

纳秒脉冲电场在运动系统中的应用前景

董延钊^{1a}, 来经天^{1a}, 王泽伟^{1a}, 姚成俊^{1a}, 周海英^{1a}, Ahmad Alhaskawi^{1a},
李鹏飞^{1b}, 涂田^{1b}, 陈永刚², Sahar Ahmed Abdalbary³, 卢荟^{1a}

1. 浙江大学医学院附属第一医院 a. 骨科; b. 整形美容科, 浙江 杭州 310003; 2. 浙江省脉冲电场技术医学转化重点实验室, 浙江 杭州 311100; 3. 埃及贝尼苏韦夫纳赫达大学 物理治疗学院 骨科物理治疗系, 埃及 贝尼苏韦夫 2711860

[摘要] 纳秒脉冲电场 (Nanosecond Pulsed Electric Fields, nsPEF) 是一种新兴的治疗技术, 具有短脉冲宽度和高能量强度等特点。传统的高压脉冲电场已证实该项技术能够成功地应用于食品消毒保存、污水处理、生物育种及恶性肿瘤的电治疗等领域, 具有极大的开发价值与应用前景。现在针对nsPEF在恶性肿瘤物理治疗中的研究也已非常深入, 但在肌骨运动系统还相对有所不足。本研究从nsPEF在骨折、肌腱/韧带疾患及肌肉损伤中入手, 进一步总结nsPEF的重要意义与应用前景, 并对未来相关的研究进行展望。

[关键词] 不可逆电穿孔; 纳秒脉冲电场; 肌骨运动系统; 电治疗

Application Prospect of Nanosecond Pulsed Electric Fields in Motor System

DONG Yanzhao^{1a}, LAI Jingtian^{1a}, WANG Zewei^{1a}, YAO Chengjun^{1a}, ZHOU Haiying^{1a},
Ahmad Alhaskawi^{1a}, LI Pengfei^{1b}, TU Tian^{1b}, CHEN Yonggang², Sahar Ahmed Abdalbary³, LU Hui^{1a}

1. a. Division of Orthopedics; b. Division of Plastic and Aesthetic, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou Zhejiang 310003, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pulsed Power Translational Medicine, Hangzhou Zhejiang 311100, China; 3. Department of Orthopaedic Physical Therapy, Faculty of Physical Therapy, Nahda University in Beni Suef, Beni Suef 2711860, Egypt

Abstract: Nanosecond pulsed electric fields (nsPEF) is an emerging technology with short pulse width and high energy density. Previously, high voltage pulsed electric field has been successfully applied in the industry of food disinfection and preservation, sewage treatment, biological breeding and electrotherapy of malignant tumors which has great development value and application prospect. At present, the ability of nsPEF as a treatment modality for malignant tumors has been extensively studied, the application of nsPEF in the management of musculoskeletal motor system remains in need of further investigation. In this paper, we aim to summarize the existing research concerning the application of nsPEF in treating bone fractures, tendon/ligament disorders, and muscle injuries, and provide a perspective for future studies.

Key words: irreversible electroporation; nanosecond pulsed electric fields; musculoskeletal motor system; electrotherapy

[中图分类号] R197.39

[文献标识码] A

doi: 10.3969/j.issn.1674-1633.2023.05.014

[文章编号] 1674-1633(2023)05-0075-04

引言

高压脉冲电场是近年来新兴的物理、医学等交叉学科研究领域, 其可使细胞膜结构极化并造成介电击穿, 产生细胞膜电穿孔, 提高细胞膜对亲水生物大分子的渗透性。在此基础上, 新兴的纳秒脉冲电场 (Nanosecond Pulsed Electric Fields, nsPEF) 采取更短的脉冲宽度 (10~300 ns) 和更高的强度 (10 kV/cm), 不仅可对细胞膜产生作用, 还可深入细胞内部, 造成多种细胞器的生物电效应。

传统的脉冲电场技术利用电厂的脉冲宽度常在毫秒到皮秒范围内, 电场强度则多限于 1 kV/cm 内, 已被成功应用于食品加工储存^[1]、污水处理^[2]、细胞的基因转化研究^[3]、肿瘤的电消融^[4]等领域, 其是一种高压、短脉冲宽度、高电场强度的电场, 是一种非热效应的物理刺激, 其主要作用机制是通过瞬间产生高电场强度, 导致细胞膜的破坏和电生物学效应, 进而影响细胞的生长、增殖、分化和凋亡等生物学过程。nsPEF 在短时间内释放大量能量的特性避免了组织升温, 既可直接针对肿瘤组织进行打击, 也避免引起神经或血管等重要组织的直接损伤, 在肿瘤治疗方面具有广阔的应用前景^[5]。

