



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.007
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4095.shtml

· 基础研究 ·

超声辐照微泡介导双自杀基因转染对乳腺癌杀伤作用的在体研究

钱滢¹, 周平¹, 田双明¹, 李家乐¹, 邓金¹, 张露¹, 刘浔阳²

(中南大学湘雅三医院 1. 超声科 2. 普通外科, 湖南长沙 410013)

摘要

目的: 探讨超声辐照微泡介导 CD/TK 双自杀基因质粒转染对在体乳腺癌的杀伤效应。

方法: 用人乳腺癌 MCF-7 细胞建立裸鼠移植瘤模型后, 将荷瘤裸鼠随机分为对照组、质粒组、超声辐照组、超声辐照微泡组, 每组 5 只。对照组仅给予 CD 与 TK 相应的前药 (5-氟胞嘧啶与更昔洛韦); 质粒组注射质粒 (含 CD/TK 基因) 与前药; 超声辐照组注射质粒与前药, 并予超声辐照; 超声辐照微泡组注射靶向超声造影剂 (质粒与微泡混合物) 与前药, 并予超声辐照。实验期间记录裸鼠肿瘤生长情况; 处理结束后 5 d, 剥除肿瘤, 计算各组的抑瘤率; 用倒置荧光显微镜观察目的基因瘤内转染情况, 计算基因转染效率; RT-PCR 法检测目的基因的表达; 免疫组化法计数肿瘤的微血管密度 (MVD)。

结果: 与对照组比较, 质粒组肿瘤的生长无统计学差异 ($P>0.05$), 而超声辐照组与超声辐照微泡组肿瘤生长被明显抑制 (均 $P<0.05$), 质粒组、超声辐照组、超声辐照微泡组的抑瘤率分别为 3.72%、21.40%、47.13%。质粒组、超声辐照组、超声辐照微泡组基因转染效率分别为 0.78%、2.81%、23.87%, 后者转染效率明显高于前两组 (均 $P<0.05$)。超声辐照组与超声辐照微泡组肿瘤组织中均出现 CD/TK 基因阳性片段, 而对照组与质粒组的肿瘤组织中未见。超声辐照组与超声辐照微泡组肿瘤组织 MVD 计数均明显低于对照组, 且超声辐照微泡组低于超声辐照组 (均 $P<0.05$), 质粒组 MVD 计数与对照组无统计学差异 ($P>0.05$)。

结论: 超声辐照微泡介导的双自杀基因系统能有效提高基因转染效率与表达, 从而增强对肿瘤生长和肿瘤微血管的生成的抑制作用。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1487-1493]

关键词

乳腺肿瘤; 基因疗法; 疾病模型, 动物; 小鼠, 裸

中图分类号: R737.9

Anti-tumor effect of suicide gene transfection mediated by microbubble-enhanced ultrasonic irradiation on breast cancer: an in vivo study

QIAN Ying¹, ZHOU Ping¹, TIAN Shuangming¹, LI Jiale¹, DENG Jin¹, ZHANG Lu¹, LIU Xunyang²

(1. Department of Ultrasonic Examination 2. Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Corresponding author: ZHOU Ping, Email: zhouping1000@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the anti-tumor effect of the transfection of plasmid containing CD/TK double suicide

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (81271680); 湖南省科学技术厅科技计划资助项目 (2011SK3245)。

收稿日期: 2013-11-15; **修订日期:** 2014-04-25。

作者简介: 钱滢, 中南大学湘雅三医院硕士研究生, 主要从事腹部疾病超声诊断及介入治疗方面的研究。

通信作者: 周平, Email: zhouping1000@hotmail.com

genes mediated by microbubble-enhanced ultrasound exposure on breast cancer in vivo.

