

胞有自我更新能力;在 EGF 刺激下增殖迅速;当撤去 EGF 后置于含胎牛血清的培养基和被覆多聚赖氨酸(PLL)的培养皿内,中脑神经前体细胞可分化成神经元和星形胶质细胞。本试验证明我们培养的中脑神经前体细胞具有增殖、自我更新能力和多向分化潜能特性。

关键词:中脑神经前体细胞 表皮生长因子

参 考 文 献

- [1] Gage, F. H., et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**:11879-11883.
- [2] Gritti, A. et al., 1996, *J. Neurosci.*, **16**:1091-1100.
- [3] Palmer, T. D. et al., 1995, *Mol. Cell. Neurosci.*, **8**:389-404.
- [4] Ling, Z. D., et al., 1998, *Exp. Neurol.*, **149**:411-423.
- [5] Vescovi, A. L., et al., 1999, *Exp. Neurol.*, **156**:71-83.

ISOLATION, CULTURE AND CHARACTERIZATION OF MESENCEPHALIC PROGENITOR CELLS IN VITRO

SUN Xiu CHEN Sheng Di LIU Zhen Guo LIU WEI Guo LIANG Liang XU Jie Yi

(Department of Neurology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

ABSTRACT

To understand the characterization of neural progenitor cells in vitro and provide a cell model for studying differentiation of mesencephalic progenitor cells. The rat embryonic E14.5 mesencephalic progenitor cells were isolated and cultured in serum-free medium containing the mitogen epidermal growth factor(EGF). The characterization of progenitor cells was investigated by immunocytochemistry. The cultured mesencephalic cells were positively immunoreactive for progenitor cell marker Nestin, immunonegative for differentiated cell markers, and remained mitotically active. Clonal and population analyses showed their extensive self-renew capacity. The cells are EGF reactive, i. e. proliferate quickly in the medium containing EGF. When growing on poly-L-lysine coated plastic in serum contained medium, the mesencephalic progenitor cells spontaneously differentiate into both neurons and astroglia cells. Our research showed the cultured mesencephalic cells preserved critical characteristics of progenitor cell, including proliferation, self-renew and multipotency.

Key Words: Mesencephalic progenitor cell Epidermal growth factor(EGF)

乳猪肝细胞短期培养后的低温保存*

陈 钟 丁义涛

张鹤云

(南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 南京 210008) (南京大学生化系 南京 210093)

初步临床试验表明生物人工肝是暴发性肝衰竭的一种有效的治疗手段,但尚有一些问题有待解决。肝细胞作为其中的主要成分面临着来源、数量及储存等问题^[1]。新鲜分离肝细胞的保存是直接冻存还是短期培养后冻存尚有争议^[2]。乳猪肝细胞为目前生物人工肝较理想的肝细胞来源,因此,我们以乳猪肝细胞为对象,采用阶段性冻存的方法,对直接冻存法和短期培养后冻存法进行了对比研究,报告如下。

材料和方法

1. 材料

本地杂种小猪5头,雌雄不限,出生后10-15天,体重2.5-2.9kg。主要试剂中胶原酶IV、EDTA、RPMI1640为

Gibco公司产品,新生牛血清(NBS)为杭州四季青生物工程研究所产品,二甲亚砜(DMSO)购自MERCK公司,CO₂培养箱为日本IKEMOTO RK110-2,冻存管购自Nunc公司。

2. 肝细胞的分离

采用改良Seglen原位两步胶原酶灌注法分离肝细胞。收集的肝细胞用RPMI1640悬浮成悬液备用。计数肝细胞总数,台盼蓝拒染试验测肝细胞成活率。

3. 实验分组

每只乳猪分离的肝细胞按是否冻存及冻存方法的不同分为A、B、C三组,A、B两组再按低温保存时间的不同各分两小组。各冻存组采用同一冻存方法:将肝细胞按 1×10^7 /ml接种至含10% NBS、200 μ g/L氢化可的松、200 μ g/L

本文2001年12月3日收到,2002年5月20日接受。

*本研究受江苏省卫生厅重点项目基金(BQ200020)、南京市科委科技发展计划(20012095)资助。

HGF、10 μ g/L EGF、10 μ g/L NGF、100 μ g/L 胰岛素、200 μ g/L Cefoperazone sodium、10 万 U/L 青霉素和 100 μ g/L 链霉素的 RPMI1640 培养基中,加入 10% DMSO,注入冻存管中,依次放入 4 $^{\circ}$ C 和 -20 $^{\circ}$ C 各保持 30 min,液氮罐口过夜,最后放入液氮中保存^[3]。

