

脉冲电场对人宫颈癌Hela细胞侵袭转移能力的影响**

张琴¹, 熊正爱¹, 周玮¹, 李成祥², 姚陈果²

Pulse electric fields effect on invasion and metastasis of Hela cells in human cervical cancer

Zhang Qin¹, Xiong Zheng-ai¹, Zhou Wei¹, Li Cheng-xiang², Yao Chen-guo²

Abstract

BACKGROUND: The inhibitory effect of pulse electric fields on invasion and metastasis ability of tumor cells is unclear.

OBJECTIVE: To explore the impact of different intensity pulse electric fields on the human cervical carcinoma Hela cell invasion and metastasis and its possible mechanism.

METHODS: The electric fields with intensity of 0, 500, 1 000 and 1 500 V/cm were performed on the human cervical carcinoma Hela cell. The clone capacity was measured with flat clone formation experiment; the invasion and immigration capacity was evaluated with transwell cave method; the expression level of mRNA of MMP-2 and RhoC was detected by RT-PCR method.

RESULTS AND CONCLUSION: After being treated with pulsed electric fields, the clone capacity of Hela cells was inhibited. The invasion and immigration capacity of Hela cells were also inhibited. The expression level of mRNA of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and RhoC were decreased. The pulse electric fields could affect the invasion and metastasis capacity of the human cervical cancer Hela cells. It is probably one of its molecular mechanisms to inhibit the expression of MMP-2 and RhoC.

Zhang Q, Xiong ZA, Zhou W, Li CX, Yao CG. Pulse electric fields effect on invasion and metastasis of Hela cells in human cervical cancer. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(28): 5245-5248. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 脉冲电场对肿瘤细胞侵袭转移能力是否具有抑制作用尚不十分清楚。

目的: 探讨不同强度脉冲电场对人宫颈癌 Hela 细胞侵袭转移能力的影响及可能的机制。

方法: 以场强分别为 0, 500, 1 000 和 1 500 V/cm 的脉冲电场作用人宫颈癌 Hela 细胞后, 采用平板克隆形成实验, 观察脉冲电场对细胞克隆能力的影响; 采用 Transwell 小室进行人工重组基底膜侵袭和转移实验, 观察脉冲电场对细胞侵袭和转移能力的影响; 采用 RT-PCR 法检测宫颈癌 Hela 细胞中基质金属蛋白酶 2 和 RhoC 基因 mRNA 的表达情况。

结果与结论: 脉冲电场作用后, 宫颈癌 Hela 细胞的克隆能力受到抑制; 细胞侵袭和转移能力明显降低; 基质金属蛋白酶 2 和 RhoC 基因 mRNA 的表达均明显减弱, 且有电场强度依赖性。结果表明, 脉冲电场能抑制人宫颈癌 Hela 细胞的侵袭转移能力, 其机制可能与降低 RhoC 和基质金属蛋白酶 2 的表达有关。

关键词: 脉冲电场; 电穿孔; 宫颈癌; 侵袭; 转移; 基质金属蛋白酶 2; RhoC

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.28.029

张琴, 熊正爱, 周玮, 李成祥, 姚陈果. 脉冲电场对人宫颈癌 Hela 细胞侵袭转移能力的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5245-5248. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; ²Chongqing University, Chongqing 400030, China

Zhang Qin★, Studying for master's degree, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China 20406737@qq.com

Correspondence to: Xiong Zheng-ai, Doctoral supervisor, Department of Gynaecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China xiongzhengai61@21cn.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 50637020*

Received: 2011-01-16 Accepted: 2011-03-24

0 引言

脉冲电场是结合生物医学、电工、微电子等领域治疗肿瘤的新方法。Sale等^[1]首次提出电场会导致细胞死亡或减少。以往研究发现: 细胞膜接受强度为kV/cm、持续时间为s~ms 级的电脉冲刺激时, 会出现可逆性穿孔, 通透性极大地增强, 有利于吸收药物分子、蛋白质或其他大分子^[2]。有学者将这一特点应用于电化学疗法, 只需相对较少剂量的化疗药物就能较高效、低毒性地杀死肿瘤细胞。当增加电脉冲剂量时, 细胞膜则出现不可逆性电穿孔导致细胞死亡^[3-6]。由于脉冲不可逆性电击穿作用时间短、非热效应、操作相对简单等独特之处, 国内外学者开始将脉冲电场不可逆性电击穿作为一种单独的肿瘤治疗手段进行研究^[7-8]。

