

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.07.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1097.R.20221227.1119.009.html\(2022-12-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1097.R.20221227.1119.009.html(2022-12-28))

低频低功率聚焦超声辐照造影剂微泡空化效应联合贝伐珠单抗治疗兔 VX2 肝癌的实验研究*

王子龙¹,张容亮¹,李进涛²,马艺斐¹,陆永萍^{1△}

(1. 云南大学附属医院超声科,昆明 650021;2. 昆明医科大学实验动物学部 650500)

[摘要] **目的** 探讨超声辐照造影剂微泡空化效应联合贝伐珠单抗治疗兔 VX2 肝癌的效果。**方法** 选取 VX2 肝癌模型兔 30 只,分为 3 组,每组 10 只;超声辐照+贝伐珠单抗+造影剂微泡组(U+B+M 组)、贝伐珠单抗组(B 组)、对照组(C 组);U+B+M 组、B 组每 7 天治疗 1 次,共治疗 4 次。分别于治疗前和治疗第 28 天行二维超声测量肿瘤体积并计算肿瘤体积增长率,通过超声造影计算肿瘤峰强度变化情况;ELISA 方法检测兔血清中的血管内皮生长因子(VEGF)水平。苏木素-伊红(HE)染色观察肿瘤病理切片,通过免疫组织化学染色计数肿瘤的微血管密度(MVD),分析 MVD 与 VEGF 的相关性。**结果** 治疗后,U+B+M 组肿瘤体积增长率最低,其次是 B 组,3 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。超声造影峰强度与血清 VEGF 水平变化具有一致性;治疗前各组超声造影峰强度、VEGF 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,U+B+M 组及 B 组超声造影峰强度、VEGF 水平与治疗前比较降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且 U+B+M 组减低程度明显大于 B 组($P < 0.05$);C 组治疗前、后超声造影峰强度比较差异无统计学意义($P > 0.05$),VEGF 水平差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后,3 组超声造影峰强度、VEGF 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$),进一步组间两两比较差异也有统计学意义($P < 0.05$)。病理 HE 染色可见 U+B+M 组、B 组部分肿瘤微血管囊状扩张,管壁不连续,少许红细胞渗出至管腔外,且 U+B+M 组较 B 组明显;肿瘤组织中 MVD 与血清 VEGF 水平呈显著正相关($r = 0.94, P < 0.01$)。**结论** 低频低功率聚焦超声及其造影剂微泡产生的空化效应能一定程度上增强贝伐珠单抗对兔 VX2 肝癌的治疗效果。

[关键词] 低频低功率超声;微泡;空化效应;贝伐珠单抗;VX2 肝癌**[中图分类号]** R445.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)07-0970-06

Experimental study of low frequency and low power focused ultrasound irradiation microbubbles cavitation effect combined with bevacizumab in the treatment of rabbits VX2 liver cancer*

WANG Zilong¹, ZHANG Rongliang¹, LI Jintao², MA Yifei¹, LU Yongping^{1△}

(1. Department of Ultrasonography, Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming, Yunnan 650021, China; 2. Department of Experimental Zoology, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ultrasound irradiation microbubbles cavitation combined with bevacizumab in the treatment of VX2 liver cancer in rabbits. **Methods** Thirty VX2 liver cancer model rabbits were divided into three groups: the ultrasound irradiation+bevacizumab+contrast agent microbubble group (the U+B+M group), the bevacizumab group (the B group), and the control group (the C group), 10 rabbits in every group. The U+B+M group and the B group were treated once every 7 days, a total of 4 times. Before and on the 28th day of treatment, the tumor volume was measured and the growth rate of tumor volume was calculated by two-dimensional ultrasound, the changes of tumor peak intensity were calculated by contrast-enhanced ultrasound. The level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rabbit serum was detected by ELISA. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological sections of tumor, and the microvessel density (MVD) of tumor was counted by immunohistochemical staining, and the

* 基金项目:云南省高等学校工程研究中心建设项目(2021);云南省科技厅-昆明医科大学联合基金项目(202101AY070001-279);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项资金项目[2019FE001(-093)]。 作者简介:王子龙(1993-),在读硕士研究生,主要从事心血管超声研究。

