

· 基础研究 ·

左旋棉酚联合低浓度阿霉素诱导纤维肉瘤细胞凋亡及其机制

张昭军¹, 周 洋¹, 阿尔孜古丽·吐尔逊², 锡林宝勒日^{1△}, 刘朝政¹, 张顺利¹

(1. 新疆医科大学附属肿瘤医院骨与软组织科, 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆医科大学第一附属医院医学研究中心, 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 研究左旋棉酚联合低浓度阿霉素(ADM)诱导纤维肉瘤 HT1080 细胞凋亡及其作用机制。方法 采用噻唑蓝(MTT)检测药物对细胞的抗增殖作用,应用瑞氏-姬姆萨(WG)染色、赫斯特 33258(hoechst 33258)染色、透射电镜观察细胞的形态学变化,流式细胞仪检测细胞的凋亡率和细胞周期。蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达,比色分析法检测细胞半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-3、caspase-9 的活性变化。结果 左旋棉酚与低浓度 ADM 对 HT1080 细胞具有抑制增殖作用,联合应用作用增强,有浓度与时间依赖性。药物作用后出现细胞凋亡的特征性改变,琼脂糖凝胶电泳观察到梯状带型,流式细胞仪检测发现两药能诱导肿瘤细胞凋亡,联合应用更强。左旋棉酚使细胞阻滞于 G₁ 期,ADM 使细胞阻滞于 S 期,联合应用 S 期的细胞明显增加。细胞内 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增多,同时出现 caspase-9、caspase-3 的相继活化,联合应用变化更加明显。结论 左旋棉酚与低浓度 ADM 对纤维肉瘤 HT1080 细胞有明显抑制增殖及诱导凋亡的作用,联合应用作用加强。

关键词:左旋棉酚;阿霉素;HT1080;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)20-2372-04

Apoptosis induced by levo-gossypol combined with low concentration adriamycin in HT1080 cells and its mechanism

Zhang Zhaojun¹, Zhou Yang¹, Aertzguli², Xilinbaoleri^{1△}, Liu Chaozheng¹, Zhang Shunli¹

(1. Department of Bone and Soft Tissue Tumor, Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China;

2. Medical Research Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To investigate apoptosis induced by levo-gossypol combined with low concentration adriamycin in HT1080 cells and its mechanisms. **Methods** The anti-proliferation of drugs on cells was detected by MTT assay. The changes of cells morphology were observed by Wright-Giemsa staining, Hoechst 33258 staining and transmission electron microscopy. The apoptosis rate and cell cycle were detected by flow cytometry. And the protein expression of Bcl-2 and Bax in HT1080 cell were detected by Western-Blot. The changes of caspase-3 and caspase-9 were detected by colorimetric assay. **Results** Levo-gossypol and low concentration adriamycin showed inhibition of HT1080 cells in a dose and time dependent. The combination had more obvious effect. Levo-gossypol and low concentration adriamycin induced apoptosis of HT1080 cell, as evidenced by typical morphological changes. Flow cytometry detected that the drugs induced apoptosis of HT1080 cell. The combination had more obvious apoptosis-inducing effect. Levo-gossypol could induce G₁ arrest and adriamycin could induce S arrest. The combination had more obvious increase of S arrest. Levo-gossypol and low concentration adriamycin can result in decrease of Bcl-2 protein, increase of Bax protein, and activation of caspase-9 and caspase-3. The combination had more obvious changes. **Conclusion** Levo-gossypol and low concentration adriamycin have the effect of anti-proliferation and induction of apoptosis in HT1080 cell. The combination has more obvious effect.

Key words: levo-gossypol; adriamycin; HT1080; cell apoptosis

阿霉素(adriamycin, ADM)是治疗纤维肉瘤的标准一线化疗药物,但其有效率仅为 20%~30%^[1]。恶心、呕吐、脱发、高热、静脉炎以及骨髓抑制等不良反应比较常见,尤其是与所用总剂量相关的心脏毒性,严重影响了它的临床应用。棉酚是一种黄色多酚羟基双萜类化合物,左旋棉酚是它的主要活性成分。有研究表明,棉酚在多种肿瘤细胞的体外实验中具有明显的抑制增殖和诱导凋亡作用,并具有来源丰富、成本低、临床应用安全性高、毒性小等优势,还可与化疗、放疗等发挥协同作用^[2-6]。本研究将左旋棉酚与低浓度 ADM 联合作用于人纤维肉瘤 HT1080 细胞,观察对人纤维肉瘤细胞的生长的影响,为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料 人纤维肉瘤 HT1080 细胞购于中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心,干粉型 DMEM 培养基、胎牛血

