

· 论 著 ·

## 皮质酮对动物骨髓间充质干细胞迁移活性的影响及其修复学意义\*

高文婷, 杨 策, 王海燕, 严 军, 蒋建新<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室/全军交通医学研究所/

创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

**摘要:**目的 研究下丘脑-垂体-肾上腺轴效应激素——糖皮质激素(GC)对不同动物骨髓间充质干细胞迁移活性影响。方法 分离、培养并鉴定大鼠和小鼠骨髓间充质干细胞,通过不同方法观察两种来源的骨髓间充质干细胞趋化活性的变化,评价GC对不同来源的骨髓间充质干细胞迁移活性的影响。结果 尽管不同种属来源的骨髓间充质干细胞在形态上存在一定差异,但一定浓度的GC能够显著增强其趋化活性( $P < 0.05$ )。结论 急性应激条件下,骨髓间充质干细胞迁移活性增强对损伤组织修复具有潜在的临床意义。

**关键词:**糖皮质激素类;间质干细胞;骨髓

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)18-1788-04

**Effects of corticosterone on migration activity of mesenchymal stem cells and its prosthetics significance\***Gao Wenting, Yang Ce, Wang Haiyan, Yan Jun, Jiang Jianxin<sup>△</sup>

(The Fourth Department of Institute of Surgery Research/the Institute for Military Traffic Medicine/

State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Daping Hospital, Third

Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of glucocorticoid, the effector hormone of hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis on the migration activity of bone marrow derived mesenchymal stem cells in different animal species. **Methods** The mesenchymal stem cells in mice and rats were isolated, cultivated and identified. Then their chemotaxis activity was observed and the effects of glucocorticoid in these courses were detected by different methods. **Results** Although the mesenchymal stem cells from different animal species exhibited the difference in morphology, their chemotaxis activity was both enhanced after some concentration of glucocorticoid treatment. **Conclusion** The improvement of mesenchymal stem cells chemotaxis activity is of great importance for the repair of injured tissues after acute stress.

**Key words:** glucocorticoids; mesenchymal stem cells; bone marrow

目前干细胞治疗中,移植的干细胞难以有效归巢并整合到靶组织是严重影响其疗效的关键所在<sup>[1-2]</sup>。因此,有效改善成体干细胞的迁移能力成为克服诸多基于干细胞治疗疾患的难点所在。既往促进干细胞迁移和动员主要应用生长因子、趋化因子、细胞外基质分子等,但外源性应用治疗常伴有药物不良反应,因此,如何有效启动内源性修复机制,促进干细胞动员并向损伤组织归巢成为干细胞治疗的关键所在。

近十年来,成体干细胞为损伤组织修复带来新的曙光。研究证实,移植骨髓源性干细胞有望加快创面愈合速度,提高愈合质量<sup>[3]</sup>。截止2012年3月,在国际注册的干细胞治疗皮肤烧伤临床研究中,分别以移植外源性间充质干细胞和募集内源性内皮祖细胞治疗急性创面。事实上创伤应激早期,机体神经内分泌反应参与调节骨髓干细胞在伤后再分布,表现为骨髓干细胞向损伤组织局部募集,其作用过程涉及骨髓干细胞黏附、趋化、分泌等诸多反应过程<sup>[4]</sup>。鉴于骨髓干细胞具有多向分化潜能,并具有低免疫原性特点,观察下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴效应激素——糖皮质激素是否对骨髓间充质干细胞的迁移作用具有重要意义。因此,本研究以不同动物种属来源的骨髓间充质干细胞为对象,采用

