

## 低温等离子体作用于恶性肿瘤细胞的研究进展

王伶俐 夏传开 杨春俊

[关键词] 低温等离子体; 肿瘤; 机制

doi: 10.3969/j.issn.1000-0399.2017.10.043

低温等离子体(cold atmospheric plasma, CAP)因良好的灭菌能力被广泛应用于医学领域,且在创面愈合方面也有不俗的表现。近年来, CAP在杀灭肿瘤细胞方面的研究已成为热点,正试图被用于肿瘤的临床治疗中,本文就近年来国内外相关CAP对肿瘤细胞的作用及机制研究进行阐述。

### 1 CAP

等离子体是广泛存在于宇宙中的一类物质,被称为除气体、液体和固体之外的第4类物质。物质形态之间的转换其实是一个吸收能量和释放能量的过程,当电子获得足够的能量足以克服静电势垒后,则电离为一个自由电子、一个带正电的离子和一个中性粒子,该过程称作离子化<sup>[1-2]</sup>。而等离子体则是电子被电离后产生的由带正电和带负电粒子组成的呈中性的离子化气体<sup>[2-3]</sup>。

1.1 CAP的概述 等离子体产生过程中不仅会出现大量的活性物质,还会产生大量热能,温度高达几千摄氏度,而这些热量是由高能电子的碰撞产生的<sup>[1-2]</sup>。众所周知,过高的温度不适用于生物体组织,所以等离子体高热的性质限制了其在医学上的应用。近年来,随着科技的发展, CAP的产生给生物医学领域的应用带来了新希望。目前, CAP使用温度可维持在40~44℃之间,这样的温度是通过限制每个周期高能电子的数量或者通过气流等措施降低等离子体中不带电分子或原子的温度而产生的<sup>[1-4]</sup>。

1.2 产生CAP的装置 CAP的产生装置分3种:直接型、间接型和混合型<sup>[1-3]</sup>。所谓直接放电装置,就是靶组织或细胞本身就是电极的一部分,而间接放电装置中活性等离子体则在两电极之间产生,混合型装置就是将直接模式和间接模式相结合<sup>[1-4]</sup>。

1.2.1 直接型装置 直接模式常用装置是浮动式介质阻挡放电,其不仅能产生高活性、高浓度的等离子体,且对等离子体内容物的控制也易于其他模式装置。但由于靶组织及细胞是电极的一部分,只有当靶组织及细胞与装置处于足够接近的位置才能产生效应<sup>[1,2,6]</sup>。虽然以往很多研究是基于这种模式装置,但该装置使用时,发射点与接触物必须为固定距离的特性限制了其在临床中的应用。

1.2.2 间接型装置 间接模式装置主要包括等离子体射流针、等离子体射流枪和多功能型射流枪等<sup>[1,3,5-7]</sup>。间接模式中,活性CAP在两电极中产生,并由输送装置运输到靶组织及细胞,运输过程中可以将等离子体纯化或过滤<sup>[2-3]</sup>。

1.2.3 混合型装置 CAP混合型装置中最具代表性的是一种由三层板电极组成的装置。该装置是一个类似三明治型的结构,即电介质板被供电平面电极和接地网状电极夹于中间,通过向供电电极输入高电压,在网状电极侧面形成高电场而产生等离子体。此外,为了避免供电电极被邻近电场干扰,供电电极被绝缘材料完全覆盖<sup>[1,3,5]</sup>。

1.3 CAP的使用方法 目前, CAP作用于生物体的方法主要有2种:一种是用CAP直接照射目标组织和细胞,另一种是用CAP装置处理后的培养液或培养基<sup>[8]</sup>处理细胞,或将PSA直接注射于目标组织内,如肿瘤组织<sup>[9-10]</sup>。Tanaka等<sup>[9]</sup>用CAP刺激林格氏乳酸盐溶液,用处理后的溶液培养肿瘤细胞,发现其有抗癌作用。

1.4 CAP的生物活性成分 CAP的生物活性成分有2大类,即物理性和化学性成分<sup>[2,11-12,17-20]</sup>。物理性活性成分主要包括紫外线、电磁场和热量;化学性活性成分复杂,目前尚无确切定论。但通过对CAP作用后的培养基或培养液,以及CAP处理后的细胞等进行成分分析,结果显示,活性氧成分(reactive oxygen species, RNS)和活性氮成分(reactive nitrogen, RNS)是其主要成分。

