

❖ 实验研究

Ultrasound-mediated sPD-1 and miR-206 gene nanoscale microbubbles synergistic inhibition of H22 hepatoma subcutaneous xenografts in mice

TAN Yandi¹, ZHAO Yun^{1*}, LIU Chaoqi¹, ZHOU Jun², ZHENG Zhiwei¹,
MA Yao¹, JIANG Jinjun¹

(1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Department of
Ultrasonography, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ultrasound-mediated soluble programmed cell death 1 receptor (sPD-1) and miR-206 loaded nanoscale microbubbles on H22 hepatoma subcutaneous xenografts in mice. **Methods** sPD-1 and miR-206 loaded nanoscale microbubbles were prepared. The mice models of H22 hepatoma xenografts were established and randomly divided into model group, microbubble control group, miR-206 microbubble group, sPD-1 microbubble group and combined group (miR-206 and sPD-1 microbubbles). Mice in each group (each $n=8$) were treated with normal saline or corresponding nanoscale microbubbles every 2 days by injection via tail vein, and then irradiated by ultrasound once after every injection. Tumor tissues were obtained after being treated 5 times. Tumor volume and quality were measured, the volume and quality inhibitory rates were calculated. HE staining was used to observe pathological changes of the tumors. The expressions of Bcl-2, Bax proteins were detected by immunohistochemistry. The expressions of Bcl-2, Bax, c-met, interferon- γ (IFN- γ) and programmed cell death 1 receptor ligand (PD-L1) mRNA were detected with RT-PCR. Quantitative real-time fluorescence PCR was used to detect the expression of miR-206. **Results** The nanoscale bubbles were spherical and distributed uniformly. Compared with model group, tumor volume and quality decreased in other groups, and the volume and quality inhibitory rates increased (all $P<0.05$), especially in combined group (all $P<0.05$). Compared with model group, the Bax protein and mRNA expressions both increased, whereas the Bcl-2 protein and mRNA expressions decreased in other groups, especially in combined group (all $P<0.01$). There were significant differences of Bax, Bcl-2, c-met, PD-L1, IFN- γ and miR-206 mRNA in tumor tissues among each group (all $P<0.01$). **Conclusion** Ultrasound-mediated sPD-1 combine miR-206 loaded nanoscale microbubbles can synergistically inhibit H22 hepatoma xenografts in mice.

[Keywords] carcinoma, hepatocellular; microbubbles; nanoparticles; microRNAs; ultrasonography

DOI:10.13929/j.1003-3289.201902029

超声介导载 sPD-1 和 miR-206 基因纳米微泡 协同抑制小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤

谭妍迪¹, 赵云^{1*}, 刘朝奇¹, 周军², 郑智唯¹, 马瑶¹, 姜矜君¹

(1. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002; 2. 宜昌市中心人民医院超声科, 湖北宜昌 443000)

[摘要] **目的** 探讨超声介导载可溶性程序性死亡因子 1(sPD-1)联合 miR-206 纳米微泡对小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤的干预效果。 **方法** 自制载 sPD-1 和 miR-206 基因的纳米微泡, 构建 H22 肝细胞癌皮下移植瘤小鼠模型, 并将模型小鼠

