

· 论 著 ·

高强度皮秒脉冲电场对人宫颈癌 HeLa 细胞体外作用初探*

张 玉¹,熊正爱^{1△},华媛媛¹,章锡明²,姚陈果²

(1. 重庆医科大学附属第二医院妇产科 400010; 2. 重庆大学输配电装备及系统安全与新技术国家重点实验室 400030)

摘要:目的 探讨高强度皮秒脉冲电场对人宫颈癌 HeLa 细胞的体外损伤效应及机制。方法 固定皮秒脉冲电场脉宽 800 ps、频率 3 Hz、场强 250 kV/cm,根据处理脉冲个数不同(0、1 000、3 000 和 5 000 个),将 HeLa 细胞分为对照组和不同剂量皮秒脉冲处理组,通过 MTT 比色法检测皮秒脉冲对各组细胞在处理不同时间点生长抑制的影响;Fluo-3/AM 探针标记细胞,激光扫描共聚焦显微镜检测细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 改变;Western blot 法检测皮秒脉冲电场作用后 Bax/Bcl-2 蛋白表达量的改变。结果 随着脉冲剂量的增加,细胞死亡率上升,生长受到抑制,12 h 时抑制率最为显著;皮秒脉冲处理可明显升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$ ($P < 0.05$);随着脉冲剂量的增加,细胞内 Bax 蛋白表达量由对照组的 0.205 ± 0.102 增加至各处理组的 0.257 ± 0.083 、 0.586 ± 0.138 和 0.791 ± 0.262 ($P < 0.05$);Bcl-2 蛋白表达量由对照组的 0.694 ± 0.132 降低至各处理组的 0.591 ± 0.145 、 0.364 ± 0.105 和 0.262 ± 0.092 ($P < 0.05$);Bax/Bcl-2 比值显著上调 ($P < 0.05$)。结论 高强度皮秒脉冲电场对 HeLa 细胞有损伤效应,并能诱导其凋亡。

关键词:电磁场;脉冲疗法;细胞凋亡;肿瘤细胞,培养的

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)18-1785-03

In vitro study of damaging effects of intense picosecond pulsed electric field on HeLa cells*

Zhang Yu¹, Xiong Zheng'ai^{1△}, Hua Yuanyuan¹, Zhang Ximing², Yao Chenguo²

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. State Key Laboratory of Power Transmission Equipment and System Security and New Technology, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To investigate the damaging effect and mechanism of intense picosecond pulsed electric field (psPEF) on HeLa cells in vitro. **Methods** Intense psPEF with constant parameters (pulse duration of 800 ps, repetition frequency of 3 Hz, and electric intensity of 250 kV/cm) and different pulses (0, 1 000, 3 000 and 5 000) were performed on HeLa cells. MTT assay was used to trace the effect of growth inhibition at different times. The changes of $[Ca^{2+}]_i$ in HeLa cells were observed by laser scanning confocal microscope using Fluo-3/AM as the calcium fluorescent indicator. Western blot was used to measure the changes of expression level of Bcl-2 and Bax. **Results** The mortality rate of HeLa cells elevated with increasing of the amount of pulses, and the maximum inhibitory rate was observed 12 h after the treatment. Compare with the control group, $[Ca^{2+}]_i$ was markedly increased by treatment with psPEF ($P < 0.05$). By increasing the pulse number, the expression of Bax was increased from 0.205 ± 0.102 in control group to 0.257 ± 0.083 , 0.586 ± 0.138 and 0.791 ± 0.262 in treated groups ($P < 0.05$), and Bcl-2 was decreased from 0.694 ± 0.132 in control group to 0.591 ± 0.145 , 0.364 ± 0.105 and 0.262 ± 0.092 in treated groups ($P < 0.05$), demonstrating significant increase of Bax/Bcl-2 ratio in all treated groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Intense psPEF can damage the HeLa cells as well as inducing tumor cell apoptosis.

