

网络出版时间: 2024 - 07 - 19 15: 06: 31 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240717.1521.006>

◇基础医学研究◇

微秒脉冲电场促进肝癌细胞凋亡及其机制

郑伟¹, 陈新华², 胡深³, 黄琦¹

摘要 目的 初步探究微秒脉冲电场引起肝癌细胞 HepG2 凋亡的现象及其机制。方法 利用 CCK-8 检测不同参数的微秒脉冲电场对人肝癌细胞 HepG2 和人正常肝细胞 L-02 增殖的影响,通过流式细胞术观察不同电场强度下微秒脉冲消融对 HepG2 细胞凋亡的影响;利用透射电镜观察消融后的 HepG2 细胞形态改变;通过转录组测序和生物信息学分析筛选消融组和对照组细胞间的差异表达基因;采用实时荧光定量 PCR(qPCR) 实验和蛋白质印迹实验验证 HepG2 细胞经脉冲消融后差异表达基因的 RNA 和蛋白表达改变。结果 CCK-8 实验显示,随着电场强度的增加,微秒脉冲电场消融对肝癌细胞 HepG2 和人肝细胞 L-02 的增殖和抑制能力也逐渐增加。但微秒脉冲电场对二者之间的消融能力没有显著性差异。在电压增加至 1 600 V/cm 时,微秒脉冲电场能够诱导 HepG2 细胞凋亡($P < 0.000 1$),凋亡细胞比率近 80%。透射电镜观察显示,微秒脉冲电场消融后,HepG2 细胞膜发生破碎,其中线粒体形态不规则,出现了典型的凋亡小体。转录组学分析揭示参与微秒脉冲消融的主要基因有丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 1(TAOK1),卷曲蛋白家族受体 3(FZD3),钙蛋白酶 10(CAPN10),基质金属蛋白酶 9(MMP-9)以及转化生长因子 β -1 诱导的转录本(TGFB1)等。qPCR 实验验证在 1 600 V/cm 微秒脉冲消融后,HepG2 细胞内 TAOK1($P < 0.05$)、FZD3($P < 0.01$)的 RNA 表达水平上调,CAPN10($P < 0.001$)、MMP-9($P < 0.01$)和 TGFB1($P < 0.05$)的 RNA 表达水平降低。蛋白质印迹实验进一步证实 TAOK1 和 FZD3 在微秒脉冲处理后表达水平出现上升,而 CAPN10、MMP-9 和 TGFB1 的表达水平出现下调。结论 微秒脉冲电场消融可以有效促进肝癌 HepG2 细胞的凋亡,

CAPN10、FZD3 等基因可能参与微秒脉冲消融促进肝癌 HepG2 细胞凋亡的调控。

关键词 肝癌;微秒脉冲消融;凋亡

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2024)08 - 1370 - 07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.08.012

肝癌已成为世界范围内的一个重要的健康问题^[1]。国家癌症中心最新的研究^[2]数据显示,肝癌的发病率和病死率在中国分别位居第 4 位和第 2 位。对于早期肝癌患者可选择肝移植和手术切除,但多数患者确诊时已处于中晚期阶段,最终接受射频消融,经动脉化疗栓塞和放化疗等联合治疗^[3]。但是,患者最终会出现对索拉非尼和贝伐珠单抗等治疗药物耐药的情况^[4]。因此,寻找新的治疗方式对提高肝癌患者的生存具有重要意义。

脉冲电场消融作为一种新兴的肿瘤治疗技术,备受关注。当对细胞膜施加电场,会产生亲水性微孔,当电场撤去后,细胞膜通透性不可改变而导致细胞死亡的现象称为不可逆电穿孔^[5]。微秒脉冲电场作为一种不可逆电穿孔技术,可以直接消退胰腺癌、肝癌、皮肤癌和前列腺癌等多种肿瘤,现已开展多项临床研究^[6-8]。微秒脉冲电场能够通过造成线粒体膜通透性增高,或者增加细胞内氧化应激,破坏细胞骨架等多种方式抑制细胞增殖以及诱导细胞凋亡^[6,9-11]。但是,具体的分子通路和机制仍不明确。探究可能影响微秒脉冲消融发生的基因和分子通路,对微秒脉冲电场消融治疗肝癌的临床应用具有重要的理论价值。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人肝癌 HepG2 细胞系购自中国科学院上海细胞库,人正常肝细胞 L-02 购自南京凯基生物公司。HepG2 细胞及 L-02 细胞用含 10% 灭活胎牛血清(购自杭州四季青生物科技有限公司)的高糖的杜氏改良 Eagle 培养基(购自北京索莱宝生物科技有限公司),培养在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱。

2024 - 05 - 11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:82003037);安徽省转化医学研究院科研基金(编号:2022zhyx-C79);浙江省科技健康计划(编号:2021KY719)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院肿瘤科,合肥 230601

