

·综述·

脉冲电磁场调控干细胞增殖与分化

王 谦¹ 王 朴¹ 刘小菁² 何成奇^{1,3}

干细胞增殖与分化的过程受多种内在机制和微环境的影响^[1]。脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMFs)作为一种非侵入性的物理干预方法,在临床上多用于治疗骨质疏松及骨不连^[2]。美国乔治亚理工学院、台湾中原大学、韩国国民大学、意大利菲拉市大学以及国内武汉华中同济大学和四川大学等诸多国内外科研机构 and 学者对PEMFs的生物学效应进行了深入研究。本文对PEMFs如何调控骨髓间充质干细胞、表皮干细胞、前软骨干细胞、神经干细胞及脂肪干细胞等的增殖与分化进行阐述;对其相关机制进行探讨,发现PEMFs可能通过影响细胞膜电位、细胞间信息传递、第二信使、基因调控以及氧化应激反应等调控干细胞的增殖与分化。因此,可以推断PEMFs通过直接或间接干预的方式发挥其生物学效应,调控干细胞的增殖与分化,在康复医学、组织工程学 and 再生医学等领域中具有广泛的应用前景。

1 PEMFs调控干细胞增殖与分化

1.1 PEMFs调控骨髓间充质干细胞增殖与分化

骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)是骨髓基质中一类具有自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,是再生医学及组织工程中重要的种子细胞来源^[3]。特定参数的PEMFs干预能够调控BM-MSCs的增殖及细胞生长周期^[4],诱发其向特定细胞如成骨细胞^[5]、成软骨细胞^[6]、神经细胞^[7]和心肌细胞^[8-9]等分化。

PEMFs促进BM-MSCs细胞增殖具有时间依赖性,在早期通过引起细胞周期中G1+S+G2的比例增加来促进细胞增殖,在晚期促增殖效应不明显^[4,10]。PEMFs在诱导BM-MSCs向特定细胞分化的早期可促进细胞增殖,但在晚期有可能抑制细胞增殖^[11]。Jansen等^[12]发现,频率15Hz、强度0.1mT的PEMFs作用14d后,诱导BM-MSCs向成骨细胞分化;然而,细胞中DNA合成量明显减少,细胞生长和增殖受到抑制。

PEMFs能够调控BM-MSCs向成骨细胞分化,调节成骨相关基因的表达,增强碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性,增加细胞外基质的钙化沉积及胶原的合成^[13-14]。Sun等^[15]报道,频率15Hz、强度1.8mT的PEMF干预加速了

BM-MSCs向成骨细胞分化,在成骨分化中期,细胞外基质中钙结节的数量显著增加。此外,PEMFs与其他成骨诱导因子联合作用具有协同效应,能够增强成骨诱导剂BMP-2、脱钙骨基质(demineralized bone matrix,DBM)及二氢睾酮(dehydro-epiandrosterone,DHEA)诱导BM-MSCs成骨分化的作用^[16-18]。

PEMFs能够诱导BM-MSCs在成纤维生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF-2)和转化生长因子 β 3(trans-forming growth factor- β 3, TGF- β 3)作用下向成软骨细胞分化^[6,19],增加II型胶原和聚集蛋白多糖的合成。同时,PEMF还可对抗IL-1 β 对软骨形成的抑制,加速BM-MSCs向软骨细胞分化^[20]。

此外,PEMFs能够诱导BM-MSCs在体外向神经细胞分化^[21],其机制可能与活性氧(reactive oxygen species, ROS)和EGFR(epidermal growth factor receptor)信号通路有关^[7]。在5-氮胞苷作用下,频率50Hz、强度1mT的PEMF诱导BM-MSCs向心肌样细胞分化,辅助肌动蛋白(ACTN2)、 α -肌球蛋白(α -actin)及肌钙蛋白T-2(TNNT2)的表达增加^[8-9]。

