

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.007

高压电场不可逆电穿孔诱发 A549 肺癌细胞凋亡的实验研究 *

卢 强 闫小龙 黄立军 韩 勇 张新伟 李小飞[△]

(第四军医大学唐都医院胸外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的: 不可逆电穿孔是治疗肿瘤的新兴技术, 本文探讨高压电场引起的不可逆电穿孔诱发 A549 肺癌细胞凋亡的特点。 **方法:** 选择处于生长周期的 A549 细胞, 共分为 A-G7 个组进行研究, 其中 A 组为不施加电场的空白对照组, B-G 组为实验组, B 组施加 500 V/cm 强度高压电场, G 组施加 1750 V/cm 的高压电场, BG 组之间各组的高压电场强度间隔为 250 V/cm。采取细胞抑制实验、不可逆电穿孔示踪实验、细胞凋亡实验, 检验 A549 细胞细胞凋亡与电场强度的关系。 **结果:** ① 各实验组与对照组、各实验组之间的细胞抑制率, 均存在显著性差异 ($P < 0.05$); ② 电场强度 ≥ 1000 V/cm 时, 细胞不可逆电穿孔率明显增加, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 电场强度 ≥ 1500 V/cm 时, 细胞不可逆电穿孔率增加不明显, 无统计学意义 ($P > 0.05$); ③ 电场强度 ≥ 1250 V/cm 时, 细胞早期凋亡率明显增加, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论:** 高压电场不可逆电穿孔诱发 A549 肺癌细胞发生早期凋亡的强度为 1250 V/cm, 发生晚期凋亡的强度为 1500 V/cm, 且凋亡率随着电场强度的增加持续升高。这对于高压电场不可逆电穿孔效应引起的肿瘤细胞凋亡机制的研究具有重要意义。

关键词: 高压电场; 不可逆电穿孔; A549 细胞; 细胞抑制; 细胞凋亡

中图分类号: R734.2, Q691 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)03-425-04

Empirical Study of A549 Lung Cancer Cells Apoptosis Induced by Irreversible Electroporation of High Voltage Electric Field*

LU Qiang, YAN Xiao-long, HUANG Li-jun, HAN Yong, ZHANG Xin-wei, LI Xiao-fei[△]

(Department of Thoracic Surgery, Tang Du Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: Irreversible Electroporation is the treatment of tumors of emerging technologies. Evaluate the character of the apoptosis of A549 lung cancer cells induced by irreversible electroporation of high voltage electric field had been studied in this article. **Methods:** Selecting A549 lung carcinoma cells being in growth cycle. There were seven groups named A to G, and the control group is A without electric field. Exerting high voltage electric field of 500 V/cm to B and 1750 V/cm to G. The distance of high voltage electric field is 250 V/cm. Cell inhibition assay, tracing the irreversible electroporation and apoptosis assays were taken to evaluate the relationship between the apoptosis of A549 lung carcinoma cells with high voltage electric field. **Results:** ① Significant differences of cell inhibition rate were found between each subgroup ($P < 0.05$). ② Significant differences of irreversible electroporation rate were found when the electric field strength increased upon 1000 V/cm ($P < 0.05$). No significant differences of irreversible electroporation rate were found when the electric field strength increased upon 1500 V/cm ($P > 0.05$). ③ Apoptosis in prophase increased significantly when the electric field strength was greater than 1250 V/cm ($P < 0.05$). **Conclusion:** Apoptosis in prophase appeared at the electric field strength of 1250 V/cm with irreversible electroporation. Apoptosis in advanced stage appeared at the electric field strength of 1500 V/cm with irreversible electroporation, and the apoptosis rate continuing to increase along with the electric field strength increasing. It was important that high voltage field induced the apoptosis of A549 lung carcinoma cells.

