

• 实验研究 Experimental research •

微波消融联合载阿霉素微泡靶向击破在小鼠 H22 肝癌治疗中的效果观察

范蕊, 李田宽, 王超, 董瑞, 陈琪, 郭金和

【摘要】目的 观察微波消融(MWA)联合载阿霉素微泡靶向击破治疗小鼠 H22 肝癌皮下瘤的效果。**方法** 制备空白微泡和载阿霉素微泡,检测其理化特性。流式细胞仪分析不同给药方式下体外细胞内药物浓度。构建 BALB/c 小鼠 H22 肝癌皮下瘤模型,将 72 只荷瘤小鼠随机均分为单纯 MWA 组(A 组)、MWA+阿霉素组(B 组)、MWA+空白微泡组(C 组)、MWA+载阿霉素微泡组(D 组),其中 C、D 组微泡经低频超声击破。记录小鼠肿瘤体积变化,构建 Kaplan-Meier 生存曲线,比较心、肾组织内药物浓度。病理切片检测各组残存活性肿瘤区微血管密度(MVD)和 Ki-67 表达,并进行统计学分析。**结果** 体外细胞实验显示,低频超声靶向击破微泡技术能显著提高肿瘤细胞内药物浓度($P=0.011$);体内实验显示,D 组抑制肿瘤生长显著优于 A 组($P=0.0085$),B 组、D 组小鼠生存时间均比 A 组显著延长($P=0.009, P=0.003$),同时 D 组心、肾组织内药物浓度均显著降低($P=0.012, P=0.045$)。D 组残存活性肿瘤区 MVD 与 A 组相比显著降低($P<0.0001$),B、D 组肿瘤细胞 Ki-67 表达均显著降低($P<0.001$)。**结论** MWA 联合载阿霉素微泡超声靶向击破可提高肝癌细胞内药物浓度,抑制肿瘤增殖和微血管生成,弥补单纯 MWA 治疗适形性不足,同时降低药物心、肾不良反应。

【关键词】 微波消融;阿霉素;微泡;低频超声;肝癌

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2020)-03-0258-06

Effect of microwave ablation combined with doxorubicin-loaded microbubbles targeted-destruction in treating experimental mice with H22 hepatocellular carcinoma RAN Rui, LI Tiankuan, WANG Chao, DONG Rui, CHEN Qi, GUO Jinhe. School of Medicine, Southeast University; Department of Interventional Radiology & Vascular Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing, Jiangsu Province 210009, China

Corresponding author: GUO Jinhe, E-mail: jinheguo@sina.com

【Abstract】Objective To explore the effect of microwave ablation(MWA) combined with doxorubicin-loaded microbubbles targeted - destruction in the treatment of mouse H22 hepatocellular carcinoma. **Methods** Blank microbubbles and doxorubicin-loaded microbubbles were prepared and their physical and chemical properties were tested. Flow cytometry was used to analyze the concentration of drug in vitro. Subcutaneous H22 hepatocellular carcinoma tumor model was established in BALB/c mice. A total of 72 tumor-bearing mice were equally and randomly divided into four groups: MWA alone(group A, control group), MWA plus doxorubicin(group B), MWA plus blank microbubbles(group C), and MWA plus doxorubicin-loaded microbubbles(group D). In group C and group D, the microbubbles were destructed by low-frequency ultrasound. The tumor growth curve was drawn and Kaplan-Meier survival curve was constructed. The drug concentrations in the heart and kidney tissues were compared. Micro-vessel density(MVD) and Ki-67 expressions in the residual active tumor areas were detected and statistically analyzed. **Results** Cellular experiments in vitro showed that low-frequency ultrasound targeted drug-loaded microbubbles destruction technique could remarkably increase the drug concentration in tumor cells($P=0.011$). Experiments in vivo indicated that the inhibition degree of tumor growth in group D was significantly stronger than that in group A($P=0.0085$).