1.2 PEMFs调控表皮干细胞增殖与分化

表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)是维持皮肤正常组织结构和细胞内环境稳定的基本要素,在创伤修复中起重要作用^[22]。如何在体外实现ESCs快速扩增,为创面移植治疗争取时间,是皮肤组织工程要解决的关键问题。PEMFs能够增加ESCs细胞周期中S期所占的比例,促进ESCs的生长和增殖^[23]。I型胶原海绵支架是体外培养ESCs的良好载体,PEMFs作用于I型胶原海绵支架培养的ESCs可协同实现ESCs的快速扩增^[24]。而且,PEMFs干预还可增加ESCs中整合素 β_1 (integrin β_1)和角蛋白19(Cytokeratin 19)的合成^[25],因此,PEMFs在皮肤组织工程中具有广阔的应用前景。

1.3 PEMFs调控前软骨干细胞增殖与分化

前软骨干细胞(precartilaginous stem cells, PSCs)又称为软骨母细胞,存在于骺板周围的La Croix环内,是构建组织工程骺板的理想种子细胞^[26]。然而,PSCs分离纯化方法复杂,增殖缓慢,难以大量获取。PEMFs能显著促进PSCs增殖,可能通过上调Bcl-2蛋白表达而抑制细胞凋亡,1mT为促

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.02.021

1 四川大学华西医院康复医学科,四川省康复医学重点实验室,成都,610041; 2 四川大学华西医院心血管疾病研究室; 3 通讯作者
作者简介:王谦,男,博士在读; 收稿日期:2013-03-03

进细胞增殖的最佳磁场强度^[27]。频率 50Hz、强度 1mT 的 PEMF 促进 PSCs 向成熟软骨细胞增殖分化,其作用机制可能与 Ihh/PTHrP 信号通路活性有关^[28]。

1.4 PEMFs 调控神经干细胞增殖与分化

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)作为神经组织自我修复的细胞基础,已成为中枢神经系统退行性疾病及损伤后功能恢复的研究焦点^[29]。PEMFs 能够促进 NSCs 的增殖与分化。Roberto 等^[30]研究发现,频率 50Hz、强度 1mT 的 PEMFs 增加细胞膜上 Cav-1 通道的活性,诱发 Ca^{2+} 内流,调控 NSCs 向神经细胞分化。Meng 等^[31]研究发现,高强度的 PEMFs (频率 0.1Hz、强度 4T) 只能促进 NSCs 的生长和增殖,不影响其分化过程。

1.5 PEMFs 调控脂肪干细胞增殖与分化

脂肪干细胞(Adipose derived stem cells, ADSCs)是脂肪组织基质中具有多向分化潜能的成体干细胞,在骨组织工程中具有广泛的应用前景^[32]。PEMFs 是调控 ADSCs 向成骨细胞分化的强有力因素。ADSCs 在成软骨诱导条件下,经频率 15Hz、强度 2mT 的 PEMFs 干预后仍可向成骨细胞分化^[33]。Kang 等^[34-35]发现,频率 45Hz、强度 1mT 的 PEMFs 增强 ADSCs 向成骨细胞分化,并且 BMP、Wnt 及 TGF β 信号通路可能介导了上述分化过程。ADSCs 经过 PEMFs 预处理 2 周后移植入鼠颅骨缺损模型中,4 周后缺损部分愈合面积是对照组的 1.9 倍。

1.6 PEMFs 调控其他种类干细胞增殖与分化

除此之外,文献中还报道了 PEMFs 调控胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、心脏干细胞(cardiac stem cell, CSCs)和内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)等增殖和分化过程。频率 50Hz、强度 1.1mT 的 PEMF 与化学成骨诱导剂联合应用,协同诱导胚胎干细胞(ESCs)向成骨细胞分化^[36]。PEMFs 能够增加细胞内 Ca^{2+} 内流,促进心脏干细胞(CSCs)向成熟心肌细胞分化^[37]。内皮前体细胞(EPCs)是构建血管组织的种子细胞,PEMFs 能够提高 EPCs 的增殖活性,促进其向成熟内皮细胞分化,开辟了治疗血管形成的新途径^[38]。