Key words: High voltage electric field; Irreversible electroporation; A549 lung cancer cells; Cell inhibition; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R734.2, Q691 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)03-425-04

前言

电穿孔(electroporation)是指当细胞置于高强度的电场中时, 由于高压电场的作用, 使细胞膜通透性明显增加, 引起细胞外液分子扩散入细胞膜内的现象。这种现象主要是由于细胞膜中的双分子脂膜在高压电场中被击穿而造成的, 并且随着作用强度的增加及时间的延长而变化, 可以由早期的可逆电穿孔

(reversible electroporation, RE)转变为不可逆电穿孔(irreversible electroporation, IRE)^[1]。细胞可逆电穿孔技术多用于将各种物质, 诸如 DNA、RNA、蛋白质、药物、抗体和荧光探针等, 转载进入细胞的研究中。不可逆电穿孔由于具有对细胞造成不可逆的破坏^[1], 最终引起细胞死亡的特性, 近年来已经被尝试的应用于肿瘤的微创治疗。不可逆电穿孔消融治疗技术不是依靠传统热能消融, 不存在热沉降现象。因此对位于血管旁的肿瘤, 可获

* 基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2012JM4022); 唐都医院创新科技发展基金资助项目(2012CXTS005); 唐都医院骨干人才基金资助项目
作者简介: 卢强, 男, 博士, 主要从事食管癌及肺癌发病及治疗研究, Tel: 86-29-84717551, E-mail: luqiang@fmmu.edu.cn

[△] 通讯作者: 李小飞, 男, 博士, 主任医师, 主要从事气管移植以及肺、食管疾病的研究, Tel: 86-29-84777436, E-mail: lxfchest@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2013-10-18 接受日期: 2013-11-17)

得不损伤血管而有效灭活肿瘤的效果。

研究发现,电穿孔的效果依赖于高压电场施加的大小、持续时间、细胞的大小和形状等肿瘤相关特性^[2],而且已经在肝、脑、肾、胰等器官中进行了肿瘤的相关治疗^[3-9],并取得了一定的疗效。但电场强度作用于肿瘤细胞引起其发生不可逆电穿孔的相关性,以及其对于肺癌细胞的生物学特性影响机制仍不清楚。我们前期的研究发现,细胞外电场可以明显影响肺癌细胞的生物学特性^[10,11],不同强度电场对于肺癌细胞的粘附、迁移及侵袭等环节有明显的抑制作用^[12]。本研究中,我们针对不同强度电场对于 A549 肺癌细胞的电穿孔效应,采用 CCK-8 法检测细胞存活率、碘化丙啶(propidiumiodide, PI)染液法计算细胞电穿孔率,使用流式细胞仪检测细胞凋亡,对其引起的肺癌细胞凋亡的相关特性进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

10%FBS (Life Technologies, Gaithersburg, USA), 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素 (Biosera, UK), RPMI 1640 培养基 (Gibco, Grand Island, USA), A549 肺癌细胞 (American Type Culture Collection, USA), 0.25%胰蛋白酶 (Gibco, Grand Island, USA), PBS (Gibco, Grand Island, USA), CCK-8 试剂 (日本同仁化学研究所), 碘化丙啶(propidiumiodide, PI)染液 (Sigma, USA), Annexin V-FITC (美国 BIO-RAD 伯乐公司), 电脉冲发生器 (TP3032, Teslaman, 大连, 中国), 全自动酶标仪 (SIGMA960, 德国), 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司 FACSCalibur 型)。

1.2 细胞培养

在含有 10%FBS (Life Technologies, Gaithersburg, USA), 100 U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素(Biosera, UK)的 RPMI 1640 培养基(Gibco, Grand Island, USA), 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 A549 肺癌细胞(American Type Culture Collection, USA)。取处于生长期的细胞, 用 0.25%的胰蛋白酶 (Gibco, Grand Island, USA) 消化, 10mL 离心管 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS (Gibco, Grand Island, USA)洗涤 2-3 次, 吹打, 调整细胞浓度至 2×10^4 /mL, 进行细胞抑制实验、不可逆电穿孔示踪实验及细胞凋亡检测。

1.3 不可逆电穿孔各实验组参数设置

参照 Kranjc 等^[13]高压电场致肿瘤细胞不可逆电穿孔的阈值剂量计量, 设置电脉冲发生器 (TP3032, Teslaman, 大连, 中

国)电极间距为 4 mm, 对照组 A 组未经电场处理, B-G 6 个实验组施加的电场强度分别为: 500、750、1000、1250、1500、1750 V/cm。其他电场条件: 脉冲宽度 100 μ s, 重复频率 1Hz, 连续 9 个直流方波。电场强度计算公式: 电场强度 = 电压 / 距离。

