

超声造影评估裸鼠食管癌移植瘤血管生成情况的实验研究

黄 浩 谢 斌 张玉敏 赵现伟 陈杰能

摘 要 **目的** 探讨超声造影(CEUS)对裸鼠食管癌移植瘤血管生成情况的评估价值。**方法** 选取 18 只裸鼠,于其背部皮下注射人食管癌细胞株建立食管癌移植瘤模型,分别于移植后 4、6、8 周均随机选取 6 只裸鼠,先应用二维超声观察移植瘤回声、形态和边界,再行 CEUS 检查并获取时间-强度曲线(TIC)。然后处死所有裸鼠,使用 HE 染色观察移植瘤细胞结构和组织形态,免疫组化观察移植瘤组织血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达和微血管密度(MVD),比较移植后不同时间移植瘤 CEUS 表现、TIC 定量参数及病理学检查结果的差异。Pearson 相关分析法分析 TIC 定量参数与 VEGF 蛋白表达、MVD 的相关性。**结果** 所有裸鼠食管癌移植瘤模型均成功建立,未出现死亡。移植后 4 周,移植瘤二维超声表现为类椭圆形低回声肿块,边界清晰,内部回声不均匀,CEUS 表现为移植瘤内部呈均匀增强;移植后 6 周,移植瘤二维超声表现为肿块边界欠清晰,内部回声不均匀,CEUS 表现为移植瘤内部呈不均匀高增强;移植后 8 周,移植瘤二维超声表现为肿块边界不清晰,内部回声不均匀,CEUS 表现为移植瘤内部出现灌注缺损。移植后 4、6、8 周移植瘤峰值强度(PI)、曲线下流入面积(AWI)及曲线下流出面积(AWO)比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与移植后 4 周比较,移植后 6、8 周移植瘤 PI、AWI 和 AWO 均升高(均 $P<0.05$);与移植后 6 周比较,移植后 8 周移植瘤 PI 和 AWO 均升高(均 $P<0.05$)。HE 染色显示,移植后 4 周移植瘤见角化珠且细胞间见细胞间桥;移植后 6 周移植瘤角化珠和细胞间桥均稍减少,毛细血管增多;移植后 8 周,移植瘤角化珠和细胞间桥均明显减少,毛细血管增多,可见病理性核裂变。免疫组化显示,移植后 4、6、8 周 MVD 和 VEGF 蛋白表达比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与移植后 4 周比较,移植后 6、8 周移植瘤 MVD 均升高,移植后 8 周移植瘤 VEGF 蛋白表达升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。相关性分析显示,移植瘤 PI、AWI、AWO 与 MVD、VEGF 蛋白表达均呈正相关(均 $P<0.001$)。**结论** CEUS 能够有效观察裸鼠食管癌移植瘤内部血流灌注情况,TIC 定量参数 PI、AWI、AWO 随着移植瘤的生长而逐渐升高,其与移植瘤 MVD、VEGF 蛋白表达均呈正相关,可以较好地评估移植瘤血管生成情况。

关键词 超声检查;造影剂;时间-强度曲线;食管癌;移植瘤;血管生成;裸鼠

[中图法分类号]R445.1;R735.1

[文献标识码]A

An experimental study on the evaluation of angiogenesis of transplanted tumor in nude mice with esophageal cancer by contrast-enhanced ultrasound

HUANG Hao, XIE Bin, ZHANG Yumin, ZHAO Xianwei, CHEN Jieneng

Department of Ultrasound Medicine, Huanggang Central Hospital, Hubei 438000, China

ABSTRACT **Objective** To explore the evaluation value of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) for angiogenesis of transplanted tumor in nude mice with esophageal cancer. **Methods** A total of 18 nude mice were selected and given subcutaneous injection of human esophageal cancer cell lines to construct models of transplanted tumor. At 4, 6 and 8 weeks after transplantation, 6 nude mice were randomly selected. The echo, morphology and boundary of transplanted tumor were observed by two-dimensional ultrasound, then CEUS was performed to obtain the time-intensity curve (TIC). All mice were killed at 4, 6 and 8 weeks after transplantation. The cell structure and tissue morphology of transplanted tumors were observed by HE staining, the vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression and microvascular density (MVD) were observed by immunohistochemistry. The differences in CEUS manifestations, TIC quantitative parameters expression and pathological results of transplanted tumors were compared at different time points after transplantation. The correlation between TIC quantitative parameters and VEGF

