

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.13.050

晚期 NSCLC 患者血液 EGFR 基因检测研究进展 *

常 宁 韩志萍 张信信 张 勇 张 艰[△]

(第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:随着表皮生长因子受体酪氨酸酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)在非小细胞肺癌(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)治疗中的应用,患者的生活质量及生存期均有很大程度的提高,但是,组织表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)检测结果为能否接受 EGFR-TKI 治疗的先决条件,而晚期肺癌患者却因组织量少、质量不佳、组织异质性无法进行检测,血液 EGFR 检测便应运而生,本研究将综述晚期非小细胞肺癌(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)患者血液 EGFR 基因检测研究。**方法:**检索 Pub-med、SCI、Medline 及中国生物文献数据库中晚期非小细胞肺癌患者血液 EGFR 基因检测的相关研究。**结果:**对于晚期 NSCLC 患者,血液 EGFR 基因检测有较高的敏感度与特异度,并且能够较好的预测患者对 EGFR-TKI 的疗效以及进行耐药监测。**结论:**当组织获取困难及质量不佳时,血液可替代组织行 EGFR 基因检测。

关键词:非小细胞肺癌;表皮生长因子受体;血液;基因突变

中图分类号:R446.1;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)13-2594-04

The Detection of EGFR Mutation Status in Blood in Advanced Non-small Cell Lung Cancer*

CHANG Ning, HAN Zhi-ping, ZHANG Xin-xin, ZHANG Yong, ZHANG Jian[△]

(Department of Respiratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: With the application of EGFR-TKI in treatment for NSCLC patients, Survival time and quality of patients improved greatly. But the results of EGFR testing is the necessary condition for treatment of EGFR-TKI. But tumor tissues may often be of insufficient quality or quantity for EGFR mutation testing in NSCLC patients. Meanwhile the results may be bias owing to heterogeneity. Therefore liquid biopsies will be imperative. This study aims to review the researches of EGFR testing in blood for the different results. **Methods:** We searched Pubmed, SCI and CBM for the literatures about EGFR mutation testing in blood. Risk ratio (RR) and hazard ratio (HR) were used as measures for clinical response to EGFR-TKIs and PFS for the mutant and wild patients. **Results:** The testing of EGFR seems to have higher sensitivity and specificity, meanwhile it can predict the efficacy of EGFR-TKI and monitor the drug resistance. **Conclusion:** Blood can become an effective substitution for EGFR mutation testing for advanced NSCLC when it often be of insufficient quality or quantity of tumor tissue.

Key words: NSCLC; EGFR; Blood; Mutation

Chinese Library Classification(CLC): R446.1; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)13-2594-04

前言

肺癌是全球癌症死亡率最高的疾病,肺癌中约 85%为非小细胞肺癌^[1]。多数患者诊断时已为晚期,治疗主要以化疗为主,严重影响患者的治疗效果及生存期。然而,随着 EGFR-TKI 在 NSCLC 特别是肺腺癌治疗中的应用,患者的生活质量及生存期均有很大程度的提高^[2]。大量研究显示,能否受益于 EGFR-TKI,取决于组织 EGFR 基因突变状态,然而,由于多数肺癌患者确诊时已为晚期,不能进行手术,穿刺活检成为进行 EGFR 基因检测主要标本来源。但是,在临床工作中,有 10%-50%的肺癌患者面临组织量少、组织不合格,即使在控制良好

的大型临床试验中,仍有 50%的患者无法获取组织,另外,对于 EGFR-TKI 耐药,需要二次活检明确是否有耐药突变(如 T790M)的患者,组织获取更是难上加难^[3]。基于上述困境,探索一种能够替代组织的检测标本刻不容缓。理论而言,负载肿瘤细胞、基因或蛋白的标本均有可能成为组织的替代,如外周血、浆膜腔积液、分泌物以及体液等,其中外周血检测因其创伤小、操作方便而唾手可得,成为近年研究的热点。我们将对所有通过晚期肺癌患者血液行 EGFR 基因检测的研究进行综述,内容包括血液 EGFR 基因检测的理论基础、检测方法、血液 EGFR 基因检测效能以及血液 EGFR 检测结果对 EGFR-TKI 疗效预测。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272518);北京医学奖励基金会专项科研基金项目(273)