Methods: After the xenograft tumor model was created in nude mice using human breast cancer MCF-7 cells, the tumor-bearing mice were randomly divided into control group, plasmid group, ultrasonic irradiation group and ultrasonic irradiation plus microbubble agent group, with 5 mice in each group. Mice in control group were only given the corresponding CD and TK prodrugs (5-fluorocytosine and ganciclovir), mice in plasmid group were injected with the plasmids (containing CD/TK gene) and prodrugs, mice in ultrasonic irradiation group were injected with plasmids and prodrugs combined with ultrasonic irradiation, and those in ultrasonic irradiation plus microbubble agent group were injected with targeted ultrasonic contrast agent (mixture of plasmids and microbubble agent) combined with ultrasonic irradiation. The growth of the tumors was recorded during the experiment. After the tumors were enucleated at post-treatment day 5, the tumor inhibition rate in each group was calculated, the transfection of the target genes in the tumors was observed by an inverted fluorescence microscope, and the transfection efficiency was also analyzed; the expression of the target genes was determined by RT-PCR method; the microvessel density (MVD) of the tumors was detected by immunohistochemical staining.

Results: Compared with control group, the tumor growth in plasmid group showed no obvious difference ($P>0.05$), while in both ultrasonic irradiation group and ultrasonic irradiation with microbubble agent group it was significantly inhibited (both $P<0.05$), and tumor inhibition rate in plasmid group, ultrasonic irradiation group and ultrasonic irradiation plus microbubble agent group was 3.72%, 21.40% and 47.13%, respectively. The gene transfection efficiency in plasmid group, ultrasonic irradiation group and ultrasonic irradiation plus microbubble agent group was 0.78%, 2.81% and 23.87%, respectively, which in the latter group was significantly higher than that in the former two groups (both $P<0.05$). The positive DNA fragment of CD/TK gene was present in the tumors from the ultrasonic irradiation group or ultrasonic irradiation plus microbubble agent group, but was absent in those from control group and plasmid group. The MVD count in tumors from both ultrasonic irradiation group and ultrasonic irradiation plus microbubble agent group was significantly lower than that in control group (both $P<0.05$), which in ultrasonic irradiation with microbubble agent group was even lower than that in ultrasonic irradiation group (both $P<0.05$), but showed no statistical difference between plasmid group and control group ($P>0.05$).

Conclusion: The double suicide gene system mediated by microbubble-enhanced ultrasonic irradiation can effectively increase the transfection efficiency and expression of the target gene, and thereby exert an enhanced inhibitory effect on tumor growth and angiogenesis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(11):1487-1493]

KEYWORDS Breast Neoplasms; Gene Therapy; Disease Models, Animal; Mice, Nude

CLC number: R737.9

乳腺癌发病率占女性恶性肿瘤的首位^[1], 在我国发病率呈明显上升趋势^[2]。虽然以手术、放疗、化疗和内分泌治疗为主的综合治疗模式极大地提高了乳腺癌患者的生存率, 但该疾病仍有较高的复发和转移率^[3]。随着医学分子生物学研究的发展和“乳腺癌是一全身性疾病”这一理念认识的深入, 基因治疗逐渐成为乳腺癌分子生物学治疗中一个令人瞩目的方向, 其中自杀基因疗法是极具应用前景的一种抗肿瘤策略, 以其独特的作用机制在乳腺癌的治疗中备受关注, 有望成为乳腺癌治疗的新

途径^[4-6]。自杀基因疗法是指将某些病毒或细菌的基因转入肿瘤细胞, 这些基因编码的特异性酶类能将对细胞无毒或毒性极低的药物前体在肿瘤细胞内代谢成毒性产物, 以达到杀死肿瘤的目的。

本研究从体内实验着手, 针对乳腺癌的基因治疗模式, 探索一种新的载体和转基因方法, 即利用超声微泡造影剂, 作为一种新型基因载体, 在一定剂量的超声波辐照下, 介导 CD/TK 双自杀基因的靶向释放和转染。以期为乳腺癌基因治疗提供一条思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

质粒: 重组质粒 pEGFP-KDR_p-CD/TK 由本课题组前期构建; 细胞株: 人乳腺癌 MCF-7 细胞由本院雷海波惠赠; 实验动物: BALB/C 近交系裸鼠, 20 只, 雌性, 4 周龄, 体质量 18~22 g, 购自本院动物实验中心; TRIzol Reagent 试剂盒, 美国 Gibco 公司; 即用型 SABC 免疫组化试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗小鼠 CD34 多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 重组质粒 pEGFP-KDR_p-CD/TK 的大量提取 将 -70 °C 保存的含重组质粒的 DH5 α 菌复苏, 扩增之后, 按 AxyPrep 质粒大量试剂盒的说明提取重组质粒; 提取的质粒用无菌双蒸水 ddH₂O 溶解后, 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度。最后再定容, 分装浓度为 1 μ g/ μ L, -20 °C 保存备用。