大量研究证实脉冲电场能作为一种单独的

手段可引起组织消融, 杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤的生长增殖, 具有良好的抗肿瘤效应^[9-13]。但临床上, 肿瘤组织与正常组织的边界往往肉眼难于确定, 电场被有效地限制在电极之间, 电场强度随着距电极距离的增加而迅速衰减, 电场作用区域边缘就可能残存肿瘤细胞^[14], 而这些残存肿瘤细胞侵袭转移能力的变化对于脉冲电场能是否安全有效地应用于临床具有重要的意义。实验利用不同强度脉冲电场作用于人宫颈癌Hela细胞, 通过检测与侵袭转移密切相关的基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinases 2, MMP-2)和RhoC基因mRNA的表达探讨脉冲电场影响肿瘤细胞侵袭转移能力的可能的机制。

1 材料和方法

设计: 体外细胞培养, 对照观察实验。

¹ 重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆市400010; ² 重庆大学, 重庆市400030

张琴★, 女, 1977年生, 四川省成都市人, 汉族, 重庆医科大学在读硕士, 主要从事妇科肿瘤方向的研究。20406737@qq.com

通讯作者: 熊正爱, 博士生导师, 重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆市400010 xiongzhengai61@21cn.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)28-05245-04

收稿日期: 2011-01-16
修回日期: 2011-03-24
(20110116004/ZW-Z)

时间和地点: 于2009-09/2010-08在重庆医科大学医学超声工程研究所完成。

材料: 宫颈癌Hela细胞由重庆医科大学超声研究所提供。

主要试剂及仪器

试剂及仪器	来源
RPMI1640	Hyclone 公司
transwell 小室	Costar 公司
Matrigel 胶	Sigma 公司
RT-PCR 试剂盒	TaKaRa 公司
RhoC 引物、MMP-2 引物	上海生物工程技术服务公司
脉冲肿瘤治疗仪	重庆大学输配电装备与系统安全及新技术国家重点实验室研制(专利号: ZL200710078282.7)
电击小室(电极板间距 4 mm)	BIO-RAD 公司
示波器 TDS3032B	Tektronix 公司

实验方法

细胞的培养及脉冲电场处理方式: 人宫颈癌Hela细胞置于含体积分数10%小牛血清的RPMI 1640培养基, 于37℃、体积分数5%CO₂培养箱中培养, 细胞贴壁生长, 二三天传代1次。待细胞生长至对数生长期时, 用0.25%的胰蛋白酶消化后离心, PBS液清洗、重悬, 调整细胞浓度至2×10⁹ L⁻¹备用。根据所接受脉冲电场强度的不同, 细胞分为4组, 空白对照组(接电极不通电源), 场强500 V/cm组, 场强1 000 V/cm组和场强1 500 V/cm组。取上述细胞悬液760 μL置于电击小室中, 设定脉冲电场肿瘤治疗仪参数(脉宽100 μs, 频率1 Hz, 脉冲个数8个), 分别给予空白对照组, 场强500 V/cm组, 场强1 000 V/cm组和场强1 500 V/cm组Hela细胞以接电极不通电源, 500 V/cm, 1 000 V/cm和1 500 V/cm场强处理。处理后的各组细胞再次分别置于含10%小牛血清的RPMI1640培养基, 于37℃, 体积分数5%CO₂的培养箱中培养24 h, 再用PBS清洗, 0.25%胰蛋白酶消化, 离心, PBS重悬后备用。

平板克隆形成实验: 将细胞悬液反复吹打, 使细胞充分分散, 计数1×10³个细胞接种于培养皿中, 每组3个复孔, 10 d后培养出肉眼可见的克隆后终止培养, 弃去培养液, 用PBS小心浸洗两次, 空气干燥, 4 g/L多聚甲醛固定 15 min, 弃多聚甲醛后空气干燥; 用Giemsa应用染色液染色15 min, 流水缓慢洗去染液, 空气干燥; 显微镜下计数大于50个细胞的克隆数。然后按以下公式计算克隆形成率。