² 浙江省脉冲电场技术医学转化重点实验室,杭州 311121

³ 浙江大学医学院附属第二医院产科,杭州 310052

作者简介: 郑伟,男,硕士研究生;

胡深,男,主治医师,责任作者,E-mail: 2515527@zju.edu.cn;

黄琦,女,博士,硕士生导师,责任作者,E-mail: huan-gqi214@163.com

1.2 实验装置 微秒脉冲发射装备由杭州睿笛生物科技有限公司和浙江省脉冲电场技术医学转化重点实验室提供。参考课题组预先实验条件和仪器设备情况,微秒消融参数设定为脉冲宽度 50 μ s,脉冲组数为 8,输出电压可调。

1.3 细胞增殖能力检测 用胰酶消化处于生长对数期的 HepG2 和 L-O2 细胞,置于电极杯中,设置完不同参数后,开始消融。治疗结束 2 h 后对不同参数治疗组的细胞进行细胞计数随后按照每孔 4 000 个细胞进行铺板,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中进行过夜培养。24 h 后加入 CCK-8 试剂孵育 2 h 于酶标仪上检测细胞增殖能力。

1.4 细胞凋亡检测 用胰酶消化处于生长对数期的 HepG2 细胞,置于电极杯中,设置完参数后,开始消融。微秒消融治疗结束 2 h 后,将细胞悬液离心后置于离心管中。使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司),每 100 μ l 细胞悬液样品加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI 试剂避光孵育 15 min 后 PBS 洗 3 次。最后采用流式细胞仪(美国安捷伦科技有限公司)检测,使用 Novoexpress 软件分析数据。

1.5 电镜观察 将消融处理完 2 h 后的细胞离心弃上清液后,加入 2.5% 的戊二醛固定液。室温下固定 2 h 后,转移至 4 $^{\circ}$ C 保存,最后在透射电镜下观察线粒体等受损情况。

1.6 全基因转录组测序 对消融处理完的 HepG2 细胞进行 RNA 提取,逆转录和基因表达分析。测序过程由杭州联川生物公司完成。在测序完成后,分析消融治疗组和对照组之间的基因表达水平的差异,并进行基因本体注释(gene ontology, GO) 分析,京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析。

1.7 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 实验测定微秒脉冲消融组 and 对照组之间相关基因的表达情况 使用胰酶消化 HepG2 细胞,随后按照 1 600 V/cm, 组数为 8 组进行消融处理。静置 2 h 后,3 500 r/min 离心 2 min 得到细胞沉淀。加入 1 ml TRIzol 裂解 15 min。随后按照天根总 RNA 提取试剂盒说明书提示提取总 RNA,按照诺唯赞 qPCR 试剂盒说明将 RNA 逆转成 cDNA。使用 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算治疗组和对照组的 mRNA 相对表达水平。研究中所设计的 mRNA 引物序列与凋亡发生相关的卷曲蛋白家族受体 3 (frizzled3, FZD3) 、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 1 (thou-

sand and one amino acid protein kinase1, TAOK1) 、钙蛋白酶 10 (Calpain-10, CAPN10) 、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP-9) 和转化生长因子 β -1 诱导的转录本 (transforming growth factor beta-1-induced transcript 1, TGFB1) 等均订购自杭州擎科生物公司,具体引物序列见表 1。

表 1 相关基因的引物序列

基因名	引物序列(5'-3')
FZD3	F: CATGGAGATGTTTGGTGTTCCTT R: AAGTCGAGGATATGGCTCATCAC
TAOK1	F: GGCGTCATAACTTAGAGCAGGAC R: TTGTGTTGAGGTGCGGAACTC
CAPN10	F: CATTACAGCCAGGAGATGCT R: CTGTTAGGTTTTTCATCACTGCCAT
MMP-9	F: GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC R: CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT
TGFB1	F: TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC R: GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA
GAPDH	F: GGATCTCGCTCTCTGCAAGATG R: ATTCCACCCATGGCAAATTC

1.8 蛋白质印迹检测微秒脉冲消融组 and 对照组之间相关蛋白的表达水平 使用胰酶消化 HepG2 细胞后按照设定参数进行消融处理。静置 2 h 后,3 500 r/min 离心 2 min 弃除上清液后得细胞沉淀加入 100 μ l 细胞裂解液,冰上裂解 30 min。随后加入上样缓冲液于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热使蛋白变性。配置 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶后一次完成电泳,转膜,封闭,洗涤,4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜,孵育二抗以及显影。相关抗体按照说明书推荐比例 1 : 500 稀释。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad prism 9 进行统计分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示。样本分布均符合正态分布,两组间统计选择 t 检验,多组间选择单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微秒脉冲电场对 HepG2 细胞和 L-O2 细胞的增殖能力的影响 采用 CCK-8 实验检测结果显示,伴随着电场强度的升高,微秒脉冲电场对肝癌细胞 HepG2 和人肝细胞 L-O2 的增殖的抑制能力均逐渐增强。但在该实验没有观察到微秒脉冲电场对肝癌细胞 HepG2 细胞增殖的抑制能力比对人正常肝细胞 L-O2 细胞增殖的抑制能力更强的现象 ($P > 0.05$),见图 1。

