DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001431

TATp与SDF-1修饰的载多西紫杉醇靶向超声造影剂体内成像及初步治疗实验

易品诗[1],邱丽华[2],何　力[3],高　志[4],赵　欣[5],李　攀[6],李　颖[2]

(1. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室,重庆　401120;2. 重庆医科大学附属口腔医院颌面外科,重庆　401120;3. 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验,重庆　401120;4. 重庆医科大学附属第二医院口腔科,重庆　400010;5. 重庆第二师范学院重庆市功能性食品协同创新中心,重庆　400067;6. 重庆医科大学超声影像学研究所,重庆　400010)

【摘　要】目的:探索由穿膜肽(transcriptional activator protein,TATp)和基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1,SDF-1)修饰的载多西紫杉醇超声造影剂对舌癌颈部淋巴组织转移灶的治疗效果。**方法**:以兔VX2舌癌颈淋巴转移模型、SCC-15细胞、超声造影剂为研究对象,将兔模型分为A、B、C、D组,分别用空白微泡(A)、靶向载药微泡(B)、单纯药物(C)和空白(D)处理;将细胞分为A、B、C、D、E、F组,分别用空白(A)、单纯药物组(B)、载药微泡(C)、靶向载药微泡(D)、靶向载药微泡+超声(E)和超声(F)处理细胞,通过测量淋巴结体积、免疫组化和细胞凋亡检验实验结果。**结果**:超声检查见颈部转移性淋巴结,实验中各组的肿瘤抑制率分别为5.3%、25.4%、22.3%、0.0%,组间比较:P_{AD}=0.436,P_{BD}=0.010,P_{CD}=0.008,P_{BC}=0.723;各组p53阳性率分别为(29.8±3.3)%,(3.8±2.8)%,(3.8±3.1)%,(30.8±3.6)%,组间比较:P_{AD}=0.663,P_{BD}=0.000,P_{CD}=0.000,P_{BC}=1.000。细胞实验中各组细胞凋亡率分别为(17.82±1.39)%,(57.61±2.37)%,(31.87±2.18)%,(46.28±1.65)%,(67.34±2.22)%,(14.17±8.13)%,组间比较P_{AB}=0.000,P_{AC}=0.001,P_{AD}=0.000,P_{AE}=0.000,P_{AF}=0.486,P_{EB}=0.007,P_{EC}=0.000,P_{ED}=0.000,P_{EF}=0.000。**结论**:TATp和SDF-1修饰的载药超声微泡在治疗中有一定作用,能为舌癌颈淋巴结转移灶的临床治疗提供参考。

【关键词】超声造影剂;靶向治疗;舌癌;体内实验;多西紫杉醇

【中图分类号】R-332　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2017-03-08

In vivo imaging and preliminary treatment experiments of docetaxel-loaded ultrasound microbubbles decorated with TATp and SDF-1 agents

Yi Pinshi[1], Qiu Lihua[2], He Li[3], Gao Zhi[4], Zhao Xin[5], Li Pan[6], Li Ying[2]

(1. Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences in Chongqing; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University; 3. Key Laboratory for Oral Biomedical Engineering in Chongqing; 4. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 5. Chongqing Collaborative Innovation Center For Functional Food, Chongqing University of Education; 6. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the imaging effect and treatment effect of the ultrasonic microbubble modified by transcriptional activator protein(TATp) and stromal cell-derived factor-1(SDF-1) carrying docetaxel lipid in metastatic lymph node lymph node of tongue cancer. ***Methods***: A control study was made with the VX2 cervical lymph node metastasis in rabbits model, SCC-15cell and the ultrasonic microbubble modified by TATp and SDF-1 carrying docetaxel. The rabbit model was divided into A, B, C, D groups, respectively dealing with blank microbubbles(A), targeted microbubbles(B), drug(C) and blank(D). The cells were divided into: A, B, C, D, E, F groups, respectively dealing with blank(A), drug group(B) and microbubbles(C), targeted microbubbles(D), targeted microbubbles + ultrasound(E) and ultrasound(F). The results were tested by measuring lymph node's volume, immunohistochemistry, and apoptosis. ***Results***: The ultrasonography revealed metastatic cervical lymph nodes. The tumor inhibitory rates in each group were 5.3%, 25.4%, 22.3%, 0.0%. Comparison between groups showed that: P_{AD}=0.436, P_{BD}=0.010, P_{CD}=0.008, P_{BC}=0.723. The positive rates of p53 were (29.8±3.3)%, (3.8±2.8)%, (3.8±3.1)%, (30.8±3.6)%. Comparison between groups were P_{AD}=