$$\text{克隆形成率} = (\text{克隆数} / \text{接种细胞数}) \times 100\%$$

细胞体外侵袭实验(transwell小室实验): transwell上下室之间滤膜上包被人工基底膜Matrigel胶。将各组Hela细胞用无血清培养基RPMI1640重悬, transwell小室的上室加入细胞悬液100 μL(2×10⁸ L⁻¹), 由含体积分数10%小牛血清的RPMI 1640培养基500 μL作为趋化因子置于transwell小室的下室, 于37℃, 体积分数5%CO₂的培养箱内培养24 h后取出, 以棉签小心刮除滤膜上室面的细胞, PBS小心冲洗小室上下室面, 以40 g/L多聚甲醛固定侵袭并黏附到滤膜下室面的细胞30 min, 苏木精染色10 min, PBS冲洗小室, 干燥后在200×光镜下随机取5个视野对小室滤膜下室面的细胞进行计数。每组平行设3个小室, 重复3次。

细胞体外迁移试验: transwell小室上面不铺Matrigel胶, 其余步骤与侵袭实验相同。

RT-PCR检测MMP-2和RhoC基因mRNA的表达: 按RT-PCR试剂盒说明书操作, RhoC引物(上游5'-ATT GCG GAC ATT GAG GTG GAC-3', 下游5'-ATG AGG ATG ACA TCA GTG TCC-3', 119 bp), MMP-2引物(上游5'-CGG ACA AAG AGT TGG CAG TGC-3', 下游-GGC AGT CCA AAG AAC TTC TGC-3', 118 bp)。RT采用说明书AMV反转录酶标准体系, 30℃, 30 min; 42℃, 30 min; 99℃, 5 min; 50℃, 5 min。PCR扩增采用40 μL反应体系, 内含: ddH₂O 27.75 μL, Buffer 10 μL, 上游引物1 μL, 下游引物1 μL, Taq酶0.25 μL。按下列条件进行循环: 94℃预变性2 min; 循环条件94℃变性30 s; 55℃退火30 s; 72℃延伸1 min, 29个循环, 最后72℃延伸10 min, 4℃保存, 以GAPDH为内参照。扩增产物2%琼脂糖凝胶电泳30 min(80 V), EB(0.5 mg/L)染色, 用Bio-Rad凝胶成像系统扫描制片并行半定量分析。

主要观察指标: 不同强度脉冲电场作用后Hela细胞的克隆形成数、侵袭和转移细胞数, MMP-2、RhoC基因mRNA的表达情况。

统计学分析: 选用SPSS 13.0统计软件对数据进行单因素方差分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 脉冲电场对宫颈癌Hela细胞克隆能力的

影响 平板克隆形成实验表明, 场强500 V/cm组, 场强1 000 V/cm组和场强1 500 V/cm组Hela细胞经不同强度脉冲电场作用后, 克隆形成率均不同程度降低, 并呈电场强度依赖性。各实验组与对照组之间差异均有显著性意义($P < 0.05$), 不同电场强度实验组之间差异均有显著性意义($P < 0.05$), 结果说明脉冲电场对Hela细胞克隆能力有抑制作用, 且具电场强度依赖性。见表1。

表1 脉冲电场对宫颈癌Hela细胞克隆形成能力的影响
Table 1 Effect of different intensities of pulse electric fields on the colony formation of Hela cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Colony formation number	Colony formation rate (%)
Control	292.67±2.08	29.27
500 V/cm	160.33±3.06 ^a	16.03
1 000 V/cm	151.67±2.52 ^{ab}	15.17
1 500 V/cm	123.66±1.53 ^{abc}	12.37

^a $P < 0.05$, vs. control group; ^b $P < 0.05$, vs. 500 V/cm group; ^c $P < 0.05$, vs. 1 000 V/cm group

2.2 脉冲电场对宫颈癌Hela细胞侵袭和迁移能力的影响 侵袭试验中, 与对照组比较, 1 000 V/cm和1 500 V/cm组Hela细胞侵袭穿过Matrigel成胶的人工基底膜的侵袭细胞数显著减少($P < 0.05$)。迁移试验中, 与对照组比较, 1 000 V/cm和1 500 V/cm组Hela细胞侵袭穿过未经Matrigel成胶的人工基底膜的迁移细胞数显著减少($P < 0.05$), 各组之间差异具有显著性意义($P < 0.05$)。且具有脉冲电场强度依赖性, 即随着脉冲电场强度(500, 1 000, 1 500 V/cm)度的增加, 对Hela细胞侵袭和迁移抑制作用增强。见表2。