△ 通信作者, E-mail: luyongping@163.com。

correlation between MVD and VEGF was analyzed. **Results** The growth rate of tumor volume in the U+B+M group was the lowest, followed by group B, there were statistically significant differences among the three groups ($P < 0.05$). The peak intensity of contrast-enhanced ultrasound was consistent with the change of serum VEGF level; there was no significant difference in peak intensity of contrast-enhanced ultrasound and VEGF level among the three groups before treatment ($P > 0.05$); After 28 days of treatment, the peak intensity of contrast-enhanced ultrasound and the level of VEGF in the U+B+M group and the B group were significantly lower than those before treatment ($P < 0.05$), and the reduction degree of the U+B+M group was significantly greater than that of the B group ($P < 0.05$). There was no significant difference in peak intensity of contrast-enhanced ultrasound before and after treatment in the C group ($P > 0.05$), but there was significant difference in VEGF level ($P < 0.05$). After 28 days of treatment, the peak intensity of contrast-enhanced ultrasound and the level of VEGF among the three groups were significantly different ($P < 0.05$), the differences between pairwise comparison between groups was also statistically significant ($P < 0.05$). Pathological HE staining showed that part of the tumor microvessels in the U+B+M group, B group had cystic dilation, the tube wall was discontinuous, and a few red blood cells oozed out of the lumen, and the U+B+M group was more obvious than that in the B group. MVD was positive correlation with serum VEGF level in tumor tissue ($r = 0.94, P < 0.01$). **Conclusion** Low-frequency and low-power focused ultrasound and the cavitation effect of its contrast agent microbubbles can enhance the therapeutic effect of bevacizumab on rabbit VX2 liver cancer to a certain extent.

[Key words] low frequency and low power ultrasound; microbubbles; cavitation effect; bevacizumab; VX2 liver cancer

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制复杂, 大多预后较差, 生存期短。目前常用的治疗方式包括手术切除、介入栓塞、射频消融及分子靶向治疗等, 治疗方法各有优劣, 在提升疗效方面还需进一步探索研究。贝伐珠单抗是临床用于抑制新生血管形成的常用药, 可作为索拉非尼之后治疗晚期 HCC 的又一可行选择^[1], 由于缺乏靶向性, 单纯用药的效果欠佳。随着超声造影技术的不断发展, 造影剂微泡不仅可进入微循环进行显影, 还能通过一定声强的超声波辐照产生空化效应, 提高肿瘤组织的局部药物灌注, 从而增强治疗效果^[2-3]。本实验拟通过监测肿瘤的体积、造影峰强度和兔血清血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平变化情况以及对肿瘤病理切片的微血管密度 (microvessel density, MVD) 分析等来探索研究超声空化效应联合贝伐珠单抗治疗兔 VX2 肝癌的效果, 为临床诊疗 HCC 提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

选取造模 2 周的 VX2 肝癌模型兔 30 只 (上海洛宇生物科技有限公司), 雌雄不限, 体重 (2.37 ± 0.11) kg。抗 VEGF、CD34 单克隆抗体 (福州迈新生物科技有限公司), 贝伐珠单抗注射液 (上海罗氏制药有限公司), 声诺维造影剂 (上海博莱科信谊药业有限责任公司), VEGF ELISA 检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 东芝 Aplio 500 超声诊断仪 [东芝医疗系统 (中国) 有限公司], 低功率聚焦超声实验装置 (重庆融

海超声医学工程研究中心有限公司)。本实验已通过昆明医科大学动物实验伦理审查委员会审查, 批准号 kmmu20211434; 实验动物生产许可证号 SCXK (滇) K2020-0004, 实验动物使用许可证号 SYXK (滇) K2020-0006。