[基金项目] 宜昌市重点实验室(三峡大学)开放基金项目(2017KNX06)、三峡大学学位论文培优基金项目(2019SSPY111)。

[第一作者] 谭妍迪(1994—), 女, 湖北宜昌人, 在读硕士。研究方向: 超声微泡治疗肿瘤。E-mail: 623812165@qq.com

[通信作者] 赵云, 三峡大学医学院, 443002。E-mail: zhaoyun@ctgu.edu.cn

[收稿日期] 2019-02-13 **[修回日期]** 2019-07-15

随机分为模型组、空微泡组、miR-206 微泡组、sPD-1 微泡组、联合组(给予 miR-206 微泡组及 sPD-1 微泡),分别每 2 天经尾静脉给予生理盐水及相应的微泡,每次注射后给予超声辐照瘤体治疗 1 次。5 次治疗后取小鼠肿瘤组织,测量肿瘤质量及体积,计算肿瘤体积及质量抑瘤率,HE 染色观察肿瘤组织病理变化,免疫组织化学法检测小鼠肿瘤组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达,半定量 PCR 检测 Bax、Bcl-2、c-met、 γ 干扰素(IFN- γ)、程序性死亡因子-1 配体(PD-L1)mRNA 表达,实时荧光定量 PCR 检测 miR-206 表达。**结果** 制备的纳米微泡呈球形,分布均一。与模型组比较,各组肿瘤体积、肿瘤质量均降低,体积抑瘤率及质量抑瘤率均升高(P 均 <0.05);上述变化以联合组为著(P 均 <0.05)。与模型组比较,其余各组 Bax 蛋白和 mRNA 均高表达、Bcl-2 蛋白和 mRNA 均低表达,以联合组为著(P 均 <0.01)。各组小鼠肿瘤组织 Bax、Bcl-2、c-met、PD-L1、IFN- γ 、miR-206 mRNA 表达差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。**结论** 超声介导载 sPD-1 和 miR-206 纳米微泡可协同抑制小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤生长。

[关键词] 癌,肝细胞;微气泡;纳米粒子;微 RNAs;超声检查

[中图分类号] R735.7; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2019)09-1315-06

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球癌症死亡的第 4 大原因^[1],目前对晚期 HCC 和耐药 HCC 的治疗方法较为有限。可溶性程序性死亡因子 1(soluble programmed cell death 1 receptor, sPD-1)基因是免疫治疗的靶基因,通过阻断程序性死亡因子 1(programmed cell death 1 receptor, PD-1)/PD-1 配体(PD-1 ligand, PD-L1)信号通路激活机体免疫系统而抗肿瘤。HCC 组织中 miR-206 表达显著降低,靶基因 c-met 表达增加,促进细胞异常增殖^[2]。超声纳米微泡转染基因可保护基因不被降解^[3],同时超声破裂微泡产生的空化作用和声孔效应等使基因转染效率显著提高,且微泡安全性较常用的病毒载体更好^[4]。本研究探讨超声介导载 sPD-1 联合 miR-206 纳米微泡对小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤的干预效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

1.1.1 实验动物及瘤株 SPF 级雄性昆明小鼠 45 只,体质量 18~20 g,由三峡大学实验动物中心提供,动物许可证号:SYXK(鄂)2010-0010。H22 肝癌细胞瘤株,由三峡大学医学院湖北省重点实验室提供。

1.1.2 主要试剂 聚乙二醇-2000-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000, Avanti)、DC 胆固醇(Dc-Chol, Avanti)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, Avanti)、全氟丙烷气体、miR-206 和 sPD-1 质粒,总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(大连宝生物科技有限公司)、PCR 引物(生工生物工程股份有限公司合成)等。

1.1.3 主要仪器 纳米粒度及 ZETA 电位分析仪(马尔文仪器公司)、超声波清洗机(SONICS)、超声治疗仪(UGT1025)、微量核酸蛋白检测仪(Thermo Scientific)、实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, Step One Plus)、高速振荡仪、旋转蒸发器、多功能显微镜及图像分析系统(Nikon)等。

1.2 sPD-1 和 miR-206 基因构建 查找基因库^[5-6]中小鼠 sPD-1 和 miR-206 基因序列,据其采用 Prime 5.0 软件设计引物,将上、下游引物分别引入限制性内切酶位点。以小鼠 cDNA 为模板,利用引物进行 PCR 扩增,采用琼脂糖凝胶电泳分离纯化其产物,以凝胶回收试剂盒回收目的基因。将目的基因与线性化空载体质粒于 16℃ 连接过夜后转化感受态细胞,涂于含卡那霉素 LB 皿后 37℃ 培养过夜,次日挑取菌落于含卡那霉素 LB 培养瓶中克隆扩增培养,抽提质粒后测序鉴定。