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2020.03.009

基金项目:国家自然科学基金(81671795)

作者单位:210009 南京 东南大学医学院(范蕊、李田宽、王超、董瑞、陈琪);东南大学附属中大医院介入与血管外科(郭金和)

通信作者:郭金和 E-mail: jinheguo@sina.com

The survival time of mice in both group B and group D were obviously longer than that in group A ($P=0.009$ and $P=0.003$ respectively), meanwhile, the drug concentrations in heart and kidney tissues in group D were strikingly lower than those in group A ($P=0.012$ and $P=0.045$ respectively). Compared with group A, in group D the MVD in the residual active tumor areas was significantly lower ($P<0.0001$), and in both group B and group D the Ki-67 expressions in the residual active tumor areas were also remarkably decreased ($P<0.001$).

Conclusion Microwave ablation combined with doxorubicin-loaded microbubbles targeted-destruction can significantly increase the drug concentration in tumor cells, inhibit the tumor proliferation and microvessel formation, all of which make up for the inadequate indications of MWA treatment, meanwhile, this therapy can reduce the side effects of drug such as cardiotoxicity and nephrotoxicity. (J Intervent Radiol, 2020, 30: 258-263)

【Key words】 microwave ablation; doxorubicin; microbubble; low-frequency ultrasound; hepatocellular carcinoma

肝细胞癌(HCC)是占全球发病率第6位恶性肿瘤^[1]。对于巴塞罗那临床肝癌(Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC)分期0~A期肝癌,消融治疗是最常用策略^[2]。单发肝癌病灶 <2 cm患者消融后总生存率与手术切除术相比无显著差异,但消融总体获益优于外科切除,因此推荐为一线治疗^[3]。诸多临床研究显示微波消融(MWA)治疗小肝癌(<3 cm)与射频消融(RFA)相比具有相同效果和安全性^[4]。由于肝脏是富血供脏器,MWA与RFA相比,可在更短时间内形成更大消融区,并在肝组织内形成长径达10 cm消融范围^[5]。目前在布针策略上尚无统一标准,在消融大肝癌(>5 cm)或外形极不规则病灶后残留活性肿瘤组织是MWA术后复发的主要原因,因此迫切需要有效的辅助治疗^[6]。低频超声靶向击破载药微泡是一种新兴的肿瘤靶向给药技术^[7]。本研究旨在观察超声靶向击破载阿霉素微泡能否弥补MWA适形性不足,尝试新的肝癌联合治疗方案并评估其抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 实验器材

无特定病原体(SPF)级5周龄雄性BALB/c小鼠(上海西普尔-必凯实验动物公司),小鼠H22肝癌细胞株(中科院上海生命科学研究院细胞资源中心),二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)(日本精化株式会社),盐酸阿霉素(大连美仑生物技术有限公司),六氟化硫(SF_6)(安徽强源气体公司),磷酸缓冲液(PBS)、1640培养基(RPMI)(美国HyClone公司),胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司),兔抗鼠CD31、Ki-67抗体(美国CST公司),旋转蒸发器(杭州大卫科教仪器公司),超声细胞破碎仪(美国Spring科学公司),Zeta电位及粒度

分析仪(美国Brookhaven仪器公司),UV-3600紫外分光光度计(日本岛津公司),BX53光学显微镜(日本Olympus公司),高速离心机、KY-2000 MWA仪(南京康友医疗科技公司),WED-100超声治疗仪(深圳市威尔德医疗电子公司)。

1.2 微泡制备与检测

取DPPC 25 mg和DPPE 10 mg溶解于10 mL甲醇与三氯甲烷(2:3)混合液,取10 mg阿霉素溶解于3 mL双蒸水,磷脂类混合液与阿霉素溶液经声振仪混匀后倒入圆底烧瓶,负压蒸发后形成脂质膜;向烧瓶中加入PBS 2 mL,声振仪震荡后附壁脂质膜洗脱于PBS中形成混悬液,吸取混悬液至5 mL U型管,置于充满 SF_6 的超声细胞破碎仪内,经高频振荡形成微泡;300 r/s离心10 min后收集表层微泡溶解于PBS,所得即为载阿霉素微泡,同法制备空白无载药微泡。光学显微镜下观察微泡形态,Zeta分析仪检测载阿霉素微泡粒径分布和平均电位。配制阿霉素标品梯度浓度溶液,紫外分光光度计建立标准曲线,通过检测载药微泡制备过程收集的游离液中药物含量,计算载药微泡包封率(EE)、载药量(DL)。EE=(质量_{总阿霉素}-质量_{游离阿霉素})/质量_{总阿霉素} $\times 100\%$;DL=(质量_{总阿霉素}-质量_{游离阿霉素})/质量_{磷脂} $\times 100\%$ 。