1.4 细胞抑制实验

采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 经公式计算存活率, 存活率 = 实验组吸光率 OD 值 / 对照组吸光率 OD 值; 抑制率 = 1 - 存活率。取经高压电场处理后的各组实验用细胞悬液 100。接种于 96 孔培养板, 置于孵育条件为 37℃、5%CO₂ 的培养箱 24h, 然后加入 10 后加入置于孵育条试剂 (日本同仁化学研究所), 继续孵育 2 h。全自动酶标仪 (SIGMA960, 德国) 分别检测各实验组在 450 nm 波长的 OD 值, 每组测 5 次, 实验重复 3 次, 取平均值, 计算细胞存活率及抑制率。

1.5 不可逆电穿孔示踪实验

参照 Miklavcic D^[14]等的研究, 调整细胞浓度为 2×10^6 /ml, 实验组细胞悬液中加入碘化丙啶(propidiumiodide, PI)染液 (美国 Sigma 公司), 调整浓度至 20 μ g/ml。对照组无电场处理, 各实验组经不同强度电场处理后, 立即使用流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司 FACSCalibur 型) 检测 PI 染色阳性的 A549 肺癌细胞, 计算细胞染色率, 即为电穿孔率。

1.6 细胞凋亡检测

实验步骤与不可逆电穿孔示踪实验略有不同, 各实验组先经不同强度高压电场处理后, 然后加入 Annexin V-FITC (美国 BIO-RAD 伯乐公司) 以及 PI, 孵育 10 min 后, 使用流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司 FACSCalibur 型) 检测。双参数图中, AnnexinV 及 PI 均为阴性的为正常细胞, AnnexinV 阳性及 PI 阴性的为早期凋亡细胞, AnnexinV 及 PI 均为阳性的为晚期凋亡细胞。

1.7 统计学处理

所有结果采用 SPSS18.0 统计软件进行分析, 计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 两组间数据比较采用 t 检验, 采用单因素方差分析和组间多重比较检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 不同强度高压电场对 A549 肺癌细胞的抑制作用

对照组 A 组与各实验组之间以及各实验组之间存在显著性差异, 有统计学意义 (表 1, 图 1, $P < 0.05$), 即对照组 A 组的细胞抑制率明显少于各实验组, 同时各实验组之间的细胞抑制

表 1 CCK-8 法检测不同强度高压电场对 A549 肺癌细胞的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of different high voltage electric field on the A549 lung cancer cells with CCK-8

分组 Groups	电场强度(V/cm) Electric field strength(V/cm)	存活率(%) Survival rate(%)	抑制率(%) Inhibition rate(%)
A (Control group)	0	100	0
B	500	91.3408	9.6592
C	750	80.4625	19.5375
D	1000	71.2130	30.7870
E	1250	60.6812	39.3188
F	1500	54.5376	45.4624
G	1750	43.5381	56.4619

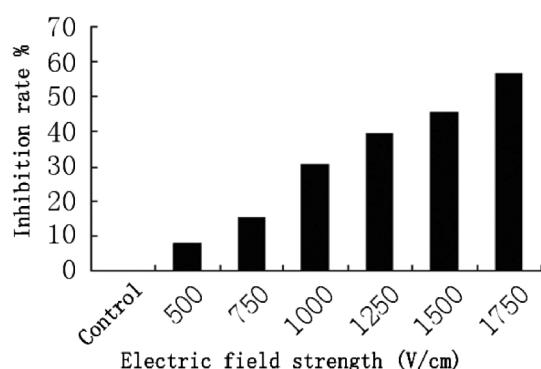


图1 CCK-8 法检测 A549 细胞抑制率 - 电场强度曲线图

Fig. 1 Inhibition rate - electric field strength in A549 cells with CCK-8

表2 不同强度高压电场对 A549 细胞电穿孔 PI 阳性染色率的影响

Table 2 Effects of different intensity high voltage electric field on the PI positive staining rate of A549 cells

分组 Groups	电场强度(V/cm) Electric field strength	PI 阳性染色率(%) PI(+) (%)	P (vs 对照组)
A (Control group)	0	11.730± 3.155	
B	500	13.302± 3.056	0.177
C	750	14.464± 4.332	0.058
D	1000	57.637± 6.214	< 0.05
E	1250	78.075± 5.362 ^a	< 0.05
F	1500	95.634± 2.963 ^a	< 0.05
G	1750	97.185± 2.824 ^b	< 0.05

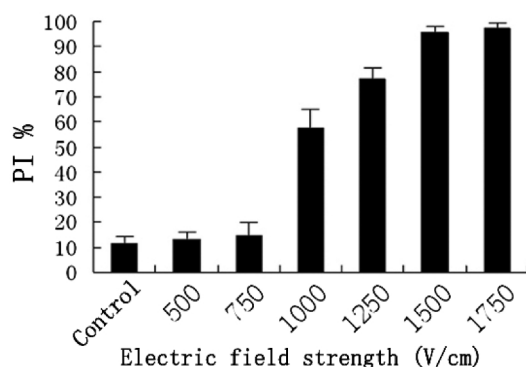
Note; a; VS 1000 V/cm group (1250 V/cm group: 7.026×10^{-19} ; 1500 V/cm group: 2.128×10^{-10})b; VS 1500 V/cm group, $P=0.153$.