Key words: electromagnetic fields; pulse therapy; apoptosis; tumor cells, cultured

脉冲电场(pulsed electric field, PEF)因其独特的生物学效应成为肿瘤治疗研究的热点之一^[1-3],其中毫、微、纳秒脉冲电场已在皮肤癌、胰腺癌、肝癌等肿瘤的治疗领域显示出有效性及优越性^[4],并已有临床实验相继开展^[5-6]。但上述毫、微、纳秒脉冲电场在用于临床治疗时,都需借助有创或微创电极阵列以穿刺的方式引导至肿瘤组织,在一定程度上限制了该方法的适应证及临床应用,寻求一种无创手段将脉冲电场引入人体成为解决上述问题的关键所在。

因皮秒脉冲具有超宽带脉冲频谱,可以通过匹配超宽带冲激脉冲辐射天线进行发射,并将脉冲电场聚焦于特定组织,从而为实现无创治疗提供了可能^[7]。且前期研究结果表明,当电

场脉冲脉宽由毫秒或微秒级降低至纳秒级时,其对细胞的作用靶点逐渐由细胞膜进入胞内结构^[8-10]。如进一步将脉冲电场脉宽降低至皮秒级,其靶向作用于胞内结构的效应是否更加明显?是否可以直接作用于胞内细胞器(如线粒体、内质网等),进而诱导细胞发生凋亡?基于以上物理特性及假设,本实验对人宫颈癌 HeLa 细胞进行体外实验,初步探讨皮秒脉冲对肿瘤细胞的生物电学损伤效应及相关机制,为基于靶向诱导凋亡的无创治疗技术提供基础研究。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 HeLa 细胞由重庆医科大学超声工程研究所提供;RPMI1640 培养基、新生小牛血清、PBS 平衡液和胰蛋

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81172123,50877083)。

△ 通讯作者, Tel:13908359484; E-mail: xiongzhengai61@21cn.com。

表 1 各组细胞在不同时间点细胞死亡率($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	2 h	12 h	24 h	36 h	48 h
对照组	1.03±0.98	2.53±1.42	4.36±2.34	5.52±3.45	6.05±2.56
低剂量组	35.95±1.16 ^a	61.18±1.54 ^{ad}	63.24±1.62 ^a	62.77±0.94 ^a	61.81±1.23 ^a
中剂量组	47.18±1.03 ^{ab}	74.76±1.13 ^{abd}	74.54±1.13 ^{ab}	74.24±1.24 ^{ab}	74.88±3.77 ^{ab}
高剂量组	58.35±1.18 ^{abc}	86.35±1.53 ^{abcd}	85.76±1.67 ^{abc}	85.87±1.69 ^{abc}	85.24±1.68 ^{abc}

^a: $P < 0.01$, 与同时时间点对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与同时时间点低剂量组比较; ^c: $P < 0.01$, 与同时时间点中剂量组比较; ^d: $P < 0.05$, 与同组 2、24、36、48 h 时比较。

白酶购于 Hyclone 公司; MTT、二甲亚砜(DMSO)、Fluo-3/AM、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒和细胞裂解液购于碧云天公司; Bax 兔抗人多克隆抗体、Bcl-2 兔抗人多克隆抗体和羊抗兔 IgG 抗血清购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 主要仪器 高强度电脉冲发生器、电极小室由重庆大学输配电装备及系统安全与新技术国家重点实验室研制; 酶标仪为美国 BIO-RAD 公司产品; 激光扫描共聚焦显微镜为德国 Leica TCS-SP2 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 复苏细胞, 将细胞置于含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 2~3 d 传代 1 次。

1.3.2 高强度电脉冲电场处理 取对数生长期细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化后离心, PBS 液洗涤 2~3 次, 校正细胞密度至 2×10^6 个/毫升备用。固定场强 250 kV/cm、重复频率 3 Hz、脉宽 800 ps, 按照脉冲个数的不同(0、1 000、3 000 和 5 000 个)分为对照组及低、中、高剂量组。每组取 500 μ L 细胞悬液置于电极小室, 给予相应剂量电脉冲, 对照组不予电处理。

