

# 纳秒脉冲电场诱导黑色素瘤焦亡及激发机体免疫响应的实验研究

王艳城<sup>1</sup>, 钱 琨<sup>1</sup>, 刘红梅<sup>1,2</sup>, 周 濂<sup>1</sup>, 董守龙<sup>1</sup>, 姚陈果<sup>1</sup>

(1. 重庆大学输变电装备技术全国重点实验室, 重庆 400044;

2. 杭州维纳安可医疗科技有限责任公司, 杭州 310018)

**摘要:**近年来, 纳秒脉冲电场(nanosecond pulsed electric fields, nsPEFs)作为一种潜在的癌症治疗手段备受关注。该研究旨在探究纳秒脉冲电场对黑色素瘤的治疗效果, 并研究其诱导黑色素瘤细胞焦亡及激发机体免疫的生物效应。选择 B16F10(小鼠皮肤黑色素瘤细胞)作为实验对象, 采用 nsPEFs(200 ns、1 Hz)对体外和体内的肿瘤细胞进行处理, 并通过细胞学、分子生物学和免疫学技术来评估细胞的生存状态、焦亡情况, 细胞中的相关蛋白和分子以及免疫相关分子的表达水平。实验结果表明, nsPEFs 刺激后细胞膜表面起泡, 膜通透性增加, 剪切的 Caspase-1 和剪切的 GSDMD 蛋白表达增加, 说明 nsPEFs 刺激可有效诱导黑色素瘤细胞发生焦亡; 免疫损伤相关分子(DAMPs: 如钙网蛋白(CRT)、热休克蛋白 70(HSP70)和高迁移族蛋白(HMGB1))的表达提高, 表明 nsPEFs 引起的细胞死亡具有免疫原性; 受 nsPEFs 刺激后, 肿瘤体积逐渐消融, 大量活化的树突状细胞(DCs)、CD8<sup>+</sup> T 细胞在肿瘤组织中出现。血清中 IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  表达升高, 而 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 表达降低, 提示小鼠可能通过相关因子的释放激发免疫响应路径, 在 nsPEFs 消融后参与抗肿瘤效应; 肿瘤挑战试验发现, 在特异性免疫应答的伴随下, nsPEFs 刺激组的肿瘤生长受到明显抑制。结果表明 nsPEFs 具有抗黑色素瘤作用, 并可短期激发机体免疫系统来增强治疗效果。

**关键词:** 纳秒脉冲电场; 黑色素瘤; 细胞焦亡; 免疫原性; 细胞因子; 免疫响应

## Experimental Study on Inducing Melanoma Pyroptosis and Eliciting Host Immune Response by Nanosecond Pulsed Electric Fields

WANG Yancheng<sup>1</sup>, QIAN Kun<sup>1</sup>, LIU Hongmei<sup>1,2</sup>, ZHOU Quan<sup>1</sup>, DONG Shoulong<sup>1</sup>, YAO Chenguo<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Power Transmission Equipment Technology, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

2. Hangzhou Winner-Onco Medical Technology Inc., Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** In recent years, nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) have garnered significant attention as a potential cancer treatment method. This study aims to investigate the therapeutic effects of nsPEFs on melanoma and explores their biological effects in inducing pyroptosis in melanoma cells and stimulating the body's immune response. The B16F10 mouse melanoma cell line was chosen as the experimental subject. The cells were treated with nsPEFs (200 ns, 1 Hz) both in vitro and in vivo, and cytological, molecular biological, and immunological techniques were used to assess cell viability, pyroptosis, expression levels of related proteins and molecules, and immune-related molecules. The experimental results showed that nsPEFs stimulation caused bubbling on the cell membrane surface and increased membrane permeability. The expression of cleaved Caspase-1 and cleaved GSDMD proteins increased, indicating that nsPEFs effectively induced pyroptosis in melanoma cells. The expression of damage associated molecular patterns (DAMPs) such as calreticulin (CRT), heat shock protein 70 (HSP70), and high mobility group protein B1 (HMGB1) was also elevated, suggesting that nsPEFs-induced cell death is immunogenic. Following nsPEFs stimulation, tumor volume gradually diminished, and a large number of activated dendritic cells (DCs) and CD8<sup>+</sup> T cells appeared in the tumor tissue. Serum levels of IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  increased, while levels of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 decreased, suggesting that mice might initiate immune

response pathways through the release of these factors, participating in the anti-tumor effect after nsPEFs ablation. Tumor challenge experiments revealed that, under the accompaniment of specific immune responses, tumor growth in the nsPEFs-stimulated group was significantly inhibited. The results indicate that nsPEFs have anti melanoma effects and can short-termly stimulate the body's immune system to enhance treatment efficacy.

**Key words:** nanosecond pulsed electric fields; melanoma; pyroptosis; immunogenic; cytokine; immune response

## 0 引言

全球范围内,黑色素瘤发病率和死亡率逐年上升,据世界卫生组织(WHO)统计,黑色素瘤是导致皮肤癌(约占6.8%~20%)死亡的主要原因之一<sup>[1-2]</sup>。目前黑色素瘤的主要治疗方式包括手术切除、放疗、化疗及免疫治疗等手段<sup>[3]</sup>。然而,黑色素瘤作为一种“冷”的肿瘤,晚期黑色素瘤的治疗难度较大,常受到手术切除不彻底、放化疗抵抗和抗肿瘤免疫效果不佳等因素的影响,导致术后肿瘤复发和转移,使得患者生存率降低<sup>[4-5]</sup>。在晚期黑色素瘤患者中,5年存活率不到10%,中位生存期仅为7.5个月<sup>[6]</sup>。因此,寻找新的治疗方法,以改善患者的治疗效果,提高生存质量,成为当务之急。

脉冲电场(pulsed electric fields, PEFs)肿瘤治疗技术为癌症治疗带来新契机<sup>[7-9]</sup>,其中nsPEFs因其独特的内电处理效应避免了细胞形态不规则引起的电敏感度降低的问题,同时也避免了因细胞膜破裂导致局部组织炎性反应的问题,在多种肿瘤的治疗中展现出良好的治疗效果<sup>[10-13]</sup>。近期,彭文成等<sup>[14]</sup>发现,高恶耐药性黑色素瘤对nsPEFs的作用更敏感,表明nsPEFs在治疗晚期黑色素瘤领域极具潜力。

nsPEFs所施加的脉冲拥有丰富的高频分量,具有高穿透性和针对性<sup>[15-16]</sup>,进而可穿透细胞膜作用到细胞内部诱导细胞死亡<sup>[17]</sup>。国内外研究学者对nsPEFs诱导细胞死亡机制开展了一系列研究,指出nsPEFs主要作用于细胞核<sup>[18]</sup>、线粒体<sup>[19]</sup>、内质网<sup>[20]</sup>、脂质体<sup>[21]</sup>等细胞内部结构,并触发内源性和外源性等多种程序性死亡途径<sup>[22]</sup>。在研究过程中发现,黑色素瘤细胞对nsPEFs的响应很快,主要表现为质膜起泡,呈现出类似细胞焦亡的现象,因此对nsPEFs诱导黑色素瘤细胞焦亡又做出进一步研究。

以往研究表明,nsPEFs技术能够在快速消除局部肿瘤的同时,调节肿瘤微环境,解除免疫抑制,实现肿瘤“冷-热”的有效转化<sup>[23]</sup>。研究者在一系列针对荷瘤小鼠的实验中发现,nsPEFs治疗后抑制了肿瘤的二次生长,表明nsPEFs可能诱发了机体的免疫反应<sup>[24-26]</sup>。证明nsPEFs有望解决黑色素瘤免疫治

疗中低应答率的问题,进而提高免疫疗法的治疗效果,达到有效清除肿瘤并抑制其复发转移的作用。

因此,本文采用B16F10(小鼠皮肤黑色素瘤细胞)构建nsPEFs的消融模型,旨在深入研究nsPEFs刺激后对B16F10细胞的死亡方式以及机体免疫应答的情况。探究nsPEFs在黑色素瘤治疗中潜在的治疗作用,并评估其在激活宿主免疫系统方面的效果。这一研究有望为深入理解nsPEFs在肿瘤治疗中的作用机制提供重要线索,为开发新的肿瘤治疗策略提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

B16F10细胞(获赠于陆军军医大学免疫教研室)用添加10%胎牛血清(FBS)(Gibco)和1%青霉素/链霉素(PS)(Gibco)的DMEM培养基(Gibco)培养。

B16F10-Luc荧光细胞获得:采用脂质体2000转染B16F10细胞,转染后24h,持续三周用含有G418的完全培养基筛选细胞,筛选出稳定表达Luciferase的B16F10细胞,最后扩大培养高表达的克隆株得到B16F10-Luc荧光细胞。