近年来, nsPEF 在生物医学领域的应用越来越广泛, 包括细胞治疗、肿瘤治疗、组织工程等领域。同

收稿日期: 2023-04-11

基金项目: 国家自然科学基金 (82027803; 82070516; 82102183)。

通信作者: 卢荟, 主任医师, 主要研究方向为肌腱粘连防治、肢体肿瘤、恶性黑色素瘤的基础和临床以及大数据在骨科、手外科中的应用等。

通信作者邮箱: huilu@zju.edu.cn

时, nsPEF 在骨骼肌和肌腱损伤的修复中也具有潜在的应用前景。nsPEF 可以促进细胞增殖和人血管生成、改善生长因子的表达, 从而加速肌腱和骨骼肌的修复。虽然 nsPEF 在这些领域的研究还处于起步阶段, 但具有巨大的潜力成为一种安全、有效的治疗手段。在此前提下, 针对 nsPEF 在骨科领域的潜在应用前景进行了较多的研究, 本文旨在总结当前 nsPEF 在运动系统中的应用及作用, 并对未来发展前景进行展望。

1 nsPEF在骨组织再生中的应用

骨骼是一类具有动态再生、高度血管化特点的组织, 创伤后在合适的愈合条件下可达到无瘢痕修复, 与人的运动功能密切相关^[6]。传统的骨科治疗骨损伤主要包括闭合复位外固定、切开复位内固定等方式, 在四肢长骨的治疗中具有重要意义, 但针对涉及关节面的复杂性创伤及躯干扁骨、手足部骨折修复等临床问题仍存在一定不足, 有时难以达到满意的恢复效果。

针对这一技术难题, 运动医学领域的研究热点是利用干细胞疗法及人造骨进行创伤修复, 而这个领域与干细胞诱导分化技术密切相关。干细胞疗法在骨科临床应用中具有巨大前景, 但一些技术难点及挑战亟待解决, 包括维持干细胞未分化状态、确保分化方向的单一性及在转运过程中保持细胞活性等问题。在既往的研究中, 诱导干细胞及成骨细胞分化的手段主要包括化学诱导^[7]和蛋白诱导^[8], 不仅过程复杂、人力物力消耗较高, 且难以达到令人满意的成功率。但在包括应用机械干预及施加电场的物理诱导技术手段方面取得了一定的成果, 其技术优势包括在无须反复暴露细胞而可直接对密闭培养基操作, 避免了污染风险^[9]。此外, 在 2012 年针对人多能干细胞诱导分化的实验中, 已证明在体外对搭载人多能干细胞的人造细胞外基质施加脉冲电场刺激并可诱导向成骨细胞分化并促进骨质再生^[10]。在 2021 年一项研究中, Li 等^[11]结合 nsPEF 和促生长激素释放激素 ghrelin 调节大鼠充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) 的分化和软骨再生作用, 并发现当结合使用 nsPEF 和 ghrelin 时, MSCs 的软骨再生作用明显增强, 可明显促进大鼠体内骨软骨组织修复。在此基础上, 其进一步发现 nsPEF 通过上调 Oct4/Nanog 和激活 JNK 信号通路实现使 MSCs 更易接受不同分化刺激的预处理, 而当处理顺序相反时则无法观测到上述变化, 这也为未来的细胞治疗提供了新的思路和策略。此外, 也有研究利用在骨样 MG63 细胞中应用荧光指示剂 dye fluo-4 AM, 证明 nsPEF 刺激可以引起 MG63 细胞内钙动力学变化, 另外, 使用乙二醇四乙酸治疗后, nsPEF 刺激诱导的 MG63 细胞内钙流显著降低, 证明了外源性钙离

子的摄取对增加 nsPEF 刺激后 MG63 细胞内钙离子浓度至关重要^[12] (图 1)。

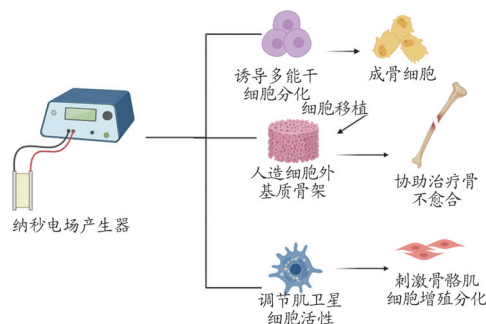


图1 nsPEF在肌骨运动系统疾病中的应用

在新型电话活性生物材料的方面 nsPEF 也具有广阔的应用前景, 例如, 复合导电聚合物的新型生物材料^[13], 解决了传统工艺制作的导电细胞外基质可塑性差的难题, 并在体外试验中表现出成功的促干细胞向成骨细胞分化作用。

