

黄敏, 彭月享, 高卫元, 等. 高强度聚焦超声对宫颈癌大鼠免疫功能及生存时间的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (11): 72-77.

Huang M, Peng YX, Gao WY, et al. Effects of high-intensity focused ultrasound on immune function and survival time in rats with cervical cancer [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 72-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.012

高强度聚焦超声对宫颈癌大鼠免疫功能及生存时间的影响

黄 敏¹, 彭月享¹, 高卫元¹, 黄红丽^{2*}

(1. 武汉市第三医院光谷院区 超声科, 武汉 430000; 2. 武汉市第三医院光谷院区 妇产科, 武汉 430000)

【摘要】 目的 高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 对宫颈癌大鼠免疫功能及生存时间的影响。**方法** 将 60 只 Wistar 雌性大鼠随机分为对照组、模型组和 HIFU 组各 20 只。模型组和 HIFU 组左侧腋窝处皮下注射人宫颈癌 HeLa 细胞, 建立宫颈癌移植瘤模型。造模后, HIFU 组进行局部 HIFU 治疗, 单点单次治疗时间为 10 s, 共 250 s。治疗后, 各组随机选取 10 只大鼠用于观察造模后 9 周内的生存时间和体重变化; 剩余 10 只大鼠于治疗后 14 d 处死, 检测各组移植瘤的体积和重量, MTT 检测脾淋巴细胞的活力, 流式细胞仪分析外周血 T 淋巴细胞亚群和 T 淋巴细胞凋亡, HE 染色观察移植瘤组织病理变化。**结果** 与对照组相比, 模型组和 HIFU 组大鼠造模 3 周、5 周和 7 周时大鼠体重均明显下降 ($P < 0.05$), 脾淋巴细胞活力、外周血 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值均明显下降 ($P < 0.05$), T 淋巴细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, HIFU 组的中位生存时间明显延长 [(54.51 ± 3.16) vs (48.03 ± 1.05), Log Rank $\chi^2 = 7.504, P = 0.006$], 造模 3 周、5 周和 7 周时大鼠体重均明显升高 ($P < 0.05$), 肿瘤体积和重量明显降低 ($P < 0.05$), 脾淋巴细胞活力、外周血 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值均明显升高 ($P < 0.05$), T 淋巴细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** HIFU 可以改善大鼠降低的免疫功能, 延长宫颈癌大鼠的生存时间。

【关键词】 高强度聚焦超声; 宫颈癌; 免疫功能; 生存时间; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0072-06

Effects of high-intensity focused ultrasound on immune function and survival time in rats with cervical cancer

HUANG Min¹, PENG Yuexiang¹, GAO Weiyuan¹, HUANG Hongli^{2*}

(1. Department of Ultrasound, Wuhan Third Hospital-Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000, China.

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Third Hospital-Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000)

【Abstract】 Objective To explore the effects of high-intensity focused ultrasound (HIFU) on immune function and survival time in rats with cervical cancer. **Methods** Sixty female Wistar rats were randomly divided into control, model, and HIFU groups, with 20 rats per group. In the model and HIFU groups, human cervical cancer HeLa cells were subcutaneously injected into the left axilla to establish cervical cancer xenograft models. After modeling, the HIFU group underwent local HIFU treatment. The single-point and single treatment time was 10 s for 250 s. After treatment, 10 rats