作者简介:常宁(1990-),硕士研究生,主要研究方向:肺癌诊断及治疗, E-mail: changninggirl@163.com

[△] 通讯作者:张艰(1970-),博士生导师,教授,主要研究方向:肺癌诊断及治疗, E-mail: 13991802390@163.com, 电话: 13991802390

(收稿日期:2016-11-19 接受日期:2016-12-16)

1 循环肿瘤 DNA(ct-DNA)

早在 1948 年 Mandel 等学者首次发现 ct-DNA 存在于罹患疾病患者与健康者的外周血中,随后较多的研究集中于肿瘤患者与健康者外周血中 ct-DNA 的数量变化,以及 ct-DNA 能否作为早期诊断疾病的标记物。直到 1977 年,Leon SA 等学者首次发现肿瘤患者血液中 ct-DNA 较健康者数量高。随后较多研究亦给予证实,Massimiliano Paci 等^[4]学者测定 151 例肺癌患者与 79 名健康者外周血中 ct-DNA 的数量,发现肺癌患者外周血中平均 ct-DNA 的浓度为 12.8 ng/mL,而健康者外周血的平均浓度仅为 2.9 ng/mL,两者具有明显的统计学意义。虽然关于 ct-DNA 已经有较多研究,但其来源还不明确,研究认为^[5],其可能来源于肿瘤细胞的坏死、正常细胞的坏死与凋亡、循环肿瘤细胞(CTCs)裂解释放,并且血液中 ct-DNA 与肿瘤组织 DNA 有相同的遗传变异特性,基于上述基础理论,表明可使用肺癌患者血液行 EGFR 基因检测,指导肺癌的靶向治疗。

但是,血液中 ct-DNA 多呈片段化,平均 DNA 大小仅为 100-200 bp 左右,且突变的 DNA 混杂在大量的野生型 DNA 中,同时,ct-DNA 拷贝数低,肿瘤患者中每毫升血中血浆游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 中突变的拷贝数仅在 100 个左右,有 25% 的肿瘤患者的突变拷贝数甚至低于 10 个每毫升,基于上述血液中 ct-DNA 片段化、数量少、突变比例低的特点^[6,7],提示血液 EGFR 基因检测需要较高的 DNA 富集技术以及较高灵敏度检测方法。

2 血液 EGFR 基因检测方法

2.1 cf-DNA 富集技术

由于血液中 cf-DNA 数量较少,cf-DNA 的富集水平将成为后续检测的关键。目前 cf-DNA 的富集技术主要有酚-氯仿法, DNA 吸附柱法和硅胶磁珠法。其中酚-氯仿法回收产物浓度较高,回收效率大约为 30% 左右,有助于提高后续检测。但是由于其处理后的样品中有残余的血浆蛋白,将会对后续的 PCR 产生抑制,将会影响检测效率。DNA 吸附柱法和硅胶磁珠法都是通过 DNA 和二氧化硅结合,来达到分离 DNA 的目的。相比较酚-氯仿法,这两种方法能够有效的消除血浆中各种成分对 PCR 反应的抑制作用。DNA 吸附柱法和硅胶磁珠法的回收效率大约在 50% 左右,但是这两种方法得到的回收产物浓度较低。cf-DNA 的富集为血液 EGFR 检测的关键步骤,所以需要在提高富集效率的同时,也提高富集浓度,从而提高血液 EGFR 基因检测的灵敏度。

2.2 血液 EGFR 基因检测技术

直接测序法依然是组织基因检测的金标准,但是,因其操作复杂,敏感度低^[8],无法应用于血液 EGFR 基因检测中。目前,可用于血液 EGFR 基因检测方法包括高效变相液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, DHPLC)^[9]、突变扩增阻滞系统法(Amplification refractory mutation system, ARMS)^[10,11]、微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)^[12]、BEAMing^[13]及下一代测序技术(Next-Generation Sequencing, NGS)^[14]。其中, DHPLC 检测速度快,方法简单,可用于已知突变检测,但其却