作者介绍:易品诗,Email:easyyps@sina.com,研究方向:口腔颌面外科。

通信作者:李　颖,Email:949187143@qq.com。

基金项目:重庆市科技计划资助项目(编号:cstc2016shmszx00010)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1708.046.html (2017-11-28)

0.663，P_{BD}=0.000，P_{CD}=0.000，P_{BC}=1.000. The apoptotic rates were (17.82 ± 1.39)%，(57.61 ± 2.37)%，(31.87 ± 2.18)%，(46.28 ± 1.65)%，(67.34 ± 2.22)%，(14.17 ± 8.13)%. Comparisons between groups were P_{AB}=0.000，P_{AC}=0.001，P_{AD}=0.000，P_{AE}=0.000，P_{AF}=0.486，P_{EB}=0.007，P_{EC}=0.000，P_{ED}=0.000，P_{EF}=0.000. ***Conclusion***：Ultrasounic microbubble modified by TATp and SDF-1 play a certain role in the treatment，and can provide reference for the clinical treatment of cervical lymph node metastasis.

【Key words】ultrasonic microbubbles；targeted therapy；tongue squamous cell；vivo experiment；docetaxel

舌鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一，近年来有发病率增高和发病低龄化的趋势[1]。舌癌一旦发病，极易发生颈部淋巴结转移，淋巴结的情况对临床诊断分期、治疗和预后都有很大的影响。在临床上，鼓励早发现早治疗，对于原发灶采取扩大切除，对于颈部转移则采用颈淋巴清扫术的手术治疗方式结合术后放化疗的治疗方式，希望提高患者的生存率[2]。但是，颈部淋巴转移灶的处理，传统的方式切除人体组织面积较大、切除组织较多，术后对病人的形态及生理功能带来严重的影响。所以，对于颈部淋巴转移灶的处理，亟待一种创伤更小的诊治方式。

近年来，越来越多的人开始尝试利用超声微泡的靶向作用治疗舌癌颈部淋巴结转移灶。围绕这个方向，本研究组在前期实验中制备了一种超声造影剂[3]，载入抗肿瘤药物，造影剂表面连接了基质细胞衍生因子 1(stromal cell-derived factor-1，SDF-1，又称趋化因子 CXCL12)和穿膜肽(transcriptional activator protein，TATp)。这种造影剂的直径为(536.00 ± 16.55) nm，在超声的局部照射下，通过空化效应和声孔效应使微泡破裂释药并使血管壁的通透性增强[4-5]，使药物进入指定组织内。SDF-1 与 CXCR4 是一对受体配体，在过去的研究中，已用免疫组化的方式证明 CXCR4 定位于舌癌细胞膜及胞浆、核中，并通过 RT-RCR 证明了 CXCR4 在舌癌组织中的高表达[6-7]，连接 SDF-1 可以帮助微泡与肿瘤组织的结合。而 TATp 则用于帮助微泡穿过肿瘤细胞膜进入细胞内[8]。这种治疗方式具有主动靶向性。

在本研究组前期研究中，欧阳紫兰等[9]用多普勒超声观察兔 VX2 舌癌颈淋巴结，发现超声对转移性淋巴结的诊断可靠；曾峥等[3]制备了由 TATp 与 SDF-1 同时修饰的载药高分子靶向微泡，取得了一定的载药量和包封率，并在体外实验中取得较好的寻靶和成像效果。本次实验是在以前实验的基础上用对照实验的方式，对 TATp 与 SDF-1 修饰的载药超声造影剂的成像和治疗效果进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及组织 新西兰大白兔 20 只，雌雄不限，独笼喂养，购自重庆医科大学动物实验中心；兔 VX2 舌癌组织由重庆医科大学生物医学工程学院提供；本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。人舌鳞癌细胞 SCC-15 由重庆医科大学附属口腔医院提供。