[作者简介] 黄敏 (1982—), 女, 主治医师, 本科, 从事心脏超声、妇科超声的研究。E-mail: hncltm@163.com

[通信作者] 黄红丽 (1983—), 女, 主治医师, 硕士研究生, 从事妇科肿瘤研究。E-mail: hhhmmmm@yeah.net

were randomly selected from each group to observe changes in survival time and weight within 9 weeks after model induction. The remaining 10 rats in each group were sacrificed 14 d after treatment. The volume and weight of xenografts in each group were calculated. MTT was applied to detect the vitality of spleen lymphocytes. The apoptosis of peripheral blood T lymphocyte subsets and T lymphocytes was analyzed by flow cytometry. The histopathological changes of xenografts tissues were observed by HE staining. **Results** Compared with the control group, at 3, 5, and 7 weeks after modeling, rat body weight was significantly decreased in the model and HIFU groups ($P < 0.05$); the vitality of spleen lymphocytes, peripheral blood $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells, and $CD4^+/CD8^+$ T cells was significantly decreased ($P < 0.05$); and the apoptosis rate of T lymphocytes was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the median survival time in the HIFU group was significantly prolonged [(54.51 ± 3.16) vs (48.03 ± 1.05) , log rank (χ^2) = 7.504, $P = 0.006$]. At 3, 5, and 7 weeks after model induction, the weight of rats was significantly increased ($P < 0.05$); tumor volume and mass were significantly decreased ($P < 0.05$); vitality of spleen lymphocytes, peripheral blood $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells, and $CD4^+/CD8^+$ T cells were significantly increased ($P < 0.05$); and the apoptosis rate of T lymphocyte was significantly reduced compared with ($P < 0.05$). **Conclusions** HIFU can improve the immune function of rats and prolong the survival time of rats with cervical cancer.

【Keywords】 high intensity focused ultrasound; cervical cancer; immune function; survival time; rat

宫颈癌早期常无明显症状和体征,主要采用外科手术治疗,中晚期主要表现为不规则阴道流血、阴道排液等,严重者可表现为贫血、恶病质等全身衰竭症状,主要采用放射治疗或化疗,但其治疗效果并不十分令人满意^[1]。高强度聚焦超声治疗(high intensity focused ultrasound, HIFU)是近年来发现的一种新型的肿瘤治疗方法,利用高强度超声波聚焦后,穿透到人体内,杀灭靶区内的肿瘤细胞,还可能激活机体的免疫系统,提高患者的免疫功能,从而达到治疗肿瘤的目的^[2]。已有研究显示,HIFU可以用于临床晚期胰腺癌^[3]、子宫肌瘤^[4]、宫颈癌^[5]等的治疗,延长患者的生存期,且毒副反应小。但HIFU治疗宫颈癌研究报道较少,杀灭肿瘤细胞的机理尚不明确,对宫颈癌患者免疫功能的影响亦尚不清楚。因此,本研究探索了HIFU对宫颈癌大鼠免疫功能和生存时间的影响,旨在为HIFU在宫颈癌治疗中的应用提供一定的理论支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60只6~8周龄Wistar大鼠,清洁级雌性,体重均为160~200 g,由湖北省实验动物研究中心提供[SCXK(鄂)2015-0018],经武汉市第三医院伦理委员会批准(20170119-03),饲养于本院动物中心实验室[SYXK(鄂)2019-0080],保持室温恒定为25℃,模拟昼夜光照,自由摄食与饮水,严格按实验动物3R原则给予实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

FACSCanto II 流式细胞仪购自美国BD公司;全自动酶标仪购自Thermo Scientific公司;人宫颈癌HeLa细胞由上海钰博生物科技有限公司提供,接种于含有100 U/mL青链霉素和10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。MTT检测试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自上海一研生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模与给药

大鼠预饲养7 d后,随机分为对照组、模型组和HIFU组,每组20只,每组随机选取10只用于观察大鼠的生存时间和体重变化,剩余10只用于病理、免疫相关指标的检测。模型组和HIFU组采用左侧腋窝处皮下注射人宫颈癌HeLa细胞建立宫颈癌大鼠模型^[6],均经左侧腋窝处皮下注射接种人宫颈癌HeLa细胞(0.5 mL, 1×10^7 /mL),密切观察,肉眼可见大鼠左腋窝处有明显肿瘤结节生长即为造模成功,对照组于左侧腋窝处皮下注射等体积生理盐水。造模后第7天,HIFU组进行局部HIFU治疗,辐照强度为2.3 MPa,单点单次治疗时间为10 s,共250 s,对照组和模型组治疗程序与HIFU治疗相同,但功率源开关关闭。对照组、模型组和HIFU组20只大鼠中,10只用于观察大鼠的生存时间和体重变化,于造模之日开始观察,观察时间共9周;剩余10只大鼠于治疗后14 d立即处死,分离大鼠的血液,无菌剥离移植瘤组织,分离大鼠脾,用于病理及免疫相关指标的检测。