1.3 载基因阳离子纳米脂质微泡制备 取适量 DSPE-PEG2000、DPPC、Dc-Chol 混合于玻璃球管中,于旋转蒸发器中 40℃ 减压蒸发 1 h,抽真空 3 h 除尽残余氯仿,加入甘油与 PBS 混合液,于超声波清洗机内至膜脱落后 45℃ 水浴 1 h,分装至西林瓶后将瓶中气体置换为 C_3F_8 ,最后将西林瓶高频振荡得到阳离子脂质微泡。使用血球计数板计算浓度,粒度仪测量粒径电位。将 1 μ g 质粒与 $10^7 \sim 10^8$ 个微泡置于 EP 管中,共同孵育 30 min,得到载 miR-206 或 sPD-1 阳离子纳米脂质微泡。采用琼脂糖凝胶电泳观察阳离子微泡与等量质粒是否结合,确定质粒连接最多时的微泡数量。将 14 μ g 质粒与 35 μ l 荧光染料碘化丙啶混合,进行荧光染色 15 min,再与 100 μ l 微泡共同孵育 30 min,以共聚焦显微镜观察质粒与微泡结合情况。

1.4 实验动物分组及处理 将冻存的 H22 肝癌细胞株复苏培养后注入小鼠腹腔,饲养 1 周后抽取腹腔积液,分别取 0.2 ml 浓度为 1×10^7 /ml 的细胞悬液接种于 45 只小鼠右前侧肩部,待移植瘤直径达 0.5~1.0 cm 即建模成功。于 40 只小鼠成功构建 H22 肝癌移植瘤模型,将其随机分均为 5 组,即模型组、空微泡组、sPD-1 微泡组、miR-206 微泡组、联合组,每组 8 只,均每 2 天经尾静脉注射 1 次;模型组给予生理盐水,空微泡组、sPD-1 微泡组、miR-206 微泡组给予相应

微泡,联合组给予 sPD-1 微泡及 miR-206 微泡,剂量均为 0.2 ml;于每次注射后给予超声辐照瘤体治疗 1 次,辐照条件:功率 1 W/cm²,频率 1 MHz,占空比 50%,每只辐照时间 90 s。5 次注射及治疗后处死小鼠并剥离肿瘤,测量肿瘤质量及体积,计算肿瘤体积及质量抑瘤率。体积或质量抑瘤率=(模型组小鼠肿瘤体积或质量-实验组小鼠肿瘤体积或质量)/模型组小鼠肿瘤体积或质量。

1.5 肿瘤组织形态及 Bax、Bcl-2 凋亡蛋白表达检测

采用多聚甲醛将肿瘤组织固定后脱水包埋形成蜡块并切片,行 HE 染色观察肿瘤组织形态,采用免疫组织化学染色检测 Bax、Bcl-2 凋亡蛋白表达:与模型组比较表达量增加记为高表达,反之为低表达。

1.6 肿瘤组织 Bcl-2、Bax、 γ 干扰素(interferon- γ 、IFN- γ)、c-met、PD-L1 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR。分别取各组肿瘤组织 50 mg,以 Trizol 法提取组织 RNA,逆转录得到 cDNA。以 GAPDH 为内参,通过 PCR 反应扩增目的基因。PCR 反应体系:引物(表 1)1 μ l, cDNA 1 μ l, 双蒸水 10.5 μ l, PCR Master mix 12.5 μ l。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,采用 Imagine J 软件观察结果。

1.7 肿瘤组织 miR-206 表达检测

采用实时荧光定量 PCR。反应体系:SYBR GreenI 5 μ l, 上下游引物各 0.25 μ l (上游: 5'-GGATCCAGGCCAAGATGGCACC TTAC-3', 下游: 5'-GAATTCCT GAAACCCAGTATTGTGGG-3'), 模板 cDNA 2 μ l, 双蒸水 2.5 μ l。扩增程序:95℃预变性 20 s;95℃变性 3 s, 58℃退火 30 s, 30 个循环;每个样品重复测量 3 次,采用相对定量法计算结果。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米脂质微泡特征 共聚焦显微镜下纳米脂质微泡呈球形,表面光滑,分散均匀,粒径均一,