2.2 微秒脉冲电场对 HepG2 细胞凋亡的影响 使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测不同强度电场消

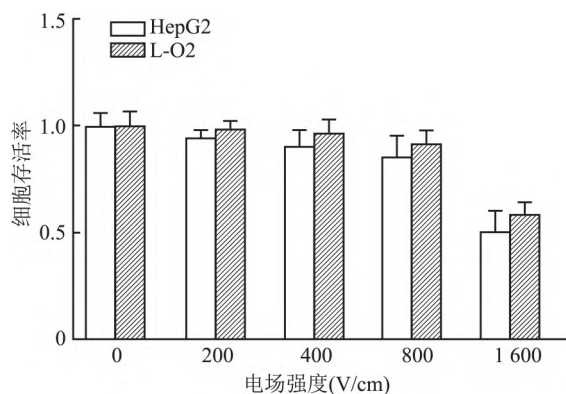


图1 微秒脉冲对肝癌细胞 HepG2 和人正常肝细胞 L-O2 细胞增殖能力的影响 ($n=5$)

融后对 HepG2 细胞凋亡的影响。与未处理的对照组相比,在不同电场强度的脉冲处理 2 h 后, HepG2 细胞均发生凋亡,并且凋亡的比例随着电场强度的增加而增加。如图 2 所示,在使用电场强度为 200、400、800 V/cm 处理后, HepG2 细胞的凋亡比例分别 (4.747 ± 0.300) %、(5.557 ± 0.383) % 和 (5.880 ± 1.185) %,但与对照组的凋亡细胞比例 (5.107 ± 1.541) % 相比差异均无统计学意义。但当电场强度为 1 600 V/cm 时, HepG2 细胞凋亡发生比例为 (77.060 ± 7.032) %,与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.0001$)。该结果表明使用微秒脉冲电场可以促进 HepG2 细胞发生凋亡,并且凋亡的发生

率随着微秒脉冲电场强度的升高而升高。在脉冲宽度为 50 μ s,脉冲组数为 8,电压强度为 1 600 V/cm 时对 HepG2 细胞的凋亡诱导较为理想。接下来的实验选择该条件。

2.3 微秒脉冲电场通过损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡 透射电镜显示,对照组的 HepG2 细胞的线粒体呈杆状或圆形,形态正常,线粒体嵴清晰可见。在使用微秒脉冲消融后的 HepG2 细胞中线粒体极性消失,线粒体嵴消失。此外,消融后的肿瘤细胞中可以看到细胞膜完整性遭到破坏并出现大量的凋亡小体。这些结果表明,微秒脉冲可以通过破坏 HepG2 细胞线粒体从而诱导凋亡的发生。

2.4 差异表达基因的筛选 对该消融后的治疗组和未消融的对照组进行了转录组测序进一步研究微秒脉冲消融肝癌的机制。通过对消融治疗组和未消融组的差异表达分析共得到 41 991 个基因,其中 3 856 个基因表达具有显著性差异,1 430 个基因上调,2 426 个基因下调(图 4)。差异基因的筛选的标准是 $|\log_2(FC)| > 2$ 、 $P < 0.05$ 。

2.5 差异基因的 GO 功能富集分析 GO 分析显示得到的差异基因主要涉及的生物过程包括对 RNA 聚合酶 II 的调控、信号传导以及凋亡(图 5)。这些差异基因涉及最多的细胞组分是细胞质和细胞膜,这一结果与电镜下观察到消融治疗的 HepG2 细