不同方法观察不同浓度的内源性糖皮质激素对其趋化活性的影响,旨在探寻内源性促进骨髓间充质干细胞迁移和归巢能力的新依据。

**1 材料与方法**

**1.1 实验动物与主要仪器、试剂** 清洁级健康雄性 C57/BL6 小鼠,4~8 周龄,体质量 22~30 g;清洁级健康雄性 Sprague-Dauley 大鼠,体质量 80 g 左右。实验动物均购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心[许可证号 SCXK(军)2007-017],于恒温(22±2)℃、12 h 光照/12 h 无光照循环条件下饲养,自由饮食、饮水。流式细胞分析仪(BD FACS Calibur)购自 BD Parmingen 公司(USA);RPMI-1640 培养基和 DMEM/F12 培养基购自 HyClone 公司(USA);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司;牛血清清蛋白购自 Roche 公司(USA);48 孔 Boyden 趋化小室趋化板和聚碳酸酯滤膜(5μm 滤孔)均购自 Neuro Probe 公司(USA);皮质酮(corticosterone)和甲酰三肽(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)均购自 Sigma 公司(USA);小鼠和大鼠单个核细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司;流式抗体 FITC-CD34 和 FITC-CD45(iso; FITC-IgG2b, κ)购自 BD Parmin-

\* 基金项目:国家重点基础研究计划项目(973 计划,2012CB518102);创伤烧伤复合伤国家重点实验室课题(2009ZZ008)。△ 通讯作者,

gen 公司(USA);FcR Blocking Reagent(mouse)购自 Miltenyi Biotec 公司(USA);苏木素液及水溶性伊红液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,其余试剂均为进口或国产分析纯级。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 不同种属动物骨髓间充质干细胞的分离和培养 小鼠骨髓间充质干细胞分离培养参照文献[5]方法,取 4 周龄,雄性 C57/BL6 小鼠,断颈处死后浸泡于 75%(V/V)的乙醇中消毒 1 min。将双下肢皮肤剥离后迅速取出双侧股骨和胫骨,剪开两侧骨端,用 2 mL 注射器吸取干细胞培养基冲取骨髓,吹打混匀后接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,加入总量 20 mL 工作培养基,置入 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 培养箱中培养。48 h 后首次换液,以后每 2~3 天换液 1 次。大鼠骨髓间充质干细胞分离培养参照文献[6]方法,大鼠断颈处死后,浸入 75%(V/V)的乙醇溶液。同法取出双侧股骨和胫骨,浸入含有双抗的 D-Hanks 液中,在无菌条件下洗涤并去除肌肉及附着软组织。吸取 10 mL 工作培养基于 10 mL 小烧杯中。剪开长骨两端,用注射器带 18 G 针头将骨髓冲出,使用 5 mL 滴管吹打骨髓液至肉眼不可见组织块。将获得的细胞悬液全部接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,同法培养。原代接种 24 h 后,将原培养基吸弃并用 20 mL D-Hanks 液轻轻洗涤后加入等量新鲜工作培养基。接种后第 6 天细胞约达到 90% 融合,进行实验或传代。

1.2.2 不同种属动物骨髓间充质干细胞的表型鉴定 消化并计数第 3 代细胞,方法同上。将每 10<sup>6</sup> 个细胞分装在 1 个 1.5 mL EP 管中,共 8 管。分别向上述每管细胞悬液中加入 PE-CD34 及同型对照单克隆抗体、PE-CD90 及同型对照单克隆抗体、FITC-CD45 及同型对照单克隆抗体、无荧光标记的 CD73 单克隆抗体及 APC-IgG<sub>1</sub> 同型对照单克隆抗体原液 1 个测试管,并得到细胞悬液体积 100 μL。4 °C 避光条件下反应 30 min。向每管中加入 1 mL 含有 3% 胎牛血清的 PBS,充分混匀后 350×g,4 °C 离心 5 min,并重复 1 次。除无荧光标记的 CD73 单克隆抗体管外,其余管用 200 μL 3% 胎牛血清的 PBS 重悬,置 4 °C 保存。无荧光标记的 CD73 单克隆抗体管重悬后加入 1 个 TEST 的 APC- IgG<sub>1</sub> 单克隆抗体,并调整细胞悬液体积至 100 μL。上机检测前分别从各管取出 50 μL,其余 150 μL 加入 7-AAD 做细胞活性检测。剩余的 50 μL 上机检测。