### 1.2 脉冲发生器和实验装置

实验装置如图1所示,实验室自主研发的用于实验的脉冲发生器可实现最大输出电压8kV,最短脉宽为100ns的脉冲。在实验过程中,使用高压探头(PPE-5kV, Teledyne LeCroy)和皮尔森电流探头(6600, Pearson Electronics)测量输出电压和电流,使用带宽为6GHz的示波器(WavePro 760 Zi-A, Teledyne LeCroy)进行监测。体外细胞使用2mm电击杯(BTX)和自制金电极(PCB制作,宽5mm,厚1.6mm,间距2mm)进行刺激(如图1(a)所示);体内肿瘤使用如图1(c)所示的平板电极进行刺激。实验使用200ns,1Hz的nsPEFs,波形示意如图1(b)所示。

### 1.3 显微镜成像

为检查nsPEFs作用下细胞的形态变化,进行了体外实验。针对细胞悬液的处理方法:将图1(a)所示的自制金电极(包含正极和负极)插入培养皿底

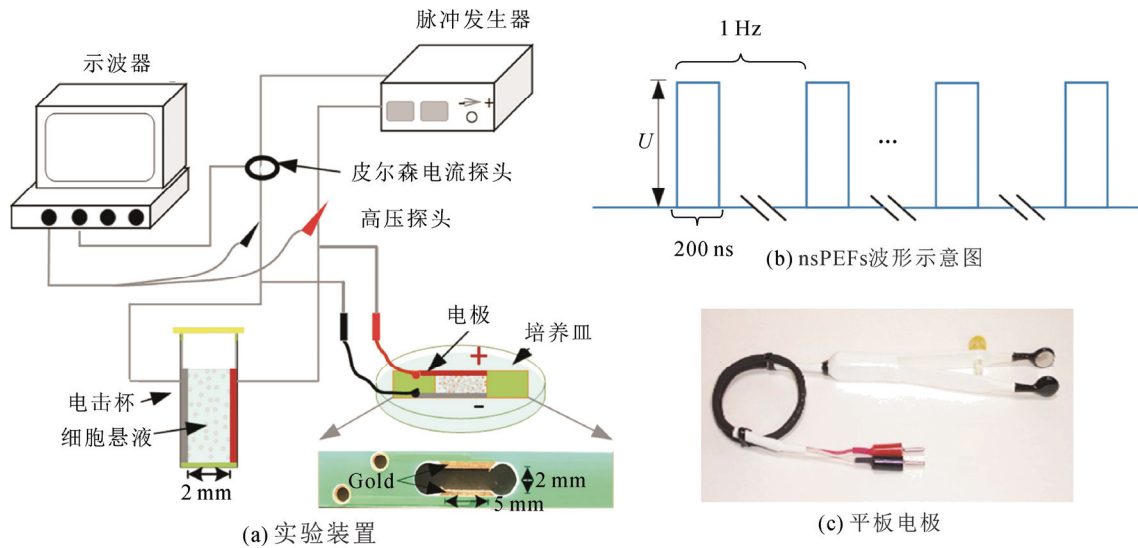


图1 实验平台示意图

Fig.1 Schematic diagram of experiment platform

部, 在正负电极中间加入 100  $\mu\text{L}$  的 B16F10( $1 \times 10^6$  cell/mL)细胞悬液, 一起放在倒置荧光显微镜 (DMi8, Leica) 的平台上用 nsPEFs 处理后采集明场图像, 实验参数如表 1 所示; 针对贴壁细胞的处理方法: 将 2 mL 的 B16F10( $1 \times 10^5$  cell/mL)细胞悬液接种在 35 mm 的培养皿中, 在 24 h 细胞贴壁后, 吸去上清液, 将图 1(a)所示的自制金电极(包含正极和负极)插入培养皿底部。加入 2 mL 含有碘化丙啶染液(PI, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 PBS, 5 min 后, 一起放在倒置荧光显微镜的平台上用 nsPEFs 处理后, 采集明场及 PI 的图像, 间隔 20 s 采集一次, 持续 3 min, 实验参数如表 1 所示。对照组以同样的方法进行成像但不施加刺激。

#### 1.4 蛋白免疫印迹(WB)

为了检测 nsPEFs 作用下细胞的焦亡情况, 用图 1(a)所示的电击杯对 200  $\mu\text{L}$  的悬浮 B16F10 细胞( $1 \times 10^6$  cell/mL)进行 nsPEFs 处理, 实验参数如表 2 所示。处理后的细胞接种在含有 2 mL 完全培养基的 6 孔板中, 培养 24 h 后收集细胞, 在预冷 RIPA 裂解液(Beyotime)中进行裂解, 其中含有蛋白酶抑制剂(Beyotime)和磷酸酶抑制剂(Beyotime)。裂解液与 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液(Beyotime)混合后, 在 95  $^{\circ}\text{C}$  下煮沸 5 min。使用电泳分离蛋白样品, 随后将其转移到 PVDF 膜上(Millipore)。在室温下用含有 5%脱脂奶粉的 TBS 溶液(Beyotime)封闭 1 h 后, 将膜与抗 GSDMD(20770-1-AP, Proteintech)、Cleaved GSDMD(10137S, CST)、Caspase1(22915-

表 1 观察细胞形态时使用的 nsPEFs 参数

参数	场强/( $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	脉宽/ns	脉冲重复频率/Hz	脉冲个数
nsPEFs	15	200	1	180

表 2 诱导焦亡时使用的 nsPEFs 参数

参数	场强/( $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	脉宽/ns	脉冲重复频率/Hz	脉冲个数
nsPEFs	5、10、15	200	1	80

1-AP, Proteintech)、Cleaved Caspase1(89332S, CST)、GAPDH(60004-1-Ig, Proteintech)的抗体孵育。在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜后, 使用过氧化物酶偶联的二抗(RGAR001、RGAM001, Proteintech)室温孵育 1 h, 然后通过凝胶成像系统(Invitrogen iBright, Thermo Fisher Scientific)的化学发光技术(Vazyme)进行检测。

#### 1.5 细胞活性检测

用图 1(a)所示的电击杯对 200  $\mu\text{L}$  的悬浮 B16F10 细胞( $1 \times 10^6$  cell/mL)进行 nsPEFs 处理, 实验参数如表 3 所示。处理后的细胞接种在含有 2 mL 完全培养基的 6 孔板中, 培养 24 h, 收集细胞用 Annexin V-PE/7-AAD 试剂盒染色, 15 min 后, 用 PBS 重悬, 离心, 重复两次后用流式分析仪(C6, BD Biosciences)进行检测。

#### 1.6 DAMPs 释放的检测

用图 1(a)所示的电击杯对 200  $\mu\text{L}$  的悬浮 B16F10 细胞( $1 \times 10^6$  cell/mL)进行 nsPEFs(实验参数如表 3 所示)处理后培养 24 h, 收集细胞, 使用 CRT

表3 处理细胞悬液的 nsPEFs 参数

参数	场强/(kV·cm <sup>-1</sup> )	脉宽/ns	脉冲重复频率/Hz	脉冲个数
nsPEFs	5、8、10、15	200	1	80

(AF1666, Beyotime)和 HSP70(AF0189, Beyotime)流式抗体对 nsPEFs 处理后的细胞进行检测, 处理后的细胞与抗体在 4 °C 避光孵育 30 min 立即用流式细胞仪(FACSCanto TM II, BD Biosciences)进行检测。使用 FlowJo 10.0 软件计算荧光强度的均值。根据酶联免疫吸附测定试剂盒(PH406, Beyotime)测定 HMGB1 的浓度。

### 1.7 荷瘤老鼠模型及消融方案

实验选择 24 只 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠(浙江维通利华实验动物技术有限公司, 合格证编号: 20230905Abzz0619000694)。动物实验获得重庆医科大学实验动物管理和使用委员会批准, 批件编号: IACUC-CQMU-2024-05038。

实验分为 3 组: 空白对照(Ctrl)、肿瘤对照(TC)和 nsPEFs(N)。只对肿瘤对照组和 nsPEFs 处理组进行荷瘤。肿瘤接种前, 用剃毛刀将老鼠背部的毛去掉。在小鼠右背侧皮下注射 100 μL 的 B16F10-Luc 荧光细胞(1×10<sup>7</sup> cell/mL)。在肿瘤生长的整个过程中, 对空白对照组、肿瘤对照组和 nsPEFs 处理组体内肿瘤使用小动物活体成像仪(IVIS Lumina III11, Perkin Elmer)进行成像, 每周两次。此外, 使用游标卡尺测量肿瘤尺寸并计算肿瘤体积  $V$ , 使用如下公式:

$$V = \frac{ab^2}{2} \quad (1)$$

式中:  $a$  为肿瘤长度;  $b$  为肿瘤宽度。当平均肿瘤直径超过 20 mm, 并且如果出现溃烂, 造成感染或坏死时, 应该中止实验且对动物施行安乐死。