1.2 实验分组及治疗方法

VX2 肝癌模型兔分为 3 组, 每组 10 只: U+B+M 组 (超声辐照 + 贝伐珠单抗 + 造影剂微泡)、B 组 (单纯静脉滴注贝伐珠单抗)、C 组 (空白对照组, 未进行任何治疗)。声诺维造影剂准备: 按使用说明书的操作流程使用 5 mL 生理盐水溶解声诺维造影剂 (含六氟化硫气体 59 mg, 冻干粉 25 mg), 充分摇匀至乳白色。B 组采用静脉缓慢滴注贝伐珠单抗注射液 (10 mg/kg, 1 mg/mL), 滴注时间约 45 min; U+B+M 组在 B 组基础上待贝伐珠单抗滴注至 20 min 左右, 抽取声诺维造影剂 0.2 mL 予以团注, 用 1 mL 生理盐水冲管, 同时进行超声辐照。辐照设备及参数: 采用低功率聚焦超声实验装置, 选择连续工作模式, 频率为 0.65 MHz, 功率为 1.5 W/cm^2 , 每次治疗共照射 8 次, 每次辐照时间为 20 s, 间隔时间为 20 s。以上方法每 7 天治疗 1 次, 共治疗 4 次。

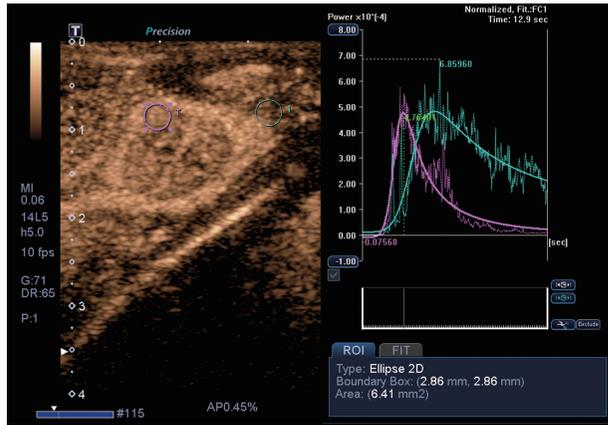
1.3 肿瘤体积增长率计算

于治疗前和治疗第 28 天对各组实验兔的肿瘤组织行二维超声扫查, 测量肿瘤的前后径 (L)、左右径 (W)、上下径 (H) 3 个参数, 根据公式计算肿瘤的体积: $L \times H \times W \times \pi / 6$ ^[4], 测量 3 次取平均值。计算肿瘤体积增长率, 肿瘤体积增长率 = 治疗第 28 天肿瘤

体积/治疗前肿瘤体积 $\times 100\%$ ^[5]。

1.4 肿瘤超声造影检查

对肿瘤行超声造影并存储动态图像,启动机器自带的图像分析软件行时间-强度曲线(time-intensity curves, TIC)定量分析,对比治疗前和治疗第28天肿瘤的造影峰强度变化。



粉色区域:肿瘤组织;绿色区域:正常肝组织,呈典型的“快进快出”增强模式。

图1 超声造影时间-强度曲线图

1.5 血清 VEGF 水平检测

治疗前,在麻醉状态下,经兔耳缘动脉取全血 1~2 mL,常温下静置 2 h,再用离心机 1 000 $\times g$ 离心 30 min,采集上清液于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;于治疗第 28 天用同样的方法采集血清,按 ELISA 试剂盒操作说明书检测各组兔血清 VEGF 水平。

1.6 肿瘤组织病理及 MVD 检测

实验结束后,处死实验兔,制作肿瘤组织石蜡切片,对病理切片行苏木素-伊红(HE)染色及抗 CD34 单克隆抗体免疫组织化学染色。以肿瘤血管内皮细胞出现边界清楚的褐色或黄褐色颗粒为一条微血管,包括独立的血管内皮细胞或细胞束,带有粗大平滑肌的或管径超过 8 个红细胞直径的血管除外。通过 Image J 图像分析软件对 MVD^[6] 进行测定并统计分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件分析数据,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用方差分析,组间两两比较用 LSD- t 检验。同一实验组治疗前、后比较用配对 t 检验。两变量的相关性分析采用 Pearson 直线相关分析法。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤体积增长率

治疗后 U+B+M 组肿瘤体积增长率最低,且小于 100%,即成负增长;B、C 组肿瘤体积增长率均大于 100%,即均呈正增长。3 组间肿瘤体积增长率比较差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步组间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 超声造影