1.1.2 实验器材 马来酰亚胺(Maleimide，MAL)-聚乙二醇(polyethylene glycol，PEG)-聚乳酸-羟基乙酸(lactic-co-glycolic acid，PLGA)(北京键凯科技)；SDF-1（南京拓达生物科技)；TATp(北京中科亚光生物科技)；多西紫杉醇(江苏奥赛康药业股份有限公司)，戊巴比妥钠(粉剂)购自上海启晟实验器材经营部；注射用青霉素、胰蛋白酶、硫化钠购自重庆医科大学设备科；“飞利浦 IU22 型超声诊断仪” 由重庆医科大学附属第二医院超声科提供；免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)、细胞凋亡用流式仪及 PE 偶联 Annexin V 试剂盒(Solarbio)由口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立 新西兰大白兔 20 只，平均分为 4 组，分别为：空白微泡组(A)、靶向微泡载药组(B)、单纯给药组(C)和空白对照组(D)。生理盐水配置质量比为 3%戊巴比妥钠溶液，耳缘静脉注射麻醉后取仰卧位固定。将 VX2 瘤块剪碎，牵出兔舌部，消毒后在舌前 1/3 左侧缘做切口，将碎瘤块植入舌体内，缝合。注射青霉素预防感染。

1.2.2 制作超声造影剂 参考曾等的方法[3]：使用双乳化法将 3 mL 多西紫杉醇用 Mal-PEG-PLGA 包裹，内部充入全氟丙烷气体，得到空白超声造影剂。另用同样的方法制得空白造影剂后按等摩尔比例加入 TATp、SDF-1 进行连接，制得 TATp 与 SDF-1 连接的空白超声造影剂，-4 ℃保存。需要使用时，用 3 mL 生理盐水将沉淀混合制成悬液。

1.2.3 实验动物的处理 植入瘤块后 5 周。分组给予实验兔耳缘静脉注射药物：A 组予以空白微泡悬液 3 mL/(kg·d)；B 组予以连接 SDF-1 和 TATp 的载药微泡悬液 3 mL/(kg·d)；C 组单纯给药 3 mL/(kg·d)；D 组予以生理盐水 3 mL/(kg·d)，

注射生理盐水。每组都连续给药 3 d，给药后立刻在兔颈部给予低强度聚焦超声辐照 6 min（5 s 触发，5 s 间隔），频率 300 kHz，功率 2 W/cm²[10]。

1.2.4 兔颈部淋巴结影像学观察 植入瘤块后，用 8%硫化钠脱去颈部毛发，涂布超声耦合剂，定期观察兔颈部影像，检测转移性淋巴结。

1.2.5 细胞培养 将实验室保种的 SCC-15 细胞冻存管从液氮中取出，复苏，在 10 cm 培养皿中进行培养，铺满培养皿工作面 80%时开始传代。

1.2.6 细胞处理 将细胞传代后培养 24 h，分为 7 组（每组 3 个培养皿，每个培养皿约 106 个细胞）：空白组（A）不作任何处理，单纯药物组（B）、载药微泡组（C）、靶向载药微泡组（D）、靶向载药微泡+超声组（E）、超声组（F）中，给予的药物和微泡稀释至含有多西紫杉醇 10 μmol/L 给药 1 mL，超声辐照利用超声治疗仪处理 6 min（5 s 触发，5 s 间隔），频率 300 kHz，功率为 2 W/cm²）。处理后再培养 48 h，收集细胞，进行细胞凋亡的检测。

1.2.7 评估治疗效果 给药 1 周后将兔处死，取出颈部淋巴做组织学检查。①计算淋巴结体积：利用超声测量淋巴结最大径和最小径计算各组淋巴结体积，公式为：体积=（最大径×最小径 2）/2[11]，肿瘤抑制率=（1-实验组平均体积/对照组平均体积）×100%[12]；②检测淋巴结内 p53 的表达：使用“二步法”检测各组给药 1 周后的淋巴结 p53 基因的表达，按照 p53 检测试剂盒说明书进行[13]；③流式法检测细胞凋亡按照 PE 偶联 Annexin V 凋亡检测试剂盒说明书进行[14]。