2 PEMFs 调控干细胞增殖与分化的相关机制

近年来,PEMFs 的生物学效应受到广泛关注,PEMFs 可能通过影响细胞膜电位^[37]、细胞间信息传递^[39]、第二信使^[40]、基因调控^[12]以及氧化应激反应^[7]等调控干细胞的增殖与分化。

2.1 细胞膜电位

PEMFs 的生物学效应主要发生在细胞膜上,使细胞膜在原有静息电位基础上,产生一个新的跨膜电位。跨膜电位的大小与外加电磁场的参数及细胞膜的种类、体积等有关,能够直接影响细胞膜的通透性及细胞的结构功能。在 PEMFs

干预下,细胞膜的结构及膜上相关酶发生变化,膜的通透性改变, Ca^{2+} 内流增加^[37,41]。细胞内 Ca^{2+} 增高可直接或通过钙调蛋白间接激活一些蛋白激酶,引起蛋白磷酸化,进而改变胞内一系列信号通路,将 PEMFs 刺激信号传递至核内,调控细胞的增殖与分化^[7]。

2.2 细胞间信息传递

细胞缝隙连接通讯(Gap junctional intercellular communication, GJIC)是相邻细胞间信息传递的方式,对于维持细胞正常生长与分化起重要作用。当正常组织再生和细胞增殖时,GJIC 受到抑制^[42]。PEMFs 干预促进细胞增殖,其机制可能与 GJIC 功能受到抑制有关。Yamaguchi 等^[39]观察频率 30—120Hz 的 PEMFs 作用于体外培养的 MC3T3-E1 细胞,在细胞增殖阶段,GJIC 信号减弱,提示 PEMFs 干预抑制了 GJIC 的功能,从而促进细胞增殖。Lohmann 等^[43]报道了 PEMFs 干预可减少细胞间隙连接蛋白 43(Connexin 43)的生成,抑制 GJIC 功能。

2.3 第二信使

cAMP 作为细胞内的“第二信使”,能够调节细胞的增殖与分化^[44]。PEMFs 作用于细胞膜上的受体,激活胞内 cAMP 系统,继而触发一系列磷酸化信号放大反应,依次活化各级酶系统,调控细胞的增殖与分化^[45]。研究发现,频率 50Hz、强度 2mT 的 PEMF 在诱导 BM-MSCs 成骨分化过程的早期上调 cAMP 表达,激活蛋白激酶 A 信号传导通路,调控 BM-MSCs 的增殖与分化^[40]。

2.4 基因调控

PEMFs 可从基因转录水平调控干细胞的增殖与分化。研究报道^[46],频率 50Hz、强度 1mT 的 PEMFs 上调 BM-MSCs 中 c-fos 和 c-myc 即刻早期基因的表达,从而增强 BM-MSCs 的增殖活性,并诱导其向成骨细胞分化。Jansen 等^[12]发现,频率 15Hz、强度 0.1mT 的 PEMF 在诱导 BM-MSCs 向成骨分化中,RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)的表达上调,而细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)的表达没有变化。杨国华等^[47]研究发现,PEMFs 干预早期通过 ERK 信号通路促进细胞增殖;而在 PEMFs 诱导 BM-MSCs 成骨分化的过程中,ERK 信号通路所起的作用较小。

2.5 氧化应激反应

活性氧(reactive oxygen species, ROS)可触发胞内信号传导,调节细胞增殖与凋亡^[48],对干细胞的自我更新和分化能力具有重要影响^[49]。PEMFs 能够调节胞内氧自由基与抗氧化剂含量,引起 ROS 合成增加并导致氧化应激反应^[50]。ROS 的产生可能介导了 PEMFs 调控干细胞增殖与分化的过程。研究发现,频率 50Hz、强度 1mT 的 PEMFs 诱发 BM-MSCs 产生 ROS,ROS 通过激活 EGFR(epidermal growth factor recep-

tor)信号通路,引起细胞内Ca²⁺增高,从而参与了PEMFs诱导BM-MSCs在体外向神经细胞分化^[7,21]。

3 前景与展望

综上所述,PEMFs通过直接或间接干预的方式调控干细胞的增殖与分化。PEMFs对干细胞的调控具有“生物窗”效应,只有特定频率或强度的PEMFs对干细胞起调控作用。因此,如何确定PEMFs的有效“生物窗”,以及如何利用PEMFs与化学因子的协同诱导效应,成为PEMFs在组织工程和再生医学领域中急需解决的关键科学问题。PEMFs对干细胞调控的作用靶点、信号通路及相关作用机制也有待进一步的研究和探索。