1.3.2 观察各组大鼠的生存时间

于造模之日开始观察大鼠的生存状态,记录各组大鼠 9 周内的生存状态(生存或死亡),分别于造模前、造模后 1 周给药即刻、造模 3 周、造模 5 周和造模 7 周称取大鼠的体重。

1.3.3 观察各组大鼠的移植瘤体积和重量

处死大鼠后,剥离大鼠移植瘤组织,测移植瘤长径、短径,计算其肿瘤体积 $=(\text{长径} \times \text{短径}^2)/2$,同时称取移植瘤重量,计算 HIFU 的抑瘤率 $=(1-\text{实验组肿瘤组织重量}/\text{对照组肿瘤组织重量}) \times 100\%$ 。

1.3.4 HE 染色观察大鼠移植瘤组织病理变化

采集大鼠移植瘤组织,进行常规切片制作和 HE 染色,显微镜下观察移植瘤组织的病理变化。

1.3.5 MTT 检测脾淋巴细胞活力

取各组大鼠脾组织,剪碎研磨,过滤,离心(1500 r/min, 10 min),弃上清,加入 10 mL 氯化铵 37℃ 水浴 10 min,加入 2 mL 的 RPMI 1640 培养液中进行培养,采用台盼蓝染色,计数活细胞在 95% 以上,制备成脾淋巴细胞悬液。将脾淋巴细胞悬液以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔培养板,在 37℃、5% CO_2 条件下培养,分别于 0 h、24 h、48 h、72 h,进行 MTT 检测,酶标仪测定波长为 570 nm 处的吸光度值(OD570),绘制细胞生长曲线,严格按照试剂盒说明操作。

1.3.6 流式细胞仪分析外周血 T 淋巴细胞亚群

分离腹主动脉血液,抗凝离心(3000 r/min, 5 min),弃上清,室温避光孵育 30 min,加红细胞裂解液作用 15 min,加 70% 乙醇混合,4℃ 静置 48 h,弃上清,采用 1 mL PBS 重悬,加入 5 μL 浓度为 10 mg/mL 的 RNase,37℃ 下孵育 1 h,分别加入相应的流式抗体(CD4-APC, CD8-PE),室温避光孵育 30 min,上机流式细胞仪检测 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例。

1.3.7 流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞凋亡

分离腹主动脉血液,抗凝离心(3000 r/min, 5 min),采用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, PBS 重悬后,收集各组细胞,采用不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化,离心(3000 r/min, 5 min),用冷 PBS 洗涤,以每毫升 1×10^5 个接种于 6 孔板,采用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒染色,上机流式细胞仪检测细胞凋亡,严格按照试剂盒说明操作。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学分析,符合正态分布的计量资料均以平均数 $\pm$ 标准差

($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用 t 检验分析,三组间差异采用单因素方差分析,采用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线,以 9 周内的总生存状态作为观察终点,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIFU 对各组大鼠生存时间的影响

生存分析结果显示,模型组大鼠于造模后 43 d 开始出现死亡,HIFU 组大鼠于造模后 46 d 开始出现死亡;与模型组相比,HIFU 组的中位生存时间明显延长[(54.51 $\pm$ 3.16) vs (48.03 $\pm$ 1.05)],Log Rank $\chi^2 = 7.504$, $P = 0.006$],见图 1。

2.2 HIFU 对各组大鼠体重的影响

造模前各组大鼠的体重均无明显差异($P > 0.05$);与对照组相比,模型组和 HIFU 组大鼠造模 3 周、5 周和 7 周时大鼠体重均明显下降($P < 0.05$);与模型组相比,HIFU 组大鼠造模 3 周、5 周和 7 周时大鼠体重均明显升高($P < 0.05$),见表 1。