### 2 CAP的抗肿瘤作用

2.1 CAP对在体肿瘤的研究 CAP作用于异种移植小鼠皮下肿瘤及黑色素瘤效果显著。Keidar等<sup>[13]</sup>用皮下膀胱癌细胞建立了小鼠皮下膀胱癌肿瘤模型,待瘤体直径约5 mm时用CAP进行照射,发现直径5 mm的肿瘤在接受2 min的CAP照射后瘤体完全消融,且瘤体直径较大的肿瘤也有不同程度的缩小,而用相同时间处理正常皮肤组织,却没有发现任何损伤。同样,也有研究<sup>[14]</sup>发现, CAP处理小鼠黑色素瘤模型后,肿瘤体积明显减少。

2.2 CAP在体外的抗肿瘤作用 CAP对接近20多种不同肿瘤细胞系和肿瘤模型有杀灭能力。其中,已经深入研究的有皮肤

基金项目: 安徽医科大学第二附属医院火花计划(项目编号: 2015hhjh04)

作者单位: 230601 合肥 安徽医科大学第二附属医院皮肤科

通信作者: 杨春俊 yachunjun9@163.com

肿瘤、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌及头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)等<sup>[2,6,15]</sup>。

Walk等<sup>[15]</sup>将小鼠神经母细胞瘤细胞分别用CAP处理0、30、60和120 s,并在处理后0、24、48小时测定细胞凋亡和代谢活性。结果显示,肿瘤细胞代谢活性和细胞活力明显下降;为进一步明确原因,他们对处理后0、24、48小时和处理后7天的细胞,用Annexin V & PI双染法和7-AAD流式细胞染色法对细胞进行检测。结果发现,CAP处理后即刻检测组细胞百分比与对照组相似,但处理后24小时和48小时的细胞出现明显的促凋亡效应,处理后7天的细胞更显示出持续的抗肿瘤作用。

HNSCC的治疗方案通常是手术联合放化疗,但疗效差,且副作用大。Guerreropreston等<sup>[16]</sup>用CAP装置处理4个HNSCC细胞系(JHU-022, JHU-028, JHU-029, SCC25),时间分别为10、30和45 s,并用2个正常口腔上皮细胞系(OKF6和NOKsi)作为对照。结果发现,CAP能选择降低HNSCC细胞的活力,其作用效果与作用时间和射流大小等有关。但MTT比色法测定细胞活力时,发现正常口腔上皮细胞的细胞活力并不受CAP影响。

Kaushik等<sup>[17]</sup>对胶质母细胞瘤细胞系T98G、甲状腺癌细胞系SNU80、口腔癌细胞系KB和人胚肾细胞系HEK293进行CAP处理,并对ROS造成的细胞效应进行监测。结果发现,CAP能降低T98G、SNU80、KB和HEK293细胞系的代谢活力和克隆形成能力。通过碘化丙啶和Annexin V-FITC染色,发现CAP处理后24小时,增强的ROS通过改变细胞抗氧化活性和NADP+/NADPH的比率,以及谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽的比率而导致细胞凋亡。这表明,抗氧化防御机制的失败,氧化还原状态受损,可能是导致恶性细胞凋亡的原因。

Yokoyama等<sup>[18]</sup>经过多年研究发现,CAP中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是杀灭宫颈癌Hela细胞的主要活性物质,为进一步研究CAP的作用机制,该研究将CAP的照射量调整为非致死剂量,并将对照组H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度调整为与之对应的浓度。尽管两组细胞的存活率均保持在90%以上,但DNA microarray检测发现两组细胞在基因表达上是有区别的,即CAP组的上调基因较多,而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组的下调基因较多。接下来,他们利用基因探针法分别筛选并发现CAP组上调和下调1.5倍的基因分别是457和30个,而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组则是224和907个。这些结果均提示CAP产生的细胞效应是一个多因素参与的过程。

Zhao等<sup>[19]</sup>在研究CAP中ROS和RNS对HepG2细胞系的作用时发现,CAP能促进HepG2细胞内ROS和RNS累积,并导致细胞抗氧化防御体系的破坏。硝基酪氨酸和蛋白质羰基含量分析表明,CAP处理引起细胞的硝化和氧化损伤。他们还发现,GRP78和前Caspase-12表达的改变会影响细胞内钙含量的稳定性,最终导致细胞功能障碍和凋亡。