1.3 体外细胞流式实验

取对数期生长H22肝癌细胞培养于6孔板内(每孔细胞 5×10^6 个,完全培养液2.5 mL),用移液枪向4个孔内添加阿霉素溶液(250 $\mu\text{g/mL}$)各100 μL 、8个孔内添加载阿霉素微泡($1.8\times 10^8/\text{mL}$)各100 μL ;用低频超声探头(1.0 MHz,2 W/ cm^2)向其中4个载药微泡孔辐照3 min,处理后6孔板置于细胞培养箱中孵育4 h;分开收集经上述不同处理的3组细胞,PBS液清洗3遍,调整细胞浓度至 $5\times 10^6/\text{mL}$ 后取500 μL ,流式细胞仪检测细胞内阿霉素自发红色

荧光强度。

1.4 动物模型建立和实验分组

H22 肝癌细胞置于含 10%FBS 的 1640 培养基,在 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。取对数期生长细胞并调整其浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$,于每只实验鼠右腋下注射 0.2 mL 细胞悬浮液,等待成瘤。取荷直径 0.8~1.0 cm 皮下瘤且瘤体形状规则的实验鼠(体重 18~22 g)72 只,4%水合氯醛腹腔注射麻醉后行 MWA 术(功率为 50 W,消融时长 20 s,术后肿瘤周边残留活性区),构建不完全消融模型;经荷瘤鼠尾静脉注射超声对比剂 SF₆ 微泡(声诺维)0.2 mL,计算仍有强化的残余活性区体积(V): $V(\text{mm}^3)=V_{\text{总}}-V_{\text{消}}$ 。将荷瘤鼠随机分为 4 组(每组 18 只),均在不完全 MWA 术后 24 h(0 d)、4 d、8 d、12 d 接受后续治疗——①单纯 MWA 组(A 组)作为空白对照,②尾静脉注射阿霉素溶液(2 mg/kg)0.2 mL(B 组),③注射空白微泡($1.8 \times 10^8/\text{mL}$)0.2 mL(C 组),④注射载阿霉素微泡($1.8 \times 10^8/\text{mL}$)0.2 mL(D 组),其中 C、D 组在注射后立即于皮下瘤处放置低频超声探头(1.0 MHz,2 W/cm²)行靶向辐照(占空比 50%)3 min 击破微泡。对比给药治疗前各组残余肿瘤体积基线水平。

1.5 描绘肿瘤生长曲线与生存曲线

记录每组随机抽取的 10 只鼠生存时间,Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。采用统计学方法比较各组平均生存期和最大生存期并分析结果。每组中再随机抽取 4 只鼠,实验 24 h 起每 3 天用游标卡尺测量肿瘤长短径,计算肿瘤体积(TV): $TV(\text{mm}^3)=(\text{长} \times \text{宽}^2)/2$,描绘肿瘤生长曲线,比较各组治疗方案抑制肿瘤生长效果。

1.6 组织内药物浓度检测

每组余下 4 只小鼠于末次给药治疗后 24 h 处死,剥取心脏和肾脏;0.9%氯化钠溶液擦净组织表面后称重、剪碎,研磨均匀后用 0.9%氯化钠溶液定容,配制 10%均浆;超声破碎仪处理 30 min 后,离心取上清液,紫外分光光度计检测阿霉素含量。

1.7 免疫组化染色

处死 B 组、D 组鼠,立即剥离肿瘤大体标本,4%多聚甲醛溶液固定 24 h;组织切片,行苏木精-伊红(HE)染色,CD31、Ki-67 免疫组化染色。CD31 将血管内皮细胞染成棕黄色,20 倍镜下分别由 5 人各计数 5 个视野,取平均值作为该标本微血管密度(MVD)值。Ki-67 染色后细胞核出现棕黄色颗粒记为阳性细胞,低倍镜下选择每张切片中“高热点”靶