1.3.3 MTT 检测细胞死亡率 收集各组细胞, 每组每孔吸取 20 μ L 细胞悬液接种于 96 孔板, 调零组仅加入培养液而不加细胞悬液, 每组设 5 个复孔, 共接种 5 块培养板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 2、12、24、36、48 h, 平板离心机 2 000 r/min 离心 5 min。每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 避光培养 4 h, 弃上清液, 每孔加 DMSO 150 μ L, 振荡 15 min, 测定吸光值(A₅₇₀)。根据公式: 细胞死亡率(%) = (对照组 A₅₇₀ - 实验组 A₅₇₀) / (对照组 A₅₇₀ - 调零组 A₅₇₀) × 100%, 计算出每组细胞死亡率的平均值。以上实验重复 3 次。

1.3.4 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)检测细胞[Ca²⁺]_i 改变 细胞处理及分组同前。将 8 mm × 8 mm 盖玻片置于 24 孔板中, 每孔加入 RPMI1640 培养液 500 μ L, 取各组细胞各 1×10^6 个种植于盖玻片上, 每组设 3 个复孔。由 MTT 结果可知细胞在 12 h 死亡率达到高峰, 因此于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 12 h。吸去培养液, 用无血清培养液洗涤 2 次, 加入 5 μ mol/L Fluo-3/AM 荧光探针, 37 °C 避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次。滴加 10 μ L 50% 甘油于载玻片上, 勾取盖玻片, 将爬有细胞的一面接触甘油盖于载玻片上完成封片。用倒置荧光显微镜物镜观察, 激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 按照 XYZ 三维扫描, 扫描密度为 1 024 × 1 024 采集荧光图像。每组随机选取 8 个单细胞, 用 LSCM 定量分析软件测出各细胞相对荧光强度, 取平均值。

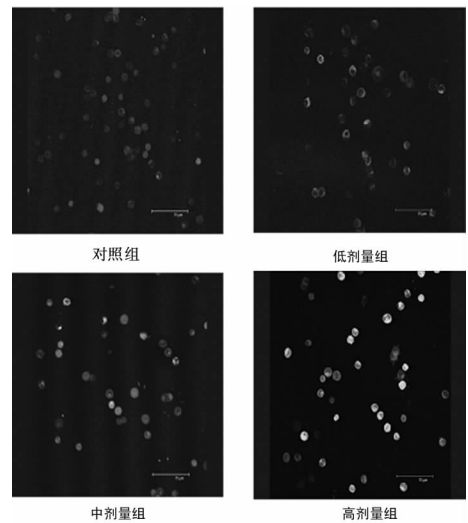
1.3.5 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达 细胞处理及分组同前。收集处理后孵育 12 h 的各组细胞, PBS 重悬并计数, 取 1×10^6 个细胞离心沉淀, 用已加 PMSF 的细胞裂解液

200 μ L 冰浴裂解 1 h, 4 °C 12 000 × g, 离心 10 min, 收集上清液, 用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 以 40 μ g 蛋白质标本上样, 经 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白质, 电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h, 加入 Bcl-2、Bax 一抗 4 °C 过夜, TBST 室温洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗常温孵育 1 h, TBST 室温洗 3 次, 每次 10 min, 凝胶成像系统显色, 检测激活型 Bcl-2、Bax 蛋白水平, 以 β -actin 水平作为等量蛋白上样对照。用 Quantity One 图像分析软件分析结果, 印迹条带吸光度 = 平均吸光度 × 面积。Bax/Bcl-2 = Bax 条带吸光度/Bcl-2 条带吸光度。

1.4 统计学处理 所有实验进行至少 3 次。使用 SPSS18.0 统计分析软件进行统计学处理, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, MTT 结果进行重复测量数据的方差分析, 激光扫描共聚焦及 Western blot 检测采用 AVOVA 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞死亡率 脉冲处理后 2、12、24、36、48 h 各组细胞的死亡率见表 1。相同时间点, 处理脉冲个数越多, 细胞的死亡率越高, 存在明显的剂量依赖关系; 同一处理组细胞, 于处理后 12 h 细胞死亡率达到高峰, 明显高于其余各时间点($P < 0.01$)。