1.2.2 MCF-7 细胞的培养 将冻存于液氮罐中的 MCF-7 细胞经复苏后传代 3~4 次, 然后收集对数生长期的 MCF-7 细胞; 1 000 r/min 5 min 离心后, 弃上清液, 以 Hanks 液洗涤 2 次, 在无血清 DMEM 重悬, 调节浓度适宜。取细胞悬液 0.2 mL, 含细胞数 0.5~1 $\times 10^7$, 分装备用。

1.2.3 裸鼠移植瘤模型的建立 将处于对数生长期的 0.5~1 $\times 10^7$ 个 MCF-7 细胞的悬液 0.1 mL, 用 1 mL 医用注射器注射于裸鼠右侧背部皮下, 置本院动物实验中心无特殊病原菌 (SPF) 级动物饲养房内饲养, 定期观察记录移植瘤生长情况。

1.2.4 成瘤裸鼠的分组和处理 20 只荷瘤裸鼠根据其移植瘤大小排序, 分成 5 等级, 每等级 4 只, 从各个等级的 4 只裸鼠中随机抽取 1 只均分成 4 组, 每组 5 只, 分别为: (1) 对照组; (2) 裸质粒组; (3) 超声辐照组; (4) 超声辐照微泡组。

1.2.5 质粒与微泡混合物的配置 SonoVue 为磷脂包裹的六氟化硫 (SF₆), 按使用说明用生理盐水 5 mL 溶解冻干粉, 震荡混匀形成微泡混悬液, 微泡平均直径 2.5 μ m, pH6.0~6.5, 渗透压为 287 mol/L。取 60 μ L 微泡悬液于 1.5 mL EP 管内, 再滴加入 60 μ L 重组质粒, 轻轻混匀后室温孵育 30 min 后, 装入 1 mL 医用注射器内备用。

1.2.6 各组动物的处理 对照组仅给予 5- 氟胞嘧啶 (5-FC) 与更昔洛韦 (GCV) (5-FC 与 GCV 分别为 CD 与 TK 相应的前药); 质粒组注射裸质粒

与前药 (考察单纯质粒的基因转染情况); 超声辐照组注射质粒与前药, 并予超声辐照 (与质粒组比较, 考察超声辐照对于基因转染的作用); 超声辐照微泡组注射靶向超声造影剂与前药, 并予超声辐照 (考察超声与微泡联合作用下的基因转染率)。

对照组、质粒组、超声辐照组、超声辐照微泡组分别用注射器在瘤体内多点注射 PBS、质粒、质粒与微泡混合物, 注射体积为 60 μ L; 后两组紧接着给予超声辐照 (1 MHz, 2 W/cm², 5 min)。各组在上述处理 24 h 后, 腹腔注射 5-FC [500 mg/(kg \cdot d)] 与 GCV [50 mg/(kg \cdot d)], 连续 10 d。

处理结束后 5 d 引颈法处死裸鼠, 剥离瘤块, 电子天平称重, 刀片快速切分瘤块, 部分浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 部分直接放于 -80 °C 冰箱冻存备用。

1.2.7 肿瘤生长情况和抑瘤率的计算 自瘤体内注射基因之日起每 3 天分别以游标卡尺测量肿瘤最大的长径和与之垂直的短径 (mm), 分别用 a 和 b 表示。肿瘤体积 (mm³) = ab²/2, 计算肿瘤体积。治疗结束后 5 d 处死裸鼠, 测瘤质量, 计算肿瘤生长抑制率。肿瘤生长抑制率 (%) = (1 - 各处理组瘤重 / 条件对照组瘤重) \times 100%。

1.2.8 重组质粒基因转染率测定 取出冻存的肿瘤组织标本, 各组取部分肿瘤研磨、制备成单细胞悬液, 然后置于倒置荧光显微镜下观察。被重组质粒成功转染的组织因其表达绿色荧光蛋白 (GFP) 而在蓝色激发光激发时发射绿色荧光。据此计算不同处理组标本中的基因转染率。