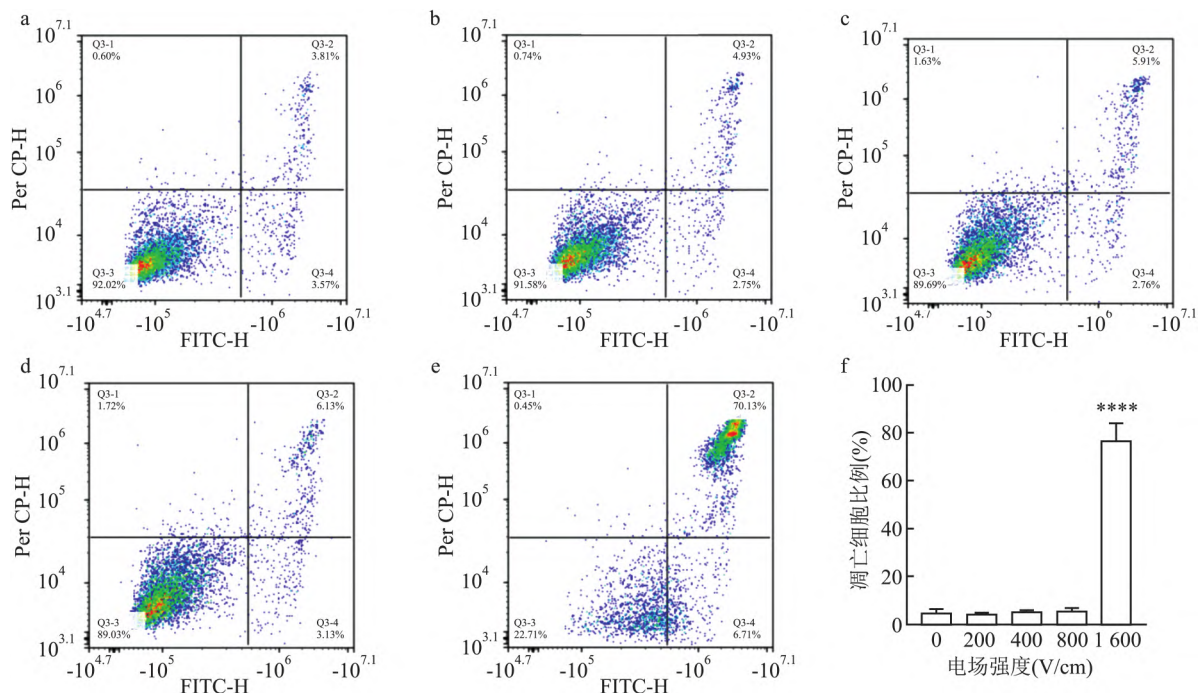


图2 流式细胞仪检测不同参数微秒脉冲对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($n=3$)

a: 0 V/cm; b: 200 V/cm; c: 400 V/cm; d: 800 V/cm; e: 1 600 V/cm; f: 不同脉冲参数对 HepG2 细胞凋亡的统计学分析直方图; 与 0 V/cm 比

较: **** $P < 0.0001$

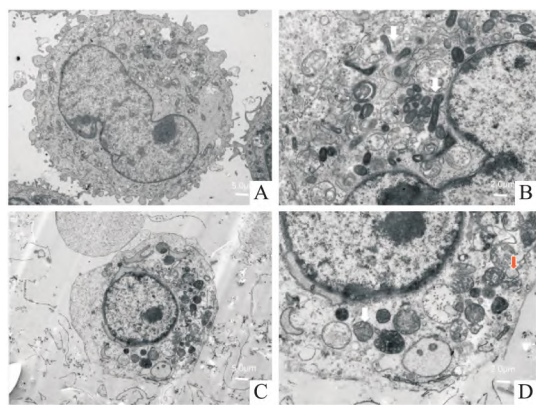


图3 微秒脉冲电场通过破坏线粒体引起 HepG2 细胞凋亡

A: 低倍镜下的对照组 $\times 3\,000$; B: 高倍镜下的对照组 $\times 7\,000$;
C: 低倍镜下的消融组 $\times 3\,000$; D: 高倍下的消融组 $\times 7\,000$; 箭头: 白色指示线粒体, 红色指示凋亡小体