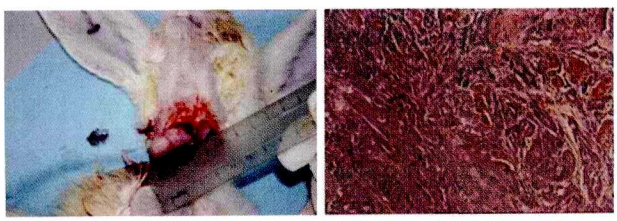
1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 20.0 处理，所得到的数值均以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，整体比较采用单因素方差分析或秩和检验，组间比较采用 LSD-t 或 SNK-q 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 成瘤情况

将 VX2 肿瘤组织种植在兔舌体上后，3 周可见所有兔植入处舌部表面突起成菜花样，中心溃疡，触之易出血，切去部分做 HE 染色，镜下见细胞排列不规则，核多形性及核分裂，细胞间桥不明显，为鳞癌特征。20 只兔舌部成瘤率为 100%（20/20）。约 5 周可在实验兔颈部扪及肿大淋巴结。如图 1。



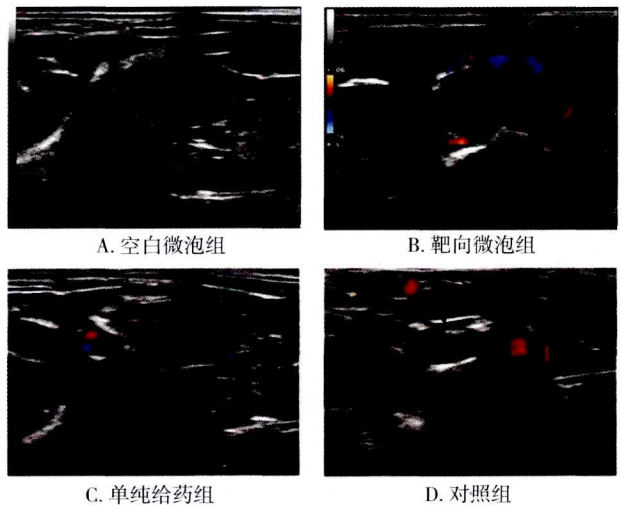
A. 转移性淋巴结 B. 舌原发灶病理

图 1 VX2 模型建立及舌部原发灶病理（400×）

Fig.1 VX2 experimental model and pathology of tongue（400×）

2.2 成像情况

转移性淋巴结影像多呈圆形或不规则形，最大横径>10 mm，表现为形态不均，边界不清，皮、髓质分界不清，皮质厚度不均匀增加，中央可出现液化坏死导致髓质强回声呈现不均匀的变小或消失，淋巴结结构破坏，淋巴结呈膨隆状，短径明显增长，纵横比<2 者比例较高，可见周边异常粗大的血流信号[9]。能清晰地看到各组反应性淋巴结（图 2）。通过影像判断各组转移性淋巴结的数量分别为 A 组 4 个，B 组 4 个，C 组 4 个，D 组 4 个，转移率为 80%（16/20）。



A. 空白微泡组 B. 靶向微泡组

C. 单纯给药组 D. 对照组

图 2 超声检查

Fig.2 Ultrasonograph

2.3 体积改变

各组测量结果见表 1。D 组作为空白对照组，代表了无治疗干涉情况下兔颈部淋巴结的发展情况。给药前，各组淋巴结体积差别不大，无明显统计学意义（F=0.876，P=0.474）。实验过程中淋巴结都有所增大，但各实验组和空白组相比，增大的情况差异明显（F=5.595，P=0.008），A、B、C 组分别与 D 组比较，给药组的淋巴结增长幅度较小，而空白组增长得更大：A 组：P_{AD}=0.436，B 组：P_{BD}=0.010，C 组：P_{CD}=0.008，A 组无明显统计学意义，而 B、C 组抑制作用明显。

表 1 给药前后淋巴结体积

Tab.1 Volume of lymph node before and after administration

组别	体积（mm³）均值		
	给药前	给药后	抑瘤率（%）
A 组	1 002.0 ± 140.6	2 655.0 ± 361.1	5.3
B 组	944.0 ± 217.7	2 092.2 ± 381.6	25.4
C 组	987.8 ± 93.1	2 178.0 ± 355.8	22.3
D 组	1 106.0 ± 179.0	2 804.6 ± 190.0	0.0
F 值	0.876	5.596	
P 值	0.474	0.008	

