



· 综述 ·

# 电穿孔现象与不可逆电穿孔治疗晚期进展期胰腺癌的研究进展

史秋生, 杜联芳, 张焱锋

上海交通大学附属第一人民医院超声医学科, 上海 201620

[摘要] 跨膜电压超过临界值时, 细胞膜会发生电穿孔现象, 物理学表现为细胞膜振荡或纳米级微孔形成, 生物物理学表现为可逆电穿孔和(或)不可逆电穿孔, 前者主要用于细胞内外DNA、基因或粒子递送, 后者近年来开始用于细胞消融。动物实验表明, 不可逆电穿孔细胞消融效果确切, 无散热效应, 并可保存血管、胆管、胰管、肾盂集合系统等细胞外基质完好, 受损的神经功能可恢复, 肾盂黏膜上皮可再生。对晚期进展期胰腺癌患者, 该治疗方法可明显延长无进展生存期、远期无进展生存期和总生存期, 无严重并发症。超声引导下即可完成不可逆电穿孔(IRE)消融治疗过程, 影像学是评估治疗效果的方法之一。

[关键词] 电穿孔; 不可逆电穿孔; 晚期进展期胰腺癌; 介入超声; 超声造影

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.03.024

中图分类号: R735.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)03-0242-04

**Electroporation phenomena and progress on treatment of advanced progressive pancreatic cancer with irreversible electroporation** SHI Qiusheng, DU Lianfang, ZHANG Yanfeng (Department of Medical Ultrasound, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201620, China)  
Correspondence to: SHI Qiusheng E-mail: sqs19631989@163.com

[Abstract] Electroporation or electrical breakdown phenomenon is observed in the plasma membranes where the membrane potential exceeds the critical value, which mechanically induces membrane oscillation, or temporary or permanent nanoscale pore formation that is biophysically called reversible electroporation or irreversible electroporation. Usually, the former is intensively used to transport DNA, genes or particles into cells for decades. However, the latter is initiated to ablate tumor cells recently, and the well-definite ablation is revealed *in vitro* and *in vivo*. Irreversible electroporation could preserve the extracellular matrix of blood vessels bile duct, pancreatic duct and renal pelvis system, and has no heat-sink effects. Furthermore, the injured nerves could recover, and the epithelium cells could regenerate in renal pelvis system. For the patients with advanced pancreatic cancer, the progression-free survival, long-term progression-free survival and overall survival are obviously prolonged after this treatment. This procedure could be flexibly performed under the guidance of ultrasound, and the imaging modality is a promising method to evaluate the ablation effects of irreversible electroporation.

[Key words] Electroporation; Irreversible electroporation; Advanced progressive pancreatic cancer; Interventional ultrasound; Contrast-enhanced ultrasound

胰腺癌发病隐匿, 进展快, 确诊时已多属晚期。文献报道, 胰腺癌1年生存率为27%, 5年生存率为5%~6%, 伴有转移者预期生存期仅2.8~5.7个月<sup>[1]</sup>。除手术和放疗外, 射频消融等是常用的局部治疗方法, 但组织破坏缺乏

选择性, 易损伤邻近重要结构而引起严重并发症<sup>[2-3]</sup>。不可逆电穿孔(irreversible electroporation, IRE)是一种细胞消融新技术, 已取得令人兴奋的临床前期研究结果, 在晚期进展期胰腺癌中的临床治疗中也收获颇丰, 现综述如下。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81571677; 81271596)。

通信作者: 史秋生 E-mail: sqs19631989@163.com

## 1 电穿孔现象

20世纪60年代早中期,悉尼大学植物生理学Alex Hope实验室的Coster博士在研究珊瑚轮藻单细胞的电特性时发现,在细胞跨膜电位从-300 mV超极化向-50 mV除极化转变过程中,细胞膜显示了很好的整流性,当超极化接近-400 mV时,电流瞬间增大而细胞活性不受影响。他描述了该现象并首次提出穿透效应(punchthrough effect)这一术语<sup>[4]</sup>。之后,相似的穿透或电穿孔现象(punchthrough or electrical breakdown phenomenon or electroporation)也在其他黏附细胞及悬浮细胞实验中被观察到<sup>[5]</sup>。