不能区分突变类型且其敏感性较低。ARMS 是目前我国法规明确批准的血液检测方法,在 EGFR 已知突变的检测上优势明显,但检测范围也局限于已知突变。ddPCR, BEAMing 均是近年发展起来的高灵敏度新技术,其检测敏感度达 0.01%,甚至更低,适用于已知突变的检测,可用于特定突变的绝对定量检测,但其也和 ARMS 方法一样,仅能够测定已知突变。而 NGS 能够弥补这一缺陷,其在多靶点检测的药物临床研究和发现未知突变上独具优势,能够提供更加全面的基因信息,但存在技术和成本的瓶颈,使其临床应用受阻^[15]。

3 血液 EGFR 敏感突变检测研究

目前,已有较多的研究使用晚期 NSCLC 患者外周血行进行 EGFR 检测,外周血检测敏感度达 46%-82%,特异度达 90%-99%^[16-18]。Kimura 等^[19]学者 2006 年首次报道了外周血行 EGFR 基因检测研究,其对 43 例非小细胞肺癌患者外周血进行基因检测,结果显示外周血 EGFR 检测的敏感性为 50%,特异性为 86%,血液与组织的一致率达 73%,同时发现接受 EGFR-TKI 治疗的患者,7 例疾病缓解者外周血中均有 EGFR 基因检测,7 例疾病稳定的患者外周血中仅有 1 例突变,病情进展患者的外周血无 1 例突变,证实血液 EGFR 突变可作为预测临床疗效的标记物。Bai 等^[20]学者进行了目前样本量最大的血液 EGFR 检测研究,其使用 DHPLC 法检测了 230 例晚期 NSCLC 患者外周血和组织中 EGFR 基因突变,结果显示外周血与组织的一致率达 74%。研究还进一步研分析了 EGFR 突变情况对 EGFR-TKIs 的治疗效果,结果显示,与野生型相比,突变型各组 PFS 均显著延长,OS 无显著差异,血液中检测到 EGFR 突变者与 EGFR 野生型患者相比,PFS 较长,证实血液 EGFR 检测较高的准确度。随后,外周血 EGFR 检测研究突飞猛进,检测方法也层出不穷,Liu 等^[20]在 2013 年使用 ARMS-PCR 法对 86 例晚期 NSCLC 患者行外周血的检测结果显示,与组织标本相比,外周血行 EGFR 突变检测的敏感性和特异性分别为 67.5% (27/40)和 100% (46/46),两者的一致率达 84%。同年 ASCO 报道^[20]的一项研究(25)中,同样使用 ARMS-PCR 法对 224 份配对的组织和血浆标本行 EGFR 基因检测,显示外周检测的敏感性为 77% (69/90),特异性为 96% (129/134),EGFR 突变阳性和阴性预测价值分别为 93% (69/74)和 86% (129/150),总一致性为 88% (198/224),进一步分析发现,接受 EGFR-TKIs 治疗的患者中,血液 EGFR 突变者较血液 EGFR 野生型患者的 PFS 长。上述两项研究使用同一种检测方法,检测结果一致,充分验证 ARMS-PCR 检测方法较高的临床使用价值及方法的稳定性。同时,研究者也在不断探索敏感度更高及更能全面反映肺癌基因谱的检测方法,以期降低血液检测的假阴性率及提高对肺癌基因谱的认识,这些方法包括 ddPCR、BEAMing 及 NGS。Yung 等^[21]在 2009 年使用 ddPCR 对 35 例晚期 NSCLC 患者行血浆 EGFR 基因检测,与组织检测结果比较,ddPCR 的敏感度与特异度分别为 92%与 100%,同时对 EGFR-TKI 治疗前后均有血浆样本的 5 例患者中发现,4 例患者血浆中突变浓度下降,其中 3 例患者影像学评估部分缓解,1 例达到完全缓解,突变浓度未下降的患者疾病进展,表明 ddPCR 不仅仅能够定性