清(fetal bovine serum, FBS)购于美国 Gibco BRL 公司,噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)购于美国 Amresco 公司,赫斯特 33258(hoechst 33258)、碘化丙啶(PI)、RNA 酶购于美国 Sigma 公司, FITC Annexin V apoptosis detection Kit I 购于美国 BD 公司,鼠抗人的 Bcl-2 抗体、鼠抗人的 Bax 抗体购于美国 Santa Cruz 公司, caspase-3 Colorimetric Assay Kit、caspase-9 Colorimetric Assay Kit 购于美国 R&D 公司, ADM 标准品购于加拿大 BBI 公司。左旋棉酚由新疆石河子大学药学院唐辉教授惠赠,以 DMSO 助溶。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 细胞培养于含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基内,在 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱常规培养。实验分为 4 组:对照组(未经任何处理的细胞)、ADM 组(ADM 0.08 μmol/L)、左旋棉酚组

(左旋棉酚 8 $\mu\text{mol/L}$)和联合组(ADM 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 联合左旋棉酚 8 $\mu\text{mol/L}$)。各实验均选用对数生长期细胞。

1.2.2 MTT 法测定药物敏感性 选取对数生长期细胞,调整细胞浓度后接种于 96 孔板,细胞贴壁后加入不同浓度药物的工作液 200 μL ,每组 4 个复孔,另设置空白孔。检测 4 h 前加入 20 μL (5 mg/mL)MTT,温育 4 h 后去上清液,每孔加入 150 μL DMSO 后振荡 10 min,测定的波长为 490 nm。测量 24、48、72、96 h 的酶标值,计算抑制率。抑制率=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.3 细胞形态学 瑞氏-姬姆萨(wright-giemsa, WG)染色:药物处理 24 h 后的细胞加入 WG 染液染色,普通光学显微镜观察并拍照;赫斯特(hoechst 33258)染色:药物处理 24 h 后的细胞 4% 甲醛固定,hoecbst 33258 室温染色后荧光显微镜观察并照片;透射电镜:收集药物处理 24 h 后的细胞各 1×10^6 个,1 mL FBS 重悬,常规制备电镜超薄切片,透射电镜观察超微结构并照片。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率 收集对照组和药物处理 24 h 后的 ADM 组、左旋棉酚组和联合组细胞各 1×10^6 个。加入 1 mL 结合缓冲液重悬,取 100 μL 溶液到细胞培养管,分别加入 5 μL 细胞凋亡检测试剂 FITC Annexin V 和 5 μL PI,另设空白对照孔、FITC 孔和 PI 孔。轻轻地混匀后室温避光孵育 15 min,加入 400 μL 结合缓冲液到细胞培养管,流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期的改变 收集对照组和药物处理 24、48 h 后的 ADM 组、左旋棉酚组和联合组细胞各 1×10^6 个,70% 冷乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h 以上。检测前离心后去乙醇,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后加入浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ RNA 酶 400 μL ,混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,再加入浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ PI 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,流式细胞仪测定细胞周期。系统软件计算 G_1 、 S 、 G_2 各期细胞的分布百分比。实验重复 3 次。

1.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达 将对照组和药物处理 24 h 后的 ADM 组、左旋棉酚组和联合组细胞的蛋白 100 μg 进行多聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白条带转移至聚二氟乙烯(PVDF)膜,脱脂奶粉封闭后一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内孵育 2 h;DAB 显影液显影,晾干后扫描。用 Q μ antity One 图像分析软件对条带进行分析,得到面积灰度值,以目的蛋白条带灰度值/内参(β -actin)灰度值作为目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.7 caspase-3、caspase-9 活性分析 收集对照组和药物作用 0、6、12、18、24 h 后的 ADM 组、左旋棉酚组和联合组细胞各 2×10^6 个,参照 caspase-3、caspase-9 比色分析试剂盒(R&D)说明书进行操作。设置操作同前的未加细胞的孔设为空白孔,酶标仪测定波长为 405 nm。将对照组的 caspase-3、caspase-9 的活