2 nsPEF在骨连结损伤修复中的应用

骨连结指骨与骨之间的连结, 其主要方式包括借助纤维结缔组织 (肌腱、跟腱等)、软骨及骨形成关节, 达成复杂的运动功能。骨连结的疾病具有多种表现形式, 早期正确处理并积极进行功能康复, 是良好预后的重要保障。脉冲电场作为一种新型的物理疗法已被广泛研究和应用于肌腱损伤的治疗中, 其可以促进肌腱细胞的增殖、分化和重构, 从而促进损伤组织的修复和再生^[14-15]。

脉冲电场可以促进肌腱细胞的增殖和分化, 这是因为脉冲电场可以激活肌腱细胞的生长和分化因子, 如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子和转化生长因子 β 等, 从而促进细胞增殖和分化。此外, 脉冲电场还可以调节细胞的骨基质蛋白合成, 从而改善肌腱的力学性能^[16-17]。脉冲电场还可以促进肌腱损伤后的重构和修复。研究表明脉冲电场可以促进肌腱细胞的迁移和增殖, 并刺激胶原纤维的合成, 从而加速损伤部位的重构和修复^[18]。此外, 脉冲电场还可以增强细胞间的信号传递, 改善细胞外基质的组织学结构, 从而进一步促进肌腱的重构和修复^[19]。总之, 脉冲电场作为一种新型的物理疗法已被广泛研究和应用于肌腱损伤的治疗中, 具有促进肌腱细胞增殖、分化和重构的作用, 有望成为一种新型的肌腱损伤治疗方法。

nsPEF 作为一种新型的物理治疗手段, 在肌腱损伤方面具有广阔的应用前景。未来, 可以结合 nsPEF 和 3D 打印技术, 针对不同类型和程度的肌腱损伤, 开发出针对性更强、更高效的治疗方案。同时, 随着 nsPEF 技术的不断发展, 其在肌腱修复中的作用机制也将更加清晰, 为其进一步应用提供更多的理论依据^[20], 其在肌腱损伤修复方面的应用前景将会更加广阔。未来的研究

可以进一步探索 nsPEF 对肌腱细胞生长、分化和基质合成的影响,深入研究 nsPEF 的生物学机制。此外,还可以结合 nsPEF 与其他生物材料或生物因子的联合应用,探寻更好的肌腱修复方案。

3 nsPEF在骨骼肌损伤愈合中的应用

骨骼肌约占一个人体重的 40%,在人体内实现多种功能,包括自主运动、呼吸、产热和姿态维持^[21]。它具有非凡的再生和适应生理需求(如生长或训练)的能力,卫星细胞是这种强大再生能力的主要驱动力^[22]。但是,在各种退行性疾病或衰老等状态的过程中,卫星细胞的功能会下降,导致骨骼肌再生受限^[23]。对于这些患者,如果能通过一些外界刺激,调节卫星细胞的活性,可以达到让肌肉再生的目的。有研究发现低强度(2.5 kV/cm) nsPEF 诱导了成肌细胞的增殖和分化,并且与原本存活率相比,不会导致成肌细胞存活率降低^[24]。目前,尚未发现在动物模型上尝试使用 nsPEF 刺激骨骼肌生成的研究。nsPEF 技术在骨骼肌损伤方面的应用前景是非常广阔的,其可以被用于治疗各种肌肉损伤,包括肌肉萎缩、肌肉扭伤、肌肉断裂等。目前,该技术已经在动物模型中得到了验证,显示出了很大的潜力^[25-28]。此外,传统的微秒脉冲电场治疗的同时可能会引发较强的肌肉收缩现象,对治疗过程产生影响^[29-31]。已有研究表明,在 nsPEF 中当施加的脉冲串频率相对较低时,一定范围内增加脉冲串内的脉冲个数将不会引起肌肉收缩强度的大幅增加;反之,则应当限制串内脉冲个数以限制肌肉收缩程度^[32]。