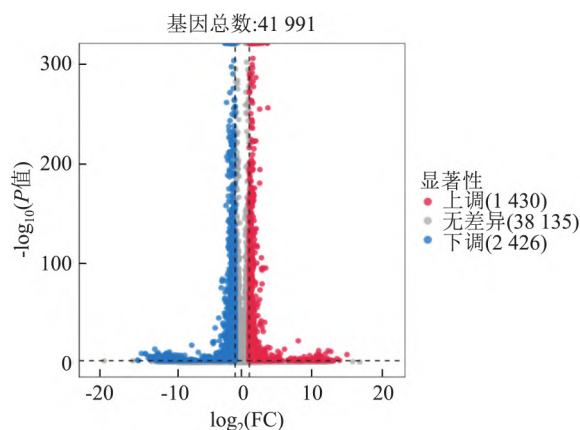


图4 微秒脉冲消融组和对照组之间差异基因的火山图

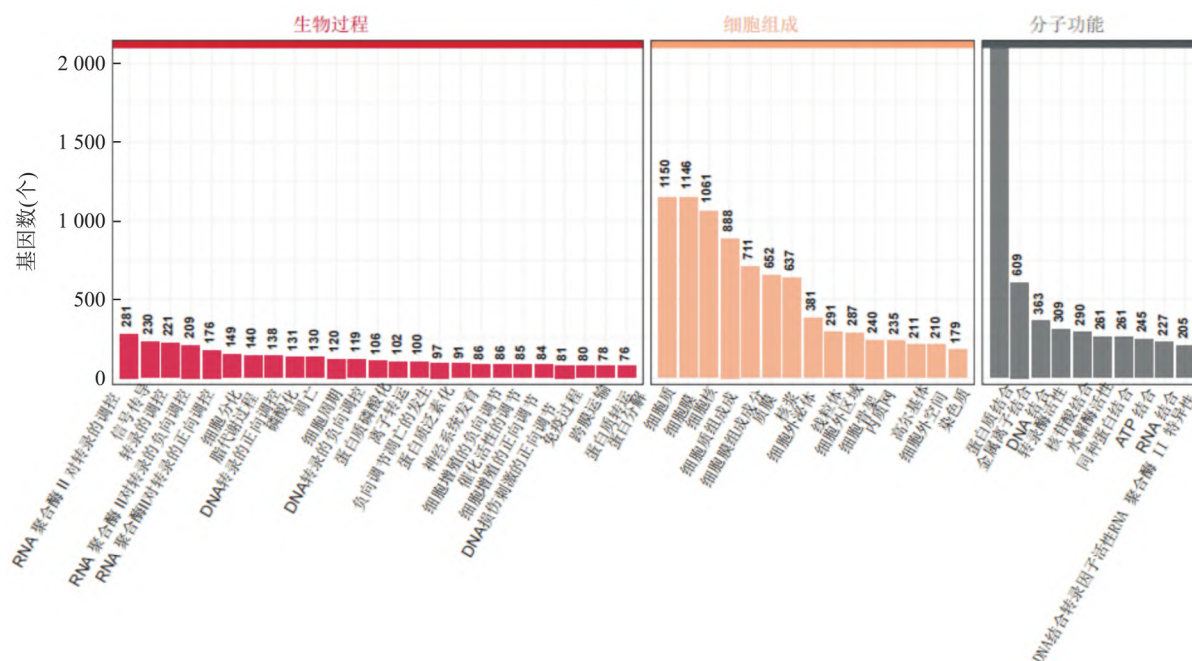


图5 微秒脉冲消融组和对照组差异基因的 GO 富集分析的柱状图

胞的细胞膜破碎以及多种细胞器形态的破坏一致。分子功能的分析结果显示两组细胞之间的差异基因的主要涉及的功能是蛋白质结合、金属离子的结合以及 DNA 的结合。

2.6 差异基因的 KEGG 通路富集分析 KEGG 富集分析显示,与富集在代谢相关通路中的差异基因数量是最多的(图 6)。除此之外,差异基因也与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路和丝裂原活化蛋白激酶信号通路密切相关。

2.7 凋亡相关基因的表达水平分析 对 GO 分析中得到的凋亡调控过程相关的基因的表达水平进行了热图分析(图 7 A)。结果显示, *FZD3*、*TAOK1*、*CAPN10*、*MMP-9*、*TGFB1* 的表达水平在微秒脉冲消融治疗组中出现变化。这些基因表达水平的变化可能是微秒脉冲治疗后肝癌 HepG2 细胞出现凋亡的重要原因。接着,利用 qPCR 对微秒脉冲消融处理后的肝癌细胞中这些显著差异表达基因水平进行了 RNA 水平验证(图 7 B),微秒脉冲消融处理后, HepG2 细胞中 *TAOK1* ($P < 0.05$) 和 *FZD3* ($P < 0.01$) 的 mRNA 表达水平相较于对照组升高,而 *CAPN10* ($P < 0.001$), *MMP-9* ($P < 0.01$) 和 *TGFB1* ($P < 0.05$) 的 mRNA 表达水平相较于对照组降低。进一步,通过蛋白质印迹检测微秒脉冲消融治疗后一些调控凋亡发生过程相关的基因在蛋白层面的表达水平的变化。实验结果显示,与对照组相比,经过