表2 脉冲电场对宫颈癌Hela细胞侵袭和迁移能力的影响
Table 2 Effect of different intensities of pulse electric fields on the invasion and immigration of Hela cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Number of invasive cells	Number of migrating cells
Control	102.10±3.28	159.50±7.79
500 V/cm	100.80±5.41	152.80±3.01
1 000 V/cm	66.80±6.36 ^{ab}	110.20±9.44 ^{ab}
1 500 V/cm	45.60±4.88 ^{abc}	96.80±7.91 ^{abc}

^a $P < 0.05$, vs. control group; ^b $P < 0.05$, vs. 500 V/cm group; ^c $P < 0.05$, vs. 1 000 V/cm group

2.3 脉冲电场对宫颈癌Hela细胞MMP-2和RhoC基因mRNA表达的影响 RT-PCR结果显示, 对照组细胞可见明显的MMP-2和RhoC基因的mRNA条带, 不同强度脉冲电场作用后, 场强500 V/cm组, 场强1 000 V/cm组和场强1 500 V/cm组Hela细胞MMP-2和RhoC基因mRNA的表达水平较对照组都有不同程度的降低, 并呈电场强度依赖性。其中场强1 000 V/cm组和场强1 500V/cm组与空白对照组之间差异具有显著性意义($P < 0.05$), 且场强1 000 V/cm组和场强1 500V/cm组之间差异也有显著性意义($P < 0.05$)。见图1和表3。

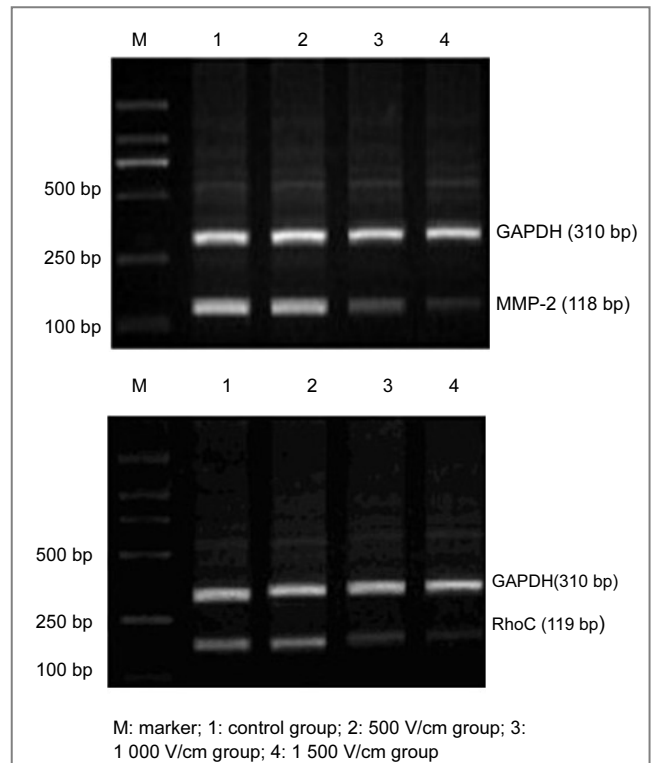


Figure 1 Effect of different intensities of pulse electric fields on mRNA expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and RhoC of Hela cells

图1 脉冲电场对宫颈癌Hela细胞基质金属的酶2和RhoC基因mRNA表达的影响

表3 脉冲电场对宫颈癌Hela细胞基质金属的酶2和RhoC基因mRNA表达的影响

Table 3 Effect of different intensities of pulse electric fields on mRNA expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and RhoC of Hela cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	MMP-2/GAPDH	RhoC/GAPDH
Control	0.907 6±0.007 4	0.907 0±0.009 6
500 V/cm	0.893 6±0.008 9	0.894 1±0.124 5
1 000 V/cm	0.661 4±0.083 3 ^{ab}	0.713 2±0.182 2 ^{ab}
1 500 V/cm	0.583 0±0.148 5 ^{abc}	0.603 0±0.129 8 ^{abc}