未来,nsPEF 技术在肌肉损伤治疗中的应用可以通过不同的途径来实现。例如,可以将其与生物材料结合使用,以促进组织再生和修复。此外,还可以将该技术与其他先进的治疗方法相结合,以提高治疗效果和减少不良反应。nsPEF 已被研究用于治疗肌肉损伤。一些研究表明 nsPEF 可以促进肌肉细胞的增殖和再生,从而有望帮助恢复肌肉损伤^[33-34]。此外,nsPEF 也可能有助于减轻肌肉疼痛和炎症反应。虽然该技术仍处于早期研究阶段,但它有望成为治疗运动系统疾病的一种新方法。未来的研究可能会进一步探讨 nsPEF 在肌肉损伤治疗中的安全性和有效性,并寻找更好的应用方法和技术。

但目前这一技术在临床应用中还存在一些限制。例如,需要进一步研究 nsPEF 对不同肌肉类型的治疗效果与剂量反应的关系,以及其在长期治疗中的安全性和有效性。此外,该技术在临床应用中的设备和治疗方案也需要进一步优化和标准化。

4 总结与展望

脉冲电场刺激作为一种医学治疗手段,具有操作相

对简单、对人体伤害小、相对安全可控等优点。nsPEF 在高电压和低电压时,对细胞的作用具有两面性,高强度电场击穿细胞膜,可以诱导细胞凋亡,赋予了其在肿瘤治疗方面的可能,而低强度电场不仅不会降低细胞存活率,还能促进细胞增殖分化,可以应用于骨细胞工程,促进骨修复。

目前对 nsPEF 的研究相对较少,对于不同频率和不同强度电场以及电场作用时间对治疗效果的具体影响尚未明确,未来的研究可以涉及更详细的电场参数设置。而且,当下 nsPEF 的实验大多还停留在细胞层面,未来可以更多在动物模型上进行研究。nsPEF 是一种新兴的治疗技术,近年来在运动系统疾病治疗领域得到越来越多的关注。nsPEF 可以通过短时间、高强度的电场作用,对细胞和组织产生瞬时的电压变化和电场效应,从而对运动系统疾病产生治疗效果。目前,nsPEF 在肌腱损伤、软骨修复、骨折愈合等领域已经有了初步的应用研究,并取得了一定的进展^[35-36]。

在肌腱损伤中,nsPEF 可以促进肌腱细胞增殖和修复,并增强肌腱的生物力学性能,从而提高肌腱损伤的治疗效果。在软骨修复中,nsPEF 可以促进软骨细胞增殖和分化,并促进软骨基质的合成和分泌,从而促进软骨修复。在骨折愈合中,nsPEF 可以促进骨细胞增殖和分化,增强骨组织的新生和愈合,从而促进骨折的愈合。

虽然 nsPEF 在运动系统疾病治疗领域中已经有了初步的应用研究,但仍需要进一步开展深入的基础和临床研究,以充分探究其治疗机制和优缺点,并为其在运动系统疾病治疗中的广泛应用提供更为坚实的科学依据。

[参考文献]

- [1] Punthi F, Yudhistira B, Gavahian M, *et al.* Pulsed electric field-assisted drying: a review of its underlying mechanisms, applications, and role in fresh produce plant-based food preservation[J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2022, 21(6): 5109-5130.
- [2] Gomez B, Munekata PES, Gavahian M, *et al.* application of pulsed electric fields in meat and fish processing industries: an overview[J]. *Food Res Int*, 2019, 123: 95-105.
- [3] Capodaglio AG. Pulse electric field technology for wastewater and biomass residues' improved valorization[J]. *Processes*, 2021, 9(5): 736.
- [4] Furukawa T, Ueno T, Matsumura M, *et al.* Inactivation of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in sewage by applying pulsed electric fields[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 424(Pt A): 127382.
- [5] Croaker GM, Wass EJ, Iland HJ. Electric field-mediated gene