肿瘤体积长到约 50 mm<sup>3</sup> 时进行消融实验。使用小动物麻醉机(R500, 瑞沃德)用异氟烷对老鼠进行维持麻醉, 将肿瘤夹在平板电极(图 1(c))中间, 测量电极间距, 根据公式  $E=U/d$  计算所需施加的电压(其中  $E$  为电场、 $U$  为施加电压及  $d$  为正负极之间的距离), 以获得 15 kV/cm 的电场。根据肿瘤体积, 在肿瘤的不同位置上治疗 2—3 次。每次施加 80 个频率为 1 Hz 的 nsPEFs 脉冲。对照组的动物也进行同样操作, 但没有脉冲输出。

### 1.8 肿瘤挑战

为了检测小鼠的抗肿瘤能力和免疫力, 本研究

进行了肿瘤挑战实验。用 nsPEFs 刺激(200 ns, 15 kV/cm; 方法与 1.4 部分相同)B16F10 细胞后, 取 100 μL 肿瘤细胞悬液(1×10<sup>7</sup> cell/mL)接种到小鼠右侧腹部皮下。一周后, 用 100 μL 未处理的 B16F10 肿瘤细胞(1×10<sup>7</sup> cell/mL)接种在动物的左腹部, 并监测肿瘤生长情况。一周后, 小鼠安乐死, 测量肿瘤的大小。

### 1.9 免疫指标检测

血清中 IL-12、IFN-γ、TNF-α、IL-10、TGF-β1 (Beyotime)的表达使用试剂盒进行 ELISA 检测。

使用小鼠外周血淋巴细胞分离液(LST1092, TBD)提取肿瘤组织中的淋巴细胞。取淋巴细胞(5×10<sup>5</sup> cells)用 anti-CD11c、anti-MHC II、anti-CD4、anti-CD8、anti-69、anti-80、anti-86、anti-IFN-γ、anti-TNF-β(eBioscience)抗体染色, 在 4 °C 避光孵育 30 min 后立即用流式细胞仪(FACSCanto TM II, BD Biosciences)进行检测。使用 FlowJo 10.0 软件处理数据。

### 1.10 酶联免疫斑点技术(ELISPOT)

为了验证 nsPEFs 诱导免疫的特异性, 通过 ELISPOT 法检测小鼠淋巴细胞分泌 IFN-γ 因子的情况。实验设置了阴性对照、阳性对照以及空白对照组、肿瘤对照组、肿瘤免疫组, 以培养基、小鼠膀胱、肿瘤细胞作为外加刺激源, 与小鼠淋巴细胞培养后通过 ELISPOT 法检测孔底部的斑点。

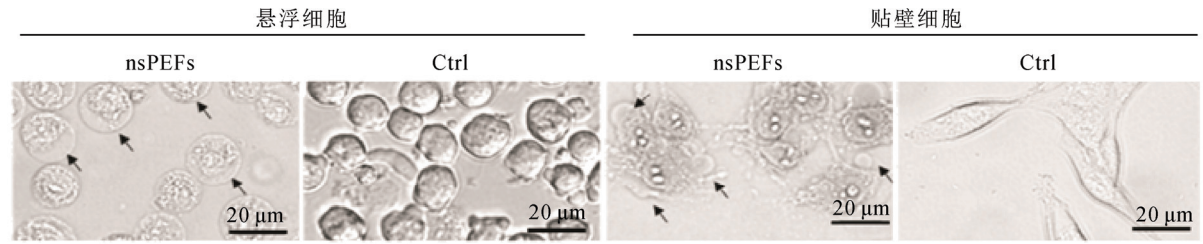
### 1.11 统计分析

所有实验重复 3 次。使用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行处理。所有数据均以均值±标准差(SD)表示。为了确保 t 检验的适用性, 在进行 t 检验之前先进行了 F 检验, 以检验方差的齐性。只有在 F 检验结果表明方差齐性成立时, 才进行 t 检验。 $p<0.05$  具有统计学意义。

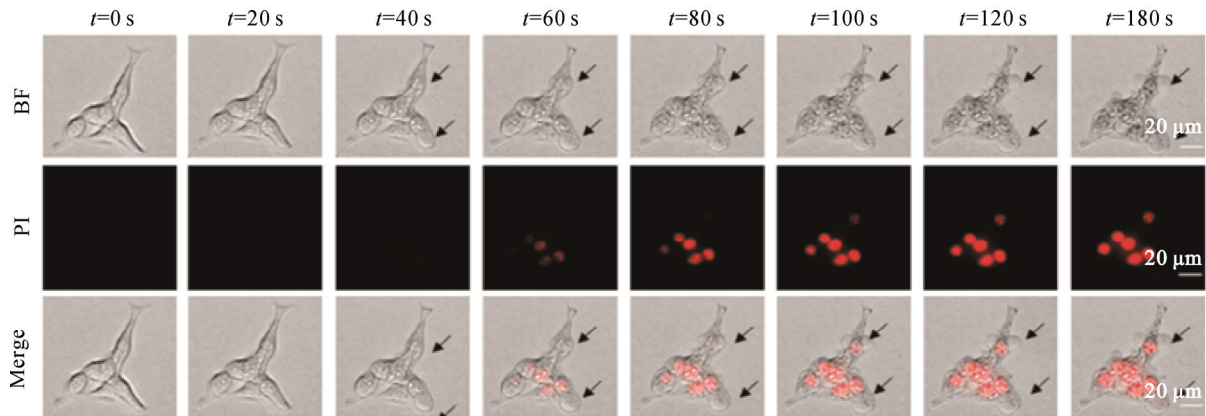
## 2 结果

### 2.1 nsPEFs 诱导细胞焦亡

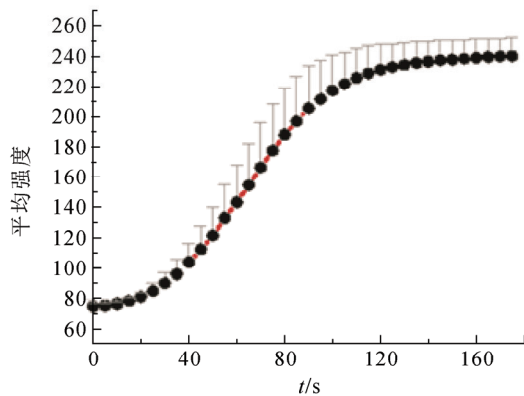
为了深入了解细胞在 nsPEFs 作用下的死亡情况, 观察了 nsPEFs 处理过程中和处理后细胞形态的变化。图 2(a)显示了经 nsPEFs(200 ns、15 kV/cm、1 Hz、80 Pulses)处理后的悬浮或附着的细胞显微镜图像。与对照组相比, 这些经处理后的细胞(悬浮或附着状态)明显肿胀, 质膜上出现特征性的大气泡。细胞核受损, 呈现异常状态。图 2(b)展示了脉冲处理后的不同时间节点的同一视野下的显微镜图像,



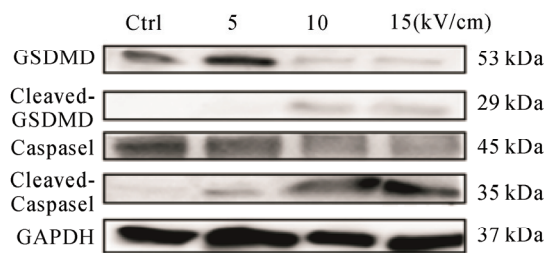
(a) 细胞形态变化



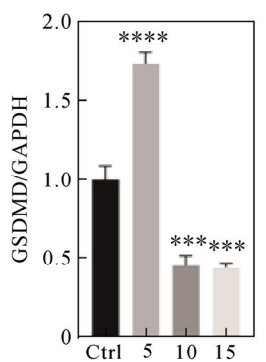
(b) 膜通透性实时监测



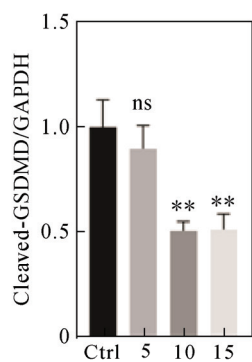
(c) PI平均荧光强度



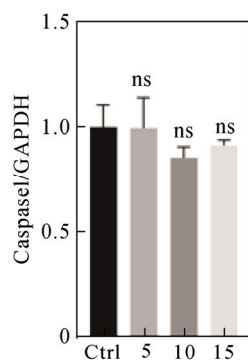
(d) 不同组别的蛋白条带



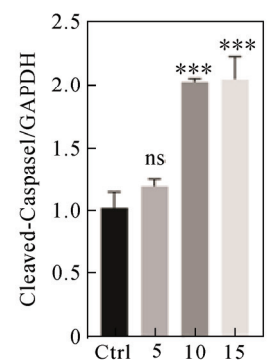
(e) GSDMD/GAPDH 蛋白的定量分析



(f) Cleaved-GSDMD/GAPDH 蛋白的定量分析



(g) Caspase1/GAPDH 蛋白的定量分析



(h) Cleaved-Caspase1/GAPDH 蛋白的定量分析

图2 nsPEFs 诱导细胞焦亡

Fig.2 nsPEFs induced pyroptosis

其中分别记录了明场(BF), PI 染色(PI)和合并(Merge)