2.2.1 超声造影峰强度定量分析

治疗前各组超声造影峰强度比较差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,U+B+M 组($t = 15.46$)、B 组($t = 6.51$)超声造影峰强度较治疗前降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且 U+B+M 组减低程度明显大于 B 组($P < 0.05$);C 组治疗前、后超声造影峰强度比较差异无统计学意义($t = 2.17, P > 0.05$);治疗后,3 组超声造影峰强度比较差异有统计学意义($P < 0.05$),进一步组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组 VX2 兔肿瘤体积增长率比较($\bar{x} \pm s, \%, n = 10$)

组别	治疗前	治疗后	肿瘤增长率(%)
U+B+M 组	1.12 \pm 0.48	1.07 \pm 0.28 ^b	96.77 \pm 3.48
B 组	1.19 \pm 0.52	2.50 \pm 0.50 ^a	214.40 \pm 12.78 ^a
C 组	1.15 \pm 0.46	3.49 \pm 0.12 ^{ab}	308.11 \pm 16.65 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与 U+B+M 组比较;^b: $P < 0.05$,与 B 组比较。

表 2 各组超声造影峰强度比较($\bar{x} \pm s, \times 10^{-5} \text{ AU}, n = 10$)

组别	治疗前	治疗后
U+B+M 组	56.63 \pm 1.55	32.94 \pm 1.03 ^a
B 组	54.19 \pm 2.23	39.60 \pm 1.65 ^{ab}
C 组	54.36 \pm 1.57	55.56 \pm 1.26 ^{bc}

^a: $P < 0.05$,与治疗前比较;^b: $P < 0.05$,与 U+B+M 组比较;^c: $P < 0.05$,与 B 组比较。

2.2.2 肉眼评估

U+B+M 组肿瘤体积较治疗前略缩小,B 组稍增大,C 组明显增大。超声造影峰强度:C 组超声造影峰强度较治疗前增高,其余 2 组降低,且 U+B+M 组降幅较 B 组显著。上述特征与软件定量分析结果一致,见图 2。

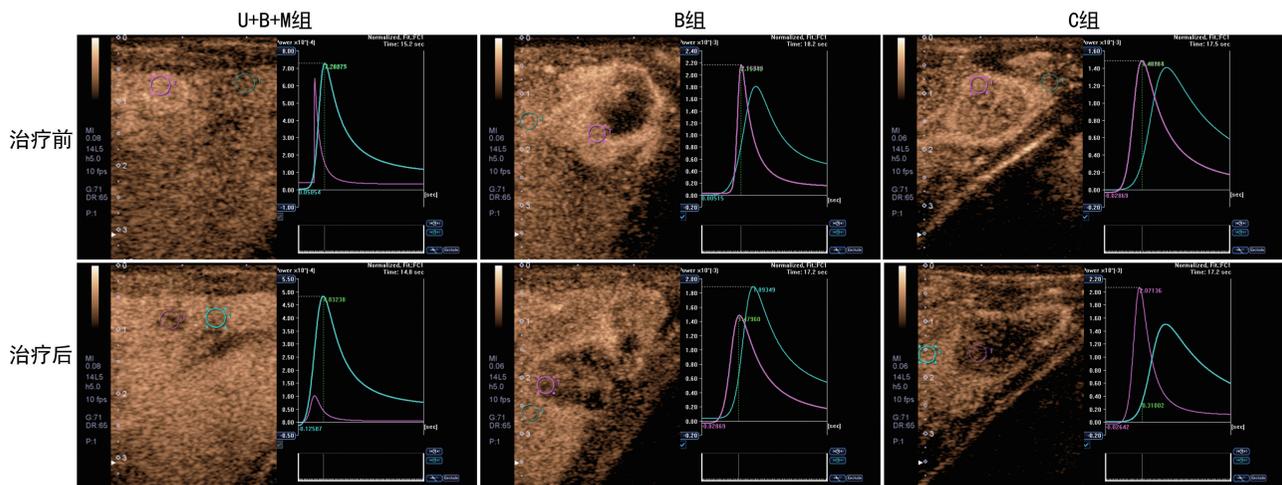
2.3 血清 VEGF 水平测定

治疗前各组 VEGF 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,U+B+M 组、B 组较治疗前降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 U+B+M 组降低程度大于 B 组($P < 0.05$);C 组治疗较治疗前后升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3 组 VEGF 比较差异有统计学意义,进一步行组间两两比较,差异也均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组治疗前、后血清 VEGF 水平比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n = 10$)