检测突变,更能够定量对疾病进行监测。Oxnard 等学者^[22]的研究也发现使用 ddPCR 测定晚期肺癌患者血液 EGFR 基因突变的敏感度为 67%,特异度为 100%。同时,Zhu 等学者^[13]对比了组织与血浆基因检测结果,与组织比较,ddPCR 的敏感度和特异度分别为 81.82%与 91.44%。上述研究均为 ddPCR 的临床应用立下更为坚实的询证医学证据。对于 NGS 检测技术,为目前最热门的检测方法,虽其敏感性低于数字检测平台,但其不仅仅能测定已知突变,更重要的是进行全基因组测序,更加全面反映肺癌基因组。王洁等学者^[14]使用 NGS 对 12 例有 EGFR 基因突变的晚期肺癌患者外周血进行测定,结果显示敏感性与特异性分别为 89%及 100%,同时检测出多种未知突变,为肺癌的靶向治疗进展提供依据。

4 血液 EGFR 耐药监测研究

虽然 EGFR-TKI 提高了 NSCLC 患者的生存期及生活质量,但均会在治疗 8-10 个月时出现耐药使治疗失败,这些耐药基因包括 T790M 突变^[23]、C-Met 基因扩增^[24]、BIM 多态性缺失^[25]、K-ras 基因突变^[26]、BRAF 基因突变^[27]、EML4-ALK 融合基因^[28]及转化为小细胞肺癌^[29]等。其中 T790M 突变所占比例最大,大约为 50%-60%^[14]。伴着针对 T790M 突变的三代 EGFR-TKI 经 FDA 批准的进程,越来越多的研究者关注耐药后突变检测。然而确定有无耐药突变,需要对患者进行二次活检,再次进行基因检测,这便成为靶向治疗进程中的困境。而组织的替代品,血液将在此进程发挥巨大作用。Oxnard 等学者^[22]对有 EGFR 突变且接受 EGFR-TKI 治疗的 9 例患者行动态血液 T790M 突变检测,首次发现血液检测结果较影像学评估结果能够更早的发现疾病进展,有 6 例患者血液中测到 T790M 耐药突变,且 3 例患者组织检测结果也给予证实,表明血液可动态监测耐药。Thompson 等学者^[30]对接受一代 EGFR-TKI 治疗耐药患者的活检组织进行检测,未发现 T790M 突变,而血液监测过程中,却发现 T790M 突变浓度逐渐上升,根据血液检测结果换用三代靶向药物后,影像学提示病情部分缓解,证实血液耐药监测的临床价值。

5 展望

目前,组织行 EGFR 基因检测依然是指导肺癌患者接受 EGFR-TKIs 的金标准,但对于晚期 NSCLC 患者,组织获取困难、组织不合格,特别是对于接受 EGFR-TKIs 治疗耐药的患者,血液将会补充组织基因检测的不足。此外,血液 EGFR 基因检测结果不仅能够指导患者能否接受 EGFR-TKI 治疗,同时其方便、无侵袭性的特点使其能够用于 EGFR-TKI 治疗过程中的动态监测,包括突变拷贝数的定量监测及耐药监测,更加精准地指导肺癌患者的靶向治疗。随着非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识成功发表^[15],血液检测正从临床研究走向临床实践,但是,我们还需要研发敏感度更高、更稳定的检测技术,更好地推进肺癌靶向治疗。

参考文献(References)