此外,Hirst等<sup>[20-21]</sup>在2014年提出CAP可能是未来治疗前列腺癌的希望,并在2015年发文称,CAP处理会导致前列腺癌细胞高水平DNA损伤,且造成细胞活力和集落形成能力的降低;并提出细胞培养基中ROS的形成可能是导致这一系列现象的主要原因,进一步肯定了CAP在未来治疗恶性肿瘤的潜力。

2.3 CAP的增敏性 在研究CAP杀灭肿瘤细胞作用的同时,不少学者发现,CAP和化疗药物联合应用能提高化疗药物的作用效率<sup>[22-23]</sup>。CAP射流枪装置的产生就是为更好地将CAP用于靶向癌症治疗。胰腺癌是恶性程度极高的消化道恶性肿瘤,该病进展迅速、预后极差且发病率逐年增高,临床上并无有效的治疗方法。为寻找更好的靶向疗法,Brullé等<sup>[22]</sup>将CAP射流枪和吉西他滨联合治疗用MIA PaCa2-luc生物发光胰腺癌细胞系做成的小鼠模型发现,单独使用CAP和联合吉西他滨对胰腺癌均有良好的疗效,但联合使用疗效更佳,提示CAP具有增加细胞对化疗药物敏感性的特征。此外,CAP还能改变某些耐药细胞对药物的敏感性,如Julia等<sup>[23]</sup>报道了CAP能提高有替莫唑胺耐药性的胶质母细胞瘤的治疗敏感性。

2.4 CAP联合纳米颗粒技术 近年来,纳米级药物递送装置的发明给癌症的诊断和靶向治疗带来了新的曙光。纳米靶向药物载体颗粒具有改善疏水性药物递送困难,减少代谢性药物降解的特性。其通过化学修饰靶向传递至特异性靶细胞,并可持续释放和触发释放。目前,一些纳米级化疗药物已处于临床试验阶段或已得到美国食品和药品管理局(food and drug administration, FDA)许可。CAP可以通过与纳米颗粒技术的协同作用获得更强的抗癌能力。Kim等<sup>[24]</sup>用CAP治疗已使用抗FAK抗体缀合的金纳米颗粒预处理黑色素瘤细胞的研究发现,实验组比对照组的凋亡率提高了5倍。Azam等<sup>[25]</sup>同样用CAP联合铁纳米粒子作用于乳腺癌细胞,并对处理前后的Bax/Bcl-2比率变化进行研究,发现肿瘤细胞活力大幅下降,但Bax/Bcl-2比率上升。众所周知,Bax是重要的促凋亡蛋白。Zhu等<sup>[26]</sup>利用含5-氟尿嘧啶的纳米颗粒联合CAP处理乳腺癌细胞,发现CAP诱导下调转移相关基因(VEGF、MTDH、MMP9和MMP2)的表达,以及促进负载药物的纳米颗粒摄取,这一特性有助于减少耐药性的产生。Shiva等<sup>[27]</sup>使用CAP照射金纳米颗粒共培养的HCT-116细胞(人结直肠癌细胞)后发现,金纳米颗粒存在的前提下,通过CAP的处理,细胞死亡率明显增加。

### 3 CAP抗肿瘤机制研究现状

CAP具有良好的抗肿瘤能力,且对正常细胞的损伤明显小于同源肿瘤细胞,但其抗肿瘤作用的分子机制仍不明确。目前,对于CAP分子机制的研究主要来源于CAP的体外实验。其中,CAP引起CAP源性ROS增高而致细胞损伤是目前关注的焦点。CAP源性ROS是导致细胞凋亡的主要因素,细胞内抗氧化系统被ROS过度消耗导致抗氧化系统失衡是细胞损伤的主要原因,且ROS可能导致DNA和线粒体损伤<sup>[17-19,28-29]</sup>。也有研究显示,将等离子体处理组与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理组的细胞进行对比后发现,两组细胞状态相似,但等离子体处理组的细胞变化更大,这也证明了CAP对细胞的作用是一种多因素的综合效应<sup>[18]</sup>。同时,CAP处理后细胞基因表达改变也是CAP分子机制的研究热点。经CAP处理后的P53、Caspase-3/7、Caspase-9、GRP78、CHOP等与细胞凋亡相关的基因在不同细胞系中的表达呈现出不同程度的改变<sup>[19-30]</sup>。最近,水通道蛋白(aquaporin,