1.2.9 双自杀基因 CD/TK 表达的 RT-PCR 检测 首先按照 TRIzol 试剂盒说明提取肿瘤组织中的总 RNA, 然后逆转录合成 cDNA, 再 PCR 扩增 CD/TK 基因, 最后凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.10 肿瘤微血管密度 (MVD) 的免疫组化检测 将固定好的组织标本行常规石蜡包埋切片, 按 SABC 免疫组化染色试剂盒染色后, 检测组织标本中 CD34 蛋白的表达, 以 CD34 阳性血管数作为 MVD 值, 以镜下 200 倍视野范围内任选不重复的 5 个视野, 计数阳性血管数。

1.3 统计 学 处 理

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料的比较应用 *t* 检验, 组间样本方差分析, 应用 SNK 法分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠移植肿瘤的生长情况和抑瘤率

质粒组裸鼠移植瘤的生长未见明显抑制,处理后各时间点肿瘤大小与对照组的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$); 超声辐照组与超声辐照微泡组裸鼠的移植瘤生长均受到明显抑制,处理后的各

时间点肿瘤体积均明显小于对照组(均 $P<0.05$),且超声辐照微泡组均小于声辐照组(均 $P>0.05$)(表 1)。

相对于对照组,质粒组、超声辐照组、超声辐照微泡组的抑瘤率分别为 3.72%、21.40%、47.13%,3 组间抑瘤率的差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 2)。

表 1 各组荷瘤裸鼠处理后不同时间移植瘤体积 (mm^3)

Table 1 Volume of the xenografts in each group of nude mice (mm^3)

组别	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	203 ± 9	338 ± 3	467 ± 7	612 ± 15	724 ± 23	826 ± 19
质粒组	211 ± 10	323 ± 4	449 ± 6	589 ± 11	692 ± 12	795 ± 16
超声辐照组	213 ± 14	255 ± 3 ¹⁾	382 ± 4 ¹⁾	497 ± 9 ¹⁾	568 ± 10 ¹⁾	649 ± 18 ¹⁾
超声辐照微泡组	205 ± 17	215 ± 2 ^{1),2)}	276 ± 4 ^{1),2)}	363 ± 9 ^{1),2)}	402 ± 15 ^{1),2)}	436 ± 8 ^{1),2)}

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与超声辐照组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. plasmid group; 2) $P<0.05$ vs. ultrasonic irradiation group

表 2 各组肿瘤生长抑制率的比较

Table 2 Comparison of the tumor inhibition rate among groups

组别	肿瘤质量 (mg)	肿瘤生长抑制率 (%)
质粒组	621 ± 18	3.72
超声辐照组	507 ± 20	21.40 ¹⁾
超声辐照微泡组	341 ± 9	47.13 ^{1),2)}

注: 1) 与质粒组比较, $P<0.05$; 2) 与超声辐照组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. plasmid group; 2) $P<0.05$ vs. ultrasonic irradiation group

2.2 重组质粒基因转染率

对照组肿瘤组织中未见绿色荧光细胞,质粒组肿瘤组织中偶尔可见 1~2 个绿色荧光细胞,超声辐照组的肿瘤组织中仅见很少的绿色荧光细胞,超声辐照微泡组的肿瘤组织中可见大量绿色荧光细胞(图 1)。肿瘤组织切片的转染效率分析结果显示,超声辐照微泡组基因转染的效率明显高于超声辐照组,两者差异有统计学意义($P<0.001$); 超声辐照组与裸质粒组比较,基因转染效率稍高,但差异无统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