1.2.3 大鼠骨髓间充质干细胞趋化能力检测 用 0.125% 胰蛋白酶消化培养的第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞,以培养基终止消化后,计数细胞;1 000 r/min 离心 5 min;用一定体积的预温结合缓冲液(binding medium, BM),将细胞密度调整至 1×10<sup>6</sup>~2×10<sup>6</sup> 个/毫升;采用 Millicell Transwell 小室,于 24 孔板趋化下室加入终浓度为 100 nmol/L fMLP 趋化液 600 μL;放入悬挂式趋化上室,趋化滤膜孔径为 8 μm,加入 5×10<sup>4</sup> 个 MSCs,总体积为 400 μL;分别含不同浓度糖皮质激素(0、75、100、1 500 ng/mL)的细胞悬液;将趋化小室置于 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 培养箱孵育 4 h 后,孵育结束后,平稳取出上室,弃去液体,以湿棉棒轻轻拭去上方未穿膜细胞;经过干燥、固定、染色处理步骤后,显微镜观察计数,趋化结果以趋化指数(chemotactic index, CI)表示。CI 以 100 倍镜下 4 个视野中穿膜骨髓间充质干细胞数目的平均值反映[7]。

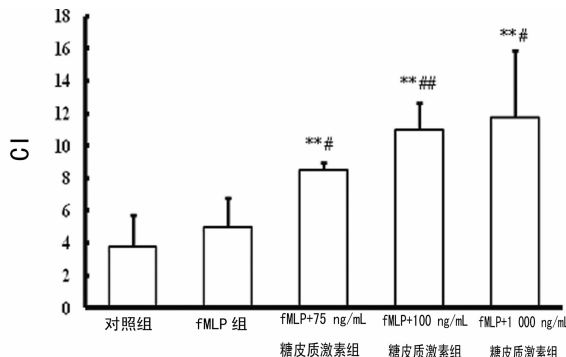
1.2.4 小鼠骨髓间充质干细胞趋化能力检测 获取原代培养 7 d 的小鼠骨髓间充质干细胞,用 BM 将细胞密度调整至 1×

10<sup>6</sup> 个/毫升,采用 Neuro Probe 趋化小室,向趋化小室下板各孔加入 28 μL 100.0 nmol/L 的 fMLP,以 BM 为对照;覆盖 5 μm 孔径的趋化滤膜;趋化小室上板加入 50 μL 含不同浓度糖皮质激素(0、75、100、1 500 ng/mL)的细胞悬液;将趋化小室置于 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 培养箱孵育,37 °C 培养箱孵育 4 h 后,孵育结束后,取出滤膜,经过刮膜、干燥、固定、染色处理步骤后,同法镜下观察并计算 CI。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较用 *t* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

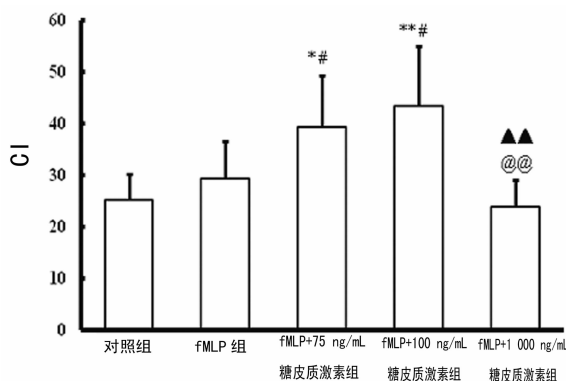
2 结果

2.1 不同种属骨髓间充质干细胞鉴定 在所选 4 个表面标记中,各分子的阳性表达率为:CD34 ≤ 0.35%、CD45 ≤ 0.40%、CD73 ≥ 95.4%、CD90 ≥ 99.0%。根据国际细胞治疗协会(ISCT)的定义[8],对骨髓间充质干细胞的表面标记表达率的要求为:阴性标记 CD45、CD34 的阳性率不高于 2%;阳性标记 CD73、CD90 阳性率不低于 95%。因此,本实验分离培养的两种骨髓间充质干细胞符合该要求。



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , ##:  $P < 0.01$ , 与 fMLP 组比较。

图 1 糖皮质激素对大鼠骨髓间充质干细胞趋化能力的影响



\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; ▲▲:  $P < 0.01$ , 与 fMLP +75 ng/mL 糖皮质激素组比较; @@:  $P < 0.01$ , 与 fMLP+100 ng/mL 糖皮质激素组比较。

