

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.05.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210122.1426.020.html\(2021-01-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210122.1426.020.html(2021-01-25))

## 纳秒脉冲脉宽参数与细胞凋亡的量效关系研究\*

张 玉<sup>1</sup>, 郭 飞<sup>2</sup>

(1. 重庆市中医院妇科 400021; 2. 重庆邮电大学复杂系统与仿生控制重庆市重点实验室 400065)

**[摘要]** **目的** 研究纳秒脉冲脉宽参数与细胞凋亡之间的量效关系。**方法** 将纳秒脉冲电场参数组合(电场强度 7、10、14 kV/cm, 脉宽 50、100、200 ns, 脉冲个数 30, 频率 1 Hz)作用于离体 SKOV3 细胞, 利用 Annexin V FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率和坏死率; 通过激光共聚焦显微镜检测细胞膜和线粒体跨膜电位变化情况; 仿真计算纳秒脉冲作用时膜电位、微孔密度及电导率的实时动态变化。**结果** 脉冲处理后细胞膜跨膜电位下降程度随脉宽增加而增加, 而线粒体跨膜电位下降程度随脉宽增加而减小, 且 100 ns 脉冲同时诱导最大的细胞凋亡率(32.14±3.76)%及较小的坏死率(5.04±1.72)%; 仿真计算中膜电位变化规律与实验结果吻合, 其中 50 ns 脉冲诱导最高的微孔密度(2.93×10<sup>15</sup>/m<sup>2</sup>)和电导率(0.004 S/m)。**结论** 通过合理选择纳秒脉冲脉宽参数可以在一定程度上调控细胞的生物电效应。

**[关键词]** 纳秒脉冲; 脉宽参数; 量效关系; 膜电位; 细胞凋亡**[中图分类号]** R318**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)05-0721-06

## Study of dose-effect relationship between the pulse duration of nanosecond pulsed electric field and cell apoptosis\*

ZHANG Yu<sup>1</sup>, GUO Fei<sup>2</sup>

(1. Department of Gynecology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Complex Systems and Bionic Control, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

**[Abstract]** **Objective** Investigation of the dose-effect relationship between the pulse duration of nanosecond pulsed electric field and cell apoptosis. **Methods** Nanosecond pulsed electric field (field intensity of 7, 10, 14 kV/cm, pulse duration of 50, 100 and 200 ns, pulse number of 30 and repetition frequency of 1 Hz) was applied to SKOV3 cells in vitro, and Annexin V/PI double staining was used to detect cell apoptosis and necrosis rate. Then changes in transmembrane potential of cell membrane and mitochondria membrane were examined by confocal laser scanning microscope, finally the real-time dynamic changes in transmembrane potential, pore density and conductivity during nanosecond pulsed electric field application were achieved by simulation study. **Results** The results indicated that with the increase of pulse duration, the decline degree of cell membrane transmembrane potential increased, while the decline degree of mitochondria membrane transmembrane potential reduced after the application of nanosecond pulsed electric field, and 100 ns pulse simultaneously induced the maximum apoptosis rate of (32.14±3.76)% and smaller necrotic rate of (5.04±1.72)%. The changes law of membrane transmembrane potential in simulation study was consistent with the experimental results. The 50 ns pulse induces the highest pore density of 2.93×10<sup>15</sup>/m<sup>2</sup> and conductivity of 0.004 S/m. **Conclusion** The research conclusions demonstrated that cell bioelectric effects might be regulated by rationally choosing the pulse duration parameter of nanosecond pulsed electric field.

**[Key words]** nanosecond pulsed electric field; pulse duration parameter; dose-effect relationship; membrane potential; apoptosis

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(51507024); 重庆高校创新团队建设计划项目(CXTDX201601019)。 作者简介: 张玉(1983-), 主治医师, 硕士, 主要从事妇科肿瘤研究。