AQP)可能是CAP选择性抗癌能力主要机制这一观点受到人们关注,该观点提出癌细胞拥有比正常细胞更多的AQP,可跨膜转运更多的ROS,最终致癌细胞比正常细胞产生更多的损伤效应<sup>[29]</sup>。

#### 4 展望

目前,CAP仍是一个新的研究领域,其抗癌作用为癌症的治疗带来了新希望。CAP装置主要适用于直接接触的物体,如培养皿或动物及人体皮肤。对肿瘤而言,怎样才能改进装置使其适用于人体体内?Chen等<sup>[31]</sup>开发了采用氦气的新型微型CAP装置,并成功利用该装置抑制了小鼠颅内的神经母细胞瘤,但该装置是否适用于人体还需进一步研究,如何有效改进CAP装置使其能够便捷、有效、安全地作用于人体是其研究的主要方向。随着CAP抗癌研究的深入,了解CAP造成癌细胞死亡的分子机制,以及造成这些结局的活性成分,CAP对哪些肿瘤具有敏感性,其作用于人体是否会产生不良反应等都有待于进一步观察研究。

#### 参考文献

- [1] ISBARY G,SHIMIZU T,LI Y F,et al. Cold atmospheric plasma devices for medical issues [J]. Expert Rev Med Devices 2013,10(3):367-377.
- [2] YAN D,SHERMAN J H,KEIDAR M. Cold atmospheric plasma a novel promising anti-cancer treatment modality [J]. Oncotarget 2017,8(9):15977-15995.
- [3] GAYMIMBRERA J,GARCÍA M C,SLATEJERA B. Clinical and biological principles of cold atmospheric plasma application in skin cancer[J]. Adv Ther 2016,33(6):894-909.
- [4] RATOVITSKI E A,CHENG X,YAN D,et al. Anti-cancer therapies of 21st century: novel approach to treat human cancers using cold atmospheric plasma [J]. Plasma Process Polym 2015,11(12):1128-1137.
- [5] AKHLAGHI M,RAJAYI H,MASHAYEKH A S,et al. On the design and characterization of a new cold atmospheric pressure plasma jet and its applications on cancer cells treatment[J]. Biointerphases 2015,10(2):029510.
- [6] CHENG X,RAJJOUB K,SHASHURIN A,et al. Enhancing cold atmospheric plasma treatment of cancer cells by static magnetic field [J]. Bioelectromagnetics,2017,38(1):53-62.
- [7] ROBERT E,BARBOSA E,DOZIAS S,et al. Experimental study of a compact nanosecond plasma gun [J]. Plasma Process Polym 2010,6(12):795-802.
- [8] ZHANG X,LI M,ZHOU R,et al. Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle[J]. Appl Phys Lett 2008,93(2):021502.
- [9] TANAKA H,NAKAMURA K,MIZUNO M,et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects [J]. 2016,6:36282.
- [10] YAN D,SHERMAN J H,CHENG X,et al. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application [J]. Applied Physics Letters 2014,105(22):2.
- [11] KALGHATGI S,KELLY C M,CERCHAR E,et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells [J]. PLoS One, 2011,6(1):e16270.
- [12] KIM J S,JOH H M,CHUNG T H. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells [J]. Appl Phys Lett 2013,103(15):153705.
- [13] KEIDAR M,WALK R,SHASHURIN A,et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy [J]. Br J Cancer 2011,105(9):1295-1301.
- [14] BINENBAUM Y,BENDAVID G,GIL Z,et al. Cold atmospheric plasma created at the tip of an elongated flexible capillary using low electric current,can slow the progression of melanoma [J]. PLoS One 2017,12(1):e0169457.
- [15] WALK R M,SNYDER J A,SRINIVASAN P,et al. Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma [J]. J Pediatr Surg 2013,48(1):67-73.
- [16] GUERREROPRESTON R,OGAWA T,UEMURA M,et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. Int J Mol Med, 2014,34(4):941-946.
- [17] KAUSHIK N K,KAUSHIK N,PARK D,et al. Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment [J]. PLoS One 2014,9(7):e103349.
- [18] YOKOYAMA M,JOHKURA K,SATO T. Gene expression responses of HeLa cells to chemical species generated by an atmospheric plasma flow [J]. Biochem Biophys Res Commun 2014,450(4):1266-1271.
- [19] ZHAO S,XIONG Z,MAO X,et al. Atmospheric pressure room temperature plasma jets facilitate oxidative and nitrate stress and lead to endoplasmic reticulum stress dependent apoptosis in HepG2 cells [J]. PLoS One 2013,8(8):e73665.
- [20] HIRST A M,SIMMS M S,MANN V M,et al. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells [J]. Br J Cancer 2015,112(9):1536-1545.
- [21] HIRST A M,FRAME F M,MAITLAND N J,et al. A novel focal therapy for localized prostate cancer [J]. Biomed Research International 2014,2014(2014):878319.
- [22] BRULLÉ L,VANDAMME M,RIËS D,et al. Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model [J]. PLoS One 2012,7(12):5806-5819.