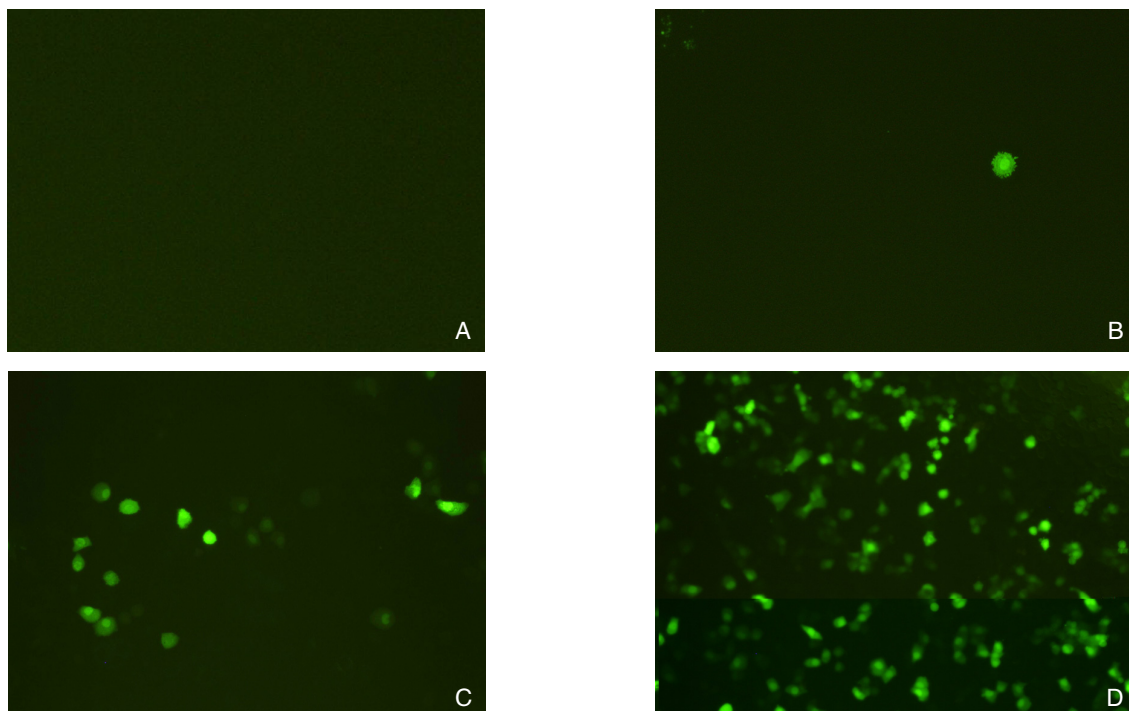


图 1 荧光显微镜下各组细胞的 GFP 表达情况 ($\times 100$) A: 对照组; B: 质粒组; C: 超声辐照组; D: 超声辐照微泡组
Figure 1 Expression of GFP in each group under fluorescence microscopy ($\times 100$) A: Control group; B: Plasmid group; C: Ultrasonic irradiation group; D: Ultrasonic irradiation plus microbubble agent group

表 3 各组肿瘤组织冷冻切片所测基因转染效率 (n=10)
Table 3 Gene transfection efficiency of each group detected on the tumor frozen (n=10)

组别	平均转染效率 (%)
对照组	0
质粒组	0.78 ± 0.03
超声辐照组	2.81 ± 1.28 ¹⁾
超声辐照微泡组	23.87 ± 2.74 ^{1), 2)}

注: 1) 与质粒组比较, P<0.05; 2) 与超声辐照组比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. plasmid group; 2) P<0.05 vs. ultrasonic irradiation group

2.3 双自杀基因 CD/TK 的表达

超声辐照组和超声辐照微泡组的肿瘤组织中均出现 2 415 bp 的 CD/TK 基因阳性片段, 而在对照组和质粒组的肿瘤组织中未出现该阳性片段 (图 2)。

2.4 各组裸鼠移植瘤组织 MVD

与对照组比较, 超声辐照组和超声辐照微泡组肿瘤组织中的微血管染色颗粒明显减少, 尤以超声辐照微泡组最为明显, 而质粒组无明显差异 (图 3)。

MVD 计数结果显示, 超声辐照组和超声辐照微泡组 MVD 计数明显低于对照组 (P<0.05); 质粒组与对照组比较, MVD 计数稍低, 但差异无统计学意义 (P>0.05) (表 4)。

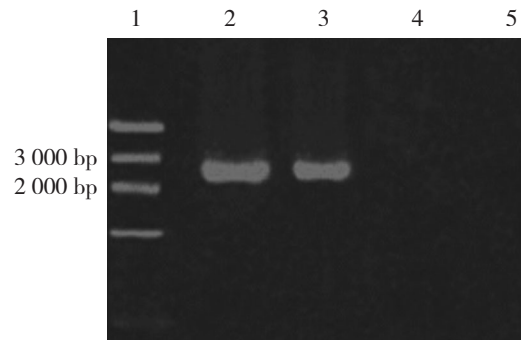


图 2 RT-PCR 检测 CD/TK 基因表达 1: 分子质量标记; 2: 超声辐照微泡组; 3: 超声辐照组; 4: 质粒组; 5: 对照组

Figure 2 Detection of CD/TK gene expression by RT-PCR 1: Maker; 2: Ultrasonic irradiation plus microbubble agent group; 3: Ultrasonic irradiation group; 4: Plasmid group; 5: Control group