脉冲电场对细胞、组织及生物体的非热电效应已成为生物电磁学领域的研究热点<sup>[1-2]</sup>。利用电场强度 kV/cm、脉宽毫微秒级的电场脉冲作用于生物细胞,导致细胞膜通透性增加,使常态下无法透过细胞膜的物质(如 DNA、药物分子等)顺利进入细胞内的现象称为电穿孔效应。根据穿孔后细胞膜能否恢复常态,将电穿孔分为可逆电穿孔和不可逆电穿孔<sup>[3-4]</sup>。目前,可逆电穿孔效应已成功应用于基因转染、药物导入、细胞融合等领域,并由此产生电化学疗法、电基因转染等新型方法<sup>[5-6]</sup>。与可逆电穿孔治疗肿瘤比较,不可逆电穿孔可独立杀灭肿瘤细胞,而不需要化疗药物辅助,避免了化疗药物的毒副作用<sup>[7-8]</sup>,已成功应用于肾癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌等实体肿瘤的治疗,展现出良好的应用前景<sup>[9-11]</sup>。

随着研究的不断深入,研究者发现当脉冲电场脉宽降低至纳秒级,电场强度增至数十 kV/cm(纳秒脉冲)时可以在细胞膜或细胞器膜上产生更多、尺寸更小的微孔,使得更多小分子物质能够顺利通过细胞膜或细胞器膜,该现象称之为超级电穿孔<sup>[12-13]</sup>。利用纳秒脉冲诱导细胞发生超级电穿孔,进而诱导细胞凋亡并激发机体免疫反应的原理,在肿瘤治疗中具有独特的优势<sup>[14-17]</sup>。目前在离体细胞实验和动物实验研究中,采用的典型纳秒脉冲参数为脉宽 10~600 ns、电场强度 20~100 kV/cm、频率 1~10 Hz 的方波脉冲<sup>[18-19]</sup>。研究者多通过经验或者文献来选择纳秒脉冲参数,导致在研究中难以获得理想的效果。目前,纳秒脉冲参数与细胞生物电效应之间的量效关系研究仍较匮乏,本文试图从脉宽角度研究二者间的关系。本文选择 3 组总能量相同、但脉宽不同的纳秒脉冲作用于 SKOV3 细胞,通过实验和仿真计算来研究脉宽参数与细胞凋亡间的量效关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及试剂

SKOV3 细胞株(重庆医科大学超声工程研究所惠赠);RPMI-1640 培养基、胎牛血清、PBS、胰蛋白酶(美国 Hyclon 公司);Annexin-V 异硫氰荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司);TMRM/JC-1 探针试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 主要仪器

纳秒脉冲源、电极小室(重庆市复杂系统与仿生控制重点实验室研制,型号 NSPG-10K);示波器(美国 Tektronix TDS3032B);激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica TCS-SP2);流式细胞仪(美国 FACS Cali-

bur);CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(美国 Thermo Forma 公司)。纳秒脉冲源输出脉冲参数:电压 10 kV,脉宽 50~200 ns,频率 1~10 kHz。有关该脉冲源的原理及其输出波形详见文献<sup>[20]</sup>。电极小室:间距为 2 mm,当脉冲源输出电压分别为 1.4、2.0、2.8 kV 时,将依次在电极小室中形成强度为 7、10、14 kV/cm 的均匀脉冲电场(分别对应脉宽 50、100、200 ns),将细胞悬液置于其中即可完成脉冲处理。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养

复苏 SKOV3 细胞,培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液内,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度箱中培养,隔天换液,2~3 d 进行传代。细胞处于对数生长期时给予 0.25% 胰蛋白酶消化 1~2 min,收集细胞于离心管中,台式离心机以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,制成单细胞悬液,于血球计数板上作细胞计数,校正细胞悬液浓度至  $2 \times 10^6$  /mL 备用。

#### 1.3.2 Annexin-V/PI 双染法检测细胞凋亡

按照 FITC 标记 Annexin V 细胞凋亡试剂盒的说明书操作,收集对照组及处理组(纳秒脉冲处理后孵育 6 h)细胞各  $1 \times 10^6$  个,PBS 洗涤 2 遍后,用 250  $\mu$ L Annexin V 结合缓冲液重悬细胞,取 100  $\mu$ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中,加 5  $\mu$ L Annexin V FITC 和 10  $\mu$ L PI,混匀后室温避光孵育 15 min,在反应管中加入 400  $\mu$ L PBS,立即用流式细胞仪检测。以 Annexin V+/PI- 判断为早期凋亡,Annexin V+/PI+ 判断为晚期凋亡或坏死,Annexin V-/PI+ 判断为操作中损伤细胞或处理过于强烈机械性损伤的细胞,Annexin V-/PI- 判断为正常细胞。