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [2] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multi-centre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8): 735-742
- [3] Costa DB, Kobayashi S, Tenen DG, et al. Pooled analysis of the prospective trials of gefitinib monotherapy for EGFR-mutant non-small cell lung cancers[J]. Lung Cancer, 2007, 58(1): 95-103
- [4] Paci M, Maramotti S, Bellesia E, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2009, 64(1): 92-97
- [5] Sanchez-Vives MV, Nowak LG, McCormick DA, et al. Cellular mechanisms of long-lasting adaptation in visual cortical neurons in vitro[J]. J Neurosci, 2000, 20(11): 4286-4299
- [6] Pérez-Callejo D, Romero A, Provencio M, et al. Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring[J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(5): 455-465
- [7] Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Herreros-Pomares A, et al. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer-which one will win [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(5): 466-482
- [8] Huang JS, Dong QG, Xu KL, et al. Epidermal growth factor receptor mutation in serum circulating DNA and selective targeting therapy against lung cancer[J]. Tumor, 2007, 27: 968-972
- [9] Bai H, Mao L, Wang HS, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(16): 2653-2659
- [10] Liu X, Lu Y, Zhu G, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies[J]. J Clin Pathol, 2013, 66(12): 1065-1069
- [11] Xu F, Wu J, Xue C, et al. Comparison of different methods for detecting epidermal growth factor receptor mutations in peripheral blood and tumor tissue of non-small cell lung cancer as a predictor of response to gefitinib[J]. Onco Targets Ther, 2012, 5: 439-447
- [12] Zhu G, Ye X, Dong Z, et al. Highly Sensitive Droplet Digital PCR Method for Detection of EGFR-Activating Mutations in Plasma Cell-Free DNA from Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer[J]. J Mol Diagn, 2015, 17(3): 265-272
- [13] Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291 [J]. Lung Cancer, 2015, 90(3): 509-515
- [14] Yang X, Zhuo M, Ye X, et al. Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20810-20824
- [15] 吴一龙.《非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识》规范中国 EGFR 血液检测,推动肺癌精准治疗[J]. 浙江医学, 2015, (24): 1959-1960
- Wu Yi-long. Experts consensus of EGFR testing in blood of NSCLC in China》standard EGFR testing in blood of China and promote the

- precise treatment of lung cancer [J]. Zhejiang Medical, 2015, (24): 1959-1960
- [16] Karachaliou N, Mayo-de ICC, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EUR-TAC Trial[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(2): 149-157
- [17] Mok T, Wu YL, Lee JS, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21 (14): 3196-3203
- [18] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(9): 1345-1353
- [19] Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, et al. EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib [J]. Br J Cancer, 2006, 95(10): 1390-1395
- [20] Mok T. Detection of EGFR-activating mutations from plasma DNA as a potent predictor of survival outcomes in FASTACT 2: A randomized phase III study on intercalated combination of erlotinib (E) and chemotherapy(C), 2013 ASCO Abstract 8021
- [21] Yung TK, Chan KC, Mok TS, et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6): 2076-2084
- [22] Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(6): 1698-1705
- [23] Kang-Yi Su, Hsuan-Yu Chen, Ker-Chau Li, et al. Pretreatment Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) T790M Mutation Predicts Shorter EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Response Duration in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. J Clin Oncol, 2012, 30: 433-440
- [24] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. Science, 2007, 316(5827): 1039-1043
- [25] Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer[J]. Nat Med, 2012, 18(4): 521-528
- [26] Califano R, Landi L, Cappuzzo F, et al. Prognostic and predictive value of K-RAS mutations in non-small cell lung cancer[J]. Drugs, 2012, 72 Suppl(1): 28-36
- [27] Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(26): 3574-3579
- [28] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(26): 4247-4253
- [29] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(75): 75ra26-75ra26
- [30] Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(23): 5772-5782

(上接第 2585 页)

- [27] Robert E Neal II, Ravi Singh, Heather C Hatcher, et al. Treatment of breast cancer through the application of irreversible electroporation using a novel minimally invasive single needle electrode [J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(1): 295-301
- [28] Viktoria N Pehlivanova, Iana H Tsoneva, Rumiana D Tzoneva. Multiple effects of electroporation on the adhesive behaviour of breast cancer cells and fibroblasts[J]. Cancer Cell International, 2012, 12(1): 9-23
- [29] Moritz F Kircher, Jürgen K Willmann. Molecular Body imaging: MR Imaging, CT, and US. Part I. Principles[J]. Radiology, 2012, 263 (3): 633-643
- [30] David Gianfelice, Abdesslem Khiat, Mourad Amara, et al. MR Imaging-guided Focused US Ablation of Breast Cancer: Histopathologic Assessment of Effectiveness Initial Experience [J]. Radiology, 2003, 227(3): 849-855
- [31] Department of Surgery, St George Hospital, University of New South Wales, et al. Cryotherapy-a mature ablation technique[J]. HPB, 2006, 8(3): 179-181
- [32] Won Gu Lee, Utkan Demirci, Ali Khademhosseini. Microscale electroporation: challenges and perspectives for clinical applications[J]. Integr Biol (Camb), 2009, 1(3): 242-251