组别	治疗前	治疗后
U+B+M 组	29.62 \pm 0.60	21.89 \pm 0.50 ^a
B 组	28.96 \pm 0.57	24.25 \pm 0.53 ^{ab}
C 组	29.14 \pm 0.55	34.34 \pm 0.41 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与治疗前比较;^b: $P < 0.05$,与 U+B+M 组比较;^c: $P < 0.05$,与 B 组比较。



紫色:肿瘤;蓝色:正常肝脏。

图2 各组肝癌组织治疗前、后超声造影时间-强度曲线对比图

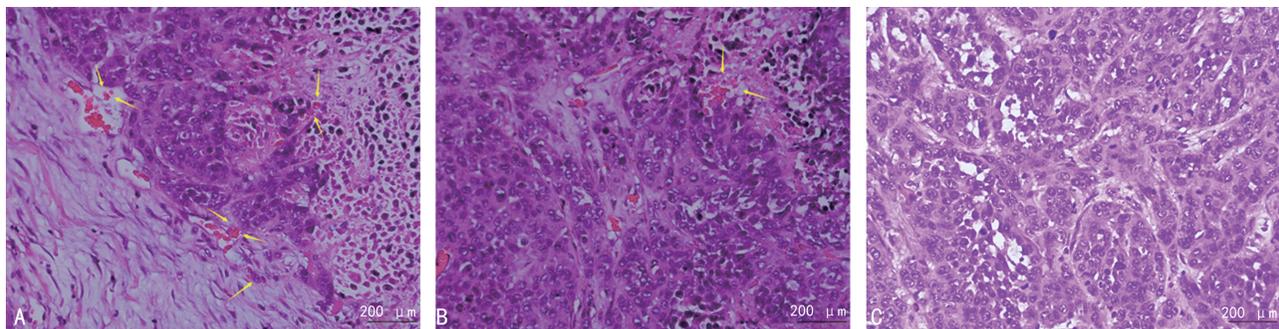
2.4 病理 MVD

2.4.1 病理检测

对各组肿瘤组织病理切片行 HE 染色, C 组可见散在分布、形态各异的癌巢, 癌巢内肿瘤细胞分布密集, 核大而深染; 另可见局灶性坏死的肿瘤组织, 肿瘤细胞体积缩小, 核固缩、碎裂。癌巢之间可见形态多变、数量不等且走行弯曲的血管及纤维组织, 血管腔内可见红细胞; U+B+M 组、B 组部分微血管腔呈囊状扩张, 管壁连续性中断, 可见红细胞渗出至管腔外(箭头所示), 且 U+B+M 组较 B 组明显, 见图 3。