图像。图 2(b)明场图像显示了气泡形成的动态过程,

在脉冲的作用下，膜发生了变化，气泡逐渐形成，并在 40 个脉冲后随着时间的推移逐渐扩大。如图 2(b)中 PI 图像及图 2(c)统计数据所示，脉冲 60 次左右可见 PI 探针渗透进入细胞内，脉冲过程中 PI 的荧光强度迅速增加，脉冲后随着时间的推移荧光强度略有增加。这说明在细胞膜上迅速形成了孔隙，孔隙的形成破坏了细胞内、外渗透压平衡，从而引起了细胞的膨胀和气泡的产生。

质膜起泡是细胞焦亡的特征，为了证明推测，使用 WB 检测 GSDMD、Cleaved-GSDMD 和 Caspase-1、Cleaved-Caspase-1 的表达，如图 2(d)所示。经过定量分析后发现(图 2(e)—(h))：GSDMD

的表达随场强增加而降低，Caspase-1 的表达随场强增加而没有变化。但是，Cleaved-Caspase-1 和 Cleaved-GSDMD 蛋白表达量随着电场的增加而增加，在 10 kV/cm 和 15 kV/cm 时尤其明显。表明 GSDMD 被活化的 Caspase-1 蛋白水解切割，从而介导细胞焦亡。

**2.2 nsPEFs 有效杀伤肿瘤并具有免疫原性**

虽然证明 GSDMD 依赖性细胞焦亡的存在，但对 nsPEFs 有效杀伤肿瘤的总比例更感兴趣。因此，在 nsPEFs 处理后，分析了 B16F10 存活细胞百分比。流式结果(图 3(a))和分析结果(图 3(b))表明，随着 nsPEFs 场强的增加，当电场高于 8 kV/cm 时，

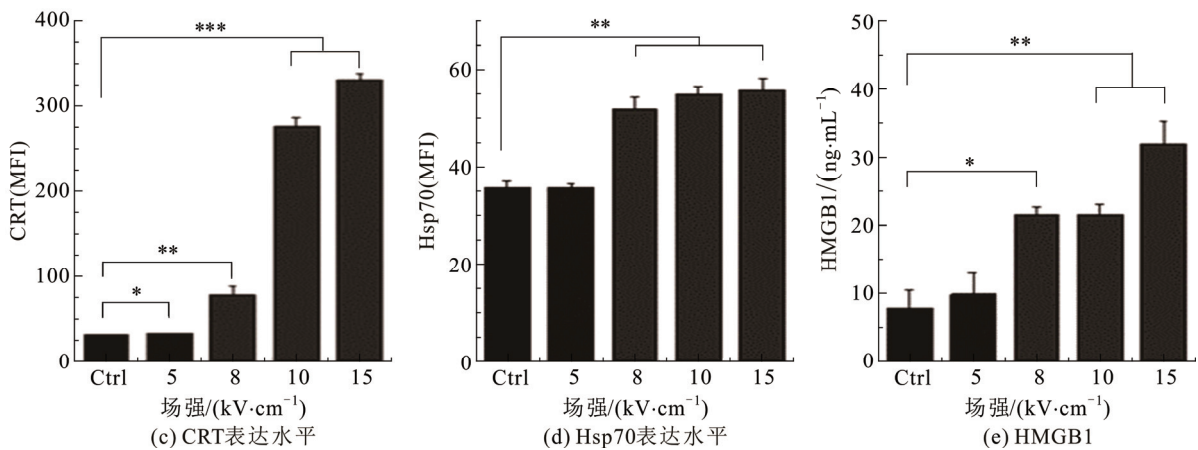
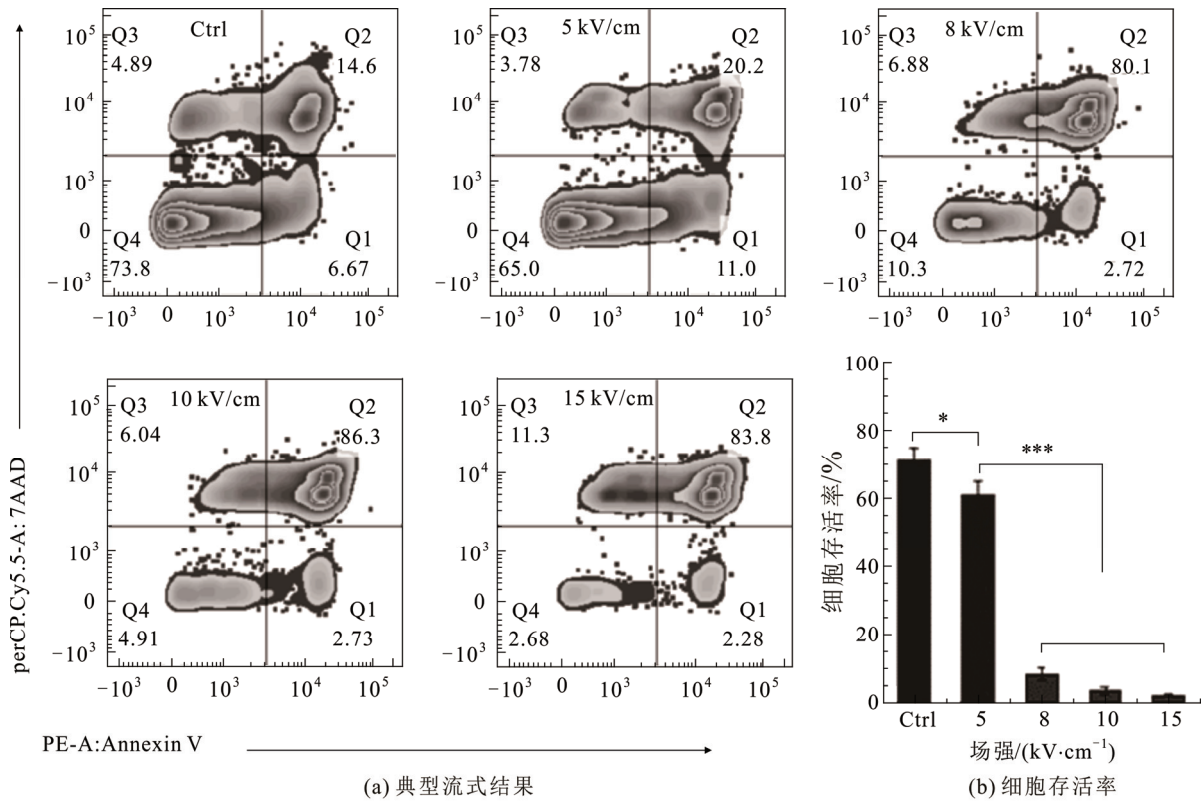


图3 nsPEFs 细胞杀伤率及 DAMPs 水平  
Fig.3 Cell killing rate of nsPEFs and DAMPs level

细胞死亡比例达到 90%，细胞生存比例迅速降低。

DAMPs 是免疫原性细胞死亡(ICD)的重要标志,是激活自体免疫攻击肿瘤细胞的重要途径<sup>[27-28]</sup>。如图 3(c)所示,表达 CRT 的细胞的平均荧光强度(MFI)随着电场的增加而增加。对照组 CRT 的 MFI 为  $8.45 \pm 0.23$ ,而在电场为 5、8、10、15 kV/cm 的脉冲下则分别升至  $12.9 \pm 0.53$ 、 $37.2 \pm 2.35$ 、 $79.2 \pm 1.78$ 、 $87.3 \pm 2.04$ 。当电场为 15 kV/cm 时, CRT 的 MFI 达到最大值。同样,流式细胞术也检测了细胞膜上表达的热休克蛋白 70(HSP70),如图 3(d)所示,对照组和 5 kV/cm 组没有显著差异, HSP70 的 MFI 分别为  $35.7 \pm 1.28$  和  $35.7 \pm 0.71$ 。但当输入电压为