表 1 Bcl-2、Bax、IFN- γ 、PD-L1、c-met 引物及序列

引物	序列
Bcl-2	上游:5'-CGTCAACAGGGAGATGTCACC-3'
	下游:5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'
Bax	上游:5'-TGGTTGCCCTCTTCTACTTTGC-3'
	下游:5'-CAGACAAGCAGCCGCTCAC-3'
IFN- γ	上游:5'-CCATCGGCTGACCTAGAGAA-3'
	下游:5'-GATGCAGTGTGTAGCGTTCA-3'
PD-L1	上游:5'-AACGCCACAGCGAATGATG-3'
	下游:5'-TCTCAAGAAGAGGAGGACCGTG-3'
c-met	上游:5'-CAACCCGAATACTGCCAGAC-3'
	下游:5'-TGACAACAGAGAAGGATACGGAGC-3'

平均粒径 (288.93 $\pm$ 7.98) nm, Zeta 电位 (17.87 $\pm$ 0.57)mV,见图 1。共聚焦显微镜示质粒与微泡结合(图 2A);琼脂糖凝胶电泳(图 2B)示,1 μ g 质粒与 30 μ l 微泡结合时,样品滞留于加样孔,无多余质粒向正极移动,即 1 μ g 质粒结合 30 μ l 微泡的结合比例恰当。

2.2 小鼠肿瘤生长情况 模型组小鼠肿瘤生长迅速,部分小鼠前肢出现运动障碍、全身呈恶病质状态。各组小鼠肿瘤体积、肿瘤质量、体积抑瘤率及质量抑瘤率差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),与模型组比较,各组肿瘤体积、肿瘤质量均降低,体积抑瘤率及质量抑瘤