## 2 电穿孔物理学改变

Coster<sup>[5]</sup>发现,电穿孔时细胞膜的物理状态不稳定,示波器显示振荡状态。Crowley<sup>[6]</sup>和Garcia等<sup>[7]</sup>认为,相对于外加电场,脂质双分子细胞膜是一个巨大的弹性层,电场中的电应力(electric stress)或化学应力(chemical stress)会振动并撕碎细胞膜导致细胞破裂。Kinosita等<sup>[8]</sup>于1988年用亚微秒级的脉冲激光荧光显微镜观察到,未受精的海胆卵细胞在临界电场中,0.01%~0.10%面积的细胞膜呈“漏洞状态”(leaky state)。Change等<sup>[9]</sup>于1990年首次用快速冷冻电子显微镜观察处于高压电场中的红细胞,约20 ns后细胞表面出现火山口样凹陷,直径20~120 nm。2012年, Lee等<sup>[10]</sup>用高压电场作用于新西兰兔与约克夏猪肝,扫描电子显微镜观察到细胞表面存在微孔,大小80~490 nm,边界清楚,呈圆形或凹陷状。微孔大小分布不均匀,细胞两极密度最高,近赤道部位孔径最大,而对照肝细胞表面则无改变。电穿孔过程受脉冲幅度、持续时间及频率影响。脉冲幅度决定电穿孔面积,持续时间和频率主要影响微孔密度。Geng等<sup>[11]</sup>认为,细胞像一个电容,细胞质和细胞外液的导电性高于细胞膜数个数量级,因此处于电场中的细胞膜两侧瞬间会形成足够大的跨膜电压。超过临界值时,膜上的脂质分子结构重排并形成纳米级微孔。微孔大小和数量与细胞形状、细胞膜厚度、导电性、电场方向和细

胞中心角度有关。

## 3 电穿孔生物物理学改变

电穿孔现象发生时,细胞膜的通透性增强,平时不能进入细胞的各种分子如荧光染料、DNA、RNA、寡核苷酸、蛋白质、多肽、药物和纳米颗粒等可进入细胞或组织。去除电场影响后,上述活动停止,细胞恢复正常活性状态,该过程称可逆电穿孔(reversible electroporation),生物物理学变化包括弥散、对流、电泳、电渗透、胞饮、细胞膜分子结构重排等多种假说<sup>[9,11]</sup>。去除电场影响后,细胞活性若不能恢复,最终会造成细胞死亡,该过程称IRE,机制尚未完全阐明。有两种假说:机电不稳定性理论(electromechanical instability theory)<sup>[4-6]</sup>和微孔理论(pore theory)<sup>[9-11]</sup>。无论何种机制,IRE的生物物理学结果是细胞内环境平衡受到破坏,最终细胞死亡<sup>[7,11]</sup>。

## 4 IRE治疗肿瘤的临床前期研究

电穿孔概念被引入医学界30多年来,一直聚焦于可逆电穿孔的基因与药物递送<sup>[12]</sup>。直到2005年,Miller等<sup>[13]</sup>体外研究证实,IRE可使人HepG2肝癌细胞发生完全细胞消融。Edd等<sup>[14]</sup>于2006年的体内研究报道,IRE可使SD大鼠肝脏发生微血管闭塞,内皮细胞坏死,大量红细胞渗出肝窦,造成肝实质缺血性损伤,但肝脏大血管结构完整保存。肝细胞边界模糊,胞质苍白,空泡变性或可复性致密化。Lee等<sup>[15]</sup>于超声引导下用IRE消融35 kg约克夏猪肝,消融区与非消融区边界十分清晰,肝细胞完全死亡,消融区周围大血管结构完好,实时超声与大体病理测量相关性好。抗Bax抗体免疫组织化学分析提示,IRE引发的细胞死亡可能是程序性细胞死亡。2011年,Charpentier等<sup>[16]</sup>在剖腹状态下对猪肝门结构进行IRE消融,结果显示IRE能完全消融肝蒂周围肝脏组织,没有附带的胆管、肝动脉和门静脉损伤,肝细胞坏死即刻发生并延伸到大的中央静脉边缘。Onik等<sup>[17]</sup>对6只雄性猎犬前列腺进行超声引导IRE研究,其中一只犬的消融灶包括直肠、尿道和神经血管束。结果显示,从正常组织到完全坏死区,有一个狭窄的过渡区,消

融区组织完全破坏, 2周内消融灶消退, 边界皱缩, 尿道、血管、神经和直肠等结构不受影响。Deodhar等<sup>[18]</sup>对35~50 kg的15只雌性猪的肾脏进行IRE研究, 29个消融灶中有18个包含肾盂或肾盏。结果显示, 36 h内肾皮质完全坏死, 肾盂上皮细胞坏死, 尿道上皮细胞脱落, 肾盂细胞外基质结构完整; 3周后肾皮质纤维化, 肾盂上皮细胞再生, 未发现肾盂及血管损伤。Maor等<sup>[19]</sup>将IRE电场直接加于300~350 g雄性大鼠颈总动脉, 所有6只大鼠均能耐受, 无明显不良反应。28 d观察发现, 血管内皮细胞层变薄, 中层平滑肌细胞数量明显减少, 血管壁的连接层基质完好, 无假性动脉瘤、血栓和坏死形成, 无偏瘫和截瘫等脑血管事件发生。Charpentier等<sup>[20]</sup>于剖腹下将IRE电极插入猪胰腺组织内, 可形成边界清晰的消融灶。José等<sup>[21]</sup>的胰腺导管癌裸鼠移植瘤实验显示, IRE后肿瘤细胞广泛坏死, 增生减缓, 裸鼠生存期明显延长, 仅有短暂性转氨酶、淀粉酶、脂肪酶增高。