2.3 HIFU 对各组大鼠移植瘤体积和重量的影响

与模型组相比,HIFU 组的肿瘤体积和重量明显降低($P < 0.05$),HIFU 的抑瘤率为 35.25%,见表 2。

2.4 各组大鼠移植瘤组织的病理变化

HE 染色结果显示,模型组大鼠移植瘤组织细胞呈椭圆形,胞核呈两个或多个,结构和细胞形态未见异常;HIFU 组大鼠移植瘤组织细胞皱缩、核染色质固缩,出现片状坏死区,见图 2。

2.5 HIFU 对各组大鼠脾淋巴细胞活力的影响

MTT 实验结果显示,与对照组相比,模型组和 HIFU 组脾淋巴细胞活力明显下降($P < 0.05$);与模

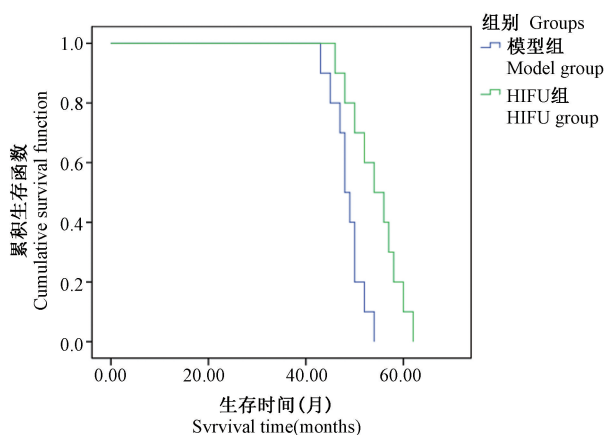


图 1 各组大鼠的生存曲线比较

Figure 1 Comparison of survival curves of rats in each group

型组相比, HIFU 组脾淋巴细胞活力明显升高 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.6 HIFU 对各组大鼠外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞水平的影响

流式细胞分析结果显示, 与对照组相比, 模型组和 HIFU 组外周血 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值均明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组相比, HIFU 组外周血 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细

胞和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值均明显升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.7 HIFU 对各组大鼠外周血中 T 淋巴细胞凋亡的影响

流式细胞分析结果显示, 与对照组相比, 模型组和 HIFU 组 T 淋巴细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, HIFU 组 T 淋巴细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$), 见图 4、表 4。

表 1 HIFU 对各组大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 1 Effect of HIFU on body weight of rats in each group

组别 Groups	造模前 Before modeling	造模 1 周 Modeling for 1 week	造模 3 周 Modeling for 3 week	造模 5 周 Modeling for 5 week	造模 7 周 Modeling for 7 week
对照组 Control group	214.74±9.25	231.64±7.69	245.62±7.83	259.72±7.85	274.38±8.21
模型组 Model group	215.03±7.81	218.03±8.25 [*]	206.73±7.96 [*]	182.83±7.73 [*]	168.59±7.36 [*]
HIFU 组 HIFU group	213.94±8.25	224.51±8.46 [#]	215.92±8.44 ^{*#}	204.54±8.61 ^{*#}	187.92±7.95 ^{*#}
<i>F</i>	0.045	6.994	63.340	241.122	515.232
<i>P</i>	0.956	0.006	<0.001	<0.001	<0.001

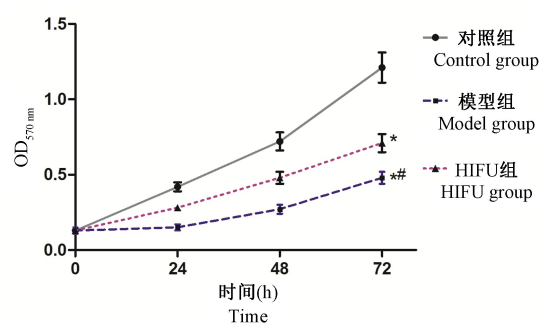
注: 与对照组相比, $^*P < 0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, $^*P < 0.05$. Compared with model group, $^{\#}P < 0.05$.