图2 不同强度高压电场对 A549 细胞的电穿孔作用

Fig. 2 Effects of different intensity high voltage electric field on the irreversible electroporation of A549 cells

率随着电场强度的增加而明显增加。

2.2 不同强度高压电场对 A549 肺癌细胞的不可逆电穿孔作用

①实验 B、C 组(500、750 V/cm)与对照组 A 组之间比较,细胞不可逆电穿孔率无明显增加,无统计学意义(表 2,图 2, $P>0.05$);②实验 D 组(1000 V/cm)与对照组 A 组之间比较,细胞不可逆电穿孔率明显增加,有统计学意义(表 2,图 2, $P<0.05$);③实验 D 组(1000 V/cm)与实验 E 组(1250 V/cm)、F 组(1500 V/cm)之间比较,细胞不可逆电穿孔率明显增加,有统计学意义(表 2,图 2, $P<0.05$);④实验 F 组(1500 V/cm)与实验 G 组(1750 V/cm)之间比较,细胞不可逆电穿孔率无明显增加,无统计学意义(表 2,图 2, $P>0.05$)。

2.3 不同强度高压电场对 A549 肺癌细胞的凋亡作用

实验各组和对照组的结果及统计学分析情况见图 3。①实

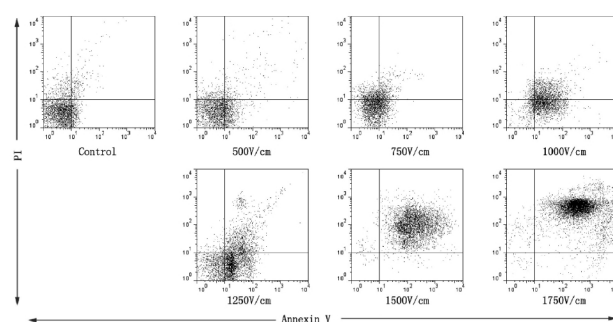


图3 不同强度高压电场对 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of different intensity high voltage electric field on the apoptosis of A549 cells

验组中的 500 V/cm、750 V/cm 处理组, 和对照组无显著性差异, 无统计学意义(图 3, $P>0.05$);②实验组中自 1000 V/cm 处理组开始, 各实验组对照组间均存在显著性差异, 有统计学意义(图 3, $P<0.05$);③实验组各处理组之间比较:a)1000 V/cm 和 1250 V/cm 处理组之间无显著性差异, 1500 V/cm、1750 V/cm 处理组之间无显著性差异, 无统计学意义(图 3, $P>0.05$); b)1000 -1250 V/cm 处理组和 1500 -1750 V/cm 处理组间存在

显著性差异, 有统计学意义(图 3, $P<0.05$)。

3 讨论

肺癌是目前危害人类生命健康的重要疾病之一。由于肺癌细胞的高转移生物学特性, 致使肺癌治疗效果不佳。早期发现的肺癌患者, 虽然经过手术、化疗、放疗等各种相关治疗, 仍存在复发及转移的可能性; 晚期发现的肺癌患者, 由于已经丧失

了手术机会,采取的治疗方案,常常由于肿瘤的原发灶无法完全抑制,更加易于发生身体其他部位的转移。研究表明,造成肺癌细胞转移的原因十分复杂,多种因素包括肿瘤细胞局部微环境、肿瘤细胞分泌的各种因子等,作用于肿瘤细胞本身,促进肿瘤细胞的粘连迁移及侵袭等生物学能力,最终造成肿瘤细胞的转移^[15,16],因此肿瘤细胞本身的生物学特性是肿瘤转移的关键环节^[17]。如何有效抑制肿瘤细胞的生物学转移特性,甚至杀伤肿瘤细胞,降低肿瘤的转移几率,是目前肿瘤研究及治疗的热点及难点。