性定为 1,各组测定的吸光度(OD)值相对于对照组 OD 值的倍数表示其他各组的 caspase-3 活性。计算公式为 caspase-3、caspase-9 活性 = (OD405Sample - OD405Blank) / (OD405control - OD405Blank)。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 分析结果 ADM 组与左旋棉酚组对纤维肉瘤 HT1080 细胞的抑制增殖作用随着时间的延长而呈明显的上升趋势,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合组的抑制作用也随着时间的延长呈明显的上升趋势,与 ADM 组、左旋棉酚组和对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组药物对 HT1080 细胞的抑制率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

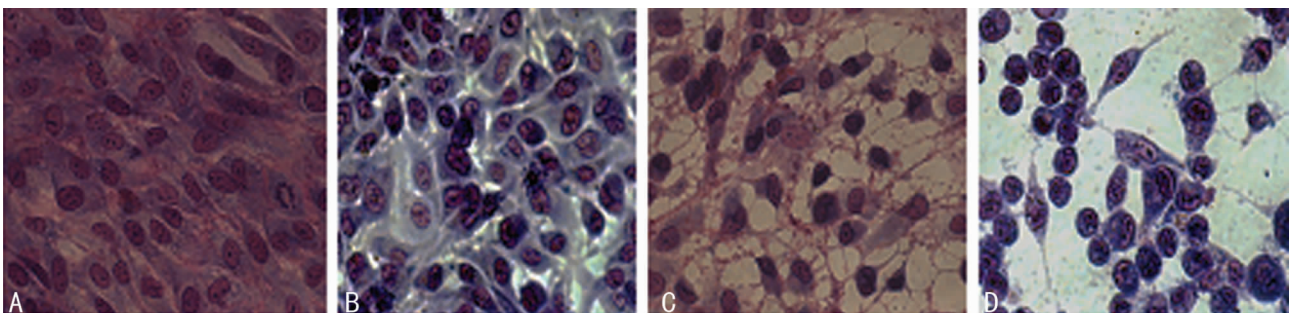
组别	抑制率(%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0	0	0	0
ADM 组	14.17 \pm 1.98*	18.06 \pm 1.24*	34.68 \pm 4.01*	50.26 \pm 5.38*
左旋棉酚组	17.26 \pm 4.02*	26.23 \pm 7.49*	41.32 \pm 2.17*	62.87 \pm 8.30*
联合组	28.33 \pm 5.33#	44.94 \pm 8.01#	64.57 \pm 3.36#	82.03 \pm 5.45#

*: $P < 0.01$, 与对照组比较; #: $P < 0.01$, 与 ADM 组、左旋棉酚组和对照组比较。

2.2 倒置相差显微镜观察细胞形态结果 对照组细胞排列致密,细胞体积较大,多呈梭形,细胞核位于中央,多为圆形、椭圆形或肾形。细胞内可见到核仁,多数为两个。细胞质比较丰富,多呈淡蓝色。药物作用 24 h 后,均可见到细胞数减少,部分细胞皱缩、变小,多为不规则形。细胞核浓缩、破裂,部分细胞核的碎片向胞外突起,形成膜包被的凋亡小体。这些变化在联合组中尤其明显,见图 1。

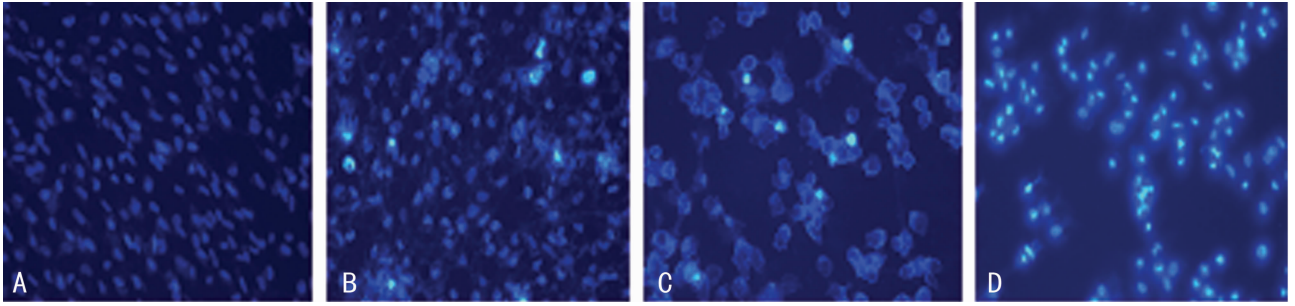
2.3 hoechst 33258 染色观察细胞凋亡结果 对照组细胞核呈弥散均匀的微弱蓝色荧光,药物作用 24 h 后,在细胞的细胞核或细胞质中出现浓染致密的颗粒状强蓝色荧光。细胞体积缩小,染色质固缩、边集,细胞质内可见强蓝色碎片,细胞膜形成泡状突起,凋亡小体形成,联合组明显增加,见图 2。