表 2 各组大鼠移植瘤的体积和重量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Volume and weight of transplanted tumor in each group

组别 Groups	肿瘤体积 (mm ³) Tumor volume	肿瘤重量 (g) Tumor mass
对照组 Control group	—	—
模型组 Model group	243.67±32.87	7.32±1.16
HIFU 组 HIFU group	174.58±21.69	4.74±0.73
<i>t</i>	5.548	5.953
<i>P</i>	<0.001	<0.001



注: 与对照组相比, $^*P < 0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 3 HIFU 对各组大鼠脾淋巴细胞活力的影响

Note. Compared with control group, $^*P < 0.05$. Compared with model group, $^{\#}P < 0.05$.

Figure 3 Effect of HIFU on spleen lymphocyte activity in each group

表 3 各组大鼠外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Levels of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood of rats in each group

组别 Groups	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组 Control group	58.18±6.52	27.65±3.26	2.10±0.20
模型组 Model group	30.29±3.84 [*]	19.57±2.43 [*]	1.55±0.13 [*]
HIFU 组 HIFU group	43.26±5.57 ^{*#}	23.76±2.78 ^{*#}	1.82±0.17 ^{*#}
<i>F</i>	66.191	20.192	24.663
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组相比, $^*P < 0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, $^*P < 0.05$. Compared with model group, $^{\#}P < 0.05$.

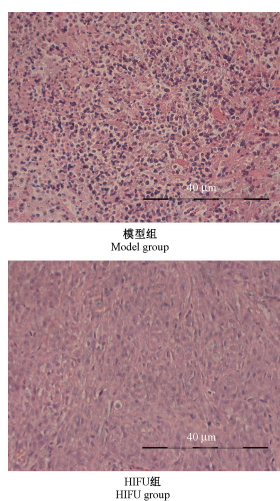


图 2 各组大鼠移植瘤组织的病理变化 (HE 染色)

Figure 2 Pathological changes of transplanted tumor tissues in each group of rats (HE staining)

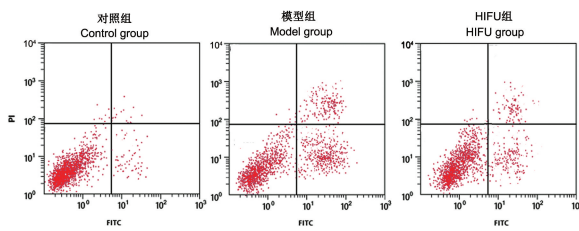


图 4 HIFU 对各组大鼠外周血中 T 淋巴细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of HIFU on T lymphocyte apoptosis in peripheral blood of rats in each group

表 4 HIFU 对各组大鼠外周血中 T 淋巴细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of HIFU on apoptosis of T lymphocytes in peripheral blood of rats in each group

组别 Groups	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate
对照组 Control group	8.26 ± 1.14
模型组 Model group	21.75 ± 4.15 *
HIFU 组 HIFU group	16.29 ± 3.24 * #
F	47.601
P	< 0.001

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

3 讨论

宫颈癌是常见的女性三大恶性肿瘤之一,临床主要采用外科手术联合放化疗,预后较差^[7]。HIFU 是一种新型的非侵入性治疗手段,可以将超声波进行聚焦后,安全地将能量密度较低的超声波汇聚至靶区,利用焦点处超声波的热效应,使靶区组织细胞发生不可逆的损伤,达到抗肿瘤的作用^[8]。目前, HIFU 已被用于前列腺癌、乳腺癌、软组织肿瘤以及子宫肌瘤等多种疾病的治疗^[9],但对宫颈癌的作用研究报道较少。因此,本研究分析了 HIFU 对宫颈癌大鼠生存时间的影响。本研究中, HIFU 作用后可明显延长宫颈癌大鼠的生存时间,提示 HIFU 可能通过抗肿瘤作用,延长大鼠的生存时间。许涛等^[10]的研究显示, HIFU 可用于晚期宫颈癌患者的治疗,减少局部复发,提示 HIFU 对宫颈癌具有的一定的抗肿瘤作用,有望应用于临床。本研究中, HIFU 作用后可明显改善宫颈癌大鼠的体重,诱导肿