大量临床前期研究表明, IRE具有很好的细胞消融效果, 对血管、胆管、胰管、神经束无热损伤, 血管周围的消融灶无散热(heat-sink)或冷却效应(cooling effect), 在肝脏、胰腺、肾脏、前列腺等器官消融中未见严重并发症。

## 5 IRE在晚期进展期胰腺癌临床治疗中的进展

2008年, 美国食品药品监督管理局(Food Drug and Administration, FDA)批准IRE消融技术用于临床肿瘤治疗, 主要是因为IRE状态下活体组织温度仍不超过50℃, 无散热现象, 不损伤血管、胆管等结缔组织<sup>[12]</sup>。2012年, Bagla等<sup>[22]</sup>首次报道1例78岁不可切除胰腺癌, 病灶大小40 mm并包绕腹腔动脉和肠系膜上动脉, 经皮IRE治疗后3个月出现肝转移, 后经肝脏射频消融及吉西他滨化疗6个月, MRI显示无残留病灶, 血清糖类抗原199(carbohydrate antigen 199, CA-199)明显降低。同年, Narayanan等<sup>[23]</sup>报道无法手术切除或放化疗后仍无法切除的晚期进展期胰腺癌14例, 病灶大小25~70 mm。IRE治疗后即刻及24 h CT扫描显示, 所有患者消融区内的血管结构通畅。2例

患者分别于消融后4个月和5个月进行胰腺肿瘤切除, 术后病理显示切缘未发现肿瘤细胞, 无病生存期(disease-free survival, DFS)分别为11和14个月, 未发生与操作过程直接相关的死亡。2014年, Månsson等<sup>[24]</sup>报道无法切除或标准抗肿瘤治疗后不适合化疗或切除的胰腺导管癌5例, 经多学科团队评估后行超声引导下IRE治疗。治疗后30 d超声造影显示, 肿瘤病灶未见残留。1例胰头肿瘤包绕门静脉, 门静脉恰好处于消融区内, 但超声检查显示门静脉未受损伤, 3个月后CT复查病灶缩小, 行胰十二指肠切除术, 组织病理学检查提示切口周围无肿瘤细胞残留。2例患者半年超声造影和CT检查均未显示复发征象。1例发生亚临床胰腺炎, 胰腺淀粉酶及C反应蛋白增高。3例发生白细胞和C反应蛋白升高。术后患者有可耐受的腹痛, 但无严重并发症征象(Dindo-Clavien分级)。Martin等<sup>[25]</sup>的多中心研究报道了200例Ⅲ期胰腺癌患者, 在诱导化疗基础上150例接受IRE, 50例接受胰腺手术切除加IRE边缘强化(margin enhancement)治疗。结果显示, 37%患者有并发症, 级别中位数为2级(1~5级), 总生存期中位数为24.9个月, 提示IRE与放化疗联合应用确实能延长患者总生存期。Kluger等<sup>[26]</sup>单中心报道T4期胰腺癌患者50例53次IRE治疗, 其中29次为IRE原始治疗(primary treatment), 24次为边缘扩展(margin extension)治疗。结果显示, 原始治疗组中90 d死亡5例, 边缘扩大治疗组死亡1例。两组均有5例发生3或4级并发症, 主要是上消化道出血、内脏溃疡和穿孔、门静脉栓塞。

## 6 存在的问题与展望

IRE作为一种崭新的肿瘤局部消融技术, 一进入临床应用阶段即已呈现出广阔的前景, 并在棘手的胰腺癌治疗中得以体现。然而, 许多问题尚待深入探讨: ①适应证与治疗方案选择, 包括治疗途径是选取经皮、经腹腔镜还是剖腹直视下IRE消融, 采用超声、CT或MRI何种引导。②治疗效果评估体系建立: 超声造影、CT或MRI何时介入疗效评估, 以及临床疗效评估参数的设置。③如何在确保完全彻

