. D:Appl. Phys.* **52** 495401
- [112] Shi F, Kolb J F 2020 *Biosens. Bioelectron.* **157** 112149
- [113] Liu T P 1999 *Sci. Found. China* **1999** 50 (in Chinese) [刘泰樾 1999 中国科学基金 **1999** 50]
- [114] Lewis R S 2001 *Annu. Rev. Immunol.* **19** 497
- [115] Feske S 2007 *Nat. Rev. Immunol.* **7** 690
- [116] Nanosecond Pulsed Electric Fields Activate Intracellular Signaling Pathways. Tolstykh G P, Thompson T, Beier H T, Roth C C, Ibey B L <https://spie.org/news/4736-nanosecond-pulsed-electric-fields-activate-intracellular-signaling-pathways?SSO=1> [2021-11-24]
- [117] Chen N Z, Jiang C, Li X K 2016 *China Biotechnology* **36** 76 (in Chinese) [陈娜子, 姜潮, 李校堃 2016 中国生物工程杂志 **36** 76]
- [118] Liu J, Chen X, Zheng S 2021 *Front. Med.* **15** 170
- [119] Batista Napotnik T, Polajzer T, Miklavcic D 2021 *Bioelectrochemistry* **141** 107871
- [120] Zharkova L P, Romanchenko I V, Buldakov M A, Pripitnev P V, Bolshakov M A, Rostov V V 2018 *20th International Symposium on High-Current Electronics (ISHCE)* Tomsk, Russia, September 16–22, 2018 p158
- [121] Nuccitelli R, McDaniel A, Connolly R, Zelickson B, Hartman H 2020 *Laser Surg. Med.* **52** 882
- [122] Tolstykh G P, Cantu J C, Tarango M, Ibey B L 2019 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1861** 685
- [123] Awasthi K, Chang F L, Hsu H Y, Ohta N 2021 *Sens. Actuators, B* **347** 130635
- [124] Pakhomova O N, Khorokhorina V A, Bowman A M, Rodaitė-Riševičienė R, Saulis G, Xiao S, Pakhomov A G 2012 *Arch. Biochem. Biophys.* **527** 55
- [125] Guo S, Burcus N I, Scott M, Jing Y, Semenov I 2021 *Sci. Rep.* **11** 23745
- [126] Gao W, Hou W, Li W, Wang Y S, Wang Y P 2014 *China Anim. Husb. Vet. Med.* **41** 150 (in Chinese) [高薇, 侯微, 李伟, 王玉帅, 王英平 2014 中国畜牧兽医 **41** 150]
- [127] Zhuang J, Steuer A, Jing Y, Kolb J F 2012 *IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC)* San Diego, California, USA, June 3–7, 2012 p106
- [128] Cen C, Chen X H, Zheng S S 2015 *J. Zhejiang Univ., Med. Sci.* **44** 678 (in Chinese) [岑超, 陈新华, 郑树森 2015 浙江大学学报 (医学版) **44** 678]
- [129] Kielbik A, Szlasa W, Novickij V, Szewczyk A, Maciejewska M, Saczko J, Kulbacka J 2021 *Sci. Rep.* **11** 15835
- [130] Perrier D L, Rems L, Boukany P E 2017 *Adv. Colloid Interface Sci.* **249** 248
- [131] Qian J, Chen T, Wu Q, Zhou L, Zhou W, Wu L, Wang S, Lu J, Wang W, Li D, Xie H, Su R, Guo D, Liu Z, He N, Yin S, Zheng S 2021 *Cancer Lett.* **498** 242
- [132] Dan T, Okamo T, Abe K, Katsuki S, Sakugawa T, Akiyama H 2010 *Abstracts IEEE International Conference on Plasma Science* Norfolk, Virginia, USA, June 20–24, 2010 p1
- [133] Della Valle E, Marracino P, Pakhomova O, Liberti M, Apollonio F 2019 *PloS One* **14** e0221685
- [134] Guo J S, Dong F H, Ding L, Wang K L, Zhang J, Fang J 2018 *Bioelectrochemistry* **123** 26

REVIEW

A review on bioelectrical effects of cellular organelles by high voltage nanosecond pulsed electric fields*Guo Yu-Yi¹⁾²⁾ Shi Fu-Kun²⁾ Wang Qun²⁾ Ji Zhen-Yu³⁾ Zhuang Jie^{2)†}1) (*Division of Life Sciences and Medicine, School of Biomedical Engineering (Suzhou),**University of Science and Technology of China, Suzhou 215000, China)*2) (*Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215000, China)*3) (*Faculty of Military Biomedical Engineering, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)*

(Received 5 October 2021; revised manuscript received 23 November 2021)

Abstract

The biomedical application of high-voltage nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) has become an emerging interdisciplinary research field in recent years. Compared with microsecond and millisecond pulsed electric fields, high-voltage nsPEFs can not only lead the cell membrane structure to polarize and dielectric break down the cell membrane structure, i.e. membrane electroporation, but also penetrate into the cell, triggering off organelle bioelectrical effects such as cytoskeleton depolymerization, intracellular calcium ion release, and mitochondrial membrane potential dissipation. Extensive attention has been attracted from related academic communities. In this article, the following aspects are involved. First, the physical model of high-voltage nsPEFs and its bioelectrical effects on cellular organelles are introduced. Then, the existing researches of the interactions of high-voltage nsPEFs with cytoskeleton, mitochondria, endoplasmic reticulum, cell nucleus and other subcellular structure are reviewed and summarized; the relationship between the influence on cellular organelles by high-voltage nsPEFs and the biological effects such as cell death and intercellular communication is highlighted. Finally, the key technical challenges to high-voltage nsPEFs in biomedical research are condensed, followed by the prospects of future research directions.

Keywords: nanosecond pulsed electric field, electroporation, bioelectrical effect, organelle**PACS:** 87.16.Tb, 82.39.Wj, 87.15.Pc**DOI:** 10.7498/aps.71.20211850

* Project supported by the National Key R&D Program of China (Grant Nos. 2019YFC0119102, 2019YFC0118004, 2020YFC0122301) .

† Corresponding author. E-mail: jzhuang@sibet.ac.cn