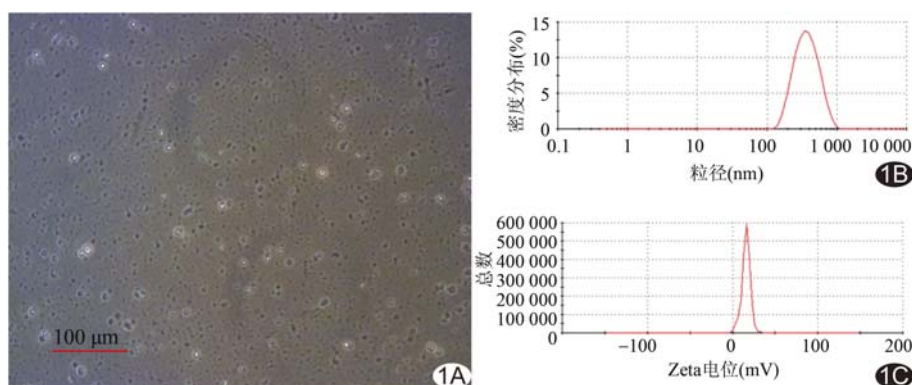


图 1 纳米脂质微泡特征 A. 共聚焦显微镜下纳米脂质微泡呈球形,表面光滑; B. 粒径分布图示纳米脂质微泡分散均匀,粒径均一; C. Zeta 电位

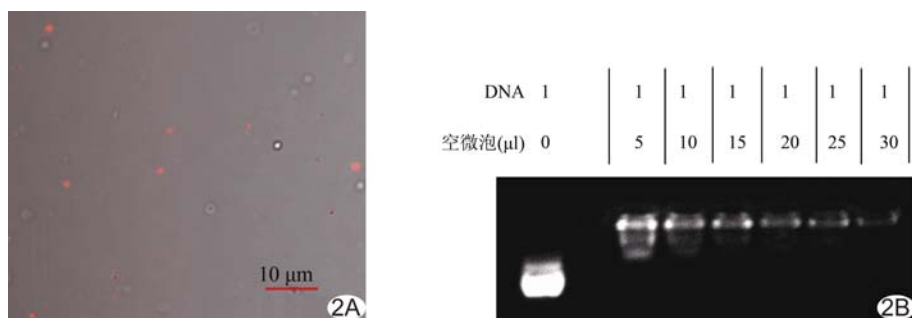


图 2 纳米脂质微泡的基因携载能力 A. 共聚焦显微镜示质粒与微泡结合; B. 琼脂糖凝胶电泳图

率均升高 (P 均 < 0.05), 尤以联合组为著 (P 均 < 0.01)。见表 2。

2.3 肿瘤组织形态 模型组肿瘤细胞排列紊乱, 异型性明显; 其余各组肿瘤细胞均见损伤, 如核固缩溶解, 大量均质红染的细胞碎片等, 联合组上述表现更严重 (图 3)。

2.4 肿瘤组织 Bax、Bcl-2 蛋白和 Bax、Bcl-2 mRNA 表达 免疫组织化学染色及 RT-PCR 结果显示, 各组 Bax、Bcl-2 蛋白和 Bax、Bcl-2 mRNA 表达总体差异有统计学意义 (P 均 < 0.01)。与模型组比较, 其余各组 Bax 蛋白和 mRNA 均高表达、Bcl-2 蛋白和 mRNA 均低表达, 以联合组为著 (P 均 < 0.01)。见表 3。

2.5 肿瘤组织 c-met、PD-L1、IFN- γ 、miR-206 mRNA 表达 各组小鼠肿瘤组织 c-met、PD-L1、IFN- γ 、miR-206 mRNA 表达差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。联合组 c-met mRNA 表达低于模型组、空微泡组、sPD-1 微泡组, 高于 miR-206 微泡组 (P 均 < 0.05); 联

合组 PD-L1 mRNA 表达低于模型组、空微泡组、miR-206 微泡组, 高于 sPD-1 微泡组 (P 均 < 0.05); 联合组 IFN- γ mRNA 表达高于模型组、空微泡组及 miR-206 微泡组 (P 均 < 0.05); 联合组 miR-206 表达高于模型组, 低于 miR-206 微泡组 (P 均 < 0.05)。见表 3。

3 讨论

基因在血液中易被核酸酶等降解清除, 常用基因载体为重组病毒, 对机体有免疫原性和侵入性^[7]。本研究所选脂质微泡采用安全无毒的原材料, 纳米级微泡可直接透过血管间隙进入肿瘤组织, 在保护基因到达肿瘤组织的同时促进基因转染^[8], 且在超声辐照微泡破裂过程中产生的空化作用和声孔效应对肿瘤血管具有破坏作用, 可进一步抑制肿瘤生长^[9]。本研究结果显示, 模型组小鼠肿瘤生长迅速, 而其他各组肿瘤生长均受抑制, 尤以联合组为著。

免疫治疗是肿瘤领域的研究热点。美国、欧洲肝病研究协会等制定的国际指南^[10]提出, 免疫治疗是肝

表 2 各组小鼠肿瘤体积、质量及其对应的抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤质量(g)	体积抑瘤率	质量抑瘤率
模型组	9 845.57 $\pm$ 1 495.86	7.29 $\pm$ 2.21	0	0
空微泡组	6 147.71 $\pm$ 1 203.97*	4.20 $\pm$ 1.86*	0.38 $\pm$ 0.03**	0.44 $\pm$ 0.13**
miR-206 微泡组	1 342.22 $\pm$ 1 404.47**##	0.16 $\pm$ 0.08***	0.87 $\pm$ 0.12***	0.98 $\pm$ 0.00**
sPD-1 微泡组	3 675.43 $\pm$ 1 006.00**	1.17 $\pm$ 0.99**	0.63 $\pm$ 0.06***	0.86 $\pm$ 0.09**
联合组	602.95 $\pm$ 262.74***##	0.11 $\pm$ 0.06***	0.94 $\pm$ 0.02*** Δ	0.99 $\pm$ 0.00**
F 值	31.70	15.53	110.25	108.59
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: *: 与模型组比较, $P < 0.05$; **: 与模型组比较, $P < 0.01$; #: 与空微泡组比较, $P < 0.05$; ##: 与空微泡组比较, $P < 0.01$; Δ : 与 sPD-1 微泡组比较, $P < 0.05$