^a $P < 0.05$, vs. control group; ^b $P < 0.05$, vs. 500 V/cm group; ^c $P < 0.05$, vs. 1000 V/cm group

3 讨论

脉冲电场能够抑制多种肿瘤细胞的增殖并可以通过多种途径诱导肿瘤细胞的凋亡^[15]。本课题组的前期研究已经证实实在体内外实验中脉冲电场均可抑制人宫颈癌细胞增殖生长^[16]。本实验同样观察到脉冲电场对Hela细胞的增殖生长有明显抑制作用, 且呈电场强度依赖性。实验也观察到脉冲电场对Hela细胞的侵袭和转移能力有明显的抑制作用, 且呈电场强度依赖性, 这与李聪等^[17]发现脉冲电场可使肿瘤细胞浸润和转移能力下降的结果一致。

侵袭与转移是恶性肿瘤最重要的生物学行为, 同时也是一个多因素、多步骤的极其复杂的病理过程。MMP-2 是一种 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 依赖性蛋白水解酶, 在肿瘤细胞和间质细胞中以酶原方式分泌, 经水解激活, 能特异性降解基底膜的主要成分-IV型胶原。研究发现它不仅能崩解细胞外基质, 还可使细胞外基质重排, 有利于肿瘤细胞的游出, 并与宫颈癌细胞的侵袭行为有很大的相关性, 当MMP-2的活性或表达降低时肿瘤细胞的侵袭性也会明显减弱^[18]。实验检测到脉冲电场作用于Hela细胞后, MMP-2的mRNA表达显著下降, 且随着脉冲电场强度的增加, 这种变化趋势趋明显。由此推测, 下调MMP-2的表达, 减弱其降解和重排细胞外基质的能力, 可能是脉冲电场抑制人宫颈癌细胞Hela侵袭转移能力的机制之一。

RhoC是Rho家族的一个成员, 在许多肿瘤特别是侵袭性高的肿瘤如乳腺癌、恶性黑色素瘤、食管癌等中都有高表达^[19-20]。Chen等^[21]证实RhoC基因高表达与肿瘤的侵袭力密切相关, RhoC基因编码的三磷酸鸟苷结合蛋白, 具有三磷酸鸟苷酶活性, 在细胞的信号转导通路中作为信号转换器或分子开关, 作用于细胞骨架或其靶蛋白, 参与细胞信号的转导和肌动蛋白细胞骨架的调节, 通过调控细胞迁移的多个方面, 参与肿瘤转移的全过程。有研究发现RhoC阳性表达与MMP2阳性表达有协同作用, 呈正相关性。过度表达RhoC能导致MMP-2、MMP-9、MTI-MMP等的mRNA表达显著升高, 即RhoC不但能明显上调MMPs的表达水平, 同时也能增加MMPs的活性, 使其降解细胞外基质能力增强, 在肿瘤细胞的侵袭过程中起到重要的促进作用^[22-23]。由此可见, RhoC诱导细胞迁移, 而后导致MMP-2破坏转移部位的细胞外基质, 从而完成侵袭转移的过程。本研究也显示脉冲电场明显抑制RhoC mRNA的表达, 同时随着脉冲电场强度的增加, 这种变化趋势愈加明显, 且和对MMP-2mRNA表达的抑制也具有协同性, 由此可推测脉冲电场对RhoC表达的抑制可能是脉冲电场引起MMP-2表达抑制及减弱其活性的重要原因之一。

综上所述, 脉冲电场能够抑制Hela细胞的侵袭转移能力, 下调MMP-2和RhoC的表达是其可能的机制之一。由于脉冲电场给恶性肿瘤的治疗提供一条新的思路和方法, 国外已将脉冲电场应用于临床前列腺癌患者的治疗, 并取得了较好效果^[24]。但对脉冲电场在妇科疾病方面的作用研究还处于起步阶段, 尚需进一步研究。

4 参考文献

[1] Sale AJ, Hamilton WA. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim Biophys Acta.* 1967;148(3):781-788.
 [2] Weaver JC. Electroporation: A dramatic, nonthermal electric field phenomenon. In: *Proceedings of the first world congress for electricity and magnetism in biology and medicine.* Florida: Lake Buena Vista, Academic Press. 1992:127.