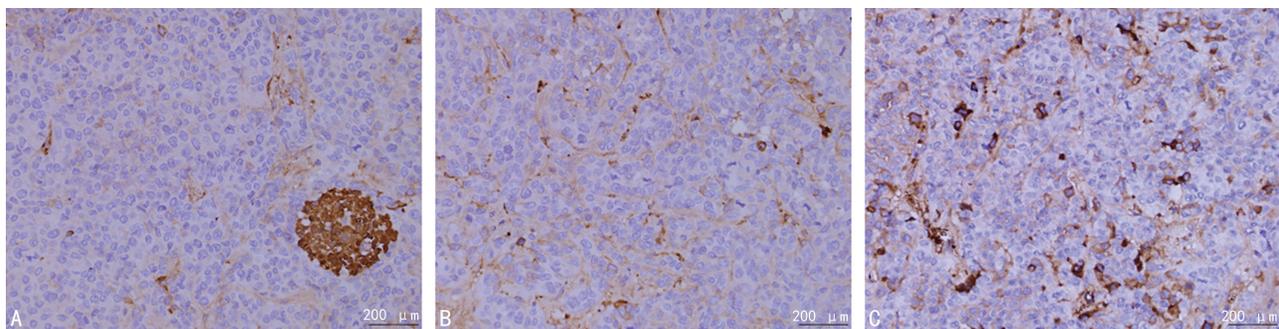
2.4.2 MVD 检测

各组抗 CD34 单克隆抗体染色呈褐色颗粒, 形态各异、分布不均, 靠近肿瘤组织边缘、新生癌巢内相对密集; 部分着色的细胞团中央可见微血管腔。U+B+M 组、B 组及 C 组颗粒密集程度依次递增, 见图 4。治疗后, U+B+M 组、B 组、C 组 MVD 值分别为 (21.57 ± 4.20) 、 (27.86 ± 6.20) 、 (49.71 ± 4.72) 个, 3 组肿瘤切片的 MVD 值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 组间两两比较差异也有统计学意义 ($P < 0.05$)。对肿瘤组织中 MVD 与血清 VEGF 水平相关性分析, 结果显示二者呈显著正相关 ($r = 0.94, P < 0.01$), 见图 5。



A: U+B+M 组; B: B 组; C: C 组。

图3 各组肿瘤组织 HE 染色



A: U+B+M 组; B: B 组; C: C 组。

图4 不同实验组 MVD 表达情况图

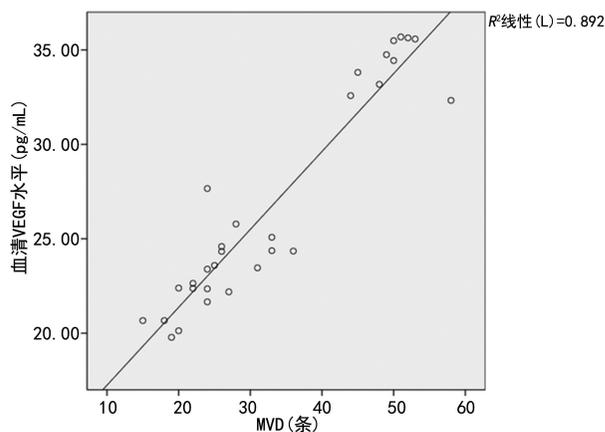


图5 肿瘤 MVD 与血清 VEGF 水平 Person 相关分析图

3 讨 论

HCC 发病隐匿,进展迅速,向四周浸润性生长的同时,会对内部组织和血管形成推挤,导致缺氧和供能不足,刺激了血管生成通路,分泌大量促血管生产因子,其中 VEGF 是最重要的组成部分之一^[7],在 HCC 组织中的表达明显高于周边正常肝组织,参与 HCC 的转移和复发^[8]。贝伐珠单抗作为重组人 VEGF 的单克隆抗体,可以竞争性地抑制 VEGF 与血管内皮生长因子受体(VEGFR)结合,从而抑制新生血管的形成,达到拮抗肿瘤生长的目的,在临床中常用且安全性可靠。DEME 等^[9]用贝伐珠单抗治疗无法手术切除的结肠癌肝转移病例,将患者的生存期延长了 6.5 个月,然而贝伐珠单抗单独用药对肿瘤新生血管形成的抑制效果并不理想。

姚远方等^[5]通过载药微球携贝伐珠单抗介入栓塞治疗兔 VX2 肝癌,证实了其疗效优于单纯载药微球或栓塞微球联合贝伐珠单抗,因栓塞致肿瘤内部缺氧,一定程度上刺激了肿瘤的生长^[10],而且由于微球粒径的限制,无法通过微小血管充分发挥治疗作用。LI 等^[11]、YANG 等^[12]研究发现,低强度超声辐照造影剂微泡产生的空化效应能一过性地增宽血管内皮间隙,促进物质和水分跨细胞转运,引起毛细血管扩张和细胞水肿等。静脉途径给药效益-风险优于口服类抗肿瘤药物^[13]。而超声辐照造影剂微泡空化联合贝伐珠单抗治疗肝癌的研究报道较少,本实验采用了超声辐照造影剂微泡联合贝伐珠单抗经耳缘静脉同时给药的方法与常规静脉滴注贝伐珠单抗进行疗效比较。B 组单纯使用贝伐珠单抗能一定程度上减慢肿瘤生长速度,而 U+B+M 组肿瘤增长率明显低于 B 组($P < 0.05$),说明超声空化效应增强了贝伐珠单抗对兔 VX2 肝癌的治疗效果。刘娅等^[14]用低机械指数(0.2~0.3)超声辐照造影剂微泡联合阿霉素经耳缘静脉给药,进一步改善了对皮下 VX2 荷瘤兔的治疗效果,同时发现超声空化效应对肿瘤生长有一定的抑制作用,与本研究结果一致。