底消融胰腺肿瘤细胞的同时防止发生严重的并发症。

### [参考文献]

- [1] AROLDI F, BERTECCHI P, SAVELLI G, et al. Pancreatic cancer: new hopes after first line treatment [J]. World J Gastrointest Oncol, 2016, 8(9): 682-687.
- [2] ROMBOUITS S E, VOGEL J A, VAN SANTVOORT H C, et al. Systematic review of innovative ablative therapies for the treatment of locally advanced pancreatic cancer [J]. Br J Surg, 2015, 102(3): 182-193.
- [3] ZHU J, JIN Z. Interventional therapy for pancreatic cancer [J]. Gastrointest Tumors, 2016, 3(2): 81-89.
- [4] COSTER H G L. A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through" [J]. Biophys J, 1965, 5(5): 669-686.
- [5] COSTER H G L. Discovery of "punch-through" or membrane electrical breakdown and electroporation [J]. Eur Biophys J, 2009, 39(1): 185-189.
- [6] CROWLEY J M. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability [J]. Biophys J, 1973, 12(7): 711-724.
- [7] GARCIA P A, DAVALOS R V, MIKLAVCIC D. A numerical investigation of the electric and thermal cell kill distributions in electroporation-based therapies in tissue [J]. PLoS One, 2014, 9(8): 1-12.
- [8] KINOSHITA K J R, ASHIKAWA I, SAITA N, et al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope [J]. Biophys J, 1988, 53(6): 1015-1019.
- [9] CHANGE D C, REESE T S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy [J]. Biophys J, 1990, 58(1): 1-12.
- [10] LEE E W, WONG D, PRIKHODKO S V, et al. Electron microscopic demonstration and evaluation of irreversible electroporation-induced nanopores on hepatocyte membranes [J]. J Vasc Interv Radiol, 2012, 23(1): 107-113.
- [11] GENG T, LU C. Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery [J]. Lab Chip, 2013, 13(19): 3803-3821.
- [12] DAVALOS R V, MIR L M, RUBINSKY B. Tissue ablation with irreversible electroporation [J]. Ann Biomed Eng, 2005, 33(2): 223-231.
- [13] MILLER L, LEOR J, RUBINSKY B. Cancer cells ablation with irreversible electroporation [J]. Technol Cancer Res Treat, 2005, 4(6): 699-705.
- [14] EDD J F, HOROWITZ L, DAVALOS R V, et al. *In vivo* results of a new focal tissue ablation technique: irreversible electroporation [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2006, 53(7): 1409-1415.
- [15] LEE E W, LOH C T, KEE S T. Imaging-guided percutaneous irreversible electroporation: ultrasound and immunohistological correlation [J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(4): 287-294.
- [16] CHARPENTIER K P, WOLF F, NOBLE L, et al. Irreversible electroporation of the liver and liver hilus in swine [J]. HPB (Oxford), 2011, 13(3): 168-173.
- [17] ONIK G, MIKUS P, RUBINSKY B. Irreversible electroporation: implications for prostate ablation [J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(4): 295-300.
- [18] DEODHAR A, MONETTE S, SINGLE G W, et al. Renal tissue ablation with irreversible electroporation: preliminary results in a porcine model [J]. Urology, 2011, 77(3): 754-760.
- [19] MAOR E, IVORRA A, LEOR J, et al. The effect of irreversible electroporation on blood vessels [J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(4): 307-312.
- [20] CHARPENTIER K P, WOLF F, NOBLE L, et al. Irreversible electroporation of pancreas in swine: a pilot study [J]. HPB (Oxford), 2010, 12(5): 348-351.
- [21] JOSÉ A, SOBREVALS L, IVORRA A, et al. Irreversible electroporation shows efficacy against pancreatic carcinoma without systemic toxicity in mouse models [J]. Cancer Lett, 2012, 317(1): 16-23.
- [22] BAGLA S, PAPADOURIS D. Percutaneous irreversible electroporation of surgically unresectable pancreatic cancer: a case report [J]. J Vasc Interv Radiol, 2012, 23(1): 142-145.
- [23] NARAYANAN G, HOSEIN P J, ARORA G, et al. Percutaneous irreversible electroporation for downstaging and control of unresectable pancreatic adenocarcinoma [J]. J Vasc Interv Radiol, 2012, 23(12): 1613-1621.
- [24] MÄNSSON C, BERGENFELDT M, BRAHMSTAEDT R, et al. Safety and preliminary efficacy of ultrasound-guided percutaneous irreversible electroporation for treatment of localized pancreatic cancer [J]. Anticancer Res, 2014, 34(1): 289-293.
- [25] MARTIN R C, KWON D, CHALIKONDA S, et al. Treatment of 200 locally advanced (stage III) pancreatic adenocarcinoma patients with irreversible electroporation: safety and efficacy [J]. Ann Surg, 2015, 262(3): 486-494.
- [26] KLUGER M D, EPELBOYM I, SCHROPE B A, et al. Single-institution experience with irreversible electroporation for T<sub>4</sub> pancreatic cancer: first 50 patients [J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23(5): 1736-1743.

(收稿日期: 2018-01-05 修回日期: 2018-05-20)