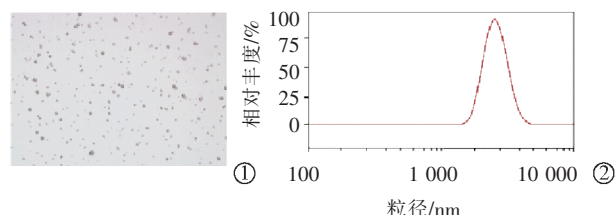
区,从中随机选择 5 个高倍镜视野,计数 1 000 个肿瘤细胞内阳性细胞数并算出百分数,取平均值(%)作为 Ki-67 增殖指数。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。连续数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间比较用单因素方差分析和多重比较,两组均数间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

制备的微泡观察显示,光镜下可见分散、粒径大小较均匀的球形微泡(图 1①),Zeta 粒径仪检测显示微泡平均粒径(2.93 ± 0.012) μm (图 1②),平均电位(-2.72 ± 0.26) eV。紫外分光光度计法计算显示,载阿霉素微泡包封率为(88.65 ± 5.60)%,载药量为(25.33 ± 4.20)%。



①吸取泡沫层中层置于 200 倍光镜下观察,见载阿霉素微泡呈散在球形;②粒径仪示制备并筛选出的中层微泡为微米级别,粒径集中度较好

图 1 球形微泡观察和粒径检测情况

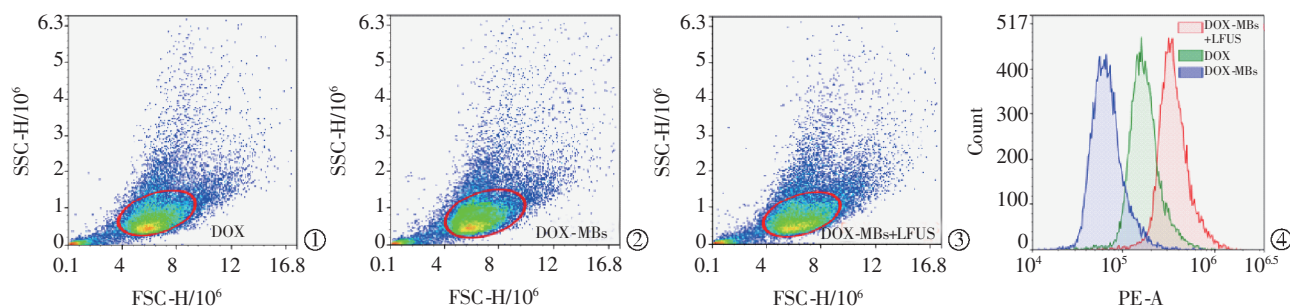
流式细胞仪检测肿瘤细胞红色荧光强度显示,阿霉素溶液处理、经低频超声辐照的载阿霉素微泡处理的肿瘤细胞相对荧光强度分别为 6.92 ± 1.42 、 13.66 ± 3.44 ,差异有显著统计学意义($P=0.011$);载阿霉素微泡处理的肿瘤细胞相对荧光强度仅为 4.73 ± 2.68 ,明显低于经辐照的载阿霉素微泡处理的细胞($P=0.006$),见图 2。

不完全消融鼠模型构建后,A、B、C、D 组皮下瘤残余活性区平均体积分别为(54.31 ± 14.70) mm^3 、(63.91 ± 17.30) mm^3 、(57.82 ± 21.60) mm^3 、(66.27 ± 15.40) mm^3 ,4 组间差异均无统计学意义,见图 3。

荷瘤小鼠肿瘤体积测量显示,实验第 15 天 A、B、C、D 组分别为($1\ 562.3 \pm 176.9$) mm^3 、($1\ 374.5 \pm 133.5$) mm^3 、($1\ 511.3 \pm 231.4$) mm^3 、($1\ 070.8 \pm 138.7$) mm^3 ;D 组与 A 组相比差异有显著统计学意义($P=0.0085$),B 组、C 组与 A 组相比差异均无统计学意义($P=0.456$, $P=0.975$);可见 D 组与其他 3 组相比,在抑制肿瘤生长方面有优势(图 4①②)。A、B、C、D 组生存