#### 1.3.3 激光共聚焦检测细胞膜及线粒体膜电位

分别以 TMRM 和 JC-1 探针标记细胞膜及线粒体膜,按照试剂盒说明书进行操作。收集对照组(未用任何处理)及处理组(纳秒脉冲处理后孵育 6 h)细胞悬液并分别加入 TMRM 和 JC-1 染色液,37 °C 孵育 15 min 后 PBS 洗涤细胞两次并加入少量 PBS,采用激光共聚焦扫描显微镜实时观测并记录细胞膜及细胞内线粒体膜电位荧光变化情况。

#### 1.3.4 膜电位、微孔密度及电导率仿真研究

参考文献<sup>[21]</sup>,基于球形细胞五层介电模型,同时引入电穿孔效应和细胞组分频率色散效应,进而记录细胞膜电导率及介电常数的实时动态变化,来获取膜电位、微孔密度及电导率动态变化规律。

### 1.4 统计学处理

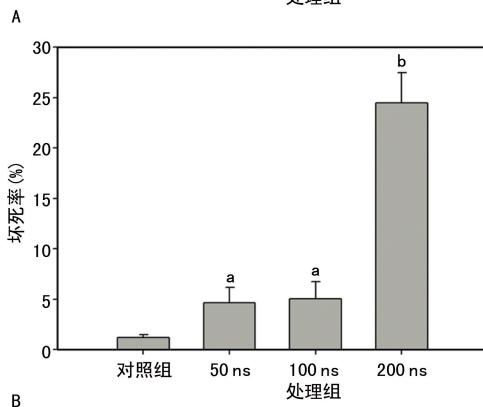
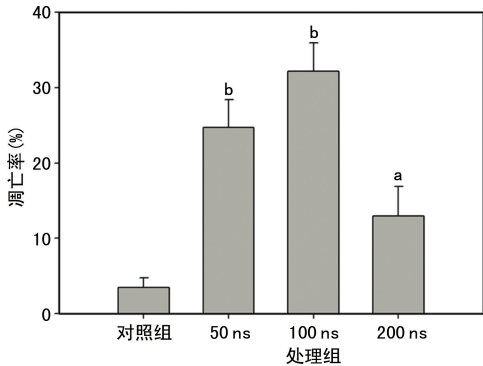
采用 SPSS22.0 软件进行统计学处理,实验重复

3 次, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 不同脉宽参数下细胞凋亡率和坏死率

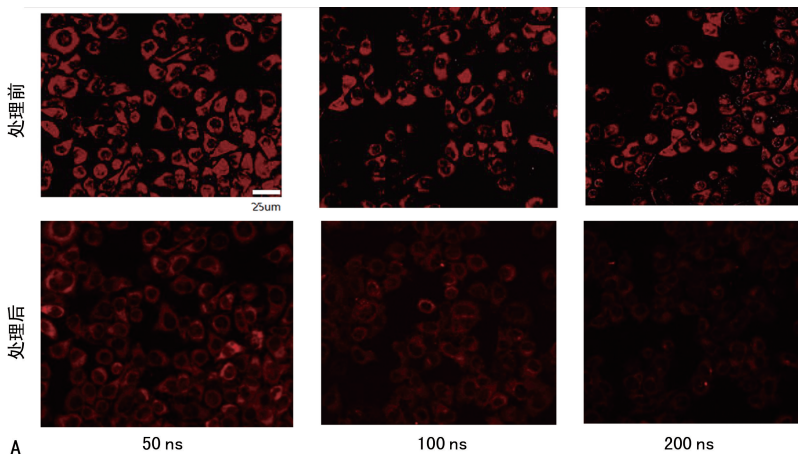
经纳秒脉冲处理后处理组各亚组 (50、100、200 ns) 细胞凋亡率和坏死率较对照组增加, 且处理组各亚组间存在较大差异, 100 ns 脉冲组诱导最高的凋亡率 (32.14 ± 3.76)%, 200 ns 脉冲组诱导最高的坏死率 (24.78 ± 2.36)%。