2.4 透射电镜观察各组细胞凋亡结果 对照组细胞呈椭圆形,表面有大量微绒毛,细胞核核仁明显,核内染色质的分布不均,胞浆内线粒体比较多见。药物作用 24 h 后,细胞出现凋亡特征性的形态学变化,主要表现为凋亡细胞表面的微绒毛大多消失,核内的染色质固缩、边集,早期常呈新月形,但大多数细胞器基本保持完整,晚期细胞肿胀、甚至破裂,细胞核浓缩、碎裂,细胞质内出现大量的空泡,最终有凋亡小体的形成,见图 3。



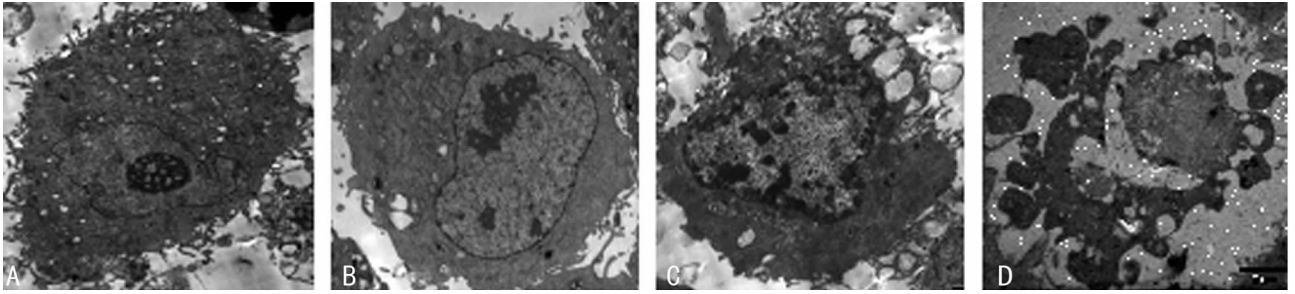
A: 对照组; B: 阿霉素组; C: 左旋棉酚组; D: 联合组。

图 1 4 组 HT1080 细胞 24 h 后肿瘤细胞凋亡情况(WG 染色, $\times 200$)



A: 对照组; B: ADM 组; C: 左旋棉酚组; D: 联合组。

图 2 hoechst 33258 染色观察各组肿瘤细胞凋亡情况比较($\times 200$)



A: 对照组; B: ADM 组; C: 左旋棉酚组; D: 联合组。

图 3 透射电镜下各组肿瘤细胞凋亡情况比较($\times 6\ 000$)

2.5 药物对 HT-1080 细胞凋亡和细胞周期的影响 药物作用细胞 24 h 后, ADM 组和左旋棉酚组的早期凋亡率与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合组与其他 3 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。作用 48 h 后, 左旋棉酚组出现了 G_1 期细胞的增多, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。ADM 组 S 期细胞增多, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合组 S 期细胞的明显增多, 与其他 3 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 药物作用 48 h 后对人纤维肉瘤 HT1080 细胞周期和细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	G_1	G_2	S	凋亡率(%)
对照组	67.72 \pm 1.99	7.93 \pm 0.35	23.7 \pm 1.28	3.15 \pm 0.15
ADM 组	63.01 \pm 1.27	8.52 \pm 1.53	27.58 \pm 1.88*	22.10 \pm 2.23*
左旋棉酚组	73.16 \pm 2.89*	7.97 \pm 1.34	17.63 \pm 2.08	24.10 \pm 2.2*
联合组	30.51 \pm 2.43	8.11 \pm 1.03	60.20 \pm 1.57#	40.30 \pm 2.61#