A 组(直接冻存组, n=5) 将新分离的肝细胞立即冻存,再分别于保存后 10 天(A1 组)、20 天(A2 组)快速复苏,将解冻后的细胞用 Hanks 液洗涤 3 次,测成活率,最后按 5 \times 10⁵/ml 接种至上述培养基中,培养瓶先用 1% 多聚赖氨酸处理,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 10 天。

B 组(短期培养后冻存组, n=5) 将新分离的肝细胞按 1 \times 10⁷/ml 接种至上述肝细胞培养基中,培养瓶先用 1% 多聚赖氨酸处理,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 天。然后离心去上清,按 1 \times 10⁷/ml 肝细胞数加入新鲜培养基和 10% DMSO,注入冻存管中冻存,再分别于保存后 10 天(B1 组)、20 天(B2 组)快速复苏,将解冻后的细胞用 Hanks 液洗涤 3 次,测成活率,最后按 5 \times 10⁵/ml 接种至上述培养基中,培养瓶先用 1% 多聚赖氨酸处理,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 10d。

C 组(对照组) 将新分离的肝细胞按 5 \times 10⁵/ml 接种至上述肝细胞培养基中进行培养。

4. 肝细胞成活率、功能观察

(1) 成活率 将复苏后的肝细胞用 Hanks 液洗涤 3 次后用台盼蓝拒染试验测定,计数每 200 个肝细胞中活细胞百分比,培养肝细胞在 1、5、10 天测定其成活率。

(2) 白蛋白合成功能、上清中尿素浓度及 LDH 活性 培养 1、5、10 天取上清液,在全自动生化分析仪(MEGA Toshiba)上测定。

(3) 葡萄糖合成功能检测 培养 1、5、10 天分别将培养基改为加入 160g/L 的果糖和 10% NBS 的无糖的 Hanks-HEPES 液。同时在培养后 1、4、8 小时收集上清,在全自动生化分析仪(MEGA Toshiba)上测定葡萄糖含量。

(4) 安定转化试验 培养开始取 10ml 细胞悬液,其中加入安定标准品 25mg/L,于培养 1、5、10 天收集上清,用自动荧光偏振分析仪(Abbott TDX)检测安定浓度。

(5) 葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)活性 复苏后培养 1、5、10 天收集肝细胞,粉碎,以 G-6-P 为底物,以反应的终产物中磷酸的含量,测 G-6-Pase 的活性。

5. 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,用方差分析(ANOVA)及模型参数的 *t* 检验(Stata 6.0 软件)进行统计学处理。

结 果

1. 肝细胞产量及成活率

平均每只肝获得(3.95 \pm 1.33) \times 10⁹ 个肝细胞,各组不同培养时间的肝细胞成活率见表 1。短期培养后冻存组肝细胞复苏当天、1 天成活率高于直接冻存组;B1 组 5 天成活率低于 A1 组,10 天的成活率高于 A1 组。各冻存组肝细胞成活率低于对照组。

表 1 肝细胞成活率变化(%)($\bar{x} \pm SD$)

组别	0d	1d	5d	10d
A1(n=5)	83.38 \pm 6.15	88.25 \pm 5.37*	92.45 \pm 2.67	85.05 \pm 3.90*
A2(n=5)	83.50 \pm 1.98	75.50 \pm 3.51	93.15 \pm 6.20	94.90 \pm 5.89
B1(n=5)	87.07 \pm 13.51 ^Δ	96.10 \pm 2.96 ^Δ	82.17 \pm 8.68 ^{Δ#}	92.62 \pm 1.87 ^{Δ#}
B2(n=5)	91.55 \pm 5.82 ^Δ	95.57 \pm 3.41 ^Δ	92.55 \pm 3.10	84.75 \pm 2.54
C(n=5)	97.57 \pm 2.91 [#]	96.67 \pm 5.52 [#]	97.70 \pm 2.78 [#]	90.70 \pm 2.19 [#]