表 3 各组小鼠肿瘤组织 Bax、Bcl-2、c-met、PD-L1、IFN- γ 、miR-206 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2	c-met
模型组	938.68 $\pm$ 50.38	9 167.03 $\pm$ 89.69	10 286.57 $\pm$ 444.80
空微泡组	3 820.36 $\pm$ 266.24*	5 392.26 $\pm$ 178.99*	7 174.44 $\pm$ 585.30*
miR-206 微泡组	8 335.26 $\pm$ 777.67*#	3 272.93 $\pm$ 130.43*#	3 717.32 $\pm$ 396.19*#
sPD-1 微泡组	4 563.38 $\pm$ 324.67*▲	1 332.39 $\pm$ 58.00*#▲	9 892.57 $\pm$ 386.27*#▲
联合组	14 083.47 $\pm$ 838.75*#▲ Δ	674.27 $\pm$ 67.33*#▲ Δ	5 206.62 $\pm$ 488.55*#▲ Δ
F 值	258.78	2 731.44	113.56
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01
组别	PD-L1	IFN- γ	miR-206
模型组	13 490.73 $\pm$ 183.30	1 550.75 $\pm$ 191.32	1.00 $\pm$ 0.00
空微泡组	12 708.96 $\pm$ 225.50*	1 573.78 $\pm$ 60.35	1.50 $\pm$ 0.14*
miR-206 微泡组	10 457.00 $\pm$ 207.86*#	2 323.35 $\pm$ 246.68*	4.67 $\pm$ 1.07*#
sPD-1 微泡组	4 826.28 $\pm$ 189.45*#▲	10 437.68 $\pm$ 747.27*#▲	2.31 $\pm$ 0.37*#▲
联合组	7 754.46 $\pm$ 250.97*#▲ Δ	9 906.28 $\pm$ 755.24*#▲	2.62 $\pm$ 0.23*#▲
F 值	851.30	257.08	22.37
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: *: 与模型组比较, $P < 0.01$; #: 与空微泡组比较, $P < 0.01$; ▲: 与 miR-206 微泡组比较, $P < 0.05$; ▲▲: 与 miR-206 微泡组比较, $P < 0.01$; Δ : 与 sPD-1 微泡组比较, $P < 0.01$