A: 凋亡率; B: 坏死率; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 1 不同脉宽纳秒脉冲处理后细胞凋亡率和坏死率

### 2.2 激光共聚焦检测细胞膜和线粒体跨膜电位



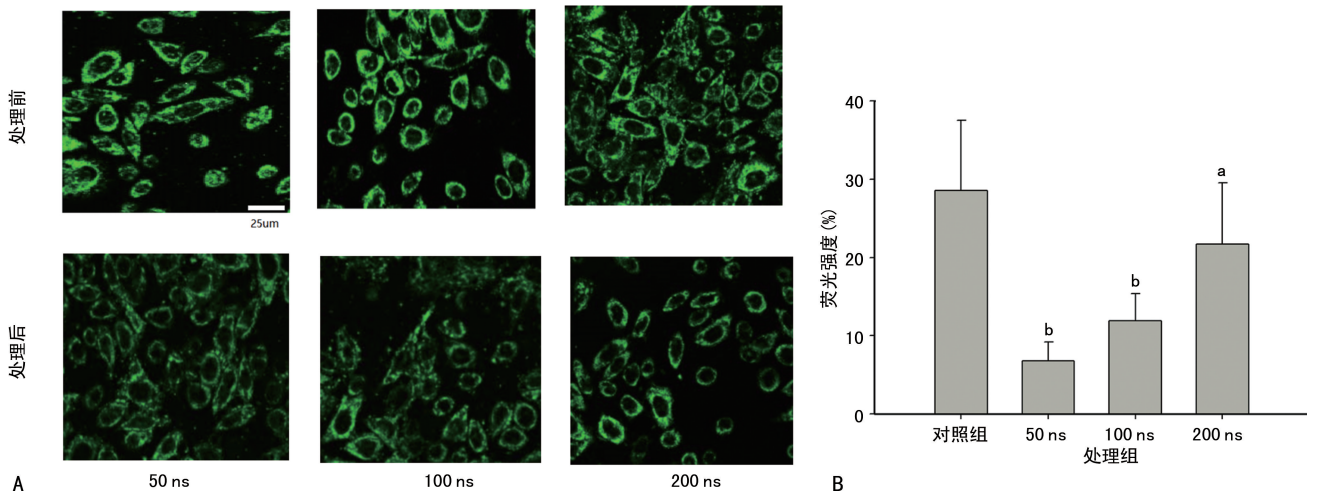
A: 荧光图; B: 荧光强度分析; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 2 激光共聚焦检测细胞膜电位荧光图及荧光强度统计图

50 ns 脉冲处理后细胞膜跨膜电位与处理前比较具有一定程度的下降 ( $P < 0.05$ ), 100 ns 脉冲处理后细胞膜跨膜电位下降更明显 ( $P < 0.01$ ), 200 ns 脉冲处理后, 荧光强度值下降最多 ( $P < 0.01$ )。见图 2。不同脉宽的纳秒脉冲处理后, 线粒体膜电位均出现不同程度的下降, 且与脉冲宽度存在一定的关联。其中, 200 ns 脉冲处理组荧光强度值较处理前明显降低 ( $P < 0.05$ ), 100 ns 脉冲处理组线粒体跨膜荧光强度值下降更加明显 ( $P < 0.01$ ), 50 ns 脉冲处理后线粒体跨膜荧光强度值下降最明显 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