注:* A1 组与 A2 组比较、B1 组与 B2 组比较, *P*<0.05;

^Δ B1 组与 A1 组比较、B2 组与 A2 组比较, *P*<0.05;

[#] C 组与各组比较, *P*<0.05。

2. 白蛋白合成功能、尿素浓度、LDH 及 G-6-Pase 活性

肝细胞白蛋白合成功能 B1 组高于 B2 组, A1 组高于 A2 组,说明低温保存时间的延长可影响肝细胞白蛋白合成功能;B2 组高于 A2 组,说明短期培养后冻存 20d 组肝细胞白蛋白合成功能高于直接冻存组。尿素浓度随着培养时间的延长而升高;A1 组高于 A2 组,说明肝细胞尿素合成功能受低温保存时间的影响。上清中 LDH 活性 B1 组低于 A1 组, B2 组低于 A2 组,说明短期培养后冻存组 LDH 活性

低于直接冻存组。肝细胞 G-6-Pase 活性各冻存组低于对照组;B1 组高于 A1 组, B2 组高于 A2 组,说明短期培养后冻存组肝细胞 G-6-Pase 活性高于直接冻存组(表 2)。

3. 葡萄糖合成功能

肝细胞葡萄糖合成功能随着培养时间的延长而有所增强;A1 组、B2 组高于 A2 组, B1 组高于 B2 组,说明葡萄糖合成功能受冻存时间的影响,短期培养后冻存 20 天组肝细胞葡萄糖合成功能高于直接冻存组;A2 组、B2 组低于 C 组,说明冻存 20 天组肝

表2 白蛋白、尿素、LDH、G-6-Pase 活性变化 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	培养天数	检测指标			
		白蛋白 (g/L)	尿素 (mmol/L)	LDH (U/L)	G-6-Pase 活性 (nmol/10 ¹⁰ cell)
A1(n=5)	1	3.15±0.06*	1.43±0.15*	37.88±1.19 [△]	4.74±1.32 [◇]
	5	3.05±0.06*	12.25±0.41	38.58±1.42 [△]	5.12±1.72
	10	3.20±0.00*	16.28±1.19*	38.70±1.31 [△]	4.21±0.29 [△]
A2(n=5)	1	2.83±0.05 [#]	1.08±0.05	31.60±1.04 [#]	7.50±0.98 ^{#◇}
	5	2.83±0.10 [#]	12.15±0.81	31.10±2.74 [#]	2.43±0.41 [#]
	10	2.62±0.05 [#]	14.43±0.26	24.98±1.40 [#]	4.14±0.54 [#]
B1(n=5)	1	3.12±0.05 [#]	1.30±0.41	17.68±0.26 [#]	11.24±2.94 [◇]
	5	3.05±0.06 [#]	12.80±0.82	21.28±0.57 [#]	5.04±2.06
	10	3.08±0.09 [#]	14.40±0.57	17.08±1.20 [#]	8.02±2.99
B2(n=5)	1	2.90±0.00	1.30±0.12	26.35±1.16	8.68±6.26 [◇]
	5	2.85±0.06	12.55±0.82	21.03±1.46	5.91±1.59
	10	2.85±0.06	14.43±0.29	17.63±2.41	10.01±1.21
C(n=5)	1	3.16±0.05	2.88±0.96	63.75±2.04	20.29±3.73
	5	3.04±0.08	12.80±0.43	55.25±1.61	5.04±1.33
	10	3.10±0.06	15.10±0.18	47.85±1.49	5.90±0.29

注: * 与 A2 组比较, $P < 0.05$; [△] 与 B1 组比较, $P < 0.05$;
[#] 与 B2 组比较, $P < 0.05$; [◇] 与 C 组比较, $P < 0.05$ 。

表3 肝细胞葡萄糖合成功能 ($\bar{x} \pm SD$) (mmol/L)

组别	1d	5d	10d
A1(n=5)	0.24±0.04*	0.34±0.06 [#]	0.43±0.08*
A2(n=5)	0.21±0.04 ^{#△}	0.30±0.03 [#]	0.37±0.05 ^{#△}
B1(n=5)	0.28±0.06 [△]	0.34±0.07 [#]	0.46±0.04 [△]
B2(n=5)	0.23±0.05 [#]	0.34±0.03 [#]	0.43±0.08
C(n=5)	0.26±0.06	0.38±0.03	0.45±0.05