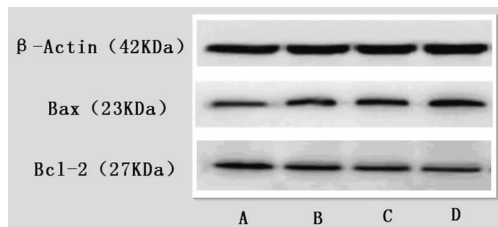
标尺长度为 75 μ m。

图 1 LSCM 透射扫描 HeLa 细胞检测电脉冲对 [Ca²⁺]_i 的影响(×200)

2.2 各组细胞[Ca²⁺]_i 检测结果 HeLa 细胞经 Fluo-3/AM 装载后细胞质呈绿色荧光。低、中、高剂量组扫描视野内可见细胞质内荧光, 与对照组相比普遍增强, 个别细胞荧光极度增强; 对照组细胞普遍为弱荧光强度, 见图 1。各组随机采集 8

个结构清晰、胞膜完整的单 HeLa 细胞,测定其荧光强度并行半定量分析,低、中、高剂量组细胞相对荧光强度分别为 58.40 ± 4.80、75.89 ± 8.93 和 101.72 ± 9.62,均明显高于对照组 (39.14 ± 5.97, $P < 0.01$)。

2.3 Bax、Bcl-2 蛋白表达结果 对照组中 Bax 表达量较低,经皮秒脉冲处理后,其表达量升高,且脉冲剂量越大,表达越强;抗凋亡蛋白 Bcl-2 在各处理组表达较对照组有所减弱 ($P < 0.01$);Bax/Bcl-2 比例上调,促凋亡作用明显,且高剂量组 Bax/Bcl-2 比例上调现象最为明显,其诱导凋亡的作用最强,见图 2、3。



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。

图 2 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2 表达的结果

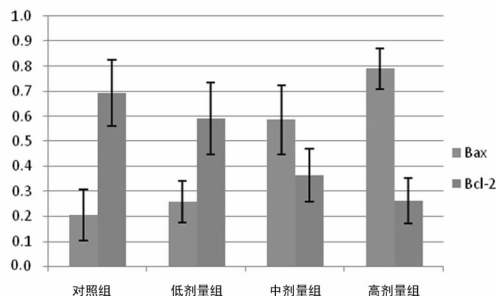


图 3 各组细胞 Bax/Bcl-2 平均光密度值

3 讨论

宫颈癌的发病率居女性生殖系统恶性肿瘤之首,目前主要采取手术结合放、化疗的综合治疗方案。传统治疗在治病的同时往往会对生殖器官造成严重损害,影响性功能及生育能力。随着近年来宫颈癌发病年轻化及患者对生活质量要求的不断提高^[1],寻求一种既能有效杀灭肿瘤细胞又能保持生殖系统完整性的无创治疗手段,是医患双方的共同期待。高强度皮秒脉冲电场因其高场强、低脉宽的物理学特性,具有集中性好、激发能量高、超宽带频谱丰富、方向性精确、控制性良好等优势,成为无创治疗研究的良好选择。

目前,国内外有关高强度皮秒脉冲生物电效应机制的研究甚少,仅有两篇有关皮秒脉冲实验研究的报道,证实了皮秒脉冲对肿瘤细胞的损伤效应是热效应和电效应的联合作用,但并未进行相关机制探讨^[12]。与上述研究不同,本研究一方面通过降低皮秒脉冲参数剂量以避免热效应,同时进行相关机制探讨,用不同实验方法探讨皮秒脉冲电场对 HeLa 细胞的损伤效应及相关机制。