[3] White KL. Electroporation of mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 1995;48(23):283-293.
 [4] Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nature Biotechnol.* 1998;16:867-870.
 [5] Okino M, Mohri H. Optimal electric conditions in electrical impulse hemotherapy. *Jpn J Cancer Res.* 1992;83(10):1095-1101.
 [6] Hofmann GA, Dev SB, Dimmer S, et al. Electroporation therapy: a new approach for treatment of head and neck cancer. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1999;46(6):752-759.
 [7] Rubinsky B. Irreversible Electroporation in Medicine. *Technol Cancer Res Treat.* 2007;6(4):255-260.
 [8] Tang LL, Sun CX, Liu H, et al. Steep pulsed electric fields modulate cell apoptosis through the change of intracellular calcium concentration. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007;57(2): 209-214.
 [9] Sun CX, Xiong L, Yao CG. Cytocidal and inhibitory effect of energy-controllable pulse on ovarian cancer cell line SKOV3. *IEEE conference of EMBS & BMES'.* Houston, 2002.
 [10] Xiong L, Sun CX, Yao CG. Vascular effect and immunity effect of steep pulse electric fields on walker 256-bearing wistar mice[C]. 2004 IEEE BMFS/FMBS Conference. San Francisco, 2004.
 [11] Miller L, Leor J, Rubinsky B. Cancer cells ablation with irreversible electroporation. *Technol Cancer Res Treat.* 2005;4(6):699-705.
 [12] Lavee J, Onik G, Mikus P, et al. A novel non-thermal energy source for surgical epicardial atrial ablation: irreversible electroporation. *The Heart Surgery Forum.* 2007;10:162-167.
 [13] Yao CG, S CX, Mi Y, et al. Gaodianya Jishu. 2007;33(4):7-13. 姚陈果, 孙才新, 米彦, 等. 陡脉冲不可逆性电击治疗肿瘤的研究[J]. *高压电技术*, 2007, 33(4):7-13.
 [14] Wang PL, Hu LN, Yang XJ, et al. *Zhonghua Gangzangbing Zazhi.* 2005;13(7):516-519. 王萍玲, 胡丽娜, 杨孝军, 等. 能量可控陡脉冲损伤兔肝脏实验性肿瘤的病理学研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(7):516-519.
 [15] Matsuki N, Ishikawa T, Imai Y, et al. Low voltage pulses can induce apoptosis. *Cancer letters.* 2008;269(1):93-100.
 [16] Hu Y, Hu LN, Mi Y, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao.* 2005, 27(17): 1745-1747. 胡娅, 胡丽娜, 米彦, 等. 能量可控陡脉冲对小鼠U14宫颈癌杀伤作用的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(17):1745-1747.
 [17] Li C, Hu LN, Dong XJ, et al. *Zhonghua Fuchanke Zazhi.* 2007;42(8): 555-557. 李聪, 胡丽娜, 董晓静, 等. 高强度电脉冲对卵巢上皮癌组织中基质金属蛋白酶9及其抑制物1的影响[J]. *中华妇产科杂志*, 2007, 42(8): 555-557.
 [18] Rauvala M, Aglund K, Puistola U. Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: Different roles in tumor progression. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(3):1297-1302.
 [19] Van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, et al. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res.* 2000;60:5832-5838.
 [20] Clark EA, Golub TR, Lander ES, et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 2000;406: 532-535.
 [21] Chen ML, Shi Z, He QL. Effect of RhoC gene on the biological behaviors of human QBC939 cholangiocarcinoma cdl. *Fujian Med J.* 2009;31(1):1-4.
 [22] Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, et al. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(3):1192-1200.
 [23] Qiao FL, Pang Y, Wang YJ, et al. *Zhongguo Shiyan Zhenduanxue.* 2009;13(7):919-923. 乔锋利, 潘颖, 王英坚, 等. RhoC与MMP2在卵巢癌侵袭与转移中作用[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(7):919-923.
 [24] Boris Rubinsky. *Irreversible Electroporation*[M]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 235-247.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金: 陡脉冲不可逆性电击穿治疗肿瘤的作用机理及关键技术研究(50637020)。

作者贡献: 由第一作者完成实验设计、实施、评估以及成文, 第二、五作者审核, 第三、四作者参与资料收集。

致谢: 感谢重庆大学输配电装备与系统安全及新技术国家重点实验室为实验提供了主要实验仪器。

利益冲突: 课题不涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。