注: * 与 A2 组比较, $P < 0.05$; [△] 与 B2 组比较, $P < 0.05$;
[#] 与 C 组比较, $P < 0.05$ 。

表4 肝细胞安定转化试验 ($\bar{x} \pm SD$) (mg/L)

组别	0d	1d	5d	10d
A1(n=5)	27.56±0.00	22.90±0.82*	21.41±2.58*	22.83±0.96*
A2(n=5)	27.56±0.00	23.64±1.77 [△]	25.07±1.41 [△]	22.54±0.72 [△]
B1(n=5)	27.56±0.00	19.26±1.75	19.89±2.15	18.58±0.61
B2(n=5)	27.56±0.00	18.70±1.03	17.37±4.00	19.30±0.47
C(n=5)	27.56±0.00	9.12±0.81 [#]	9.56±0.62 [#]	9.40±0.16 [#]

注: 0d 为安定标准品测定值 * 与 B1 组比较, $P < 0.05$;
[△] 与 B2 组比较, $P < 0.05$; [#] C 组与其他组比较, $P < 0.05$ 。

讨 论

肝细胞培养已广泛应用于生物人工肝、肝细胞移植、药物代谢及细胞毒性试验等领域^[4]。由于肝细胞体外培养增殖较难, 只能较短时间维持其成活率和功能, 而且易受污染, 因此, 低温保存肝细胞无疑是保存的理想方法^[5]。低温保存肝细胞还减少了对动物数量及新鲜肝细胞的需要。然而, 肝细胞对外界环境变化十分敏感, 多数文献报告低温保存肝细胞后成活率及功能受到影响^[6-8], 迄今为止, 尚无一种理想的冻存方案。

冻存和复苏过程中肝细胞易受理化因素影响,

细胞葡萄糖合成功能低于对照组(表3)。

4. 安定(Diazepam)转化试验

安定浓度随着培养时间的延长逐渐下降, 以培养后 24h 下降最为明显; B1 组、B2 组安定浓度低于 A1、A2 组, 说明短期培养后冻存组肝细胞安定转化能力高于直接冻存组; 各冻存组安定浓度高于 C 组, 说明冻存对肝细胞安定转化能力有一定影响(表4)。

造成细胞膜的严重破坏、细胞器的丢失, 导致细胞水肿、功能丧失甚至死亡。冻存成功的关键有以下几点: (1) 供肝须处于良好状态, 避免离体后保存过缓 (>24h) 及热缺血时间过久 (>1/2h); (2) 缓慢加入保护剂以避免渗透性休克, 解冻过程中稀释保护剂以减少其毒性; (3) 控制冷冻速率以调节冰冻过程中晶体形成时的热量释放; (4) 快速解冻以减少细胞内冰晶的形成。但对以下几个问题尚待深入研究: (1) 新分离的肝细胞是直接冻存还是培养后冻存; (2) 低温保护剂及浓度如何选择; (3) 冷冻速率如何控制^[9]。

DMSO 可阻碍冰冻过程中冰晶的形成, 减轻细

胞的损害,并可与细胞膜上的磷脂发生静电反应,提高生物膜的液态流动性,并显著降低生物膜脂质的相变温度,从而增加生物膜对渗透压和细胞皱缩的耐受性,以保持冰冻和解冻过程中细胞膜的稳定,为目前常用的细胞低温保存液,其最佳浓度为10%^[10]。激素、HGF、EGF对肝细胞低温保存亦有保护作用。我们以10% DMSO加入到含激素、血清、生长因子的RPMI1640培养基中作为保存液,将新分离的肝细胞经短期培养后采用阶段性冷冻、快速解冻的方法,取得了较好的保存效果。实验结果表明:各组复苏后肝细胞成活率均达83%以上;短期培养后冻存组肝细胞的成活率、G-6-Pase活性、葡萄糖合成功能及安定转化能力均高于直接冻存组,LDH活性低于直接冻存组,与Koebe等^[10]的报告一致。这可能与分离时细胞膜受酶的消化作用而损伤以及分离后细胞对体外环境有一适应过程有关。因此,直接冻存法对肝细胞影响较大,而经短期培养使细胞膜恢复完整性和稳定性,并使肝细胞适应体外环境后再冻存,冻存、复苏过程中肝细胞受损会减轻,复苏后的肝细胞活率和功能会保持较高水平。本研究中A2组1天时的肝细胞活率低于0天,这可能与直接冻存20天组肝细胞解冻后的适应较慢有关。