瘤组织坏死,减少移植瘤体积和重量。Hectors 等^[11]的研究显示, HIFU 可以将超声波能量汇聚于肿瘤组织,通过热效应,使肿瘤细胞发生凝固性坏死,提示 HIFU 可能通过破坏宫颈癌肿瘤细胞,诱导肿瘤细胞坏死,发挥其抗肿瘤作用,延长大鼠的生存时间。

细胞免疫是机体抗肿瘤的主要机制,肿瘤细胞可通过改变细胞表面抗原、降低或不表达组织相容性抗原 I (major histocompatibility complex, MHC- I) 和 MHC- II、分泌多种免疫抑制因子等多种途径,发生免疫逃避或免疫抑制,发生恶性增殖^[12]。本研究中,宫颈癌大鼠的脾淋巴细胞活力明显下降, HIFU 作用后可明显提高大鼠的脾淋巴细胞活力。脾是机体最大免疫系统中的最主要的免疫器官之一,含有大量淋巴细胞和巨噬细胞,可以清除血细胞抗原和异物,是机体免疫系统的中心,脾淋巴细胞增殖活性可以反应机体淋巴细胞的功能^[13]。许涛等^[14]的研究显示, HIFU 可以改善原发性肝癌的免疫功能,延长患者的生存时间,提示 HIFU 可能通过诱导肿瘤细胞坏死,抑制肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子,提高脾淋巴细胞活力,提高机体的细胞免疫功能和抗肿瘤能力,从而延长宫颈癌大鼠的生存时间。

本研究中,宫颈癌大鼠的外周血 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值均明显下降, HIFU 作用后可明显提高大鼠外周血。T 淋巴细胞亚群是机体抗肿瘤免疫的主要免疫细胞,按功能可分为辅助 T 细胞 (T helper cells, Th)、记忆 T 细胞、细胞毒性 T 细胞 (Cytotoxic T cells, Tc)、调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 和抑制性 T 细胞 (suppressor T cell, Ts)^[15]。CD4⁺T 细胞主要为 Th 细胞, CD4 分子主要与 MHC- II 分子相结合, CD8 分布于 Tc 细胞及 Ts 细胞表面,可以与 MHC- I 分子结合,共同调节细胞的免疫功能^[16]。Th 细胞可以分泌多种细胞因子,促进其他 T 细胞的分化成熟,在协助诱导细胞免疫中具有重要作用,还可以辅助 B 细胞分化为抗体分泌细胞,协助 B 细胞产生抗体, Tc 细胞主要通过分泌各种细胞因子参与免疫作用,清除病毒、肿瘤等靶细胞, Ts 细胞则能抑制 Th 细胞,负向调节细胞的免疫功能^[17-18]。已有研究显示^[19], CD4⁺T/CD8⁺T 细胞比值可反映机体的整体免疫功能,提示 HIFU 作用后,可明显改善宫颈癌大鼠降低的免疫功能。本研究中,宫颈癌大鼠的外周

血 T 淋巴细胞凋亡率明显升高, HIFU 作用后可明显降低 T 淋巴细胞凋亡率。已有研究显示^[20], 肿瘤细胞可通过诱导 T 淋巴细胞凋亡, 发生免疫逃避或免疫抑制, 进行恶性增殖, 提示 HIFU 作用可能通过破坏宫颈癌肿瘤细胞, 抑制肿瘤细胞诱导的 T 淋巴细胞凋亡, 改善机体的免疫功能, 抑制肿瘤细胞的免疫逃避或免疫抑制, 提高其抗肿瘤作用。

综上所述, HIFU 可以明显升高大鼠的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 的数量以及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值, 提高脾淋巴细胞活力, 改善大鼠降低的免疫功能, 延长宫颈癌大鼠的生存时间, 但 HIFU 调节机体免疫功能的具体机制尚不明确, 需进一步深入研究探索。

参考文献:

- [1] Cui RR, Chen L, Tergas A, et al. Trends in use and survival associated with fertility-sparing trachelectomy for young women with early-stage cervical cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 2018, 131(6): 1085-1094.
- [2] Marinova M, Huxold H, Henseler J, et al. Clinical effectiveness and potential survival benefit of us-guided high-intensity focused ultrasound therapy in patients with advanced-stage pancreatic cancer [J]. *Ultraschall Med*, 2019, 40(5): 625-637.
- [3] 朱衍菲, 赵洪, 张宇, 等. 高强度聚焦超声治疗晚期胰腺癌: 疗效及预后相关因素分析 [J]. *肿瘤*, 2016, 36(4): 430-435.
- [4] 金琳, 王迎春, 封岚, 等. 超微血流成像技术评估高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤疗效的应用价值 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2018, 27(4): 334-337.
- [5] 武佳薇, 张新玲, 尹庭辉, 等. 高强度聚焦超声联合液态氟碳纳米颗粒消融治疗宫颈癌移植瘤的实验研究 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2016, 25(3): 248-251.
- [6] 崔开颖, 赵素芬, 朱根海. 姜黄素对宫颈癌大鼠的影响及作用机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(11): 1142-1145.
- [7] Hu G, Zhang J, Xu F, et al. SLP-2 inhibits cisplatin-induced apoptosis through MEK/ERK signaling and mitochondrial apoptosis pathway in cervical cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1357-1368.
- [8] Peek MC, Ahmed M, Scudder J, et al. High intensity focused ultrasound in the treatment of breast fibroadenomata: Results of the HIFU-F feasibility trial [J]. *Int J Hyperthermia*, 2016, 32(8): 881-888.
- [9] Federau C, Goubran M, Rosenberg J, et al. Transcranial MRI-guided high-intensity focused ultrasound for treatment of essential tremor: A pilot study on the correlation between lesion size, lesion location, thermal dose, and clinical outcome: Transcranial MRgFUS [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2018, 48(1): 58-65.
- [10] 许涛, 景红霞, 李林均, 等. 介入栓塞化疗联合 HIFU 治疗晚期宫颈癌同步放化疗后局部复发的疗效观察 [J]. *现代妇产科进展*, 2016, 25(2): 116-119.
- [11] Hectors S, Jacobs I, Moonen C, et al. MRI methods for the evaluation of high intensity focused ultrasound tumor treatment: Current status and future needs [J]. *Magn Reson Med*, 2016, 75(1): 302-317.
- [12] Gruber IV, Hartkopf AD, Hahn M, et al. Relationship between hematogenous tumor cell dissemination and cellular immunity in dcis patients [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(5): 2345-2351.
- [13] Lindemann DM, Carpenter JW, Almes KM, et al. Solitary T-cell hepatic lymphoma with large granular lymphocyte morphology in a captive cheetah (*Acinonyx jubatus*) [J]. *J Zoo Wildl Med*, 2015, 46(2): 400-404.
- [14] 许涛, 景红霞, 李林均, 等. TACE、IMRT、HIFU 联合 DC-CIK 治疗局部晚期原发性肝癌的效果 [J]. *广东医学*, 2016, 37(12): 1846-1849.
- [15] Deng CY, Wang XF, Qi H, et al. Effects of Anti-CD45RB monoclonal antibody for T lymphocyte subsets in mice heart transplantation model [J]. *Scand J Immunol*, 2016, 84(2): 86-94.
- [16] Capetti A, Orofino G, Paladini L, et al. Does simplification to dolutegravir-based dual regimens impact on the CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio [J]. *AIDS*, 2018, 32(8): 1083-1084.
- [17] Pedrotti LP, Barrios BE, Maccio-Maretto L, et al. Systemic IL-12 burst expands intestinal T lymphocyte subsets bearing the $\alpha 4 \beta 7$ integrin in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(1): 70-80.
- [18] Chen LY, Tsang JY, Ni YB, et al. Lymphocyte subsets contribute to the degree of lobulitis and ductitis in sclerosing lymphocytic lobulitis of the breast [J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(6): 527-532.
- [19] Overgaard N, Jung J, Steptoe R, et al. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(1): 31-38.
- [20] Ng S, Deng J, Chinnadurai R, et al. Stimulation of natural killer cell-mediated tumor immunity by an IL15/TGF- β -neutralizing fusion protein [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(19): 5683-5695.

[收稿日期] 2020-04-17