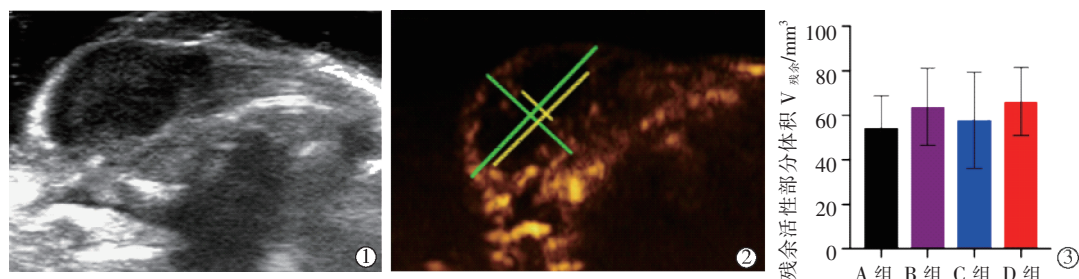
时间分别为 (28.40 ± 2.02) d、 (39.10 ± 3.19) d、 (31.50 ± 2.06) d、 (42.10 ± 3.67) d, B 组、D 组与 A 组相比差异均有显著统计学意义($P=0.009, P=0.003$), 但 B、D 组间差异无统计学意义($P=0.324$), C 组与 A 组间差异无统计学意义($P=0.292$)(图 4③)。t 检验分

析 B、D 组心、肾组织内阿霉素浓度显示, 两组间心、肾组织内药物浓度差异均有显著统计学意义($P_{\text{心}}=0.001, P_{\text{肾}}=0.014$)(表 1); 结果显示 D 组与 B 组相比, 可明显降低心、肾组织内药物浓度(图 4④)。



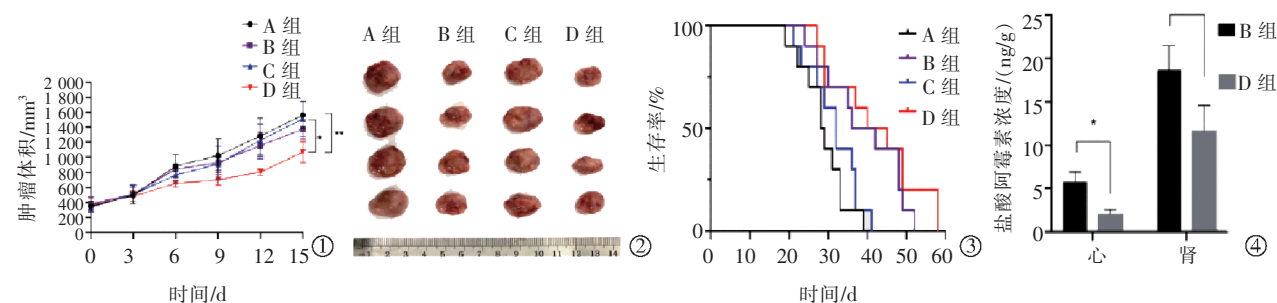
①阿霉素溶液处理的细胞测量范围;②载阿霉素微泡处理的细胞测量范围;③经低频超声辐照的载阿霉素微泡处理的细胞测量范围;④3 组药物自发红色荧光相对强度对比, 经低频超声辐照的载阿霉素微泡处理的肿瘤细胞内药物浓度增加

图 2 不同处理后肿瘤细胞相对荧光强度值不同表示细胞内药物浓度存在差异



①②分别测量强化及未强化区最大长、短径;计算仍有强化的残余活性区体积;③4 组消融后残余活性区体积差异无统计学意义

图 3 不完全消融鼠模型构建后皮下瘤残余活性区体积计算结果



①消融后 0~15 d 各组小鼠肿瘤体积变化曲线;②消融后 15 d 各组小鼠皮下瘤剥离后大体标本;③各组小鼠生存时间曲线;④末次治疗后 B、D 组小鼠心、肾组织药物浓度对比