实验结果还表明:低温保存20d后复苏细胞再培养组的白蛋白、尿素和葡萄糖合成功能比低温保存10d后复苏再培养组的为低,说明冻存时间长短对肝细胞的一些功能有一定影响。

分离肝细胞的质量对低温保存复苏后的肝细胞的活率和功能十分重要。本实验采用改良Seglen原位灌注法,分离的肝细胞成活率较高(>97%),短期培养后肝细胞得以恢复,以及应用含多种因子、激素和营养成分的低温保存液,因而复苏后肝细胞活率和功能均能保持较高的水平。

应该看到,本研究中冻存组的肝细胞活率、G-6-

Pase活性、葡萄糖合成功能和安定转化能力仍然低于对照组,因此,积极寻找理想的冻存方案仍是今后努力的方向。

摘 要

本文对乳猪肝细胞短期培养后冻存法和直接冻存法进行比较。采用改良原位两步胶原酶灌注法分离乳猪肝细胞,将肝细胞接种到含10% DMSO、激素、生长因子和10% NBS的RPMI 1640培养基中,用阶段性冻存法保存肝细胞,分别对直接冻存和培养后冻存10天、20天复苏的肝细胞进行培养,动态观察其活率和功能。研究结果表明各组复苏后的肝细胞均保持较高的活率;短期培养后冻存组肝细胞活率、G-6-Pase活性、白蛋白和葡萄糖合成功能及安定转化能力均较直接冻存组为高;LDH活性低于直接冻存组;冻存时间的长短对其白蛋白、尿素和葡萄糖合成功能有一定影响。因此,短期培养后冻存法较直接冻存法为好。

关键词: 肝细胞 低温保存 培养
生物人工肝 移植

参 考 文 献

- [1] Riordan S, Williams R, 1997, *Br Med Bull*, **53**: 730-744.
- [2] Li AP, et al., 1999, *Chem Biol Interact*, **121**: 117-123.
- [3] 薛庆善, 2001, 体外培养的原理与技术, 科学出版社, 北京, 128-136.
- [4] Li AP et al., 1999, *Chem Biol Interact*, **121**: 1-5.
- [5] Jamal HZ, et al., 2000, *Gastroenterology*, **118**: 390-394.
- [6] Watts P, Grant MH, 1996, *Human Exp Toxicol*, **15**: 30-37.
- [7] Lawrence JN, Banford DJ, 1991, *Toxicol In vitro*, **5**: 39-50.
- [8] Koebe HG, et al., 1999, *Chem Biol Interact*, **121**: 99-115.
- [9] Diener B, Oesch F, 1995, *Mut Res*, **335**: 309-316.
- [10] Keobe HG, Pahernik SA, 1996, *Artif Organs*, **20**: 1181-1190.

CRYOPRESERVATION OF SUCKLING PIG HEPATOCYTES AFTER SHORT-TERM CULTURE

CHEN Zhong DING Yi Tao

(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital,
Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008)

ZHANG He Yun

(Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

ABSTRACT

In this study, we compared cryopreservation of pig hepatocytes after short-term culture with that of fresh samples. Suckling pig

hepatocytes were isolated by a modified two-step in situ collagenase perfusion method. Hepatocytes were inoculated into RPMI 1640 medium supplemented with 10% DMSO, hydrocortisone, growth factors and 10% newborn bovine serum and cryopreserved by the step-wise method. Viability and functions of hepatocytes cryopreserved by the two protocols for 10 days and 20 days respectively and then cultured after thawing were dynamically observed. The results showed that high viability was maintained in each subgroup. Viability, G-6-Pase activity, syntheses of albumin and glucose, and diazepam transformation were higher in short-term culture group than those in direct cryopreservation group. Albumin, urea and glucose syntheses of hepatocytes were influenced by the duration of cryopreservation. Therefore, the cryopreservation after short-term culture protocol seems better than the direct cryopreservation protocol.