8 kV/cm 时, HSP70 的 MFI 增加到  $51.85 \pm 2.58$ 。然后,随着电场的增加, HSP70 的 MFI 略有上升,在 15 kV/cm 时达到最大值  $55.76 \pm 2.37$ 。HMGB1 是 ICD 的另一个标志性蛋白,如图 3(e)所示,随着电场的增加, nsPEFs 处理后 HMGB1 水平持续上升。处理后的 HMGB1 浓度达到或超过 20 ng/mL,最大值达到  $31.96 \pm 3.3$  ng/mL。DAMPs 的表达上调,表明 nsPEFs 诱导的细胞死亡具有免疫原性。

### 2.3 nsPEFs 有效消融在体肿瘤

图 4 显示了 nsPEFs 治疗前后的肿瘤生长情况。如图 4(a)所示,对于 nsPEFs 治疗组,治疗后肿瘤体积开始缩小,治疗后 3 天和 6 天捕获的肿瘤发光消

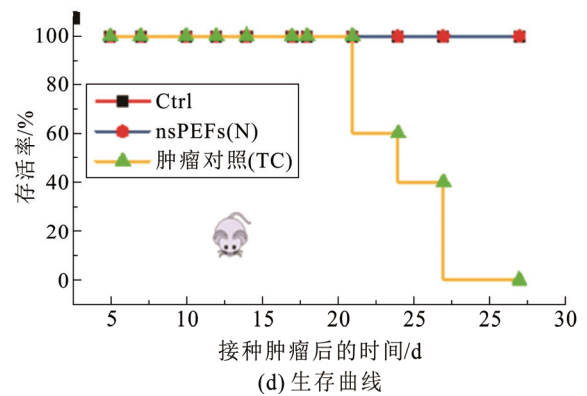
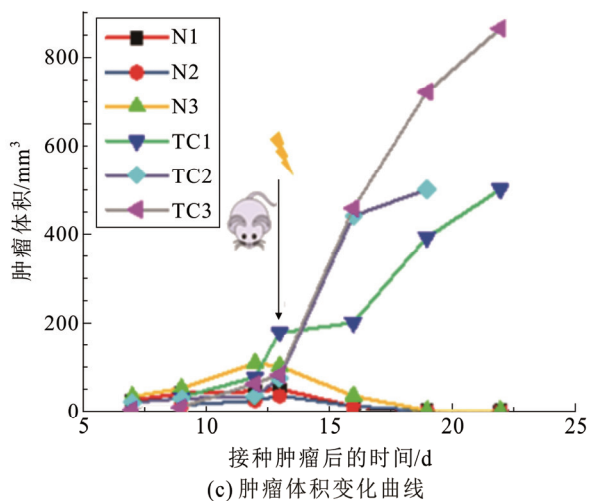
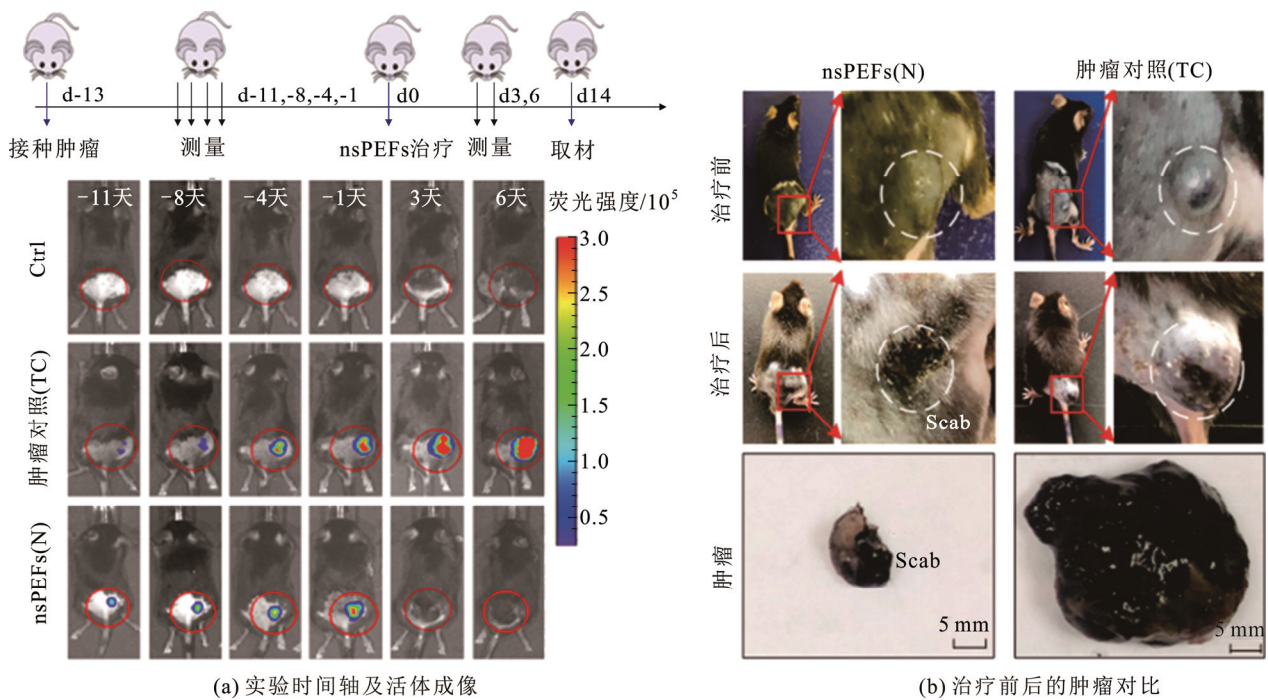


图 4 nsPEFs 消融效果(空白对照: Ctrl, 肿瘤对照: TC, nsPEFs: N.  $n=3$ )  
 Fig.4 Ablation effect of nsPEFs (Blank: Control, Tumor control: TC, nsPEFs: N.  $n=3$ )

失,表明肿瘤已被消除。然而,未治疗组肿瘤体积持续增加。消融区域在治疗后3天开始结痂(图4(b)),肿瘤体积逐渐变为零(图4(c))。在小鼠存活率方面,未治疗肿瘤对照组的小鼠存活率明显下降,随着肿瘤的发展逐渐死亡,其余小鼠在肿瘤体积达到伦理界限时安乐死。然而,在接受nsPEFs治疗2周后,荷B16F10黑色素瘤的老鼠仍表现出良好的存活率如图4(d)生存曲线所示。

## 2.4 nsPEFs 激发机体免疫反应

DCs是机体内部功能最全面的专职性抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),它的成熟可活化T细胞,引起机体的免疫响应<sup>[29]</sup>。由图5(a)可见,在肿瘤组织中,相较于肿瘤对照组,nsPEFs治疗组的CD11c<sup>+</sup>DCs显著升高,同时,CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>以及CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>等指标表达升高( $P < 0.05$ ),表明nsPEFs作用后促进了小鼠肿瘤DCs的活化。

图5(b)所示为肿瘤组织中CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T细胞的表达情况,nsPEFs刺激组的CD8<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T细胞表达相较于肿瘤对照组有所升高,而CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T细胞无明显变化,说明机体存在毒性T细胞反应且在肿瘤局部免疫反应表现更加明显。

上述结果表明,nsPEFs作用下细胞发生了免疫原性死亡,进而可使得DCs活化,促进抗原呈递并激发机体免疫响应。此过程中,常伴有免疫因子的改变。图5(c)所示为 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )以及肿瘤坏死因子 $\beta$ (TNF- $\beta$ )的检测结果。在肿瘤组织中,CD4<sup>+</sup>TNF- $\beta$ <sup>+</sup>T细胞的表达也有所升高;CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞以及CD8<sup>+</sup>TNF- $\beta$ <sup>+</sup>T细胞的表达在肿瘤组织中也显著升高,表明nsPEFs消融后,激发了机体的免疫响应。

血液中相关因子的变化会在外加刺激激发机体免疫效应的整个响应过程中体现。图5(d)为血清中的IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10、TGF- $\beta$ 1的表达情况。可见相较于空白对照组和肿瘤对照组,nsPEFs处理组的IL-12、TNF- $\alpha$ 以及IFN- $\gamma$ 表达有所上调,而IL-10和TGF- $\beta$ 1表达下调,提示nsPEFs处理激发了小鼠的免疫响应并释放相关因子参与到抗肿瘤效应中,同时抑制肿瘤的生长和转移。