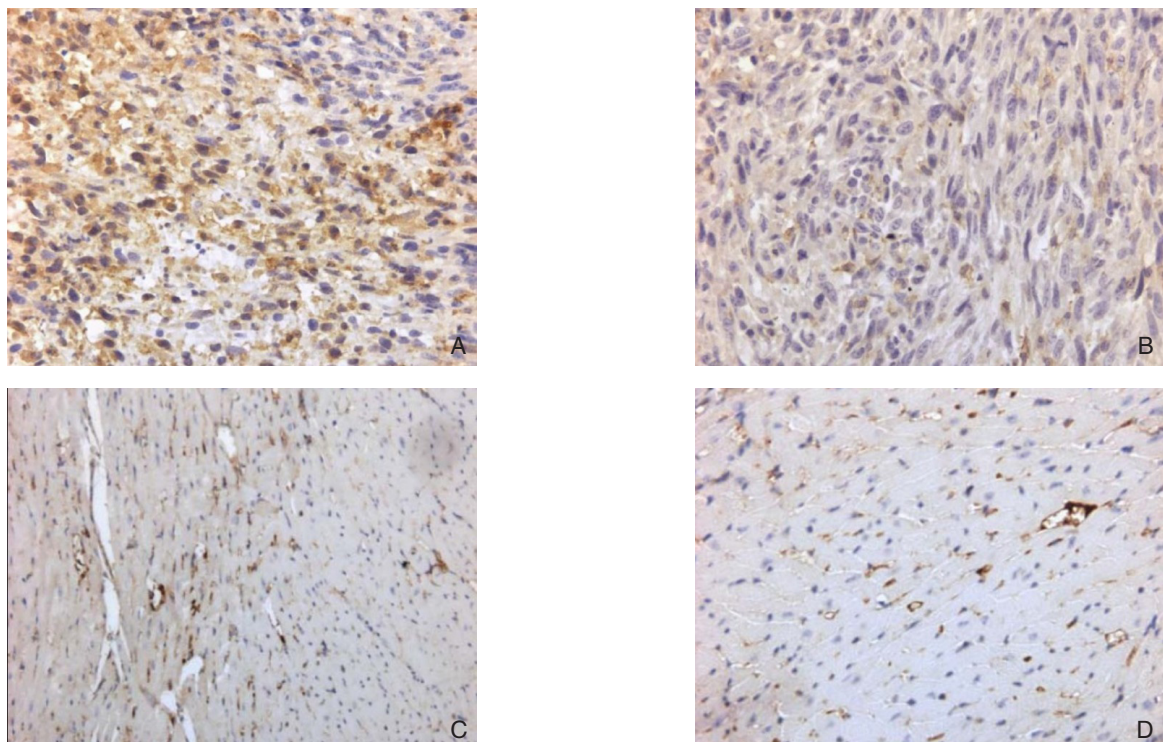


图 3 CD34 免疫组化染色结果 A: 对照组; B: 质粒组; C: 超声辐照组; D: 超声辐照微泡组

Figure 3 Immunohistochemical staining for CD34 expression A: Control group; B: Plasmid group; C: Ultrasonic irradiation group; D: Ultrasonic irradiation plus microbubble agent group

表 4 各组肿瘤组织石蜡切片的 MVD ($n=10$)Table 4 The MVD of tumor's paraffin sections in each group ($n=10$)

组别	平均转染效率 (%)
对照组	48.8 ± 5.1
质粒组	42.77 ± 6.4
超声辐照组	27.4 ± 3.2 ¹⁾
超声辐照微泡组	12.3 ± 1.4 ^{1),2)}

注: 1) 与质粒组比较, $P<0.05$; 2) 与超声辐照组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. plasmid group; 2) $P<0.05$ vs. ultrasonic irradiation group