肿瘤超声造影峰强度与组织内部的血流灌注量

有关,间接反映肿瘤内部的血管密度。本研究 U+B+M 组、B 组的超声造影峰强度均不同程度减低,即肿瘤组织内部新生血管密度减低,且 U+B+M 组减低幅度大于 B 组($P < 0.05$),说明低频低功率聚焦超声辐照造影剂微泡联合贝伐珠单抗抑制新生血管形成的作用强于单纯用药,该结论与董桂芳等^[15]、唐远姣等^[16]的研究结果一致,即超声空化效应能够增强药物的治疗效果及基因的转染率,同时降低细胞毒性。

ELISA 检测结果显示,除 C 组血清 VEGF 水平增高外,其余 2 组的血清 VEGF 水平均出现不同程度的降低,其中 U+B+M 组的降低幅度较 B 组大。同时,本实验采用免疫组织化学技术对组织血管内皮细胞进行 CD34 染色标记,计算不同组别肿瘤组织的 MVD^[17],以预测肿瘤的发展、预后等情况^[18]。结果提示,肿瘤组织中 MVD 与血清 VEGF 水平呈显著正相关。研究表明,肿瘤的相对灌注率和血流分级均与 MVD 和 VEGF 相关,推测病理 MVD 与血清 VEGF 可能存在相关性^[19],本实验与该结论结果相符。

病理 HE 染色观察到 U+B+M 组肿瘤微血管的病理损伤较 B 组明显,说明低频低功率聚焦超声辐照造影剂微泡产生的空化效应能增强对肿瘤新生血管的破坏作用。

综上所述,低频低功率聚焦超声辐照造影剂微泡能一定程度上增强贝伐珠单抗对肿瘤新生血管生成的抑制作用,从而拮抗肿瘤组织生长,为人类临床治疗 HCC 提供了参考,具有一定的借鉴意义。本研究存在一定的局限性,本实验采用的是声诺维造影剂,受粒径限制无法进入微血管充分发挥治疗作用,后续研究拟采用纳米微泡造影剂。本实验采用了药物与微泡同时注射的方法,计划于后期实验采用载药微泡及靶向载药微泡对肿瘤进行治疗,对比不同实验方案的疗效。该实验样本量较小,今后仍需进一步扩大样本量加以验证。

参考文献

- [1] WATTENBERG M M, DAMJANOV N, KAPLAN D E. Utility of bevacizumab in advanced hepatocellular carcinoma: a veterans affairs experience [J]. *Cancer Med*, 2019, 8 (4): 1442-1446.
- [2] POSTEMA M, GILJA O H. Contrast-enhanced and targeted ultrasound [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(1): 28-41.
- [3] DAYTON P A, FERRARA K W. Targeted imaging using ultrasound [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2002, 16(4): 362-377.
- [4] SHI Y, YAN P, LUO Z, et al. Effects of microbubble-enhanced ultrasound combined with