MTT 比色法显示经高强度皮秒脉冲作用后 HeLa 细胞生长受到不同程度抑制,且存在明显的剂量和时间依赖关系。已知细胞死亡可表现为坏死和凋亡,其中坏死即刻发生,而凋亡需要时间来完成。因此,处理后 2 h 细胞生长抑制可能由细胞坏死造成,而处理后 12 h 细胞抑制率增高,则说明细胞可能发生了凋亡。为了研究高强度皮秒脉冲能否诱导细胞凋亡,本研

究同时进行了细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 和 Bax/Bcl-2 蛋白表达量实验检测。

激光扫描共聚焦示皮秒脉冲处理组细胞荧光强度显著高于对照组,提示皮秒脉冲可导致细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。已知哺乳动物细胞核膜与细胞膜的充电时间常数分别为几十纳秒 (ns) 和几百纳秒,而细胞器的充电时间常数仅为几百皮秒 (ps)^[13]。高强度皮秒脉冲电场具有极高的场强、极窄的脉宽 (ps 级),当作用于细胞时,不满足细胞膜电穿孔所需的充电时间,对细胞膜无损伤,而胞内细胞器 (如线粒体、内质网等) 因充电速度极快,可先于细胞膜与核膜受到影响^[14],故可以排除 $[Ca^{2+}]_i$ 升高是由于细胞膜不完整情况下胞外 Ca^{2+} 内流所致,而可能来自于内质网、线粒体等胞内 Ca^{2+} 库的释放。 Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使,已有大量研究证实 $[Ca^{2+}]_i$ 升高参与了凋亡早期信号转导和凋亡的执行阶段。线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的崩解, $[Ca^{2+}]_i$ 升高,使许多与细胞凋亡直接相关的酶或蛋白质被释放到胞质中,就可能通过破坏核内染色质、激活 Caspase 或作用于其他 Ca^{2+} 依赖性蛋白质引起细胞凋亡。本实验中处理组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,很可能进而诱导细胞凋亡。

Bcl-2 基因家族及其相关蛋白 Bcl-2 是研究最早的与凋亡有关的基因,也是目前最受重视的调控细胞凋亡的基因家族。Bcl-2 是细胞凋亡的负调因子, Bax 能拮抗 Bcl-2,进而促进细胞凋亡。因此,细胞中 Bax/Bcl-2 比例可以反映细胞的死亡调控状态。本实验中处理组细胞 Bax/Bcl-2 比例上调,且高剂量组最为明显,说明高强度皮秒脉冲电场能影响细胞的生存状态,促进细胞内 Bax 高表达,从而诱导细胞凋亡的发生。

高强度皮秒脉冲电场因其独特的物理学特性,有望成为继热疗、磁疗、高强度聚焦超声等疗法之后又一种新颖、无创、有效的肿瘤物理治疗手段。目前国外对皮秒脉冲电场的生物学效应研究甚少,本课题组在国内首次对皮秒脉冲电场对肿瘤细胞的生物电学效应进行研究,旨在为基于靶向诱导凋亡的高强度皮秒脉冲无创治疗技术提供研究基础,其有效实验参数的筛选、细胞凋亡分子机制的探讨、动物实验中皮秒天线的辐射及聚焦等诸多领域有待进一步研究解决。

参考文献:

- [1] José A, Sobrevalls 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.
- [2] Shankayi Z, Firoozabadi SM. Tumor growth inhibited by low-voltage amplitude and 5-kHz frequency electrochemotherapy[J]. J Membr Biol, 2011, 244(3): 121-128.
- [3] Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer electrogenetherapy with interleukin-12[J]. Curr Gene Ther, 2010, 10(4): 300-311.
- [4] Neal RE, Davalos RV. The feasibility of irreversible electroporation for the treatment of breast cancer and other heterogeneous systems[J]. Ann Biomed Eng, 2009, 37(12): 2615-2625.
- [5] Heller LC, Heller R. Electroporation gene therapy pre-clinical and clinical trials for melanoma[J]. Curr Gene Ther, 2010, 10(4): 312-317.