参考文献

- [1] Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life[J]. Cell, 2008, 132(4):598—611.
- [2] Assiotis A, Sachinis NP, Chalidis BE. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and non-unions. A prospective clinical study and review of the literature[J]. J Orthop Surg Res, 2012, 7(24):1—6.
- [3] Kagami H, Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: basic science to clinical translation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(3):286—289.
- [4] Li X, Zhang M, Bai L, et al. Effects of 50 Hz pulsed electromagnetic fields on the growth and cell cycle arrest of mesenchymal stem cells: an in vitro study[J]. Electromagnetic Biology and Medicine, 2012, 31(4):356—364.
- [5] Yang Y, Tao C, Zhao D, et al. EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes[J]. Bioelectromagnetics, 2010, 31(4):277—285.
- [6] Mayer-Wagner S, Passberger A, Sievers B, et al. Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Bioelectromagnetics, 2011, 32(4):283—290.
- [7] Park JE, Seo YK, Yoon HH, et al. Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation[J]. Neurochemistry International, 2013, 62(4):418—424.
- [8] 李凯, 姜建, 姚晓林, 等. 低频脉冲电磁场诱导大鼠骨髓间充质干细胞 ACTN2, α -actin 和 TNNT2 表达[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(5):670—674.
- [9] 冯贤, 何学令, 李凯, 等. 脉冲电磁场诱导大鼠骨髓间充质干细胞体外心肌样细胞分化的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2011, 28(4):676—682.
- [10] Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, et al. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(4):251—260.
- [11] Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, et al. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2009, 27(9):1169—1174.
- [12] Jansen JH, van der Jagt OP, Punt BJ, et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study[J]. BMC musculoskeletal disorders, 2010, 11(188):1—11.
- [13] Zhong C, Zhang X, Xu Z, et al. Effects of low-intensity electromagnetic fields on the proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow stromal cells[J]. Physical Therapy, 2012, 92(9):1208—1219.
- [14] Luo F, Hou T, Zhang Z, et al. Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Orthopedics, 2012, 35(4):526—531.
- [15] Sun LY, Hsieh DK, Lin PC, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate proliferation and osteogenic gene expression in human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation[J]. Bioelectromagnetics, 2010, 31(3):209—219.
- [16] Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, et al. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2008, 26(9):1250—1255.
- [17] 王志平, 柳峰, 赵建华. 脉冲电磁场对脱钙骨基质诱导人骨髓干细胞成骨分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9):947—950.
- [18] Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2012, doi: 10.1002/term.1612.
- [19] 邱飞远, 何学令, 姚晓琳, 等. 低频脉冲电磁场诱导大鼠骨髓间充质干细胞软骨样细胞分化[J]. 生物医学工程学杂志, 2012, 29(3):501—507.
- [20] Ongaro A, Pellati A, Setti S, et al. Electromagnetic fields counteract IL-1 β activity during chondrogenesis of bovine mesenchymal stem cells[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2012, doi: 10.1002/term.1671.
- [21] Cho H, Seo YK, Yoon HH, et al. Neural stimulation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by extremely low frequency electromagnetic fields[J]. Biotechnology Progress, 2012, 28(5):1329—1335.
- [22] Beck B, Blanpain C. Mechanisms regulating epidermal stem cells[J]. The EMBO Journal, 2012, 31(9):2067—2075.
- [23] Zhang M, Li X, Bai L, et al. Effects of low frequency electromagnetic field on proliferation of human epidermal stem cells: An in vitro study[J]. Bioelectromagnetics, 2012, 34(1):