注：每组 4 个样本。给药前体积差异不明显，P=0.474；给药后各组体积出现明显差异，P=0.008；组间比较 AD 组：P_{AD}=0.436；BD 组：P_{BD}=0.010；CD 组：P_{CD}=0.008；BC 组之间比较，P_{BC}=0.723

2.4 兔淋巴结病理和 p53 免疫组化

各组淋巴结切片下见淋巴组织内存在癌巢，证实前述淋巴结为转移性淋巴结。见图 3。

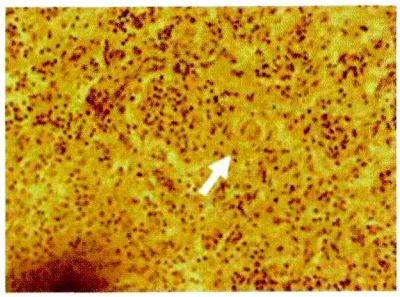


图 3 颈淋巴结病理（400×）

Fig.3 Cervical lymph node pathology（400×）

切片在 400 倍镜下随机选取 5 个视野进行计数：核蓝色为阴性细胞（图 4 蓝箭头），棕色为阳性细胞（图 4 红箭头）。每组 5 张切片，计算阳性细胞比例均值，结果见表 2。各实验组分别与对照组进行方差分析：A 组与 D 组比较 P_{AD}=0.663，无明显统计学意义，B 组与 D 组比较：P_{BD}=0.000，C 组与 D 组比较：P_{CD}=0.000，均具有统计学意义，阳性率明显低于对照组。

表 2 p53 表达平均阳性率

Tab.2 The average positive rate of p53 gene expression

组别	阳性率（%）	H值	P 值
A 组	29.8 ± 3.3	14.432	0.002
B 组	3.8 ± 2.8		
C 组	3.8 ± 3.1		
D 组	30.8 ± 3.6		

注：每组 8 个样本。数据不成正态分布，采用秩和检验，各组阳性率有明显差异，P=0.002，具有统计学意义。组间比较 AD 组：P_{AD}=0.663，BD 组比较：P_{BD}=0.000，CD 组比较：P_{CD}=0.000；BC 组比较：P_{BC}=1.000

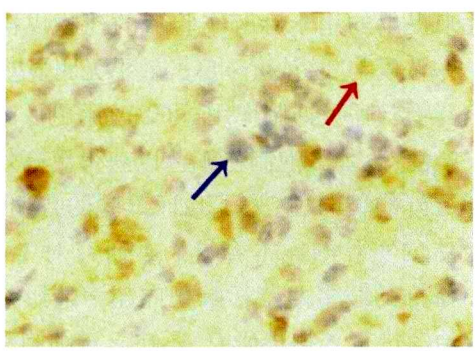


图 4 p53 免疫组化染色（400×）

Fig.4 p53 immunohistochemi（400×）

2.5 微泡靶向性的观察

在 SCC-15 细胞培养皿中，加入由 FITC（异硫氰酸荧光素）标记的超声微泡，在激光共聚焦扫描显微镜下观察，癌细胞周围超声微泡密集。见图 5。

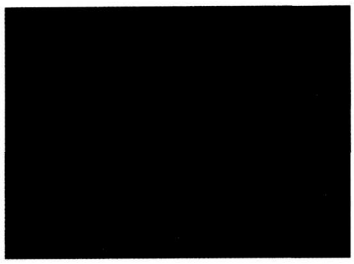


图 5 FITC 标记的微泡在细胞周围聚集

Fig.5 FITC-microbubbles clustered around the cell

2.6 细胞凋亡

流式细胞仪检测 SCC-15 细胞凋亡率（%），结果见表 3、图 6。

表 3 各组平均细胞凋亡率

Tab.3 Average apoptosis rate in each group

组别	凋亡率（%）	F 值	P 值
A组	17.82 ± 1.39	96.987	0.000
B组	57.61 ± 2.37		
C组	31.87 ± 2.18		
D组	46.28 ± 1.65		
E组	67.34 ± 2.22		
F组	14.17 ± 8.13		