- transfer into K562 cells: optimization of parameters affecting efficiency[J]. *Leukemia*, 1990, 4(7): 502-507.
- [6] Eppich HM, Foxall R, Gaynor K, *et al.* Pulsed electric fields for selection of hematopoietic cells and depletion of tumor cell contaminants[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(8): 882-887.
- [7] Chen R, Sain NM, Harlow KT, *et al.* A protective effect after clearance of orthotopic rat hepatocellular carcinoma by nanosecond pulsed electric fields[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(15): 2705-2713.
- [8] Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton[J]. *Eur Spine J*, 2001, 10(Suppl 2): S86-S95.
- [9] Cheng SL, Yang JW, Rifas L, *et al.* Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone[J]. *Endocrinology*, 1994, 134(1): 277-286.
- [10] Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*[J]. *J Cell Biol*, 1991, 113(3): 681-687.
- [11] Li K, Fan L, Lin J, *et al.* Nanosecond pulsed electric fields prime mesenchymal stem cells to peptide ghrelin and enhance chondrogenesis and osteochondral defect repair *in vivo*[J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(5): 927-939.
- [12] Zhou P, He F, Han Y, *et al.* Nanosecond pulsed electric field induces calcium mobilization in osteoblasts[J]. *Bioelectrochemistry*, 2018, 124: 7-12.
- [13] Craiu A, Saito Y, Limon A, *et al.* Flowing cells through pulsed electric fields efficiently purges stem cell preparations of contaminating myeloma cells while preserving stem cell function[J]. *Blood*, 2005, 105(5): 2235-2238.
- [14] Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, *et al.* Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(4): 902-909.
- [15] Seeliger C, Falldorf K, Sachtleben J, *et al.* Low-frequency pulsed electromagnetic fields significantly improve time of closure and proliferation of human tendon fibroblasts[J]. *Eur J Med Res*, 2014, 19(1): 37.
- [16] Perucca Orfei C, Lovati AB, Lugano G, *et al.* Pulsed electromagnetic fields improve the healing process of Achilles tendinopathy: a pilot study in a rat model[J]. *Bone Joint Res*, 2020, 9(9): 613-622.
- [17] Randelli P, Menon A, Ragone V, *et al.* Effects of the pulsed electromagnetic field PST(R) on human tendon stem cells: a controlled laboratory study[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 293.
- [18] Uzun C, Erdal N, Gurgul S, *et al.* Comparison of the effects of pulsed electromagnetic field and extracorporeal shockwave therapy in a rabbit model of experimentally induced achilles tendon injury[J]. *Bioelectromagnetics*, 2021, 42(2): 128-145.
- [19] Huegel J, Choi DS, Nuss CA, *et al.* Effects of pulsed electromagnetic field therapy at different frequencies and durations on rotator cuff tendon-to-bone healing in a rat model[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2018, 27(3): 553-560.
- [20] Robotti E, Zimble AG, Kenna D, *et al.* The effect of pulsed electromagnetic fields on flexor tendon healing in chickens[J]. *J Hand Surg Br*, 1999, 24(1): 56-58.
- [21] Hess R, Jaeschke A, Neubert H, *et al.* Synergistic effect of defined artificial extracellular matrices and pulsed electric fields on osteogenic differentiation of human MSCs[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35): 8975-8985.
- [22] Chen J, Yu M, Guo B, *et al.* Conductive nanofibrous composite scaffolds based on in-situ formed polyaniline nanoparticle and polylactide for bone regeneration[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2018, 514: 517-527.
- [23] Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function[J]. *Calcif Tissue Int*, 2015, 96(3): 183-195.
- [24] Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, *et al.* Satellite cells and skeletal muscle regeneration[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(3): 1027-1059.
- [25] Chakkalakal J, Brack A. Extrinsic regulation of satellite cell function and muscle regeneration capacity during aging[J]. *J Stem Cell Res Ther*, 2012 (Suppl 11): 1.
- [26] Wiedmer P, Jung T, Castro JP, *et al.* Sarcopenia-molecular mechanisms and open questions[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 65: 101200.
- [27] Vadlamani RA, Nie YH, Detwiler DA, *et al.* Nanosecond pulsed electric field induced proliferation and differentiation of osteoblasts and myoblasts[J]. *J R Soc Interface*, 2019, 16(155): 20190079.
- [28] Sachdev S, Potocnik T, Rems L, *et al.* Revisiting the role of pulsed electric fields in overcoming the barriers to *in vivo* gene electrotransfer[J]. *Bioelectrochemistry*, 2022, 144: 107994.
- [29] 董守龙, 姚陈果, 储贻道, 等. 不可逆电穿孔对兔组织阻抗的影响[J]. *高电压技术*, 2015, 41(4): 1402-1408.
- Dong SL, Yao CG, Chu YD, *et al.* Influence of irreversible electroporation on tissues resistance of rabbit[J]. *High Volt Eng*, 2015, 41(4): 1402-1408.
- [30] 宁周雨, 王鹏, 陈颖, 等. 不可逆电穿孔消融技术治疗兔肌肉