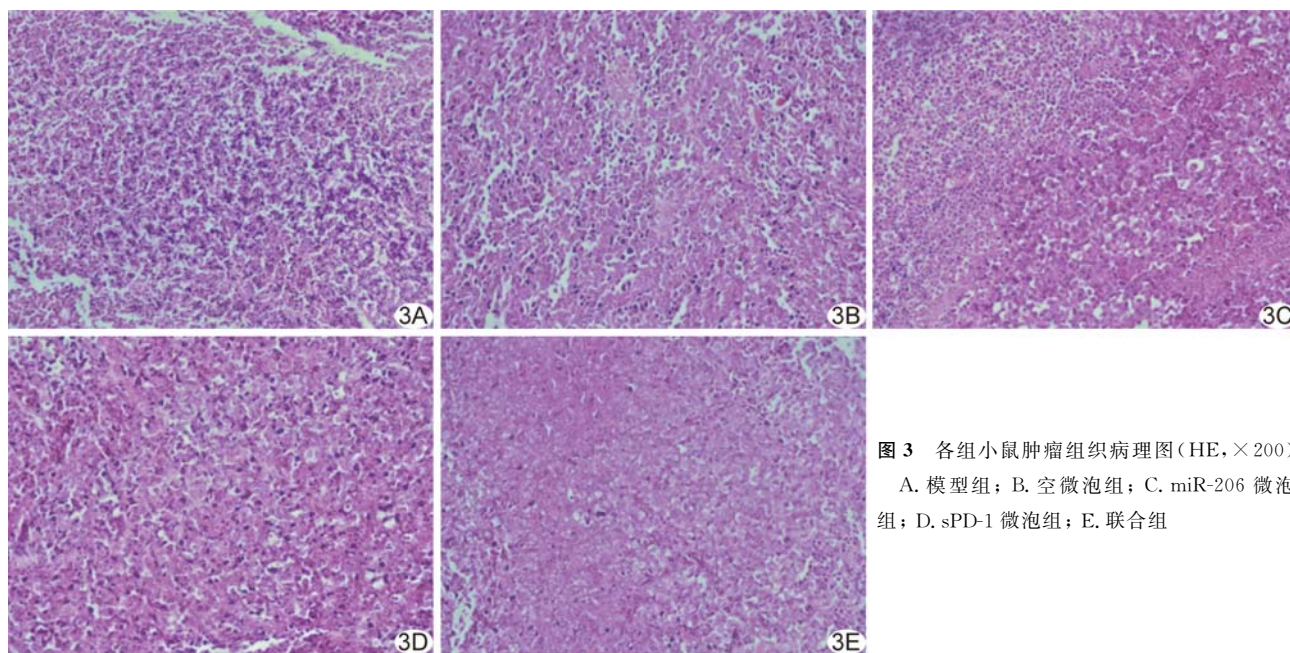


图 3 各组小鼠肿瘤组织病理图(HE, ×200)

A. 模型组; B. 空微泡组; C. miR-206 微泡组; D. sPD-1 微泡组; E. 联合组

癌晚期的有效治疗手段。PD-1/PD-L1 是常用免疫检查点的分子靶点,通过阻碍 PD-1 与 PD-L1 结合而抑制信号通路,减轻癌细胞对免疫系统的抑制,从而激活免疫系统抵抗肿瘤。PD-1 抗体如 nivolumab 已用于临床,可提高晚期 HCC 患者总生存率,且安全性尚可^[11]。本研究结果显示, sPD-1 及靶向 PD-L1 的 miR-206 联合治疗可有效阻断 PD-1 与 PD-L1 结合,促进肿瘤微环境 IFN- γ 上调及 PD-L1 下调,逆转被抑制的 T 细胞,提高 NK 细胞及 T 细胞活性,进而提高细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的抗肿瘤作用。Pan 等^[12]采用 sPD-1 治疗 H22 肝癌小鼠的实验也证明 sPD-1 可通过上调促炎症因子 IFN- γ 而增强小鼠的抗肿瘤免疫,但该研究采用裸质粒局部注射于肿瘤部位,临床可操作性小;本研究采用的载基因脂质微泡通过静脉注射即可进行微创治疗。

miRNA 可作为抑癌基因或致癌基因,调控恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和凋亡。miR-206 是 miR-1 家族成员,可靶向下调 c-met、PD-L1 等癌基因。肝癌组织中 miR-206 表达减少,与肿瘤形成、转移及预后相关^[13]。促进 miR-206 表达可阻滞肿瘤细胞周期而促凋亡,抑制细胞增殖、分化和迁移。本课题组曾以 miR-206 治疗宫颈癌小鼠移植瘤,使 miR-206 靶向调控的 c-met 表达下调^[14]。本研究结果显示,与模型组比较,miR-206 微泡组和联合组中 miR-206 表达增加,PD-L1 和 c-met 表达下调。Liu 等^[15]采用脂质体

将 miR-206 转染至肝癌 HepG2 细胞,结果显示 miR-206 抑制细胞增殖并促进凋亡;本研究进一步在动物实验层面验证了 miR-206 对肝癌的抑制作用。

miR-206 可靶向抑制 PD-L1, miR-206 与 sPD-1 联合可更有效阻断 PD-1/PD-L1 信号通路,进一步促进机体抗肿瘤免疫。miR-206 还可通过靶向 c-met 癌基因,促进肝癌细胞凋亡。本研究联合组相对单独治疗组表现出更好的抗肿瘤作用。Bcl-2 和 Bax 调控 HCC 的内源性凋亡通路。Bcl-2 是通过改变线粒体通透性而抑制细胞凋亡的抗凋亡蛋白,而 Bax 高表达可拮抗 Bcl-2 的上述作用^[16]。本研究从基因和蛋白水平均证实了各治疗组肿瘤组织中 Bax 高表达, Bcl-2 低表达,联合组更加明显。