注：每组 3 个样本。各组凋亡率有明显差异，P=0.000；各组与空白组比较采用 SNK 法，以降低假阳性率：P_{AB}=0.000，P_{AC}=0.001，P_{AD}=0.000，P_{AE}=0.000，P_{AF}=0.486；与 E 组比较，P_{EB}=0.007；P_{EC}=0.000；P_{ED}=0.000；P_{EF}=0.000

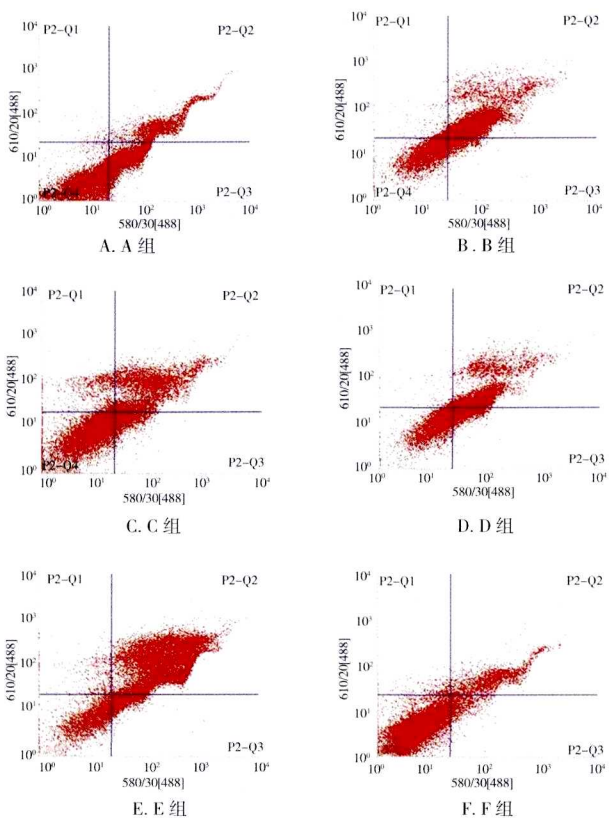


图 6 各组细胞凋亡率

Tab.6 Apoptosis rate in each group

3 讨 论

多西紫杉醇为细胞毒类抗肿瘤药，其抗癌效果在过去的临床研究中已经得到证明[15]。根据研究组曾峥等的前期研究[3]，成功制备了超声微泡，在光学显微镜下观测粒径约为(536.00 ± 16.55)nm，通过免疫荧光和流式法测得连接率为 69.84%，载药量约为 1.69%，包封率约为 62.2%。造影剂内包裹全氟丙烷气体，由于空气对超声波的阻抗与周围血液不同，能够增强显像[4-5]。在一定强度超声波的局部照射下，微泡发生体积的改变，进而破裂，药物可释放入血。微泡破裂所具有的能量形成冲击破，使附近的毛细血管壁细胞通透性增加，能使药物穿过血管壁进入肿瘤组织内[4-5]；微泡膜上所连接的趋化因子 SDF-1 能特异地结合肿瘤细胞上的受体 CXCR-4[3]，使药物靶向地被送至肿瘤组织；微泡表面所连接的穿膜肽则有助于药物进入细胞[16]。借助超声和趋化因子共同作用，超声造影剂有主动靶向性。

实验模型制作方式参考以往实验所制作兔 VX2 颈淋巴转移模型[17-18]，该模型建立技术成熟，成功率高，重复性高[19]，在第 5 周时颈淋巴结转移率高，且此时宿主的生存状态可，是进行舌癌治疗研究的黄金阶段[9]。兔生存时间一般约为 6 周，在化疗 1 周后将实验兔处死，取出淋巴结经行检测。兔 VX2 舌癌的转移方式和人舌癌的转移方式相似，颈部淋巴结位置确定，位于颈动脉旁，左右各一，便于观察[9]。根据本研究组欧阳紫兰等[9]的前期研究报告，超声观察淋巴结的形态、大小、结构、内部回声、纵横比的改变等，呈现特殊的影像，诊断率高，可作为诊断舌癌颈部转移性淋巴结的影像学指标。而处死实验兔后，淋巴结组织做片切，也证实了转移模型的成功。