protein expression, MVD were analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** All models of nude mice with transplanted tumors were successfully prepared. At 4 weeks after transplantation, two-dimensional ultrasound showed that there were ellipsoid-like hypoechoic lumps with clear boundary and uneven internal echo, while CEUS showed that there was homogeneous enhancement in transplanted tumors. At 6 weeks after transplantation, two-dimensional ultrasound showed that there was unclear boundary of lumps and uneven internal echo, while CEUS showed that there was uneven and high enhancement of blood flow signals in transplanted tumors. At 8 weeks after transplantation, two-dimensional ultrasound showed that there was unclear boundary of lumps and uneven internal echo, while CEUS showed that there were defects of blood flow signal perfusion in transplanted tumors. There were significant difference in peak intensity (PI), area wash in (AWI) and area wash out (AWO) of transplanted tumors at 4, 6 and 8 weeks after transplantation (all $P < 0.05$). Compared with those at 4 weeks after transplantation, PI, AWI and AWO were increased at 6 and 8 weeks after transplantation (all $P < 0.05$). Compared with those at 6 weeks after transplantation, PI and AWO were increased at 8 weeks after transplantation (both $P < 0.05$). The results of HE staining showed that at 4 weeks after transplantation, there were keratin pearls in transplanted tumors and intercellular bridges in cells. At 6 weeks after transplantation, keratin pearls and intercellular bridges were slightly decreased, and capillaries were increased. At 8 weeks after transplantation, keratin pearls and intercellular bridges were significantly decreased, capillaries were increased and there was pathological nuclear fission. There were significant differences in MVD and VEGF protein expression at 4, 6 and 8 weeks after transplantation (all $P < 0.05$). Compared with those at 4 weeks after transplantation, MVD of transplanted tumors was increased at 6 and 8 weeks after transplantation, and VEGF protein expression was increased at 8 weeks after transplantation, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Correlation analysis showed that PI, AWI and AWO were positively correlated with VEGF protein expression and MVD (all $P < 0.001$). **Conclusion** CEUS can accurately observe the blood perfusion in transplanted tumors in nude mice. The TIC quantitative parameters PI, AWI and AWO gradually increase with the growth of the transplanted tumors, which are positively correlated with MVD and VEGF protein expression of transplanted tumors. It can effectively evaluate the angiogenesis of transplanted tumors in nude mice with esophageal cancer.

KEY WORDS Ultrasonography; Contrast agent; Time-intensity curve; Esophageal cancer, transplanted tumor; Angiogenesis; Nude mice

食管癌是原发于食管的恶性肿瘤,其典型症状为进行性吞咽困难、胸骨疼痛,好发于中老年男性群体,农村地区的发病率高于城市,且具有明显的地域差异,发病情况与生活习惯关系密切^[1]。食管癌主要根据患者个体情况、病理类型及侵犯范围来制定治疗方案,化疗联合抗血管生成治疗是目前临床常用的治疗方案。肿瘤细胞增殖、转移均受血管生成情况影响,若肿瘤内血管生成丰富,可为肿瘤生长提供所需营养^[2]。但目前评估肿瘤血管生成多依赖免疫组化,该方法检测周期较长,重复性较差。超声造影(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)是在二维超声的基础上注入造影剂,经血液循环将造影剂微气泡递送至靶器官,有助于清晰显示病灶血流分布和灌注情况,观察病灶与周围组织器官的关系,提高了超声对疾病的诊断和鉴别诊断能力^[3]。时间-强度曲线(time-intensity curve, TIC)定量参数已用于评估膀胱癌分期^[4]和前列腺增生患者前列腺动脉栓塞疗效^[5]。本实验通过建立裸鼠食管癌移植瘤模型,旨在探讨 CEUS 对裸鼠食管癌移植瘤血管生成情况的评估价值。

材料与方法

一、实验动物和细胞

6 周龄雌性裸鼠 18 只(购自华中科技大学动物实验中心),体质量 18~22 g,平均(20.0±1.0)g,于恒温(25~27℃)、恒湿(45%~50%)的清洁级半屏障系统环境下饲养,饲养期间水、饲料均行灭菌处理。人食管癌细胞株 Eca-109(上海酶研生物科技有限公司),细胞复苏后置于含有 10% 胎牛血清的细胞培养液中培养,培养环境为 37℃、5%CO₂ 的恒温细胞培养箱,待细胞生长至 90% 时进行细胞传代。

二、主要仪器与试剂

1. 主要仪器:Philips iU22 彩色多普勒超声诊断仪, L12-4 探头,频率 6~15 MHz;冷冻离心机(CR22N,德国 Eppendorf 公司);石蜡切片机(HM325,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);光学显微镜(DM3000,德国 Leica 公司)。

2. 主要试剂:血管内皮生长因子(VEGF,美国 Abbiotec 公司);细胞培养液、胎牛血清、山羊抗兔二抗、DAB 显色液(美国 Sigma 公司);Fac-Ⅷ抗体(上海化邦生物科技有限公司);HE 染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);免疫组化试剂盒(YDDEF001,上海羽喙生物科技有限公司);枸橼酸钠缓冲液(爱必信上海生物科技有限公司);超声造影剂 SonoVue(意大利 Bracco 公司),按说明书配制制成混悬液备用。

三、实验方法

1. 食管癌移植瘤模型建立: 培养人食管癌细胞株 Eca-109 生长至对数期时, 收集并制成细胞悬液, 调整浓度为 1×10^7 个/L, 参考 Guan 等^[6]方法制备裸鼠食管癌移植瘤, 对裸鼠右侧背部进行酒精消毒, 使用无菌注射器抽取 0.2 ml 食管癌细胞悬液皮下注射, 待移植瘤生长至直径约 0.5 cm 视为建模成功。