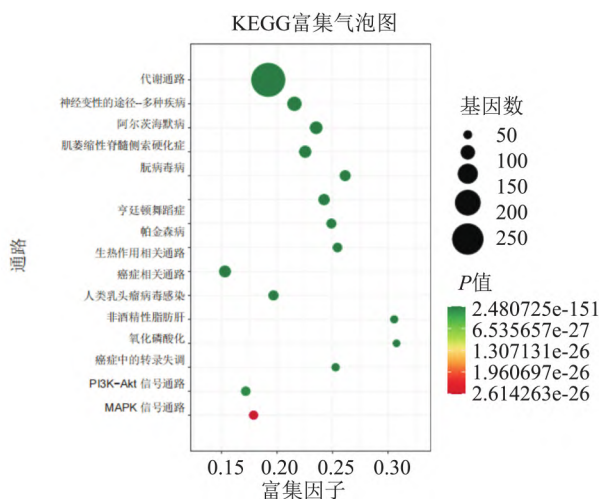


图6 微秒脉冲消融组和对照组差异基因的 KEGG 富集分析气泡图

微秒脉冲消融处理后肝癌细胞 HepG2 细胞中 TAOK1 ($P > 0.05$) 和 FZD3 ($P < 0.05$) 的蛋白表达水平出现上升, CAPN10 ($P < 0.05$), MMP-9 ($P < 0.05$) 和 TGFB1 ($P < 0.05$) 的蛋白表达水平在微秒脉冲治疗后出现下调, 见图 8。因此推测这一系列基因的显著变化可能是微秒脉冲消融促进 HepG2 细胞凋亡发生的重要原因之一。

3 讨论

根据国家癌症中心发布的最新数据显示, 2022 年中国全癌种发病数为 482 万人, 其中肝癌发病数为 36 万, 位居第 4 位^[1]。全癌种死亡人数为 257 万, 其中肝癌死亡人数位居第 2 位, 约占 12%^[2]。肝癌患者的治疗方式主要与临床分期相关。早期肝癌患者主要选择肝切除或者肝移植, 局部治疗和全

身治疗是中晚期患者的希望。尽管出现了一些新的治疗方式, 但是晚期肝癌患者的生存时间仍然有限^[2]。

不可逆电穿孔作为肿瘤治疗的新技术, 具有高度的组织选择性, 能够保护正常组织, 有加速术后康复的功能, 是一种高效安全的肿瘤治疗方式。不可逆电穿孔消融已经在皮肤癌等一些浅表肿瘤中展现良好的应用前景^[3], 是肿瘤微创治疗的备受期待的手段。研究^[4]表明低频电刺激可以影响肿瘤细胞的增殖和迁移能力, 防止肿瘤的复发。本研究细胞增殖实验表明微秒脉冲消融对肝癌细胞和正常肝细胞均具有一定的抑制能力, 但对肝癌细胞和正常细胞的影响不具有统计学差异。该结果提示微秒脉冲电场消融对不同种类细胞的消融能力可能没有显著差异。卢佳华^[3]利用不可逆电穿孔技术对猪的肝内肿瘤消融发现, 肝内肿瘤可以被完全消融同时有效保护了消融区域附近的肝静脉管道结构。其对正常组织的保护主要基于细胞和结缔组织的区别^[4]。这一结果与该实验观察到现象基本一致。

在不可逆电穿孔处理的肿瘤细胞中利用透射电镜观察到线粒体出现不同程度的损害。喻向春等^[4]检测到 Bax 的上调和 Bcl-2 的下调, 提示不可逆电穿孔造成的细胞凋亡可能与线粒体内源性凋亡途径的激活有关。但是, 影响这一过程的具体的生物机制仍不明确。进一步对调控凋亡发生过程中的基因的 mRNA 和蛋白水平研究, 结果显示 FZD3 的基因和蛋白表达水平均出现升高。FZD3 的过表达可以降低卵巢癌细胞对顺铂的耐药性并促进细胞凋亡和 DNA 损伤^[5]。这一结果表明, FZD3 的表达

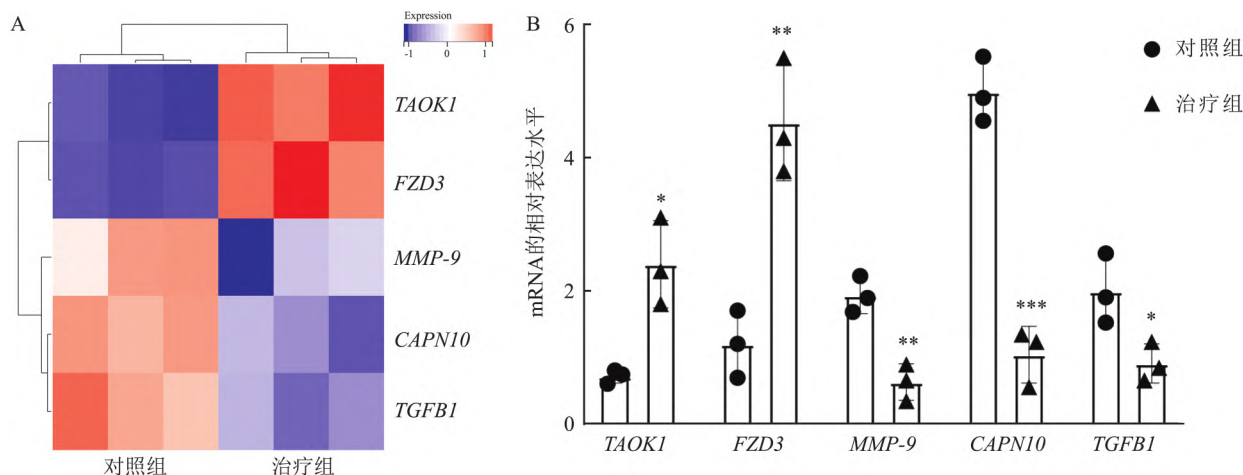


图7 微秒脉冲消融组和对照组之间有关凋亡相关基因的表达水平分析
A: 热图; B: mRNA 的表达水平; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