综上所述,本课题组成功构建了载 sPD-1 和 miR-206 纳米阳离子脂质微泡,超声介导 sPD-1 联合 miR-206 纳米微泡通过调节多种凋亡基因和蛋白表达,协同抑制小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤生长。

[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. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Li S, Li Y, Wen Z, et al. microRNA-206 overexpression inhibits cellular proliferation and invasion of estrogen receptor α -positive ovarian cancer cells. Mol Med Rep, 2014, 9(5):1703-1708.

- [3] 席佳达,夏国园,程祖胜. 超声微泡携基因治疗肝脏疾病应用进展. 中国医学影像技术, 2018, 34(12):1897-1900.
- [4] Piscaglia F, Bolondi L. The safety of Sonovue in abdominal applications: Retrospective analysis of 23188 investigations. *Ultrasound Med Biol*, 2016, 32(9):1369-1375.
- [5] 汤文凡, 佐满珍, 刘朝奇, 等. miR-34a 稳定表达株构建及其对宫颈癌 Caski 细胞功能影响的观察. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(19): 1503-1507.
- [6] Wang G, Li Z, Tian H, et al. Modification of sPD1 with CRT induces potent anti-tumor immune responses in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother*, 2015, 76:57-64.
- [7] Shapiro G, Wong AW, Bez M, et al. Multiparameter evaluation of in vivo gene delivery using ultrasound-guided, microbubble-enhanced sonoporation. *J Control Release*, 2016, 223:157-164.
- [8] Anderson CD, Moisyadi S, Avelar A, et al. Ultrasound-targeted hepatic delivery of factor IX in hemophilic mice. *Gene Therapy*, 2016, 23(6):510-519.
- [9] Izadifar Z, Babyn P, Chapman D. Mechanical and biological effects of ultrasound: A review of present knowledge. *Ultrasound Med Biol*, 2017, 43(6):1085-1104.
- [10] 许洋, 刘子荣, 张雅敏. 原发性肝癌的免疫治疗进展. 山东医药, 2017, 57(2):110-113.
- [11] El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): An open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*, 2017, 389(10088):2492-2502.
- [12] Pan XC, Li L, Mao JJ, et al. Synergistic effects of soluble PD-1 and IL-21 on antitumor immunity against H22 murine hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 2013, 5(1):90-96.
- [13] Li Y, Hong F, Yu Z. Decreased expression of microRNA-206 in breast cancer and its association with disease characteristics and patient survival. *J Inter Med Res*, 2013, 41(3):596-602.
- [14] 姜矜君, 刘朝奇, 郑智唯, 等. 超声介导载 miR-206 微泡联合顺铂对小鼠 U14 宫颈癌皮下移植瘤抑制作用的实验研究. 现代妇产科进展, 2018, 27(12):4-8.
- [15] Liu W, Xu C, Wan H, et al. MicroRNA-206 overexpression promotes apoptosis, induces cell cycle arrest and inhibits the migration of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Int J Mol Med*, 2014, 34(2):420-428.
- [16] Zheng W, Xiong YH, Han J, et al. Contrast-enhanced ultrasonography of cervical carcinoma: Perfusion pattern and relationship with tumor angiogenesis. *Br J Radiol*, 2016, 89(1065):20150887.

2018 版中国科技期刊引证报告相关数据 ——《中国医学影像技术》

由中国科学技术信息研究所主持的“2017 中国科技论文统计结果发布会”于 2018 年 11 月 1 日在北京国际会议中心举行。《中国医学影像技术》杂志在《2018 版中国科技期刊引证报告》(核心版)的相关数据为:

- 1 文献来源量:416 篇;
- 2 基金论文比:0.44;
- 3 总被引频次:3311;
- 4 影响因子:0.920;
- 5 学科扩散指标:20.57;
- 6 学科影响指标:1.00;
- 7 综合评价总分:69.9。