对于手术后出现局部复发或远处转移的患者,以及发现较晚或身体条件无法耐受手术的患者,除了可以选择放疗等传统治疗方法,还可以采用极低温度或高热等物理手段进行消融治疗,灭活肿瘤病灶^[18-20]。此类方法的优点是患者机体负担轻,但仍存在无法针对空腔脏器进行消融治疗肿瘤病灶,或者肿瘤病灶与血管等重要部位毗邻,进行消融易发生严重并发症^[19,20]。这些都限制了消融治疗肿瘤病灶的应用。研究表明^[3,21],不可逆电穿孔通过高强度电场作用于肿瘤细胞,造成肿瘤细胞膜形成不可逆的孔洞,使细胞内外电解质平衡紊乱,细胞内容物外流,引起细胞凋亡。这种电穿孔主要是针对细胞的膜性结构起作用,而对于非细胞结构无明显的作用。具有不损伤血管壁及气管壁中的非细胞结构的优点^[5,22],这在动物实验及在人体肝、脑等多个器官的肿瘤治疗中得到了验证^[3,23]。但是,不可逆电穿孔治疗肿瘤的机制,包括其对于肿瘤细胞的粘附、迁移、侵袭及细胞凋亡等过程的作用还不清楚。我们前期的实验研究表明,不同强度电场对于肺癌细胞的粘附、迁移及侵袭等环节有明显的抑制作用^[12]。本研究主要明确高强度电场是否可以促进肺癌细胞的凋亡或引起肺癌细胞坏死。在实验最低的高压电场强度条件下,A549肺癌细胞就出现了明显的抑制,且随着电场强度的变化出现了线性相关的特点,说明在非生理条件的高压电场中,肺癌细胞的抑制率与电场强度成正相关。这与我们前期进行的生理直流电场的实验研究结果不同^[11,17],说明在不同强度及特性的电场中,肺癌细胞的凋亡特征不同,更有利于对于肺癌转移及复发机制的理解。不同强度电场促进肺癌细胞不可逆电穿孔的效果不同。

磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine,PS)在细胞凋亡早期,就暴露在细胞膜外表面上,是最早期的凋亡信号,因此采用能与PS结合的Annexin V进行细胞染色,可以明确细胞的早期凋亡。本研究中我们发现,在电场强度为1250 V/cm时,Annexin V阳性染色的细胞明显升高。提示对于A549肺癌细胞,引起早期凋亡的高压电场强度为1250 V/cm。PI是一种高选择性的荧光染色剂,其与双链DNA结合后,可以释放出超出20倍的红色荧光,易于被流式细胞仪检测。细胞膜完整时,PI无法进入细胞内。而当细胞晚期凋亡出现明显的穿孔时,PI可以通过细胞孔洞进入细胞进行染色。因此通过PI染色,可以明确细胞晚期凋亡或死亡。实验发现,电场强度达到1000 V/cm时,细胞的PI染色明显增加,达到将近60%;电场强度达到1250 V/cm时,细胞的PI染色率达到80%左右;电场强度达到1500 V/cm时,细胞的PI染色率达到95%左右。这些说明,当电场强度在1000-1500 V/cm之间时,细胞PI阳性染色率显著上升,电场强度大于1500 V/cm时,肺癌细胞死亡率上升不显著。说明对于

A549肺癌细胞,产生不可逆电穿孔引发晚期凋亡或死亡的高压电场强度为1500 V/cm。我们认为,高压电场强度与A549肺癌细胞的抑制程度密切相关。随着高压电场强度的增加,肺癌细胞在电场中明显受到抑制。这与宫颈癌细胞在电场中的表现类似^[24],但其电场强度对于凋亡的影响还有不同之处。

总之,高压电场不可逆电穿孔诱发A549肺癌细胞早期凋亡的强度为1250 V/cm,产生不可逆电穿孔引发晚期凋亡或死亡的高压电场强度为1500 V/cm,并且随着电场强度的增加其凋亡率持续升高。这对于高压电场不可逆电穿孔效应引起的肿瘤细胞凋亡机制的研究具有重要意义,下一步的实验则需要对于不同电场强度下,肺癌细胞转移相关的细胞膜蛋白、细胞骨架、细胞周围微环境的影响做更深入的研究,同时探讨高压电场对人体组织器官的影响,以期高压电场不可逆电穿孔消融治疗方法早日应用临床治疗。