- the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(7): 3908-3908.
- [7] Yang C, Zhou JY, Zhong HJ, et al. Exogenous norepinephrine correlates with macrophage endoplasmic reticulum stress response in association with XBP-1[J]. *J Surg Res*, 2011, 168(2): 262-271.
- [8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [9] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [10] Bensidhoum M, Gobin S, Chapel A, et al. Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage[J]. *J Soc Biol*, 2005, 199(4): 337-341.
- [11] Hu DH. Expediting the study on the role of stem cells in wound treatment[J]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2010, 26(4): 247-250.
- [12] Sugiyama K, Ishii G, Ochiai A, et al. Improvement of the breaking strength of wound by combined treatment with recombinant human G-CSF, recombinant human M-CSF, and a TGF-beta1 receptor kinase inhibitor in rat skin[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(5): 1021-1028.
- [13] Stagg J, Galipeau J. Immune plasticity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(180): 45-66.
- [14] Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 305(1): 33-41.
- [15] Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells [J]. *Blood*, 2005, 105(10): 4120-4126.
- [16] Dato GM, Sansone F, Omedé P, et al. Preoperative mobilization of bone marrow-derived cells followed by revascularization surgery: early and long-term outcome[J]. *Int J Artif Organs*, 2012, 35(1): 67-76.
- [17] Zhang H, Bai H, Yi Z, et al. Effect of stem cell factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced bone marrow stem cell mobilization on recovery from acute tubular necrosis in rats[J]. *Ren Fail*, 2012, 34(3): 350-357.
- [18] Zhang F, Zhang L, Jiang HS, et al. Mobilization of bone marrow cells by CSF3 protects mice from bleomycin-induced lung injury[J]. *Respiration*, 2011, 82(4): 358-368.
- [19] Arimura K, Inoue H, Kukita T, et al. Acute lung Injury in a healthy donor during mobilization of peripheral blood stem cells using granulocyte-colony stimulating factor alone[J]. *Haematologica*, 2005, 90(3): ECR10.
- [20] Morstyn G, Campbell L, Souza LM, et al. Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy[J]. *Lancet*, 1988, 1(8587): 667-672.
- [21] Hoffman-Goetz L, Zajchowski S, Aldred A. Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen[J]. *Life Sci*, 1999, 64(3): 191-200.
- [22] Barlow SM, Morrison PJ, Sullivan FM. Plasma corticosterone levels during pregnancy in the mouse [J]. *Br J Pharmacol*, 1973, 48(2): 346P.

(收稿日期: 2012-03-22 修回日期: 2012-05-14)

(上接第 1787 页)

- [6] Horton HM, Lator PA, Rolland AP. IL-2 plasmid electroporation: from preclinical studies to phase I clinical trial [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 423: 361-372.
- [7] Schoenbach KH, Hargrave B, Joshi RP, et al. Bioelectric effects of intense nanosecond pulses[J]. *IEEE Trans Dielectr Electr Insul*, 2007, 14(5): 1088-1107.
- [8] Yao C, Mi Y, Li CX, et al. Study of transmembrane potentials on cellular inner and outer membrane-Frequency response model and its filter characteristic simulation[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2008, 55(7): 1792-1799.
- [9] Schoenbach KH, Beebe SJ, Buescher ES. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses[J]. *Bioelectromagnetics*, 2001, 22(6): 440-448.
- [10] Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, et al. Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells [J]. *FASEB J*, 2003, 17(11): 1493-1495.
- [11] Bray F, Loos AH, Mccarron P, et al. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(3): 677-686.
- [12] Schoenbach KH, Shu X, Ravindra P, et al. The effect of intense subnanosecond electrical pulses on biological cells [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2008, 36(2): 414-422.
- [13] Yao C, Mo DB, Li CX, et al. Study of transmembrane potentials of inner and outer membranes induced by pulsed-electric-field model and simulation[J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2007, 35(5): 1541-1549.
- [14] 龙再全, 姚陈果, 孙才新, 等. ps 电场脉冲无创治疗肿瘤的方法及天线设计[J]. *高电压技术*, 2010, 36(5): 1275-1280.

(收稿日期: 2011-12-19 修回日期: 2012-02-22)