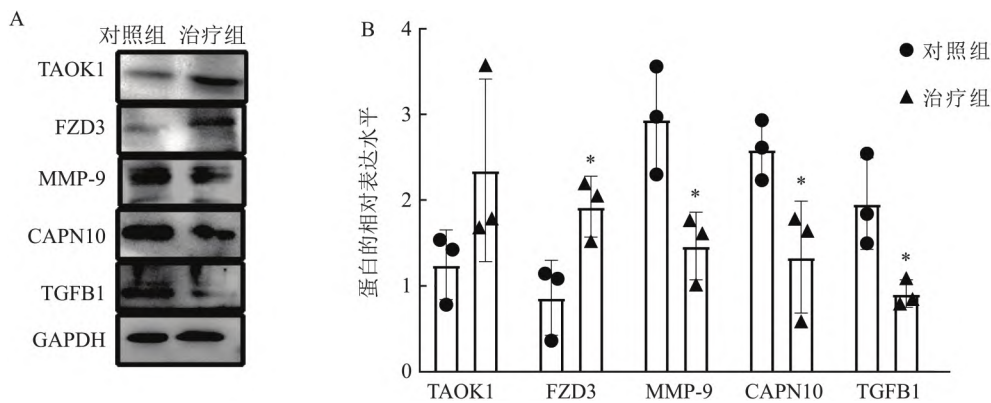


图8 微秒脉冲消融组和对照组之间有关凋亡相关蛋白的表达水平检测

A: 蛋白免疫印迹检测凋亡相关蛋白的表达水平; B: 凋亡相关蛋白表达水平的定量分析; 与对照组比较: * $P < 0.05$

可能对微秒脉冲消融促进肝癌细胞凋亡具有重要作用。有研究称紫杉醇可以激活内源性 TAOK1 以及 JNK 通路进而促进细胞凋亡^[6]。但是在微秒脉冲消融处理后,TAOK1 的蛋白水平变化并不显著。此外,与凋亡发生相关的 MMP-9、CAPN10 和 TGFB1 在微秒脉冲消融处理后的蛋白水平出现下调。在格列美脲和格列本脲诱导前列腺癌细胞凋亡的过程中,出现凋亡典型标志物 Caspase-3 的上调的同时伴随着 CAPN10 等钙蛋白酶活性的下降^[7]。该结果提示 MMP-9、CAPN10 和 TGFB1 可能参与微秒脉冲消融促进肝癌细胞 HepG2 凋亡的生物过程。

但是,该研究也存在着一些局限性。目前,该实验只是初步提出一些可能参与微秒脉冲消融促进肝癌细胞 HepG2 的凋亡的基因,但是关于这些基因调控凋亡发生的具体的信号通路的仍然需要进一步探索。除此之外,关于微秒脉冲消融肝癌在动物层面的治疗效果也需要进一步得到明确。