参考文献(References)

- [1] Davalos RV, Mir IL, Rubinsky B. Tissue ablation with irreversible electroporation[J]. *Ann Biomed Eng*, 2005, 33(2): 223-231
- [2] Teissie J, Rols MP: An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation [J]. *Biophys J*, 1993, 65(1): 409-413
- [3] Li X, Xu K, Li W, et al. Immunologic response to tumor ablation with irreversible electroporation [J]. *PloS one*, 2012, 7(11): e48749
- [4] Lee YJ, Lu DS, Osuagwu F, et al. Irreversible electroporation in porcine liver: acute computed tomography appearance of ablation zone with histopathologic correlation [J]. *Journal of computer assisted tomography*, 2013, 37(2): 154-158
- [5] Lee EW, Thai S, Kee ST. Irreversible electroporation: a novel image-guided cancer therapy [J]. *Gut and liver*, 2010, 4 Suppl 1: S99-S104
- [6] Olweny EO, Kapur P, Tan YK, et al. Irreversible electroporation: evaluation of nonthermal and thermal ablative capabilities in the porcine kidney[J]. *Urology*, 2013, 81(3): 679-684
- [7] Charpentier KP. Irreversible electroporation for the ablation of liver tumors: are we there yet?[J]. *Archives of surgery*, 2012, 147(11):1053-1061
- [8] Pehlivanova VN, Tsoneva IH, Tzoneva RD. Multiple effects of electroporation on the adhesive behaviour of breast cancer cells and fibroblasts[J]. *Cancer cell international*, 2012, 12(1): 9
- [9] Philips P, Hays D, Martin RC. Irreversible Electroporation Ablation (IRE) of Unresectable Soft Tissue Tumors: Learning Curve Evaluation in the First 150 Patients Treated[J]. *PloS one*, 2013, 8(11): 76260
- [10] Yan X, Han J, Zhang Z, et al. Lung cancer A549 cells migrate directionally in DC electric fields with polarized and activated EGFRs [J]. *Bioelectromagnetics*, 2009, 30(1): 29-35
- [11] 闫小龙, 韩静, 汪健, 等. 生理范围直流电场对肺癌细胞凋亡及细胞周期影响的观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(13): 985-988
- [12] Yan Xiao-long, Han Jing, Wang Jian, et al. Physiological range direct current electric fields effect on apoptosis and cell cycle of lung cancer cells [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2011, 18(13): 985-988
- [12] 卢强, 黄立军, 韩勇, 等. 不同强度高压电场对A549肺癌细胞肿瘤生物学特性的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(14): 2669-2673

- [11] 詹翠金.全方位护理对剖宫产产妇母乳喂养的影响[J].中国当代医药, 2011, 18(14): 132-133
Zhan Cui-jin. Comprehensive care and the impact of breastfeeding on the cesarean section [J]. The influence of contemporary Chinese medicine, 2011, 17(14): 132-133
- [12] 陈美霞,方善红,黄月娇.胎膜早破 96 例妊娠结局临床分析[J].现代生物医学进展, 2011, 11(24): 5083-5085
Chen Mei-xia, Fang Shan-hong, Huang Yue-jiao. A 96 case pregnancy outcome clinical Analysis of Premature rupture of fetal membrane[J]. Progress in Modern biomedicine, 2011, (24): 5083-5085
- [13] Abernathy-Young KK, LeBlanc MM, Embertson RM, et al. Survival rates of mares and foals and postoperative complications and fertility of mares after cesarean section: 95 cases (1986-2000)[J]. J Am Vet Med Assoc, 2012, 241(7): 927-934
- [14] 文静,周菲,张芳,等.宫腔镜对剖宫产疤痕缺损治疗方法研究[J].现代生物医学进展, 2012, 11(31): 6124-6126
Wen Jing, Zhou Fei, Zhang Fang, et al. Therapy of Cesarean Section Scar Defect by Hysteroscopy [J]. Progress in Modern biomedicine, 2012, 11(31): 6124-6126
- [15] Xu LL, Chau AM, Zuschmann A, et al. Blunt vs. sharp uterine expansion at lower segment cesarean section delivery: a systematic review with metaanalysis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 208(1): 62.e1-8
- [16] Yazicioglu HF, Sevket O, Ekin M. Incomplete healing of the uterine incision after cesarean section: is it preventable by intraoperative digital dilatation of the internal cervical ostium?[J]. Gynecol-Obstet-Invest, 2012, 74(2): 131-135
- [17] Ghahiry A, Rezaei F, Karimi Khouzani R, et al. Comparative analysis of long-term outcomes of Misgav Ladach technique cesarean section and traditional cesarean section [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38(10): 1235-1239
- [18] Paraskeva A, Diamantis M, Petropoulos G, et al. Postoperative analgesic requirements after subarachnoid or epidural anesthesia with ropivacaine 0.75% in cesarean section. A double-blind randomized trial[J]. Curr Med Res Opin, 2012, 28(9): 1497-1504
- [19] Niklasson B, Björkesson A, Carmnes UB, et al. Intraoperative injection of bupivacaine-adrenaline close to the fascia reduces morphine requirements after cesarean section: a randomized controlled trial[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2012, 91(12): 1433-1439
- [20] Chong C, Su LL, Biswas A. Changing trends of cesarean section births by the Robson Ten Group Classification in a tertiary teaching hospital[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2012, 91(12): 1422-1427
- [21] Draisci G, Sbaraglia F, Pinto R, et al. Does Huntington's disease enhance cephalad spread during neuraxial anesthesia for cesarean section?[J]. J Clin Anesth, 2012, 24(6): 516-517
- [22] Kalampokas E, Sofoudis C, Antonogeorgos G, et al. A randomized controlled trial for cervical priming using vaginal misoprostol prior to hysteroscopy in women who have only undergone cesarean section[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 286(4): 853-857