根据国家食品药品监督管理局药品审评中心规定[20]，给药前后肿瘤体积的改变应作为检测治疗效果的指标之一。B、C 组经化疗后肿瘤生长抑制率达到 20%以上，具有一定的效果。组间检验结果显示 B、C 组的体积增大量小于对照组，并具有统计学意义（P_B=0.010，P_C=0.008），起到了治疗效果。而未给药的 A 组淋巴结的增大量与对照组相比无明显差异（P_A=0.436）。通常抗肿瘤药物对肿瘤的抑制作用在 50%以上为效果显著，而实验结果仅有 20%，这可能是低载药量引起的。

试验结果选择 p53 基因的表达作为实验结果检验指标之一。p53 基因是抑癌基因，它参与诱导细胞凋亡、调控基因转录等。多数实体肿瘤中都会发现 p53 突变、p53 蛋白失活会导致细胞凋亡减少，促进肿瘤生长[21]。化疗使肿瘤细胞 DNA 受损，使细胞通过 p53 途径凋亡。突变型 p53 蛋白含量的下降，与肿瘤细胞的生长反相关。检测 p53 结果中，整体来看各组阳性率有明显差异，P=0.000，组间比较 AD 组：P_A=0.663，B、C 组与 D 组比较则有明显差异（P_B=0.000，P_C=0.000），说明从分子水平上影响了肿瘤的生长；而 B、C 组之间无明显差异（P=1.000）。

细胞凋亡的结果显示，整体凋亡率有明显差（P=0.000）；各组与空白组比较，除 F 组（超声组）无明显差异（P_{AF}=0.486）之外，其他各组细胞凋亡率都有明显提高（P=0.000），说明都有药物作用于癌细胞；C、D、E 3 组的凋亡率依次增高，说明 SDF-1 和 TATp 在微泡上的连接提高了微泡的药物作用率，但是 C、D 组效果不如单纯用药明显，这可能是载药率较低引起的。而 E 组（靶向载药微泡+超声组）、B 组（单纯药组）比较凋亡率却有明显提高（P_{EB}=0.007），说明超声和靶向微泡的作用，可使得 E 组的药物有更高的利用率：荧光标记微泡可以看出靶向分子使微泡更多地集中于癌细胞周围。

近来提出的用于麻醉实验兔的药物戊巴比妥钠在 0.7%浓度与 3%浓度下麻醉效果无明显差异[22]，鉴于该药物有呼吸抑制作用，可以改用更低浓度以取得安全性；改善微泡制作工艺以获得更高效的载药量和更好的靶向性；为了验证试验的普遍性，仍需扩大体内实验的样本容量。本研究对 TATp 与 SDF-1 修饰的载多西紫杉醇靶向超声造影剂体内成像及治疗进行了初步研究，还缺乏对细胞和动物的最适药物浓度进行深入研究，在之后的研究中将对浓度梯度或不同的给药方式进行研究，以达到最好的治疗效果。

综上所述，本研究在探索 TATp 和 SDF-1 修饰的载药超声微泡治疗舌癌颈淋巴转移中，转移性淋巴结的增长得到抑制，p53 表达低，细胞凋亡高，取

得了一定治疗效果，值得继续深入研究。

参 考 文 献

[1] Ng JH, Iyer NG, Tan MH, et al. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue:a global study[J]. Head Neck, 2017, 39(2): 297-304.

[2] 张志愿，俞光岩，马绪臣，等. 口腔颌面外科学[M]. 7 版. 北京：人民卫生出版社，2008：289-301.

[3] 曾 峥，邱丽华，高 志，等. TATp 和 CXCR4 修饰的载 VP3 基因超声微泡制备及体外寻靶实验[J]. 重庆医学，2016，45(30)：4203-4206.

[4] Gupta B, Lev ehenoko TS, Tomhilin VP. Intracelular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(4): 637-651.

[5] 鲁仁财，赵 卫. 超声微泡对比剂增强高强度聚焦超声治疗作用研究进展[J]. 介入放射学杂志，2016，25(12)：1114-1118.

[6] 朱双喜，郭俊兵，蒋宏伟，等. CXCR4 在舌癌及转移颈淋巴结组织中的表达及意义[J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版)，2008，1(4)：9-12.

[7] Wehler T, Wolfert F, Schimanski CC, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease[J]. Oncol Rep, 2006, 16(6): 1159-1164.