图 4 消融后荷瘤小鼠肿瘤体积、生存时间和末次治疗后药物浓度

表 1 D 组、B 组心、肾组织药物浓度对比

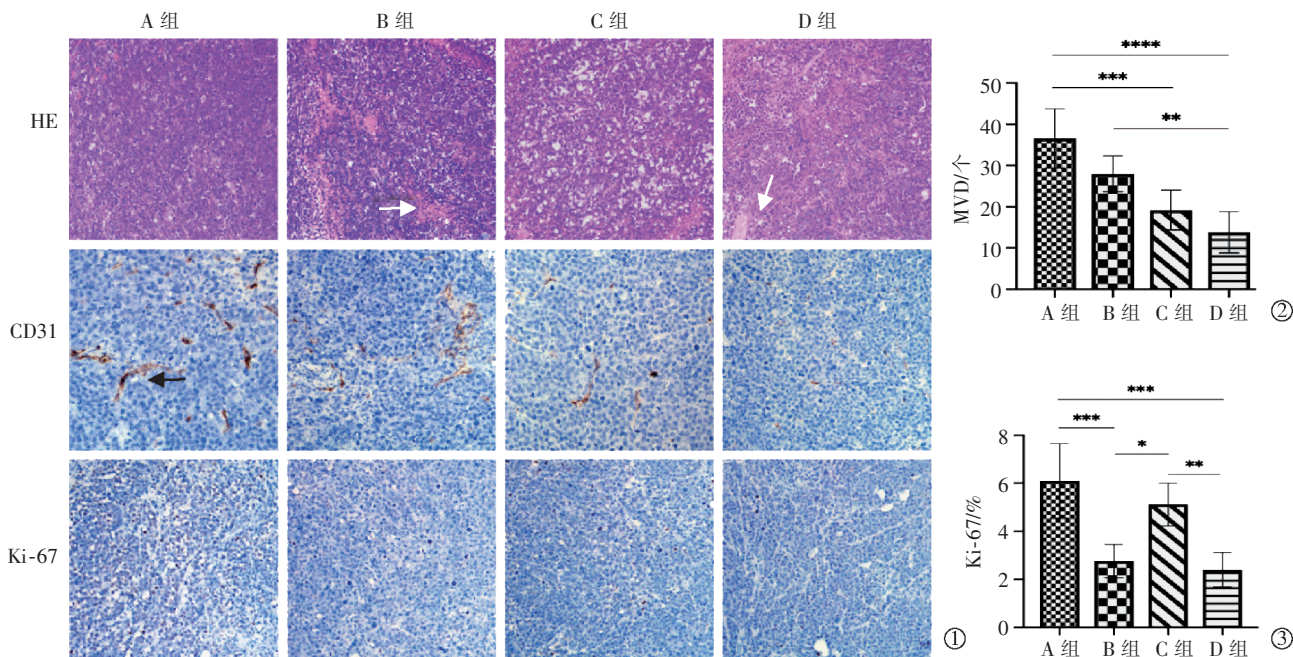
组别	心/(ng/g)	肾/(ng/g)
B 组	5.750 ± 1.156	18.700 ± 2.811
D 组	2.100 ± 0.469	11.650 ± 2.972

肿瘤标本常规 HE 染色切片光镜观察发现, A、B、C 组肿瘤细胞排列较 D 组紊乱, A 组内可见多个癌巢, 且细胞核大深染、异型性明显; B、C、D 组未消

融区边缘肿瘤组织内可见坏死区域, 其中 D 组坏死区域面积较大, 且微血管扩张、血管壁不完整、管腔内可见血栓形成, 而微血管内血栓形成现象在 C 组中较少见到, A、B 组中均未见(图 5①)。A、B、C、D 组残存活性肿瘤组织区内平均 MVD 分别为 (36.6 ± 7.16) 个、 (28.0 ± 4.36) 个、 (19.2 ± 4.82) 个、 (13.8 ± 4.97) 个, D 组与 A 组、B 组差异均有显著统计学意义