(上接第 428 页)

- Lu Qiang, Huang Li-jun, Han Yong, et al. Different Effects of High Voltage Electric Field on the Biological Characteristics of A549 Lung Cancer Cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(14): 2669-2673
- [13] Kranjc M, Bajd F, Sersa I, et al. Ex vivo and in silico feasibility study of monitoring electric field distribution in tissue during electroporation based treatments[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45737
- [14] Miklavcic D, Semrov D, Mekid H, et al. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy [J]. Biochimica et biophysica acta, 2000, 1523(1): 73-83
- [15] Liang H, Gu M, Yang C, et al. Sevoflurane inhibits invasion and migration of lung cancer cells by inactivating the p38 MAPK signaling pathway [J]. J Anesth, 2012, 26(3): 381-392
- [16] Huang CW, Chen HY, Yen MH, et al. Gene expression of human lung cancer cell line CL1-5 in response to a direct current electric field [J]. PloS one, 2011, 6(10): e25928
- [17] Yang X, Zhang Y, Wang S, et al. Effect of fasudil on growth, adhesion, invasion, and migration of 95D lung carcinoma cells in vitro[J]. Canadian journal of physiology and pharmacology, 2010, 88(9): 874-879
- [18] Mouraviev V, Polascik TJ. Update on cryotherapy for prostate cancer in 2006[J]. Current opinion in urology, 2006, 16(3): 152-156
- [19] Lu Q, Cao W, Huang L, et al. CT-guided percutaneous microwave ablation of pulmonary malignancies: Results in 69 cases [J]. World journal of surgical oncology, 2012, 10: 80
- [20] Huang L, Han Y, Zhao J, et al. Is radiofrequency thermal ablation a safe and effective procedure in the treatment of pulmonary malignancies?[J]. European journal of cardio-thoracic surgery, 2011, 39(3): 348-351
- [21] Arena CB, Sano MB, Rossmeisl JH, et al. High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction[J]. Biomedical engineering online, 2011, 10: 102-122
- [22] Maor E, Ivorra A, Rubinsky B. Non thermal irreversible electroporation: novel technology for vascular smooth muscle cells ablation[J]. PloS one, 2009, 4(3): e4757
- [23] Appelbaum L, Ben-David E, Faroja M, et al. Irreversible Electroporation Ablation: Creation of Large-Volume Ablation Zones in in Vivo Porcine Liver with Four-Electrode Arrays [J]. Radiology, 2013 Oct 14. [Epub ahead of print]
- [24] 周玮,熊正爱,刘颖,等.不可逆性电穿孔致 HeLa 细胞凋亡与坏死的作用研究[J].第三军医大学学报, 2010, 32(18): 1941-1944
Zhou Wei, Xiong Zheng-ai, Liu Ying, et al. Apoptosis and necrosis of HeLa cells induced by irreversible electroporation[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2010, 32(18): 1941-1944