## 2.5 nsPEFs 激发机体免疫具有远隔效应

肿瘤挑战实验结果显示,相对于对照组,经过nsPEFs处理的小鼠的肿瘤发病率显著降低,nsPEFs

处理组成瘤率为60%,小于对照组。并且肿瘤增长速度减慢,在nsPEFs处理组中,肿瘤体积在一周的时间内显著低于对照组,如图6(a)—(b)所示。这些结果明确地表明了nsPEFs的应用激活了机体的免疫响应,从而抑制了肿瘤的二次生长。此外,在nsPEFs处理组中,当以肿瘤细胞作为刺激源时,IFN- $\gamma$ 因子的分泌量显著增加,远高于同组以膀胱作为抗原刺激源及相应的对照组,如图6(d)—(e)所示。这一发现暗示了nsPEFs处理组的淋巴细胞对肿瘤细胞的刺激能力更强,促进了机体对肿瘤的免疫应答。

## 3 讨论

nsPEFs通过极短时间内(纳秒级)施加高强度电场,穿透细胞膜并作用于细胞内部结构。nsPEFs能够迅速影响细胞质和细胞器,改变细胞的电生理特性,诱导多种细胞应激反应。这种高强度电场能够直接作用于细胞内的分子,导致细胞膜通透性增加、钙离子内流、以及活性氧(ROS)生成<sup>[11,13,18]</sup>,从而触发细胞的程序性死亡路径,包括焦亡。焦亡是一种炎症性细胞死亡形式,伴随着细胞膜的破裂和炎症因子的释放,这种死亡形式对肿瘤治疗具有重要意义<sup>[22]</sup>。

不受控制的黑色素生成会产生具有遗传毒性和致突变中间体的氧化环境,从而引发黑色素瘤的进展<sup>[30-31]</sup>。nsPEFs对抑制黑色素的合成具有极大的帮助,因为其可有效杀伤黑色素肿瘤,体外肿瘤杀伤率达到90%以上(图3(a)—(c)),体内肿瘤nsPEFs消融后3~6天后未见明显残留(图4(a)—(c)),表现出对黑色素瘤极强的抑制性。并且,nsPEFs波形具有丰富的高频含量和透膜效应,可以将能量释放至细胞内部<sup>[12]</sup>,诱导一系列功能性的改变,启动细胞死亡通路,从而导致细胞程序性死亡的现象<sup>[32]</sup>,例如2.1节所述的细胞焦亡。与传统的不可逆电穿孔<sup>[9]</sup>诱导的细胞死亡类型不同,程序性死亡的细胞在细胞膜破裂前就会被吞噬细胞所吞噬,可避免细胞内物质的大量释放导致的不良反应,相较于细胞坏死,具有明显的医学优势。

如上所述,黑色素瘤进展过程中表现出极强的免疫抑制性。为探究不可逆电穿孔刺激黑色素瘤诱导的免疫应答情况,Shao等<sup>[33]</sup>发现传统IRE相较于冷冻及热消融,更容易促进CD8<sup>+</sup>T细胞的活化与增值;Lv等<sup>[34]</sup>研究表明H-FIRE与博来霉素联合可

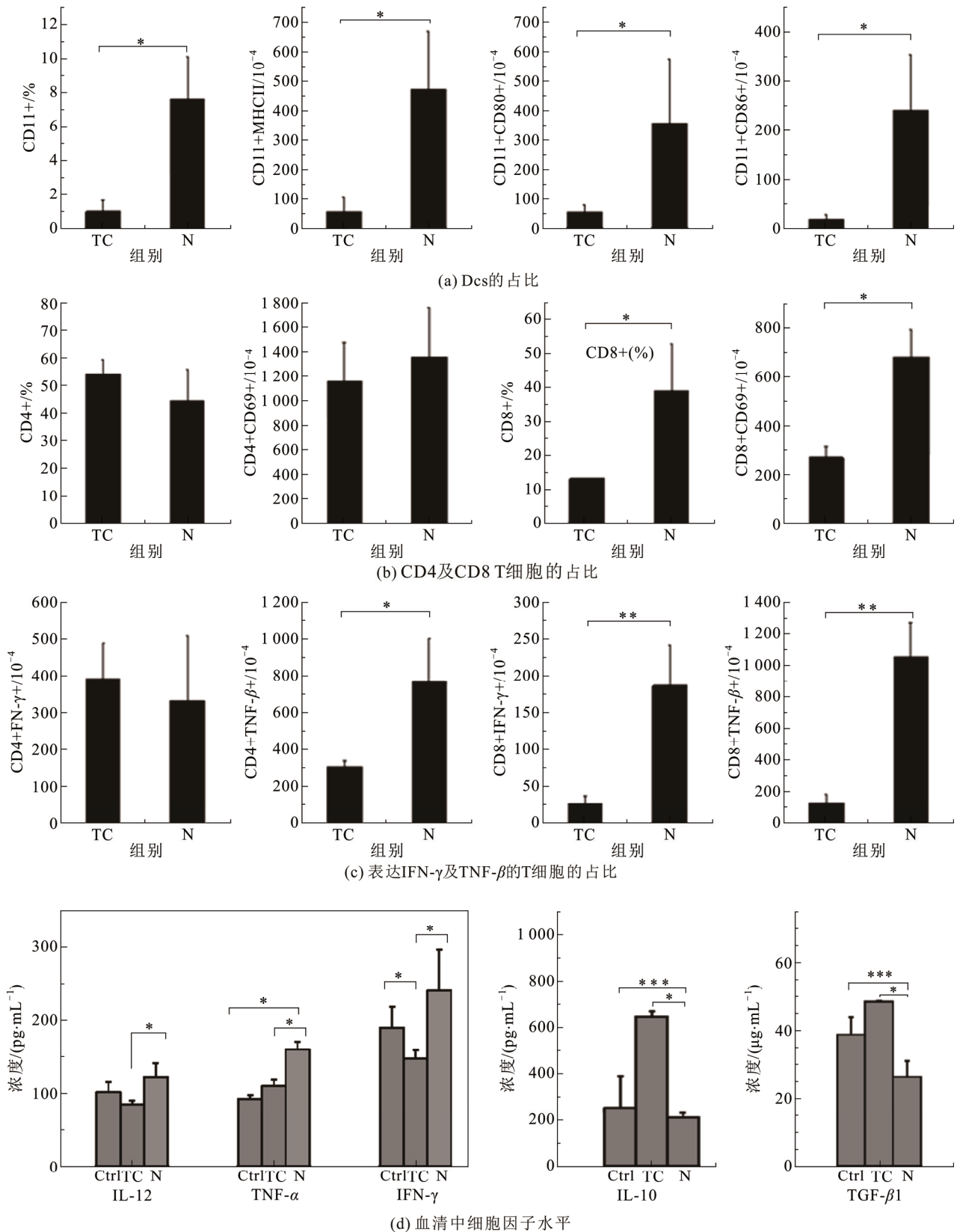
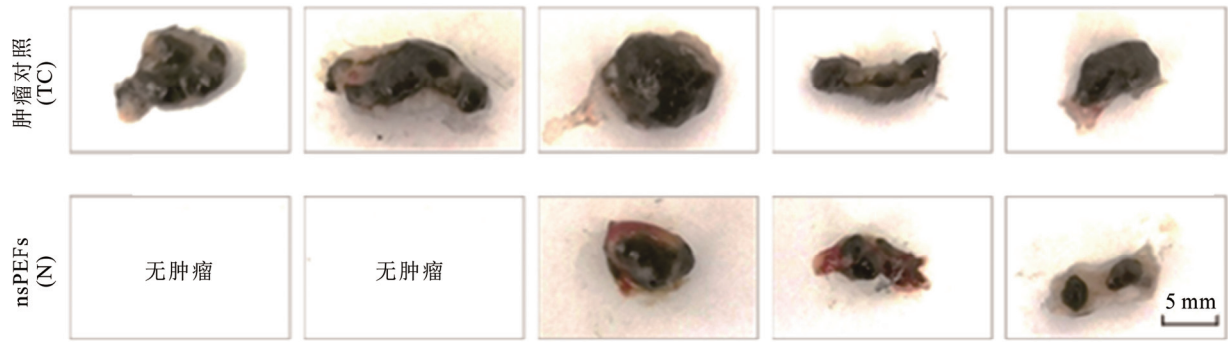


图5 免疫细胞及细胞因子检测(空白对照: Ctrl, 肿瘤对照: TC, nsPEFs: N)