图 2 糖皮质激素对小鼠骨髓间充质干细胞趋化能力的影响

2.2 糖皮质激素对大鼠骨髓间充质干细胞趋化能力的影响 趋化实验结果发现,低浓度糖皮质激素(75、100 ng/mL)可以显著增加大鼠间充质干细胞向 fMLP 的迁移( $P < 0.01$ ),而高浓度糖皮质激素(1 500 ng/mL)也对骨髓间充质干细胞的趋化

功能有明显促进作用( $P < 0.05$ ),见图 1。

**2.3 糖皮质激素对小鼠骨髓间充质干细胞趋化能力的影响**  
趋化实验结果发现,低浓度糖皮质激素(75、100 ng/mL)可以显著增加小鼠间充质干细胞向 fMLP 的迁移( $P < 0.05$ ),而高浓度糖皮质激素(1 500 ng/mL)则对骨髓间充质干细胞的趋化功能没有显著影响( $P > 0.05$ ),见图 2。

### 3 讨 论

骨髓间充质干细胞作为一种具有多向分化能力的成体干细胞,可分化为包括软骨细胞、骨细胞、骨骼肌细胞、脂肪细胞、肝细胞、血管内皮细胞、心肌细胞、神经细胞和胶质细胞在内的 3 种胚层细胞,在损伤组织修复中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。既往研究证实,骨髓间充质干细胞能够在小鼠皮肤创面归巢,改善创面愈合质量,加速创面愈合过程<sup>[10-11]</sup>;反之,骨髓间充质干细胞动员受损时,小鼠创面愈合延迟。恢复动员骨髓间充质干细胞后,创面愈合明显改善<sup>[12]</sup>。此外,在骨髓间充质干细胞参与损伤修复过程中,最近研究发现,骨髓间充质干细胞除了其强大的组织修复能力外,通过免疫调节功能对局部免疫和炎症反应微环境有重要调节作用,如骨髓间充质干细胞可以抑制 T、B、NK 细胞的增殖和 B 细胞的迁移<sup>[13]</sup>;抑制 Th1 细胞分泌促炎细胞因子,促进 Th2 细胞产生抗炎细胞因子;负向调节抗原递呈细胞树突状细胞(dendritic cells, DCs)的分化和功能<sup>[14-15]</sup>;当骨髓间充质干细胞暴露于 IFN- $\gamma$  可以获得抗原递呈功能等。此外,骨髓间充质干细胞的免疫调节作用还有赖于分泌一些可溶性介质,如 PGE2, HGF, TGF- $\beta_1$  和 IL-10。一些临床研究表明,外周血干细胞的数量与疾病的预后密切相关。因此,基于骨髓间充质干细胞重要免疫调节功能和免疫豁免特点以及向损伤组织趋化特性,动员足量骨髓间充质干细胞到损伤组织,有助于调节局部微环境,促进损伤组织功能修复。

为获得足量的内源性骨髓间充质干细胞,既往研究多采用药物干预方法,主要使用骨髓动员剂等外源性药物动员骨髓干细胞<sup>[16-18]</sup>。临床多采用集落刺激因子,如重组人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)。然而,在 hG-CSF 动员骨髓间充质干细胞和内皮祖细胞等骨髓来源细胞在创面大量聚集并分泌生长因子的同时,能引起 30% 的治疗患者骨痛、头痛、四肢乏力,甚至引发急性肺损伤<sup>[19-20]</sup>。因此,探寻内源性动员机制对于损伤组织修复具有重要价值。