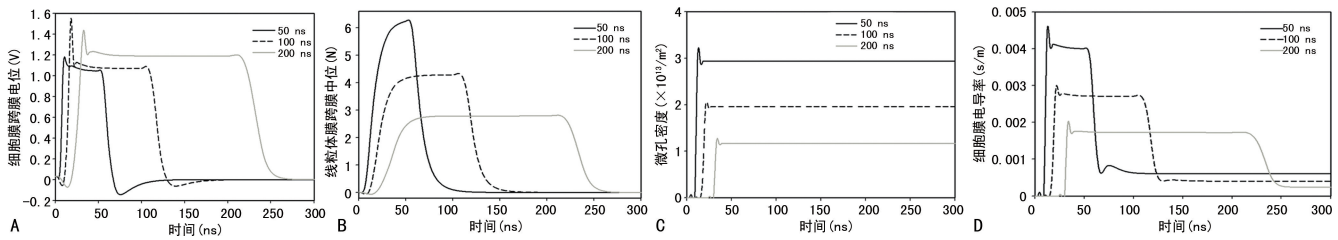
### 2.3 跨膜电位、微孔密度及电导率的仿真结果

仿真计算基于球形细胞五层介电模型, 考虑引入电穿孔 Smoluchowski 方程和频率色散 Debye 方程, 最终通过求解电磁场 Laplace 方程得出结果。本文仿真计算了上述纳秒脉冲参数作用下球形细胞跨膜电位、微孔密度及电导率的变化规律。50 ns 脉冲作用时细胞膜跨膜电位上升最快, 且在 12 ns 达到其峰值 1.15 V, 随后开始下降至平稳值约 1.05 V, 最终随外加脉冲下降而减小; 100 ns 和 200 ns 脉冲作用时细胞膜跨膜电位呈现类似的变化规律, 但达到峰值时间依次增加且峰值及平稳值依次增大, 这是由于 50 ns 脉冲作用时细胞膜微孔密度及细胞膜电导率增加最为明显, 进而导致穿孔后较低的跨膜电位平稳值。50 ns 脉冲作用时细胞器膜跨膜电位增加最为明显, 且随着脉宽的增加, 膜电位上升速度明显变缓, 见图 4。整体来看, 随着脉宽的增加, 外加纳秒脉冲对细胞膜的影响逐渐增强, 而对细胞器膜的影响不断减弱, 与前述细胞实验结果基本一致。而 50 ns 脉冲作用时细胞膜上微孔密度最大且电导率最高, 是由于此时发生明显的超级电穿孔效应, 与以往研究<sup>[22]</sup>相符。



A:激光共聚焦;B:荧光强度分析;<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与对照组比较。

图3 激光共聚焦检测线粒体膜电位荧光图及荧光强度统计图



A:细胞膜跨膜电位;B:线粒体膜跨膜电位;C:微孔密度;D:细胞膜电导率。

图4 仿真参数随时间的变化情况

### 3 讨论

脉冲电场作用致使细胞膜跨膜电位变化是电穿孔效应产生的生物电学基础,通常认为当细胞膜跨膜电位由静息电位(约 70 mV)上升为 0.4~1.0 V 时,细胞发生电穿孔效应,进而使细胞膜通透性、电导率急剧增加,最终导致细胞膜、细胞器膜跨膜电位崩溃产生一系列诸如凋亡、坏死的生物电效应<sup>[23-24]</sup>。因此,跨膜电位的实时变化规律是电穿孔效应研究的关键所在,然而受限于测量手段的精度和适应性,目前难以获得脉冲电场作用时细胞膜及细胞器膜跨膜电位的实时变化规律。实际上,研究者一般通过检测脉冲作用前后的膜电位或者通过仿真计算脉冲作用时膜电位的变化规律来间接研究电穿孔效应<sup>[25-26]</sup>。本文以膜电位变化为纽带,分别从实验和仿真角度研究了细胞膜和线粒体膜电位变化规律,并对不同脉宽参数下的结果进行分析,最终与实验中细胞宏观生物学效应建立联系,从而获得纳秒脉冲脉宽参数与细胞凋亡效应之间的关系规律。

本文选择 3 组不同脉宽但能量相同的纳秒脉冲进行研究,主要基于以下两点:(1) 以往仿真及实验研究表明<sup>[27]</sup>,当脉冲电场脉宽由毫微秒级降为纳秒级时,其作用靶点将由细胞膜转至胞内细胞器,对于纳

秒脉冲来说,随着脉宽降低其作用靶点将逐渐由细胞膜转至细胞内结构的规律依然存在,因此笔者选择脉宽参数来进行量效关系研究;(2) 选择不同脉宽参数,但为了得到可以比较的结果,需保持 3 组脉冲能量相同,在脉冲个数一定的情况,通过设置不同脉冲场强来实现。