- prothrombin on microwave ablation in rabbit VX2 liver tumor[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9):5764-5775.
- [5] 姚远方, 高飞, 张雪松, 等. 载药微球加载贝伐珠单抗介入栓塞治疗兔 VX2 肝癌的抗血管生成效果[J]. *介入放射学杂志*, 2021, 30(3):254-257.
- [6] YU J Q, ZHOU Q, ZHU H, et al. Overexpression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) in cervical cancer and its correlation with angiogenesis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6):2277-2281.
- [7] MIZUKAMI Y, KOHGO Y, CHUNG D C. Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(19):5670-5674.
- [8] HUANG G W, YANG L Y, LU W Q. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: impact on neovascularization and survival[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(11):1705-1708.
- [9] DEME D, TELEKES A. Bevacizumab rechallengé kezelés hatékonysága vastagbél-daganat májáttétje esetén [Effectivity of bevacizumab rechallenge treatment in liver metastasis of colon cancer][J]. *Orv Hetil*, 2018, 159(31):1284-1290.
- [10] SERGIO A, CRISTOFORI C, CARDIN R, et al. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): the role of angiogenesis and invasiveness[J]. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103(4):914-921.
- [11] LI S Y, HUANG P T, FANG Y, et al. Ultrasonic cavitation ameliorates antitumor efficacy of residual cancer after incomplete radiofrequency ablation in rabbit VX2 liver tumor model[J]. *Transl Oncol*, 2019, 12(8):1113-1121.
- [12] YANG F Y, LIU S H, HO F M, et al. Effect of ultrasound contrast agent dose on the duration of focused-ultrasound-induced blood-brain barrier disruption[J]. *J Acoust Soc Am*, 2009, 126(6):3344-3349.
- [13] 姜皓, 章之琪, 张冰, 等. 斑蝥类制剂治疗原发性肝癌的效益-风险评估[J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(6):525-531.
- [14] 刘娅, 刘政, 冯爽, 等. 超声联合微泡对兔 VX2 肿瘤化疗效果的影响[J/CD]. *中华医学超声杂志(电子版)*, 2021, 18(7):705-709.
- [15] 董桂芳, 冉海涛, 王志刚, 等. 低强度聚焦超声联合载药微泡靶向治疗兔 VX2 肿瘤的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2013, 29(9):836-839.
- [16] 唐远姣, 张凌燕, 王磊, 等. 治疗性超声介导微泡破裂促进大鼠体内肌肉基因转染的参数优化实验研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2012, 43(6):930-935.
- [17] XING J, HE W, DING Y W, et al. Correlation between contrast-enhanced ultrasound and microvessel density via CD31 and CD34 in a rabbit VX2 lung peripheral tumor model[J]. *Med Ultrason*, 2018, 1(1):37-42.
- [18] 吴鸿峰. 肝动脉联合门静脉化疗栓塞对 VX2 肝癌血供及新生血管生成的影响[D]. 合肥:安徽医科大学, 2018.
- [19] 肖际东, 沈守荣, 朱文晖, 等. 彩色多普勒超声检测肝癌血流及其与 MVD、VEGF 表达的关系[J]. *中国医学影像技术*, 2007, 23(6):884-887.

(收稿日期:2022-11-18 修回日期:2023-01-08)

(上接第 969 页)

- [10] 钟雅男, 陈春霞, 周雪妍, 等. 基于胆汁酸稳态调控的维生素 D 对结直肠癌的抑制作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(3):379-385.
- [11] 王劲. 钙和维生素 D 补充剂对结直肠肿瘤的预防效应[J]. *中国临床营养杂志*, 2004, 12(1):72-75.
- [12] 刘超, 俞捷, 许洁. 环境雌激素暴露对心血管系统影响的研究进展[C]. *中国毒理学会药物毒理与安全性评价学术大会*, 2019:244-247.
- [13] KIM S M, CHOI J, LEE J P, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and effects of supplementation with cholecalciferol in patients with chronic kidney disease[J]. *J Renal Nutr*, 2014, 24(1):20-25.
- [14] 刘志红. 冠心病患者雌激素与维生素 D 水平的相关性研究[J]. *中国社区医师*, 2019, 33(23):44-45.
- [15] 夏维波, 章振林, 林华. 维生素 D 及其类似物的临床应用共识[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2018, 34(3):187-200.
- [16] 陈冬芍, 张小田. 维生素 D 与结直肠癌的发生、预防与干预[J/CD]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2018, 7(6):518-522.

(收稿日期:2022-12-18 修回日期:2023-01-28)