3 讨 论

3.1 乳腺癌移植瘤动物模型的建立

目前主要的乳腺癌模型, 有自发性、诱发性、移植性等^[7]。而研究乳腺癌的治疗, 移植瘤模型更能直观地反映疗效。本实验使用的 ER (+) MCF-7 细胞株来源于人乳腺癌, 同源性强, 荷瘤模型能较好地体现乳腺癌组织学和病理学生物学特点。裸鼠是先天性胸腺缺陷的突变小鼠, 对异体组织无排斥反应^[8]。随着近代医学的发展, 其在肿瘤学、免疫学等领域有着特殊的价值, 目前已成为医学生物学研究领域中不可缺少的实验动物。本实验采用 MCF-7 细胞株, 接种于裸鼠右侧背部皮下, 接种后 7~10 d 可见结节, 移植瘤成功率为 100%。

3.2 超声靶向微泡击破技术 (UTMD) 介导目的基因转染

超声靶向微泡击破 (ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD) 是使血管通透性增加, 从而使外源性物质通过血管内皮屏障进入靶部位的一种技术^[9]。

UTMD 介导基因转染的主要机制与超声空化效应有关^[10-11]。在特定空间 (聚焦区) 和特定时间发射超声时击破造影剂微泡, 产生空化效应及化学反应, 使周围靶细胞 (包括血管内皮细胞及组织细胞) 的细胞间隙增宽, 膜通透性增加, 细胞表面一过性小孔形成 (声孔效应), 同时, 微泡破裂产生的冲击波促使从微泡上释放出来的药物或基因进入靶细胞。

超声微泡可以作为靶向治疗的载体联合 UTMD 使目的基因能进入细胞内、血管壁、组织间隙, 从而增强目的基因的转染率。超声波与微泡还可以增加化疗药的细胞毒性, 发挥协同作用或增效作用。UTMD 产生的空化作用还可以损伤细胞、抑制

细胞增殖、促进细胞凋亡。运用治疗性超声长时间辐照对癌细胞进行有效转染, 将血管内皮生长因子 (VEGF) 抵制物传输到细胞, 引起增殖抑制和诱导凋亡作用。

不同条件下, 超声微泡对局部组织的生物学作用程度不同, 基因传输及表达的效率亦不同。主要影响因素有 3 个方面: (1) 微泡本身的特性; (2) 发射超声本身的参数; (3) 微泡输入的途径及超声微泡作用的局部环境。如果理想的微泡是提高超声微泡基因、药物传输效率的充分条件, 则最优化超声参数是其必要条件。将超声参数最佳化, 在不产生不良反应的基础上释放出更多能量, 即可产生更多的外溢孔, 使更多基因或药物外溢到组织间隙, 从而提高超声微泡基因、药物的传输效率^[12]。

3.3 超声辐照微泡介导双自杀基因系统对裸鼠乳腺癌的体内抑瘤作用

本实验依据国内外多数文献的报道, 设定当移植瘤直径达 5 mm 时作为处理的起点^[13-15]。将成瘤的 20 只荷瘤鼠随机分成 4 组, 每组给予不同的处理。结果发现, 质粒组、超声辐照组、超声微泡联合辐照组的抑瘤率分别为 3.72%、21.40% 和 47.13%, 质粒组与对照组比较无统计学差异 ($P>0.05$), 而超声辐照组和超声微泡联合辐照组的肿瘤生长抑制率均明显大于对照组 (均 $P<0.05$), 且超声微泡联合辐照组的肿瘤生长抑制率大于超声辐照组 ($P<0.05$)。

肿瘤的生长和迁移都依赖大量新生血管的生成, VEGF/VEGFR 途径在肿瘤新生血管的生成中起着非常重要的作用, 多数肿瘤组织过量表达 VEGF。VEGFR 是 VEGF 的受体之一, 存在于血管内皮细胞中, 与血管内皮细胞的增殖和血管生成密切相关。本实验将双自杀基因靶向性转染肿瘤细胞, 使被转染的肿瘤组织内的 MVD 明显下降。结果发现: 与对照组比较, 质粒组对肿瘤组织 MVD 的抑制作用不太明显, 而超声微泡组和超声辐照组的 MVD 均有明显下降, 尤以超声微泡组最为显著。