细胞典型的凋亡途径包括死亡受体途径和线粒体凋亡途径<sup>[28]</sup>,二者分别与细胞膜和线粒体膜的跨膜电位改变密切相关,即纳秒脉冲作用不同靶点将诱导对应的凋亡途径。本文的实验和仿真结果均表明,随着脉宽降低,纳秒脉冲作用靶点由细胞膜逐渐转移至细胞内细胞器;对于 100 ns 脉冲来说,其将同时有效作用于细胞膜和线粒体膜,从而诱导最大的凋亡效应。而 50 ns 和 200 ns 诱导较低凋亡率的一个可能原因是:前者只靶向细胞器膜从而介导线粒体凋亡途径,后者只介导死亡受体途径,从而产生较低的细胞凋亡率。这只是本文给出的一个猜想,至于不同脉宽纳秒脉冲是否介导不同途径的细胞凋亡,仍需进一步深入研究。

在仿真计算中发现 50 ns 脉冲作用产生最大的微孔密度,从而使得细胞膜电导率变化最大,这也与以往研究中随脉宽降低微孔数量不断增加相吻合<sup>[22]</sup>;由

于本文仿真研究中未考虑微孔孔径变化,实际上 50 ns 脉冲作用产生的微孔孔径比较小,不能有效介导死亡受体凋亡途径。

本研究只是对脉宽这一参数进行了量效关系研究,实际上纳秒脉冲参数包括场强、脉宽、频率及脉冲个数等,另外对于不同的细胞类型及状态,相应的量效关系是否发生改变及如何变化仍需要进一步深入研究。脉冲参数发生变化除了带来细胞效应的改变外,有可能引发新的生物电效应<sup>[29]</sup>,如 PAKHOMOVA 等<sup>[30]</sup>发现细胞在分串纳秒脉冲处理后表现出超级敏感性,都是值得深入研究的内容。在本文的仿真计算中采用的细胞几何参数和电磁参数均来自以往文献,与实验中 SKOV3 细胞实际参数存在较大差别,导致二者在比对时出现差异。

综上所述,本文从脉宽参数角度研究纳秒脉冲参数与细胞生物电效应间的量效关系,能够在一定程度上为纳秒脉冲样机研制及后续临床前实验提供重要的理论依据和参数指导,具有重要的工程价值。

本文通过细胞实验和仿真计算研究了纳秒脉冲脉宽参数与细胞凋亡之间的量效关系,实验结果和仿真结论均表明二者之间存在一定的窗口效应,即某一特定脉宽的脉冲(100 ns)同时靶向细胞膜和细胞器膜,可能通过死亡受体和线粒体凋亡途径诱导细胞最大程度凋亡,且伴随较小的细胞坏死率,这在临床肿瘤治疗中具有重要的意义。本研究结果能够为临床样机研制及后续临床实验提供重要的理论支撑和参数指导。

## 参考文献

- [1] 姚陈果,赵亚军,李成祥,等.不可逆电穿孔微创消融肿瘤技术的研究进展[J].高电压技术,2014,40(12):3725-3837.
- [2] BRETON M, MIR L M. Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments[J]. Bioelectromagnetics, 2012, 33(2):106-123.
- [3] CHEN C, SMYE S W, ROBINSON M P, et al. Membrane electroporation theories: a review. Med Biol Eng Comput, 2006, 44(1-2):5-14.
- [4] YADOLLAHPOUR A, REZAAEE Z. Electroporation as a new cancer treatment technique: a review on the mechanisms of action[J]. Bio Pharmacol J, 2014, 7(1):53-62.
- [5] FATTORI E, LA MONICA N, CILIBERTO G, et al. Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery[J]. Somat Cell Mol Genet, 2002, 27(1-6):75-83.
- [6] BELEHRADEK M, DOMENGE C, LUBOINSKI B, et al. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial[J]. Cancer, 1993, 72(12):3694-3700.
- [7] DAVALOS R V, MIR L M, RUBINSKY B. Tissue ablation with irreversible electroporation[J]. Ann Biomed Eng, 2005, 33(2):223-231.
- [8] RUBINSKY B, ONIK G, MIKUS P. Irreversible electroporation: a new ablation modality: clinical implications[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(1):37-48.
- [9] ZHAO J, WEN X, TIAN L, et al. Irreversible electroporation reverses resistance to immune checkpoint blockade in pancreatic cancer[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):899-912.
- [10] GIGANTI F, STABILE A, GIONA S, et al. Prostate cancer treated with irreversible electroporation: MRI-based volumetric analysis and oncological outcome[J]. Magn Reson Imaging, 2019, 58(5):143-147.
- [11] LIU B, CLARK J, DOMES T, et al. Percutaneous irreversible electroporation for the treatment of small renal masses: the first canadian case series[J]. Can Urol Assoc J, 2019, 13(9):1-10.
- [12] GOWRISHANKAR T R, WEAVER J C. Electrical behavior and pore accumulation in a multicellular model for conventional and supraelectroporation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(2):643-653.
- [13] BEEBE S J, WHITE J, BLACKMORE P F, et al. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues[J]. DNA Cell Biol, 2003, 22(12):785-796.
- [14] SCHOENBACH K H, BEEBE S J, BUESCHER E S. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses[J]. Bioelectromagnetics, 2001, 22(6):440-448.
- [15] 姚陈果,郭飞,王建,等.纳秒级电场脉冲诱导肿瘤细胞凋亡的线粒体通路研究[J].中国生物医