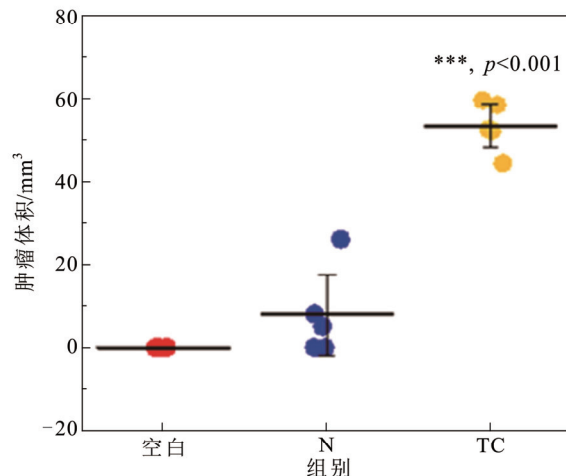
Fig.5 Detection of immune cells and cytokines(Blank: Control, Tumor control: TC, nsPEFs: N)

以促 B16 细胞死亡, 并表现出 ICD 现象, 触发适应性免疫反应, 激活丰富的 CD8<sup>+</sup> T 细胞来抑制肿瘤

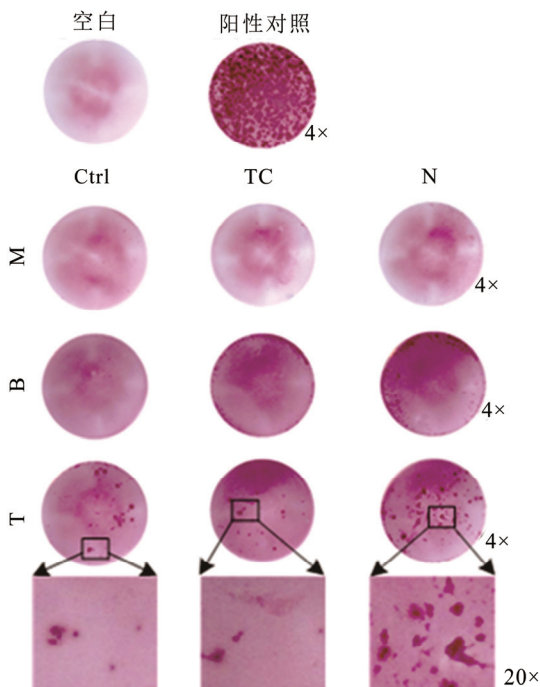
生长。不仅如此, 不可逆电穿孔作用在肝癌<sup>[35-38]</sup>、肺癌<sup>[39]</sup>、乳腺癌<sup>[40]</sup>、胰腺癌<sup>[41-43]</sup>、前列腺癌<sup>[44]</sup>等癌



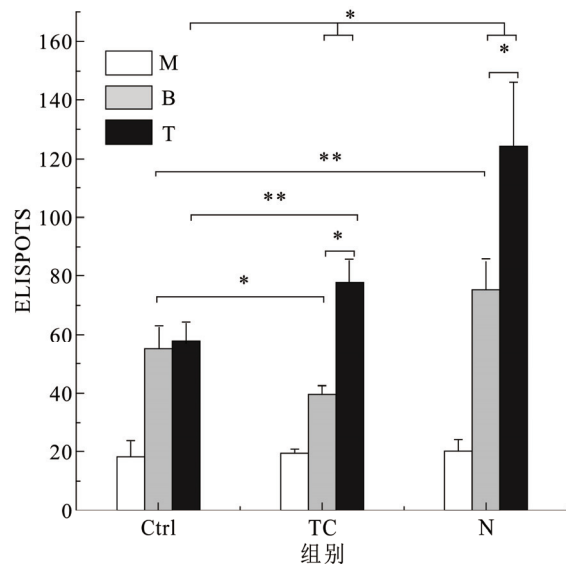
(a) 小鼠肿瘤生长情况



(b) 肿瘤体积



(c) IFN- $\gamma$ 斑点(刺激源为M: 培养基, B: 膀胱, T: 肿瘤)



(d) IFN- $\gamma$ 分泌的量化结果

图6 肿瘤挑战(空白对照: Ctrl, 肿瘤对照: TC, nsPEFs: N. n=5)

Fig.6 Tumor challenge(Blank: Control, Tumor control: TC, nsPEFs: N. n=5)

症时, 也表现出适应性免疫的现象, 主要以 DCs、CD8<sup>+</sup> T 细胞、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>细胞增多为主要表征。

本文研究发现 nsPEFs 刺激作用下可诱导黑色素瘤中 DAMPs 等特征分子表达(图 3(d)—(f)), 进而可使得 DCs 活化, 激起小鼠的免疫反应(图 5(a)—(b))。进一步的分析显示, nsPEFs 处理组中肿瘤细胞诱导的免疫反应得到了显著增强, 主要体现在 IFN- $\gamma$  因子分泌水平的显著提高上(图 5(c)及图 6(d)—(e))。这种免疫反应的增强可能部分解释了 nsPEFs 治疗对黑色素瘤的抑制作用。IFN- $\gamma$  的高表达提示了免疫细胞对肿瘤细胞的更强识别和攻击能力, 从而促进了机体的抗肿瘤免疫反应<sup>[45]</sup>。

尽管本研究取得了一定的进展, 但仍存在一些限制。首先, 本研究中的治疗期为两周, 这一时间段主要用于初步评估治疗效果。由于时间较短, 实验结果主要反映了短期免疫反应, 未能充分考察免疫能力的长期建立和稳定。因此, 未来的研究应考虑延长考核时间, 以全面评估免疫反应的时效性。其次, 实验数据仅基于小鼠模型, 其在人类中的适用性尚待进一步研究。最后, 本研究未对 nsPEFs 的治疗机制进行深入探讨, 需要进一步的分子和细胞水平研究来阐明其作用机制。综上所述, 本研究初步证明了 nsPEFs 对黑色素瘤具有潜在的治疗效果, 并且可能通过激发机体免疫响应来增强其杀伤肿瘤的作用。这为 nsPEFs 作为黑色素瘤治疗的新策略提供了一定的理论和实验基础, 但还需要更深入的研究来进一步确认其临床应用的可行性和有效性。

## 4 结论

本文基于 B16F10 黑色素瘤细胞, 进行体外及体内 nsPEFs 刺激实验, 研究了 nsPEFs 诱导 B16F10 细胞焦亡, 并短期激发机体的免疫反应, 得出以下结论:

1) nsPEFs 作用伴随 Caspase-1 切割 GSDMD 发生, 表明细胞焦亡途径被激活。

2) nsPEFs 诱导的细胞死亡具有 DAMPs 介导的免疫原性, 促进 DCs 的分化和成熟, 进而激发机体的抗肿瘤免疫响应。

3) nsPEFs 可有效消融在体肿瘤, 同时引起了 DCs 和 T 细胞的活化和成熟, 激发了局部 T 细胞介导的免疫响应。

4) nsPEFs 诱导了机体特异性免疫反应, 可显著抑制肿瘤的二次生长。

## 参考文献 References

- [1] DAVEY M G, MILLER N, MCINERNEY N M. A review of epidemiology and cancer biology of malignant melanoma[J]. *Cureus*, 2021, 13(5): e15087.
- [2] ARNOLD M, SINGH D, LAVERSANNE M, et al. Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040[J]. *JAMA Dermatology*, 2022, 158(5): 495-503.
- [3] 邱 锦, 黄景祥, 许宋锋, 等. 皮肤恶性黑色素瘤的治疗进展[J]. *甘肃医药*, 2023, 42(11): 969-971, 983.  
QIU Jin, HUANG Jingxiang, XU Songfeng, et al. Advances in the treatment of cutaneous malignant melanoma[J]. *Gansu Medical Journal*, 2023, 42(11): 969-971, 983.
- [4] 张鹏晓, 胡 念. 黑色素瘤免疫治疗作用机制研究进展[J]. *生物技术进展*, 2023, 13(6): 900-906.  
ZHANG Pengxiao, HU Nian. The research progress on action mechanism of melanoma immunotherapy[J]. *Current Biotechnology*, 2023, 13(6): 900-906.
- [5] 王稼祥, 斯 璐. 2023 年度黑色素瘤药物治疗研究进展[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2024, 10(2): 54-58.  
WANG Jiexiang, SI Lu. Research progress in drug treatment for melanoma in 2023[J]. *Journal of Multidisciplinary Cancer Management (Electronic Version)*, 2024, 10(2): 54-58.
- [6] DIMITRIOU F, MATTER A V, MANGANA J, et al. Cytokine release syndrome during sequential treatment with immune checkpoint inhibitors and kinase inhibitors for metastatic melanoma[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2019, 42(1): 29-32.
- [7] AYCOCK K N, DAVALOS R V. Irreversible electroporation: background, theory, and review of recent developments in clinical oncology[J]. *Bioelectricity*, 2019, 1(4): 214-234.
- [8] BENZ R, ZIMMERMANN U. The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1981, 640(1): 169-178.
- [9] GEBOERS B, SCHEFFER H J, GRAYBILL P M, et al. High-voltage electrical pulses in oncology: irreversible electroporation, electrochemotherapy, gene electrotransfer, electrofusion, and electroimmunotherapy[J]. *Radiology*, 2020, 295(2): 254-272.
- [10] SCHOENBACH K H, BEEBE S J, BUESCHER E S. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses[J]. *Bioelectromagnetics*, 2001, 22(6): 440-448.
- [11] CHEN N Y, SCHOENBACH K H, KOLB J F, et al. Leukemic cell intracellular responses to nanosecond electric fields[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 317(2): 421-427.
- [12] KASPRZYCKA W, TRĘBIŃSKA-STRYJEWSKA A, LEWANDOWSKI R B, et al. Nanosecond pulsed electric field only transiently affects the cellular and molecular processes of leydig cells[J]. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 11236.
- [13] BEEBE S J, BLACKMORE P F, WHITE J, et al. Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms[J]. *Physiological Measurement*, 2004, 25(4): 1077-1093.
- [14] 彭文成, 唐 满, 刘红梅, 等. 高压纳秒脉冲电场对同源细胞的杀伤差异性研究[J]. *电工技术学报*, 2024, 39(20): 6544-6552.  
PENG Wencheng, TANG Xiao, LIU Hongmei, et al. Study on the killing difference of homologous cells by high-voltage nanosecond pulsed electric fields[J]. *Transactions of China Electrotechnical Society*, 2024, 39(20): 6544-6552.
- [15] STACEY M, STICKLEY J, FOX P, et al. Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2003, 542(1/2): 65-75.
- [16] YANG Q, KAJIMOTO S, KOBAYASHI Y, et al. Regulation of cell volume by nanosecond pulsed electric fields[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2021, 125(38): 10692-10700.

- [17] BEEBE S J, FOX P M, REC L J, et al. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition[J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2002, 30(1): 286-292.
- [18] CHEN N Y, GARNER A L, CHEN G, et al. Nanosecond electric pulses penetrate the nucleus and enhance speckle formation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 364(2): 220-225.
- [19] NAPOTNIK T B, WU Y H, GUNDERSEN M A, et al. Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells[J]. *Bioelectromagnetics*, 2012, 33(3): 257-264.
- [20] FURUMOTO Y, SATO D, TERANISHI K, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response by applying of nanosecond pulsed electric fields for medical application[C]//2018 IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC). Jackson, USA: IEEE, 2018: 456-460.
- [21] RETELJ L, PUCHAR G, MIKLAVČIČ D. Electroporation of intracellular liposomes using nanosecond electric pulses—a theoretical study[J]. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering*, 2013, 60(9): 2624-2635.
- [22] NAPOTNIK T B, POLAJŽER T, MIKLAVČIČ D. Cell death due to electroporation – A review[J]. *Bioelectrochemistry*, 2021, 141: 107871.
- [23] BEEBE S J, FORD W E, REN W, et al. Pulse power ablation of melanoma with nanosecond pulsed electric fields[M]. MORTON R. *Treatment of Metastatic Melanoma*. London, UK: IntechOpen, 2011.
- [24] NUCCITELLI R, BERRIDGE J C, MALLON Z, et al. Nanoelectroablation of murine tumors triggers a CD8-dependent inhibition of secondary tumor growth[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134364.
- [25] ZHANG X, ZHANG Y, CHEN J, et al. Nanosecond pulsed electric field inhibits malignant melanoma growth by inducing the change of systemic immunity[J]. *Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 2019, 24(4): e555-e561.
- [26] LIU J P, CHEN X H, ZHENG S S. Immune response triggered by the ablation of hepatocellular carcinoma with nanosecond pulsed electric field[J]. *Frontiers of Medicine*, 2021, 15(2): 170-177.
- [27] PARK S J, YE W D, XIAO R, et al. Cisplatin and oxaliplatin induce similar immunogenic changes in preclinical models of head and neck cancer[J]. *Oral Oncology*, 2019, 95: 127-135.
- [28] FUCIKOVA J, KEPP O, KASIKOVA L, et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(11): 1013.
- [29] ABERNATHY E. How the immune system works[J]. *The American journal of nursing*, 1987, 87(4), 456-459.
- [30] 张锦标, 高振东, 黄涛, 等. TRP 家族调控黑色素的研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2024, 45(7): 87-92.
- ZHANG Jinbiao, GAO Zhendong, HUANG Daitao, et al. Research progress on TRP family regulating melanin[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2024, 45(7): 87-92.
- [31] SCHADENDORF D, FISHER D E, GARBE C, et al. Melanoma[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2015, 1(1): 15003.
- [32] OBENG E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review[J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2021, 81(4): 1133-1143.
- [33] SHAO Q, O'FLANAGAN S, LAM T, et al. Engineering T cell response to cancer antigens by choice of focal therapeutic conditions[J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2019, 36(1): 130-138.
- [34] LV Y P, CHEN S, WU S X, et al. Study on B16 cell cytotoxicity by high frequency reversible electroporation with bleomycin that induces hallmarks of immunogenic death[J]. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering*, 2023, 70(4): 1359-1367.
- [35] LASSITER B P, GUO S Q, BEEBE S J. Nano-pulse stimulation ablates orthotopic rat hepatocellular carcinoma and induces innate and adaptive memory immune mechanisms that prevent recurrence[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(3): 69.
- [36] CHEN R, SAIN N M, HARLOW K T, et al. A protective effect after clearance of orthotopic rat hepatocellular carcinoma by nanosecond pulsed electric fields[J]. *European Journal of Cancer*, 2014, 50(15): 2705-2713.
- [37] DAI Z H, WANG Z R, LEI K, et al. Irreversible electroporation induces CD8<sup>+</sup> T cell immune response against post-ablation hepatocellular carcinoma growth[J]. *Cancer Letters*, 2021, 503: 1-10.
- [38] 岳亚琪, 董守龙, 马欣, 等. 协同脉冲增强不可逆电穿孔消融疗效的多参数效应分析及活体大动物实验研究[J]. *高电压技术*, 2023, 49(12): 5246-5259.
- YUE Yaqi, DONG Shoulong, MA Xin, et al. Multi-parameter effect analysis and large living animal experimental study of synergistic pulse-enhanced irreversible electroporation ablation[J]. *High Voltage Engineering*, 2023, 49(12): 5246-5259.
- [39] GAO Y, YANG J J, CAI Y X, et al. IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling[J]. *International Journal of Cancer*, 2018, 143(4): 931-943.
- [40] GUO S Q, JING Y, BURCUS N I, et al. Nano-pulse stimulation induces potent immune responses, eradicating local breast cancer while reducing distant metastases[J]. *International Journal of Cancer*, 2018, 142(3): 629-640.
- [41] HE C B, HUANG X, ZHANG Y, et al. T-cell activation and immune memory enhancement induced by irreversible electroporation in pancreatic cancer[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2020, 10(2): e39.
- [42] HE C B, SUN S X, ZHANG Y, et al. The role of irreversible electroporation in promoting M1 macrophage polarization via regulating the HMGB1-RAGE-MAPK axis in pancreatic cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2021, 10(1): 1897295.
- [43] ZHAO J, WEN X F, TIAN L, et al. Irreversible electroporation reverses resistance to immune checkpoint blockade in pancreatic cancer[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 899.
- [44] BURBACH B J, O'FLANAGAN S D, SHAO Q, et al. Irreversible electroporation augments checkpoint immunotherapy in prostate cancer and promotes tumor antigen-specific tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3862.
- [45] IVASHKIV L B. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2018, 18(9): 545-558.



WANG Yancheng  
Ph.D. candidate



DONG Shoulong  
Ph.D.  
Assistant professor  
Corresponding author

#### 王艳城

1992—, 男, 博士生

主要研究方向为脉冲功率技术生物医学应用

E-mail: wangyancheng@cqu.edu.cn

#### 董守龙(通信作者)

1989—, 男, 博士, 副教授, 博导

主要研究方向为脉冲功率技术、电力电子开关及脉冲电源技术、脉冲功率技术生物医学应用等

E-mail: dsl@cqu.edu.cn