[8] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans-activator protein[J]. Cell Press, 1988, 55(6): 1179-1188.

[9] 欧阳紫兰，邱丽华，王 婷，等. 建立图舌癌经淋巴转移模型的多普勒超声动态监测[J]. 重庆医科大学学报，2013，1(9)：50-53.

[10] 王 婷，邱丽华，高 志，等. 载多西紫杉醇脂质微泡联合超声靶向微泡破裂对兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤作用的初步研究[J]. 重庆医科大学学报，2014，1(5)：710-714.

[11] Zhang DY, Shen XZ, Wang JY, et al. Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fuorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(22): 3554-3362.

[12] Okuno S, Harada M, Yano T, et al. Complete regression of xenografted human carcinomas by camptothecin analogue-carboxymethyl dextran conjugate(T-0128)[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2988-2995.

[13] 周卫平，王惠民，贾春平. p53 基因突变的检测方法及临床应用[J]. 临床检验杂志，2008，26(3)：224-226.

[14] Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1994, 105(4): 327-332.

[15] Kim HS, Oh JM, Jin DH, et al. Paclitaxel induces vascular endothelial growth factor expression through reactive oxygen species production[J]. Pharmacology, 2008, 8(1): 317-324.

[16] 郑元义，王志刚，冉海涛，等. DFY-II 型超声图像定量分析诊断仪的设计及应用[J]. 临床超声医学杂志，2005，7(5)：338-340.

[17] 张 林，黄桂林. 兔 VX2 口腔鳞状细胞癌模型的研究进展[J]. 遵义医学院学报，2013，36(2)：174-176.

[18] 廖贵清，田 军，刘海潮，等. 兔 VX2 舌癌移植瘤模型的建立及生物学特性观察[J]. 中国口腔颌面外科杂志，2009，7(3)：244-248.

[19] Li YJ, Liu Y, Shen WH, et al. Ultrasound2guided implantation with constitution mass of rabbit 1 fiver VX2 tumor model[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2008, 24(12): 1886-1888.

[20] 国家食品药品监督管理局. 细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则[J]. 中国新药与临床杂志，2008，27(6)：462-465.

[21] Lain S, Hollick J, Campbell J, et al. Discovery in vivo activity and mechanism of action of a small-molecule p53 activator[J]. Cancer Cell, 2008, 13(5): 454-463.

[22] 刘为萍，白 梅. 戊巴比妥钠麻醉家兔的浓度探讨[J]. 华夏医学，2013，26(1)：11-1.

[23] Sapundzhiew N, Dunne AA, Ramaswamy A, et al. Lymphogenic metastatic spread of auricular VX2 carcinoma:feasibility of complete tumor resection[J]. Anti-cancer Res, 2005, 25(6B): 4209-4214.

[24] Frenkel V, Kimmel E, Iger Y. Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin[J]. Ultrasound Med Biol, 1999, 25(8): 1295-1303.

[25] 庞 亮，邱丽华，高 志，等. 超声微泡在肿瘤转移淋巴结显像与治疗中的应用研究[J]. 重庆医学，2009，38(13)：1666-1668.

[26] 鲍 晓，程竞仪，章英剑，等. 分子影像学肿瘤疗效评价标准及应用[J]. 肿瘤影像，2014，1(3)：165-171.

[27] Ahmed M, Goldberg SN. Basic science research in thermal ablation[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2011, 20(2): 237-258.

[28] Woo SU, Bae JW, Kim CH, et al. A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(1): 281-285.

[29] Awan KH, Yang Y, Morgan P, et al. Utility of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of potentially malignant disorders of the oral cavity-a clinical and histological assessment[J]. Oral Dis, 2012, 18(8): 728-733.

[30] Steele TO, Meyers A. Early detection of premalignant lesions and oral cancer[J]. Otolaryngol Clin N Am, 2011, 44(1): 221-229.

[31] Wu H, Rognin NG, Krupka TM, et al. Acoustic characterization and pharmacokinetic analyses of new nanobubble ultrasound contrast agents[J]. Ultrasound Med Biol, 2013, 39(11): 2137-2146.

[32] Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy[J]. Cancer Cell, 2014, 25(1): 91-101.

（责任编辑：冉明会）