*: $P < 0.01$, 与对照组比较; #: $P < 0.01$, 与其他 3 组比较。

2.6 药物作用 HT1080 细胞后 Bcl-2、Bax 蛋白的相对表达量的改变 Western blotting 检测药物作用于 HT1080 细胞作用 24 h 后 Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达量的变化。与对照组(80.08 \pm 4.5)比较, 左旋棉酚组(56.34 \pm 2.32)和 ADM 组(61.78 \pm 1.46) Bcl-2 蛋白的表达减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合组(30.75 \pm 2.49)与其他 3 组比较, Bcl-2 蛋白的表达明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与对照组(7.99 \pm 0.31)比较, 左旋棉酚组(22.66 \pm 2.55)和 ADM 组(16.17 \pm 1.4)的 Bax 蛋白的表达增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。联合组(31.92 \pm 3.66)与其他 3 组比较, Bax 蛋白的表达明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.7 4 组 caspase-3、caspase-9 在不同时间段的活性分析 ADM 组、左旋棉酚组和联合组均能导致 HT1080 细胞内 caspase-9、caspase-3 的活化, 与 0 h 比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。caspase-9 活性最高点出现在加药后 6 h, 加药

12 h 后活性下降。caspase-3 活性最高点出现在加药后 12 h, 加药 18 h 后活性下降。与对照组比较, ADM 组与左旋棉酚组的 caspase-9、caspase-3 的活性升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 联合组明显高于其他 3 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4。

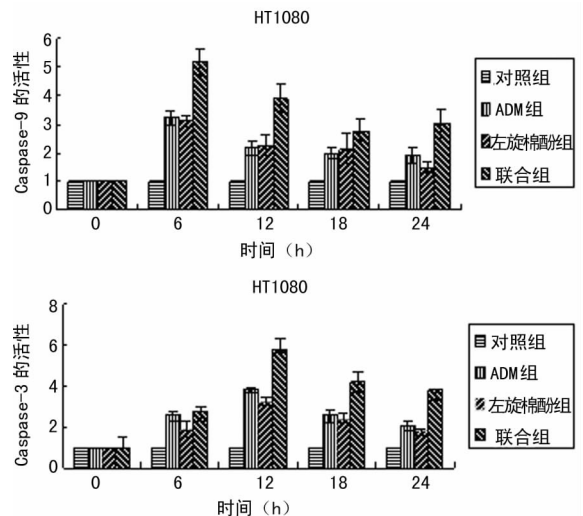


图 4 各组肿瘤细胞 caspase-9、caspase-3 在不同时间段活性的变化

3 讨论

MTT 法证实, 左旋棉酚联合低浓度 ADM 对 HT1080 细胞的抑制增殖和诱导凋亡作用均较单药组明显增强。WG 染色、hoechst 33258 染色, 透射电镜观察到细胞典型的形态学变化, 流式细胞仪检测发现左旋棉酚联合低浓度 ADM 时肿瘤细胞的凋亡率较单药时明显增加。

诱导肿瘤细胞凋亡是近年来肿瘤治疗方面研究的热点, 大量研究资料表明, 凋亡基因的抑制和抑癌基因的激活是导致肿瘤发生的主要原因^[7-8]。Bcl-2 是主要的抗凋亡基因, 可以抑制多种途径的凋亡, Bax 是重要的促凋亡基因, 是 Bcl-2 的拮抗基

因,二者均通过编码相应功能蛋白而起作用^[9]。Bax 的高表达、Bcl-2 的低表达等作用于线粒体,导致线粒体膜通透性转运孔开放,外膜破坏引起线粒体膜通透性增加,细胞色素 C、Smac 等凋亡相关分子大量释放到细胞质,可以活化 caspase-9,再使下游的 caspase-3 激活,最终激活 caspase-3 引起细胞凋亡^[10-11]。在凋亡的过程中,Bcl-2 蛋白的表达下降,而 Bax 蛋白的表达上升,并出现了 caspase-9 和 caspase-3 的相继活化,两药联合应用较单药变化更加明显。

细胞周期分析结果显示,左旋棉酚使肿瘤细胞阻滞于 G₁ 期,这提示可以联合周期特异性抗肿瘤药物提高化疗的敏感性。低浓度 ADM 使细胞阻滞于 S 期,联合组阻滞于 S 期的细胞明显增加,可能是通过调节多药耐药基因的表达,使 P-糖蛋白水平降低,增加了肿瘤细胞内 ADM 的浓度,因此左旋棉酚可以提高肿瘤细胞对化疗药的敏感性。

本研究证实,左旋棉酚与低浓度 ADM 对纤维肉瘤 HT1080 细胞有明显抑制增殖和诱导凋亡作用,联合应用作用明显增加,其机制可能与下调 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达及影响细胞周期有关。低浓度 ADM 可以减少不良反应的发生,联合具有抗肿瘤活性的左旋棉酚,同样具有明显的诱导凋亡效果。本实验为左旋棉酚临床治疗的研究奠定实验基础,与低浓度 ADM 的联合应用找到一种治疗纤维肉瘤的新方法,有待于进一步地研究。

参考文献:

[1] Scurr M, Judson I. Neoadjuvant and adjuvant therapy for extremity soft tissue sarcomas[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2005, 19(3): 489-500.