Key words: Hepatocyte Cryopreservation Culture Bioartificial liver Transplantation

低频脉冲电场对胰岛素介导的细胞增殖影响及其作用机理研究*

丁荔萍 张红锋** 陈树德*** 张利华****

(华东师范大学生命科学学院 ***华东师范大学物理系光谱学与波谱学教育部重点实验室

****华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

极低频电磁场(ELF-EMF:0-100Hz)与人类密切相关,我们的日常用电和脑电图波形等都位于这个频率范围内。这些极低频电磁场是否对人类具有不良影响?极低频电磁场对细胞增殖的影响是当前国际上颇有争论的问题。丁翠兰等^[1]发现不同强度的极低频正弦交变磁场对 K562(人白血病肿瘤细胞)和 WZDS(分泌树突状细胞单克隆抗体的杂交瘤细胞)细胞生长有不同程度的抑制作用,另外一些科学家却发现低频电磁场具有促进细胞增殖的作用^[2,3]。一些研究指出,极低频磁场可能具有促癌效应。目前趋向认为,电磁场与细胞作用的初始位点是细胞膜,随后触发的一切反应都是由细胞膜介导的^[4]。细胞膜上的细胞信号系统很可能是与外界电磁场相互作用的关键性靶体之一。Binderman^[5]等发现成骨细胞暴露于 13v/cm 电场中,细胞 DNA 和 cAMP 合成呈同步升高;沈海红等^[6]的研究认为脉冲电场影响鸡胚脑细胞 cAMP 含量和 Ca²⁺通道的活动;Karabakhtsian^[7]等发现低频电磁场作用于人 HL-60 细胞,细胞的重要信使钙离子明显下降;Pessina^[8]等用 50 Hz 3mT 脉冲电磁场处理人星形细胞瘤 U-373MG 细胞,发现钙离子浓度显著上升;Eichwald^[9]等认为极低频电磁场干扰细胞内信号转导并直接与细胞的钙离子转导过程相关联,提出存在受体控制胞浆钙振荡的理论。

胰岛素是一种肽类激素,它是几乎所有细胞株在无血清培养基中生长时必需添加的生长因子^[10]。有报道表明,胰岛素抑制腺苷酸环化酶的活性,使细胞内 cAMP 浓度下降^[11],而 cAMP 浓度的下降,具有促进有丝分裂的作用。作者在研究脉冲电场影响人皮肤细胞生长的实验中发现,培养基中添加生长因子胰岛素是电场产生效应的重要因素之一。在细

胞未受电场处理,仅将电场处理的胰岛素加入培养基后,细胞的增殖活动发生明显变化。由于胰岛素是人肝细胞培养时需要添加的生长因子,胰岛素与其受体结合,发挥受体的酪氨酸激酶活性,启动细胞内的一系列生化反应,引起细胞分化、分裂等生物效应。因此本实验选择胰岛素——胰岛素受体这一信号转换系统,从脉冲电场改变胰岛素与其受体的专一结合特性方面,研究脉冲电场的细胞生物效应机理问题。

材料和方法

1. 材料

(1) 正常人肝细胞 L-02 细胞株 中科院上海生化细胞所。

(2) 试剂和药品 小牛血清(FCS):中科院实生公司;1640 培养基:GIBCOBRL 公司;胰蛋白酶:SIGMA 公司;MTT:SERVA 进口分装;DMSO:SIGMA 公司;胰岛素注射液:上海生物化学制药厂;胰岛素抗体:DAKO 公司;荧光标记二抗(FITC):DAKO 公司;其他试剂均为分析纯。

(3) 培养器皿 96 孔细胞培养板为 Corning 公司产品。

(4) 主要仪器 FAC Scan 流式细胞仪:BECTON DICKSON 公司;荧光分光光度计:HITACHI 850 型;脉冲电场发生系统:由华东师范大学物理教研室自行设计的,可使细胞培养板或培养瓶受均匀辐照的脉冲电场装置(电场频率 $f=50\text{Hz}$,脉宽 $\tau=20\mu\text{s}$,溶液中场强峰值 $E_{pp}=1\text{V/m}$),脉冲电场存在于两圆形平板电极板之间。

本文 2001 年 12 月 7 日收到,2002 年 5 月 20 日接受。

*国家自然科学基金面上和重点资助课题(NO 39870193 和 NO 50137030)。

上海市重点学科资助课题。

**通讯作者。