近年发现,神经内分泌反应对骨髓间充质干细胞动员、增殖、分化和修复功能有潜在调控作用,如交感肾上腺髓质和其他内分泌器官源性激素(如去甲肾上腺素、雌激素)可以促进不同类型骨髓干细胞从骨髓池外流。鉴于神经内分泌反应对于骨髓间充质干细胞数量的影响以及效应激素在损伤微环境中的重要作用,调节应激反应动员骨髓干细胞的策略可能具有潜在临床意义。尽管机体遭受应激、损伤时,外周血液循环中干细胞数量增多可能难以完全满足严重损伤时创面修复需要,但科学调理内源性应激激素水平,对于增强骨髓间充质干细胞动员的促修复效果可能有重要价值。例如,在对严重创(烧)伤、休克、外科大手术后常见并发症(如脓毒症)治疗中发现,脓毒性休克患者肾上腺皮质功能不全发生率约为 50%,而应用小剂量糖皮质激素(如氢化可的松,每日剂量不超过 300 mg, 50~100 毫克/次, 3~4 次/天,治疗持续 1 周),使脓毒性休克逆转率和患者生存率显著提高。然而值得注意的是,大剂量糖皮质激素治疗严重脓毒症并不能提高患者的生存率,且增加了再

感染机会。这可能与不同浓度糖皮质激素所产生的特定效应有关。

前期的研究证实,血浆糖皮质激素水平与应激模型有关<sup>[21-22]</sup>。慢性长时间心理应激后糖皮质激素为 46~80 ng/mL。跑步、游泳等疲劳应激后糖皮质激素数分钟内快速升高,其浓度范围为 100~550 ng/mL,应激后 1 h 的血浆糖皮质激素维持在 150~480 ng/mL,应激后 3 h,迅速降低至 40 ng/mL。而其他生理应激如妊娠、疼痛等状态下糖皮质激素水平也显著升高,如小鼠妊娠 16 d 血浆糖皮质激素达到峰值,约 1 079~1 687 ng/mL,电击小鼠血浆皮质酮可达 80.6~330.0 ng/mL。作者在前期实验中发现,强迫跑步应激后 1 h,小鼠血浆皮质酮与对照相比升高了约 25 倍,约 75 ng/mL,在此条件下观察到外周血骨髓间充质干细胞数量增多。因此,本研究采用 75、100、1 500 ng/mL 终浓度的糖皮质激素模拟急性应激和部分生理应激条件下糖皮质激素对骨髓骨髓间充质干细胞趋化作用的影响,对于揭示动物体内骨髓骨髓间充质干细胞动员反应具有重要意义。虽然高、低浓度的糖皮质激素对大鼠骨髓间充质干细胞趋化均有促进作用,然而对于小鼠而言,低浓度的糖皮质激素可显著增加小鼠骨髓间充质干细胞向 fMLP 的迁移,而高浓度糖皮质激素(1 500 ng/mL)则对骨髓间充质干细胞的趋化功能无显著影响。结合临床实际,提示低浓度糖皮质激素的良好疗效可能与骨髓间充质干细胞向损伤组织的趋化有关,相关机制尚待深入研究。

目前,在临床应用中,虽然糖皮质激素可引起一系列包括医源性库欣综合征、骨质疏松、类固醇性糖尿病、高脂血症等不良反应,但此类反应严重程度与用药剂量、时间呈正相关。探索不同剂量糖皮质激素的治疗效应,加深对糖皮质激素作用机制的认识,可以有效避免或减轻这些不良反应,如低钠、高钾、高蛋白饮食预防药物性糖尿病和高脂血症;补充钙剂和维生素 D 防治骨质疏松;合并感染时联合应用抗生素预防感染扩散及加重等。因此,应用包括糖皮质激素在内的神经内分泌激素动员内源性骨髓间充质干细胞向损伤部位募集可能成为促进损伤组织修复的重要手段之一。

### 参考文献:

- [1] Okano H, Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363(1500): 2111-2122.
- [2] Smart N, Riley PR. The stem cell movement[J]. *Circ Res*, 2008, 102(10): 1155-1168.
- [3] Fu X, Fang L, Li X, et al. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury[J]. *Wound Repair Regen*, 2006, 14(3): 325-335.
- [4] Hannoush EJ, Sifri ZC, Elhassan IO, et al. Impact of enhanced mobilization of bone marrow derived cells to site of injury[J]. *J Trauma*, 2011, 71(2): 283-289.
- [5] Tropel P, Noël D, Platet N, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 295(2): 395-406.
- [6] Ausim AS, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in

- 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)