综上所述, 超声辐照微泡介导双自杀基因治疗系统对荷瘤鼠移植瘤的生长具有最明显的抑制作用。分析其体内抑瘤机制可能为: 对肿瘤细胞靶向性杀伤作用, 肿瘤细胞生长受到抑制, 同时也减少了 VEGF 的分泌, MVD 亦随之下降, 肿瘤赖以生长的微血管减少, 从而使肿瘤生长受到显著抑制。

参考文献

- [1] Bièche I, Tozlu S, Girault I, et al. Identification of a three-gene expression signature of poor-prognosis breast carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2004, 3(1):37.
- [2] 刘丽萍, 王智彪. SonoVueTM-- 一种新型超声对比剂的研究进展[J]. *国外医学(生物医学工程分册)*, 2005, 28(1):40-42.
- [3] Miller DL, Pislaru SV, Greenleaf JE. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation[J]. *Somat Cell Mol Genet*, 2002, 27(1-6):115-134.
- [4] Chen ZY, Sun XF, Liu JQ, et al. Augmentation of transgenic expression by ultrasound-mediated liposome microbubble destruction[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(4):964-970.
- [5] 冉海涛, 任红, 王志刚, 等. 超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用的实验研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 2003, 12(8):499-501.
- [6] Portsmouth D, Hlavaty J, Rennet M. Suicide genes for cancer therapy[J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(1):4-41.
- [7] Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(9):659-672.
- [8] Shoji M, Sun A, Kisiel W, et al. Targeting tissue factor-expressing tumor angiogenesis and tumors with EF24 conjugated to factor VIIa[J]. *J Drug Target*, 2008, 16(3):185-197.
- [9] 汪朝霞, 王志刚. 超声微泡造影剂携基因或药物治疗研究[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2006, 3(4):306-308.s
- [10] Alter J, Sennoga CA, Lopes DM, et al. Microbubble stability is a major determinant of the efficiency of ultrasound and microbubble mediated in vivo gene transfer [J]. *Ultrasound Med Bio*, 2009, 35(6):976-984.
- [11] Miller DL. Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007, 93(1-3):314-330.
- [12] Shen ZP, Brayman AA, Chen L, et al. Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver via intraportal delivery[J]. *Gene Ther*, 2008, 15(16):1147-1155.
- [13] Nakase M, Inui M, Okunmm K, et al. p53 gene therapy of human osteosarcoma using a transferrin-modified cationic liposome[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(4):625-631.
- [14] Sundaresan G, Yazaki PJ, Shively JE, et al. 124I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice[J]. *J Nucl Med*, 2003, 44(12):1962-1969.
- [15] 成海恩, 张溢, 张翠莉, 等. 沉默 HPV16E6 基因对人宫颈癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(6):486-489.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 钱滢, 周平, 田双明, 等. 超声辐照微泡介导双自杀基因转染对乳腺癌杀伤作用的在体研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(11):1487-1493. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.007

Cite this article as: QIAN Y, ZHOU P, TIAN SM, et al. Anti-tumor effect of suicide gene transfection mediated by microbubble-enhanced ultrasonic irradiation on breast cancer: an in vivo study[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(11):1487-1493. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.007

《中国普通外科杂志》声明

我们发现, 经常有人假冒《中国普通外科杂志》编辑部的名义, 在互联网上发布征稿信息或谎称能包在本刊发表学术论文, 并向投稿人、作者收取发表费, 这不仅严重损害了我编辑部的声誉, 更严重侵犯了投稿人、作者的合法权益。在此, 本编辑部郑重声明: 本刊没有设立其他采编点和分支机构, 也从未委托任何单位和个人组稿。我刊用稿以文章的学术质量为唯一标准, 实行三审制和匿名审稿制, 不向作者收取审稿费用; 版面费是在稿件经三审定稿、录用、发排后按相关规定收取。敬请各位投稿人、作者在投稿前认真核对本编辑部联系方式, 保护自己的合法权益, 以免上当受骗。

请作者投稿前确认以下信息:

中国普通外科杂志投稿网站: www.zpwz.net

编辑部联系方式: 0731-84327400; Email: pw4327400@126.com

编辑部地址: 湖南省长沙市开福区湘雅路 87 号湘雅医院内 1-102

中国普通外科杂志编辑部