参考文献

- Brown Z J, Tsilimigras D I, Ruff S M, et al. Management of hepatocellular carcinoma: a review [J]. JAMA Surg, 2023, 158(4): 410–20.
- Han B, Zheng R, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. JNCC, 2024, 4(1): 47–53.
- Chakraborty E, Sarkar D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(11): 2798.
- Gajewska-Naryniecka A, Szwedowicz U, Łapińska Z, et al. Irreversible electroporation in pancreatic cancer—an evolving experimental and clinical method [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4381.
- Latouche E L, Sano M B, Lorenzo M F, et al. Irreversible electroporation for the ablation of pancreatic malignancies: a patient-specific methodology [J]. J Surg Oncol, 2017, 115(6): 711–7.
- Chen X, Ren Z, Li C, et al. Preclinical study of locoregional therapy of hepatocellular carcinoma by bioelectric ablation with microsecond pulsed electric fields (μ sPEFs) [J]. Sci Rep, 2015, 5: 9851.
- Rao X, Chen X, Zhou J, et al. A digital controlled pulse generator for a possible tumor therapy combining irreversible electroporation with nanosecond pulse stimulation [J]. IEEE Trans Biomed Circuits Syst, 2020, 14(3): 595–605.
- Wang H, Xue W, Yan W, et al. Extended focal ablation of localized prostate cancer with high-frequency irreversible electroporation: a nonrandomized controlled trial [J]. JAMA Surg, 2022, 157(8): 693–700.
- Morotomi-Yano K, Akiyama H, Yano K. Different involvement of extracellular calcium in two modes of cell death induced by nanosecond pulsed electric fields [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 555–556: 47–54.
- 岑超, 陈新华, 郑树森. 纳秒脉冲电场肿瘤电消融的分子生物学机制 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2015, 44(6): 678–83.
- Stacey M, Fox P, Buescher S, et al. Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival [J]. Bioelectrochemistry, 2011, 82(2): 131–4.
- Wang Y, Deng B. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanism, targeted therapy, and biomarkers [J]. Cancer Metastasis Rev, 2023, 42(3): 629–52.
- 卢佳华. 纳秒脉冲电场精准消融肝静脉周围组织的安全性研究 [J]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- 喻向春, 殷胜勇, 张慧. 纳秒脉冲消融联合顺铂对人宫颈癌细胞 Hela 生长的影响及机制 [J]. 现代妇产科进展, 2016, 25(6): 437–40.
- Zhu L, Zhou Q. Aberrant epigenetic regulation of FZD3 by TET2 is involved in ovarian cancer cell resistance to cisplatin [J]. J Chemother, 2024, 36(2): 143–55.
- Fang C Y, Lai T C, Hsiao M, et al. The diverse roles of TAO kinases in health and diseases [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7463.
- Szymczak-Pajor I, Fleszar K, Kasznicki J, et al. A potential role of calpains in sulfonyleureas (SUs)-mediated death of human pancreatic cancer cells (1.2B4) [J]. Toxicol In Vitro, 2021, 73: 105128.

Promotion of apoptosis and mechanisms in hepatocellular carcinoma cells by microsecond pulsed electric field

Zheng Wei¹, Chen Xinhua², Hu Shen³, Huang Qi¹

(¹Dept of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pulsed Electric Field Technology for Medical

Transformation, Hangzhou 311121; ³Dept of Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052)

Abstract *Objective* To preliminarily explore the phenomenon and mechanism of apoptosis induced by microsecond pulsed electric field in hepatocellular carcinoma cells HepG2. *Methods* CCK-8 was used to test the effects of microsecond pulsed electric fields with different parameters on the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 and human normal hepatocytes L-02. The effects of microsecond pulsed electric field ablation on HepG2 cell apoptosis under different electric field intensities were observed by flow cytometry; morphological changes of ablated HepG2 cells were observed by transmission electron microscopy; differentially expressed genes between ablated and control cells were screened by transcriptome sequencing and bioinformatics analysis, and the RNA and protein expression of differentially expressed genes in HepG2 cells after pulse ablation was verified by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot. *Results* CCK-8 experiments showed the proliferative and inhibitory abilities of microsecond pulsed electric field ablation on hepatocellular carcinoma cells HepG2 and human hepatocytes L-02 increased gradually with the increase of electric field intensity. However, there was no significant difference in the ablation ability of microsecond pulsed electric field between HepG2 cell and L-02 cell. When the voltage was increased to 1 600 V/cm, the microsecond pulsed electric field significantly induced apoptosis in HepG2 cells compared to control group, with an apoptosis cells ratio of nearly 80% ($P < 0.0001$). Using transmission electron microscopy, it was found that the HepG2 cell membrane was fragmented, the mitochondria were irregular in morphology and typical apoptotic vesicles appeared after microsecond pulsed electric field ablation. Transcriptomics analysis showed the major genes revealed to be involved in microsecond pulse ablation were thousand and one amino acid protein kinase 1 (TAOK1), frizzled protein family receptor 3 (FZD3), calpain 10 (CAPN10), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), and transforming growth factor β -1-induced transcript (TGFB1) and qPCR analysis showed that the differentially expressed genes were mainly involved in the regulation of RNA polymerase II, signaling, and apoptosis after ablation of HepG2 cells by microsecond pulses at 1 600 V/cm, the RNA expression levels of TAOK1 ($P < 0.05$), FZD3 ($P < 0.01$) were significantly up-regulated, and the RNA expression levels of CAPN10 ($P < 0.001$), MMP-9 ($P < 0.01$), and TGFB1 ($P < 0.05$) were significantly reduced in HepG2 cells. Western blot experiments further confirmed that TAOK1 and FZD3 showed an increase in expression levels after microsecond pulse treatment, while CAPN10, MMP-9 and TGFB1 showed a down-regulation of expression levels. *Conclusion* Microsecond pulsed electric field ablation can effectively promote apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and genes such as CAPN10, FZD3 may be involved in the regulation of apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells promoted by microsecond pulsed ablation.

Key words hepatocellular carcinoma; microsecond pulse ablation; apoptosis