[2] Seidel C, Bartel F, Rastetter M, et al. Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas; hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma[J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(3): 442-447.

(上接第 2371 页)

for adenomyosis; the clinical experience of a single center[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(7): 900-905.

[2] Wang W, Wang Y, Tang J, et al. Safety and efficacy of high intensity focused ultrasound ablation therapy for adenomyosis[J]. *Acad Radiol*, 2009, 16(11): 1416-1423.

[3] Yang Z, Cao YD, Hu LN, et al. Feasibility of laparoscopic high-intensity focused ultrasound treatment for patients with uterine localized adenomyosis[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(16): 2338-2340.

[4] 王丽萍, 翁亚娟, 王亚金. 高强度聚焦超声在子宫腺肌症治疗中的价值[J]. *陕西医学杂志*, 2012, 41(10): 1318-1319.

[5] Fan TY, Zhang L, Chen W. Feasibility of MRI-guided high intensity focused ultrasound treatment for adenomyosis[J]. *Eur J Radiol*, 2012, 81(11): 3624-3630.

[6] 周永昌, 郭万学. 超声医学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 1026-1027.

[7] Orsini L, Salardi S, Pilu G, et al. Cacciari E. Pelvic organs in premenarcheal girls; real-time ultrasonography[J]. *Radiology*, 1984, 153(1): 113-116.

[3] van de Rijn M, Fletcher JA. Genetics of soft tissue tumors[J]. *Annu Rev Pathol*, 2006, 1: 435-466.

[4] Maki RG. Gemcitabine and docetaxel in metastatic sarcoma: past, present, and future[J]. *Oncologist*, 2007, 12(8): 999-1006.

[5] D'Adamo DR, Anderson SE, Albritton K, et al. Phase II study of doxorubicin and bevacizumab for patients with metastatic soft tissue sarcomas[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(28): 7135-7142.

[6] Tschoep K, Kohlmann A, Schlemmer M, et al. Gene expression profiling in sarcomas[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 63: 111-124.

[7] Suzuki O, Abe M. Cell surface N-glycosylation and sialylation regulate Galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(3): 743.

[8] Takai N, Ueda T, Nishida M, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human choriocarcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(1): 109-115.

[9] Banadyga L, Veugelers K, Campbell S, et al. The fowlpox virus BCL-2 homologue, FPV039, interacts with activated bax and a discrete subset of BH3-Only proteins to inhibit apoptosis[J]. *J Virol*, 2009, 83(14): 7085-7098.

[10] Bajt ML, Farhood A, Lemasters JJ, et al. Mitochondrial bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murine model of acetaminophen hepatotoxicity[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 324(1): 8-14.

[11] Tikhomirov O, Carpenter G. Bax activation and translocation to mitochondria mediate EGF induced programmed cell death[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt24): 5681-5690.

(收稿日期: 2013-01-17 修回日期: 2013-04-24)

[8] Stewart EA, Rabinovici J, Tempany CM, et al. Clinical outcomes of focused ultrasound surgery for the treatment of uterine fibroids[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(1): 22-29.

[9] 李发琪, 白晋, 王智彪, 等. HIFU 在牛肝组织中的传播衰减研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2003, 20(4): 675-678.

[10] 李发琪, 王智彪, 杜永洪, 等. 高强度聚焦超声“切除”组织的剂量学研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(4): 839-843.

[11] 王智彪, 李发琪, 冯若. 治疗超声原理与应用[M]. 南京: 南京大学出版社, 2008: 112-126.

[12] Chen L, Haar G, Hill CR. Influence of ablated tissue on the formation of high-intensity focused ultrasound lesions[J]. *Ultrasound Med Biol*, 1997, 23(6): 921-931.

[13] Kennedy JE. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 321-327.

[14] Goldberg SN, Grassi CJ, Cardella JF, et al. Image-guided tumor ablation; standardization of terminology and reporting criteria[J]. *Radiology*, 2005, 235(3): 728-739.

(收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-03-21)