($P<0.0001$, $P=0.004$), C 组与 A 组差异有显著统计学意义($P<0.0001$), C 组与 D 组差异无统计学意义($P=0.420$)(图 5①②)。200 倍光镜下分别统计 4 组小鼠 Ki-67 增殖指数, A、B、C、D 组分别为 6.10 ± 1.55 、

2.76 ± 0.69 、 5.12 ± 0.89 、 2.40 ± 0.72 , B、D 组与 A 组差异均有显著统计学意义($P<0.001$), 表明抑制肿瘤细胞增殖效果明显; C 组与 A 组差异无统计学意义($P>0.05$)(图 5①③)。



①4 组肿瘤边缘区染色结果:1 200 倍光镜下 HE 见散在小范围肿瘤内细胞坏死(左白箭头), 瘤内微血管腔内可见血栓(右白箭头);400 倍光镜下 CD31 抗体染色见肿瘤组织内血管内皮细胞呈棕黄色, 表示 CD31 阳性(黑箭头);200 倍光镜下细胞核染色成棕黄者为 Ki-67 阳性细胞。②组间比较肿瘤边缘活性区域内 MVD。③组间比较肿瘤增殖相关 Ki-67 表达

图 5 免疫组化染色结果

3 讨论

诸多临床研究表明, MWA 治疗巨块型(>10 cm)肝癌与 RFA 相比虽具有升温快速、受热沉淀效应影响小的优势, 但仍有一定的术后肿瘤复发率和转移率^[8]。为进一步降低消融术后肿瘤复发和转移率, 提高姑息性治疗中减瘤效果, 国内外学者近年尝试应用各种消融联合其他治疗新策略。Zhu 等^[9]研究报道 MWA 联合免疫抑制剂治疗小鼠乳腺癌。Li 等^[10]报道在兔 VX2 肝肿瘤中观察 RFA 联合 SF₆ 微泡的治疗效果。

阿霉素是临床常用抗肿瘤药物, 广泛应用于实体瘤治疗。作为广谱抗肿瘤药物, 阿霉素经静脉注射后半衰期较短, 肿瘤局部药物浓度较低, 抗肿瘤疗效受限, 且其特异性差, 心脏、肾脏不良反应不可忽视, 故在实际应用中不推荐全身给药^[11-12]。近年化疗药物靶向转运载体系统研制应用, 使阿霉素靶向治疗肝癌效果进一步提高、药物不良反应减少成为可能。低频超声靶向击破载药微泡, 弥补了微泡作为转运载体时缺乏特异性的缺点^[13-15], 而根据载药微泡所载药物理化性质和微泡脂质外壳构成不同,

载药微泡载药率、包封率、粒径及稳定性等均会发生变化。本实验在参考其他文献报道的载药微泡和载阿霉素脂质体制备基础上, 根据阿霉素具有脂溶性、带负电荷等特性, 采用创新的实验方法制备出具有合适粒径、较其他文献中载药量和包封率高的载阿霉素微泡, 且在体内外实验中进一步验证了其抗肿瘤效果。

前期大量实验研究结果提示, 载药微泡靶向击破技术具抗肿瘤原理, 可从几方面解释。一是通过微泡“空化效应”增加肿瘤细胞膜通透性, 促进抗肿瘤药物局部释放或吸收; 二是利用微泡瞬时破裂释放的机械能, 破坏肿瘤内新生微血管管壁, 形成血栓, 减少肿瘤血供; 三是利用超声波热能或机械能, 诱导免疫相关生物效应^[16-18]。本研究中体外细胞实验证实, 经低频超声辐照的载阿霉素微泡显著提高肿瘤细胞内化疗药物浓度, 无辐照载阿霉素微泡组细胞内药物浓度并无增加, 间接表明低频超声击破微泡具有产生空化效应、提高细胞膜通透性的作用; 动物体内实验显示, 传统静脉给药(B 组)与靶向击破载药微泡(D 组)两种给药方式与单纯微泡消融