- 74—80.
- [24] Bai WF, Zhang MS, Huang H, et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on human epidermal stem cells cultured on collagen sponge scaffolds[J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2012, 88(7):523—530.
 - [25] 张鸣生, 何斌, 朱洪翔, 等. 不同频率低强度脉冲电磁场对表皮干细胞增殖的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 28(11):726—729.
 - [26] Zhang S, Chen A, Hu W, et al. Immunological purification of rat precartilaginous stem cells and construction of the immortalized cell strain[J]. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2008, 128(11):1339—1344.
 - [27] 黄志刚, 李锋, 游洪波, 等. 不同强度工频电磁场对大鼠前软骨干细胞增殖的影响[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(20):3466—3468.
 - [28] 丁然, 游洪波, 李锋, 等. 脉冲磁场与前软骨干细胞向成熟软骨细胞的增殖与分化: 与 Ihh/PTHrP 信号通路活性有关吗? [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(20):3615—3619.
 - [29] Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, et al. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(8):1078—1087.
 - [30] Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Cav1-channel activity[J]. *Journal of cellular physiology*, 2008, 215(1):129—139.
 - [31] Meng D, Xu T, Guo F, et al. The effects of high-intensity pulsed electromagnetic field on proliferation and differentiation of neural stem cells of neonatal rats in vitro[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Sciences*, 2009, 29(6):732—736.
 - [32] Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine[J]. *Stem cells*, 2012, 30(5):804—810.
 - [33] Chen CH, Lin YS, Fu YC, et al. Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2012, doi: 10.1152/jappphysiol.01216.
 - [34] Kang KS, Hong JM, Seol YJ, et al. Short-term evaluation of electromagnetic field pretreatment of adipose-derived stem cells to improve bone healing[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2012, doi: 10.1002/term.1664.
 - [35] Kang KS, Hong JM, Kang JA, et al. Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2013, 45(e7):1—9.
 - [36] 曹伟鹏, 周强, 徐海伟, 等. 脉冲电磁场诱导小鼠胚胎干细胞向成骨细胞分化[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(009):772—775.
 - [37] Gaetani R, Ledda M, Barile L, et al. Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields[J]. *Cardiovascular research*, 2009, 82(3):411—420.
 - [38] 李飞, 程康, 王海昌, 等. 脉冲电磁场对原代大鼠骨髓来源内皮前体细胞生长及分化的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29(8):514—516.
 - [39] Yamaguchi DT, Huang J, Ma D, et al. Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields in osteoblast-like models is dependent on cell differentiation[J]. *Journal of cellular physiology*, 2002, 190(2):180—188.
 - [40] Wu H, Ren K, Zhao W, et al. Effect of electromagnetic fields on proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Sciences*, 2005, 25(2):185—187.
 - [41] Baur é us Koch CL, Sommarin M, Persson BR, et al. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes[J]. *Bioelectromagnetics*, 2003, 24(6):395—402.
 - [42] Ey B, Eyking A, Gerken G, et al. TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury[J]. *Science's STKE*, 2009, 284(33):22332—22343.
 - [43] Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2003, 21(2):326—334.
 - [44] Jackson EK, Ren J, Gillespie DG, et al. Extracellular 2' , 3' -cyclic adenosine 5' -monophosphate is a potent inhibitor of preglomerular vascular smooth muscle cell and mesangial cell growth[J]. *Hypertension*, 2010, 56(1):151—158.
 - [45] Fini M, Cadossi R, Canè V, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002, 20(4):756—763.
 - [46] 赵东明, 吴华, 祝文涛, 等. 电磁场刺激对骨髓间充质干细胞即刻早期基因表达的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(38):7417—7421.
 - [47] 杨国华, 吴华, 赵东明. 骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化中电磁场激活 ERK 通路的作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(19):3607—3610.
 - [48] Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2011, 194(1):7—15.
 - [49] Hochmuth CE, Biteau B, Bohmann D, et al. Redox regulation by Keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in *Drosophila*[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(2):188—199.
 - [50] Frahm J, Mattsson MO, Simko M. Exposure to ELF magnetic fields modulate redox related protein expression in mouse macrophages[J]. *Toxicology letters*, 2010, 192(3):330—336.