- 学工程学报,2010,29(5):724-730.
- [16] 米彦,姚陈果,李成祥,等. 陡脉冲电场对体外人肝癌细胞 SMMC-7721 的诱导凋亡作用[J]. 中国生物医学工程学报,2009,28(5):743-748.
- [17] BEEBE S, LASSITER B, GUO S. Nanopulse stimulation (NPS) induces tumor ablation and immunity in orthotopic 4T1 mouse breast cancer: a review[J]. *Cancers*, 2018, 10(4):97-107.
- [18] SCHOENBACH K H, HARGRAVE S J, JOSHI R P, et al. Bioelectric effects of intense nanosecond pulses[J]. *IEEE Trans Dielectr Electrical Insul*, 2007, 14(5):1088-1109.
- [19] BEEBE S J, SCHOENBACH K H. Nanosecond pulsed electric fields: a new stimulus to activate intracellular signaling [J]. *BioMed Res Int*, 2005, 2005(4):297-300.
- [20] YAO C, ZHANG X, GUO F, et al. FPGA-controlled all-solid-state nanosecond pulse generator for biological applications[J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2012, 40(10):2366-2372.
- [21] 郭飞,张琳,刘欣,姚陈果. 含色散和电穿孔效应的球形细胞在纳秒脉冲下的生物电效应仿真[J]. *高电压技术*, 2020, 46(4):1243-1249.
- [22] GOWRISHANKAR T R, ESSER A T, VASILKOSKI Z, et al. Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(4):1266-1276.
- [23] ROLS M P, TEISSIE J. Electroporation of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration[J]. *Biophys J*, 1998, 75(3):1415-1423.
- [24] BILSKA A O, DEBRUIN K A, KRASSOWSKA W. Theoretical modeling of the effects of shock duration, frequency, and strength on the degree of electroporation[J]. *Bioelectrochemistry*, 2000, 51(2):133-143.
- [25] ZHUANG J, REN W, JING Y, et al. Dielectric evolution of mammalian cell membranes after exposure to pulsed electric fields [J]. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 2012, 19(2):609-622.
- [26] MELCR J, BONHENRY D, TIMR S, et al. Transmembrane potential modeling: comparison between methods of constant electric field and ion imbalance[J]. *J Chem Theory Comput*, 2016, 12(5):2418-2425.
- [27] WEAVER J C, SMITH K C, ESSER A T, et al. A brief overview of electroporation pulse strength: duration space: a region where additional intracellular effects are expected[J]. *Bioelectrochemistry*, 2012, 87(10):236-243.
- [28] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6805):770-776.
- [29] JENSEN S D, KHOROKHORINA V A, MURATORI C, et al. Delayed hypersensitivity to nanosecond pulsed electric field in electroporated cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):1-10.
- [30] PAKHOMOVA O N, GREGORY B W, KHOROKHORINA V A, et al. Electroporation-induced electrosensitization[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):1-10.

(收稿日期:2020-10-26 修回日期:2020-12-26)