## 脾脏血管肉瘤 ——2017年读片窗(5)

王龙胜

[关键词] 脾脏; 血管肉瘤; CT 诊断

doi: 10. 3969/j. issn. 1000 - 0399. 2017. 10. 044

### 1 病史摘要

患者 女性 55 岁 腹痛 1 天。患者在无明显诱因下出现腹痛, 为左侧上腹部持续性疼痛 时轻时重 无发热 无恶心呕吐 无心慌胸闷 取前倾坐位疼痛可稍缓解 不能平卧 饮食、睡眠一般 自诉大小便正常 体质量无明显变化。体检: 体温 36.9℃ 脉搏 79 次/分, 呼吸 18 次/分 血压 126/74 mmHg 疼痛视觉模拟评分 3 分。神清, 精神差 痛苦病容 查体不能配合 巩膜无黄染 皮肤黏膜未见出血点 头颈部浅表淋巴结未触及肿大 肺部听诊呼吸音稍粗 未闻及干

湿性啰音 心脏听诊未闻及病理性杂音。腹部检查不能配合 左侧腹部明显压痛 双下肢无水肿 NS(-)。

### 2 CT 检查所见

脾脏体积明显增大, 失去正常形态, 脾实质密度弥漫减低, CT 值约 38 HU, 脾脏包膜下见弧形高密度影, CT 值约 60 HU (见图 1) 增强扫描动脉期呈斑片状不均匀强化, 测其 CT 值 99 HU (见图 2) 静脉期 (见图 3)、延迟期 (见图 4) 强化范围逐渐扩大, 测其 CT 值分别为 133、112 HU。



图 1 CT 平扫



图 2 增强扫描动脉期



图 3 增强扫描静脉期



图 4 增强扫描延迟期

作者单位: 230601 合肥 安徽医科大学第二附属医院

- [23] JULIA K, VERONIKA B, ANDREA S, et al. Restoration of sensitivity in chemoresistant glioma cells by cold atmospheric plasma [J]. PLoS One 2013 8(5): e64498.
- [24] KIM G C, KIM G J, PARK S R, et al. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer [J]. J Phys D Appl Phys 2009 42(3): 032005.
- [25] AZAM J, SHIVA I, REZA M. Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer: gene expression and apoptosis study [J]. Onco Targets Ther, 2016 9: 5911 - 5917.
- [26] ZHU W, LEE S J, CASTRO N J, et al. Synergistic effect of cold atmospheric plasma and drug loaded core-shell nanoparticles on Inhibiting breast cancer cell growth [J]. Sci Rep, 2016 6(11 Suppl): 357 - 369.
- [27] SHIVA I, ZHOHREH S, MOHAMMAD A S, et al. Induction of growth arrest in colorectal cancer cells by cold plasma and gold nanoparticles [J]. Arch Med Sci, 2015, 11(6): 1286 - 1295.
- [28] YAN D, NOURMOHAMMADI N, BIAN K, et al. Stabilizing the cold plasma-stimulated medium by regulating medium's composition [J]. Sci Rep 2016 6(13): 26016.
- [29] YAN D, TALBOT A, NOURMOHAMMADI N, et al. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma: a model based on aquaporins (Review) [J]. Biointerphases 2015, 10(4): 040801.
- [30] JAE WON C, SUNG UN K, YOO SEOB S, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: involvement of DNA-damage-triggering sub-G(1) arrest via the ATM/p53 pathway [J]. Arch Biochem Biophys 2014, 545(3): 133 - 140.
- [31] CHEN Z, SIMONYAN H, CHENG X, et al. A novel micro cold atmospheric plasma device for glioblastoma both In vitro and in vivo [J]. Cancers 2017 9(6): 61.

(2017-03-01 收稿)