(C 组)相比,均显示出抑制肿瘤生长、延长生存期的效果,D 组与 B 组间抑制肿瘤生长、延长生存期结果虽无差异,但 D 组在保证抑瘤效果的同时可有效减少心、肾等非靶向器官组织内药物浓度,降低化疗药物不良反应;C 组与 D 组病理切片均显示 MWA 不完全的肿瘤边缘区域微血管内可见血栓形成,D 组为甚;MVD 检测差异证实低频超声靶向击破微泡技术能影响肿瘤微血管生成。B、D 两组与 C 组在抑制肿瘤生长、延长生存期上均存在差异,可解释为空白微泡破裂时产生的效应虽能减少肿瘤微血管形成,但在无化疗药物作用于局部情况下,单纯靠微泡破裂释放能量并不能达到明显的抑制肿瘤细胞增殖的效果。然而微泡转运阿霉素并经低频超声靶向击破提高肿瘤细胞内药物浓度后,则表现出较好的抑制肿瘤增殖效果。Ki-67 增殖指数与肝癌预后相关,A 组和 C 组 Ki-67 表达差异无统计学意义,也进一步证实了此推断。

综上所述,本实验为临床上降低 MWA 治疗肝癌后肿瘤复发率提供了新的联合治疗思路。MWA 联合载药微泡治疗新方案有待临床试验进一步验证,其更深层机制尚需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.
- [2] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2019, 380: 1450-1462.
- [3] Zhang Z, Zhang L, Wang N, et al. Therapeutic efficacy of percutaneous radiofrequency ablation versus microwave ablation for hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8: e76119.
- [4] 经翔,丁建民,王彦冬,等. 射频消融和微波消融治疗肝癌的比较[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23:306-310.
- [5] Lubner MG, Brace CL, Hinshaw JL, et al. Microwave tumor ablation: mechanism of action, clinical results, and devices[J]. J Vasc Interv Radiol, 2010, 21: S192-S203.
- [6] Zhang M, Ma H, Zhang J, et al. Comparison of microwave ablation and hepatic resection for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 4829-4839.
- [7] Ren ST, Shen S, He XY, et al. The effect of Docetaxel-loaded micro-bubbles combined with low-frequency ultrasound in H22 hepatocellular carcinoma-bearing mice[J]. Ultrasound Med Biol, 2016, 42: 549-560.
- [8] Izzo F, Granata V, Grassi R, et al. Radiofrequency ablation and microwave ablation in liver tumors: an update[J]. Oncologist, 2019, 24: e990-e1005.
- [9] Zhu J, Yu M, Chen L, et al. Enhanced antitumor efficacy through microwave ablation in combination with immune checkpoints blockade in breast cancer: a pre-clinical study in a murine model[J]. Diagn Interv Imaging, 2018, 99: 135-142.
- [10] Li SY, Huang PT, 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: 1113-1121.
- [11] Vogl TJ, Lee C. Doxorubicin-eluting beads in the treatment of liver carcinoma[J]. Expert Opin Pharmacother, 2014, 15: 115-120.
- [12] Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy[J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10: 853-858.
- [13] 冉海涛,任红,王志刚,等. 包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2005, 7: 217-220.
- [14] 董虹美,王志刚,冉海涛,等. 超声辐照载 10-HCPT 微泡在小鼠 H22 肝癌移植瘤的定位释放研究[J]. 中国超声医学杂志, 2010, 26:592-595.
- [15] 刘娜,陈云超,肖婷,等. 超声纳米微泡联合阿霉素对小鼠 H22 移植瘤治疗及毒性的探讨[J]. 中华超声影像学杂志, 2016, 25:723-726.
- [16] Mayer RC, Geis AN, Katus AH, et al. Ultrasound targeted microbubble destruction for drug and gene delivery[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5: 1121-1138.
- [17] Azmin M, Harfield C, Ahmad Z, et al. How do microbubbles and ultrasound interact? Basic physical, dynamic and engineering principles[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18: 2118-2134.
- [18] Stride EP, Coussios CC. Cavitation and contrast: the use of bubbles in ultrasound imaging and therapy[J]. Proc Inst Mech Eng H, 2010, 224: 171-191.

(收稿日期:2020-02-25)

(本文编辑:边 皓)