2. 超声检查及图像分析: 分别于移植后 4、6、8 周随机选取 6 只裸鼠, 先行二维超声检查, 观察移植瘤回声、形态和边界; 然后行 CEUS 检查, 于裸鼠尾静脉注射配制好的造影剂混悬液 (剂量 $2.5 \mu\text{l/g}$, 2~4 s 注射完成), 随即使用生理盐水冲管, 观察移植瘤血流灌注情况。使用 Qlab 6.0 定量分析软件对移植瘤 CEUS 图像进行 TIC 分析, 获取峰值强度 (PI)、达峰时间 (TTP)、平均通过时间 (MTT)、曲线下流入面积 (AWI)、曲线下流出面积 (AWO)。以上操作均由同一具有 5 年以上工作经验的超声医师完成, 所有参数均重复测量 3 次取平均值。

3. 病理学检查: ① HE 染色观察移植瘤细胞结构和组织形态。于移植后 4、6、8 周麻醉并处死裸鼠, 将移植瘤固定于 4% 多聚甲醛溶液, 进行脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋, 使用石蜡切片机对包埋蜡块进行切片 (厚度约 $4 \mu\text{m}$), 切片脱水、透明后封片, 于光学显微镜下观察移植瘤细胞结构和组织形态; ② 免疫组化观察移植瘤 VEGF 蛋白表达和 MVD。取移植瘤切片进行脱蜡、复水, 将其置于枸橼酸钠缓冲液 (pH 值 6.0) 中加热 5 min, 冷却后使用磷酸缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, 加入 VEGF、Fac-Ⅷ抗体 4°C 孵育过夜, 加入山羊抗兔二抗, 再于室温孵育 1 h, 加入 DAB 显色液室温显色, 苏木素复染 1 min, 脱水、透明后封片, 于光学显微镜下观察 VEGF、Fac-Ⅷ蛋白表达。计算肿瘤内微血管密度 (MVD), 以 Fac-Ⅷ蛋白表达免疫组化阳性染色评估 MVD, 使用 Weidender 计数标准计算移植瘤内着色微血管, 单个内皮细胞计为 1 个血管, 于光学显微镜 ($\times 200$) 下获取 5 个不重叠视

野中的血管计数, 取其均值作为单个视野下 MVD。

四、统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 SNK 法。采用 Pearson 相关性分析法分析 TIC 定量参数与移植瘤 VEGF 蛋白表达、MVD 的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

所有裸鼠食管癌移植瘤模型均成功建立, 未出现死亡。

一、二维超声检查结果

移植后 4 周, 移植瘤表现为类椭圆形低回声肿块, 边界清晰, 内部回声不均匀; 移植后 6 周, 移植瘤表现为肿块边界欠清晰, 内部回声不均匀; 移植后 8 周, 移植瘤表现为肿块边界不清晰, 内部回声不均匀。见图 1。

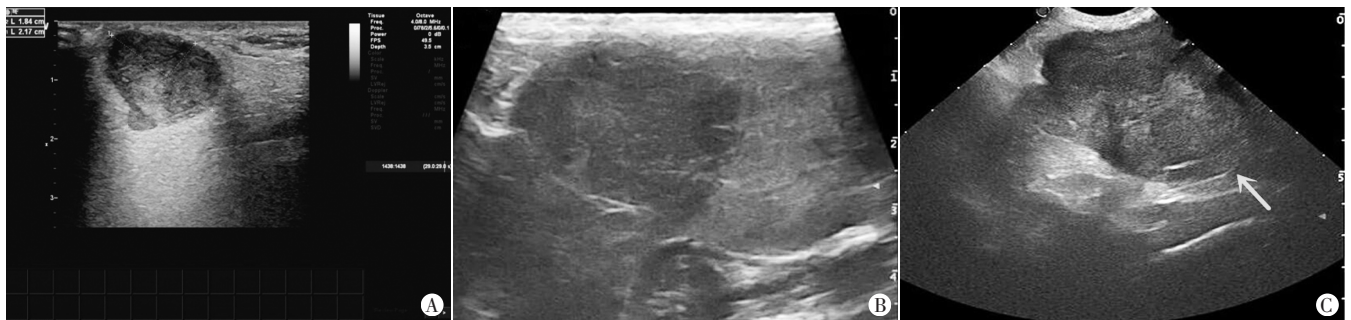
二、CEUS 检查结果

1. 移植后 4 周, 移植瘤内部呈均匀高增强; 移植后 6 周, 移植瘤内部呈不均匀高增强; 移植后 8 周, 移植瘤内部出现灌注缺损。见图 2。

2. TIC 显示, 移植后 4、6、8 周移植瘤 PI、AWI 及 AWO 比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与移植后 4 周比较, 移植后 6、8 周移植瘤 PI、AWI 及 AWO 均升高 (均 $P < 0.05$); 与移植后 6 周比较, 移植后 8 周移植瘤 PI 和 AWO 均升高 (均 $P < 0.05$)。移植后 4、6、8 周移植瘤 TTP 和 MTT 比较, 差异均无统计学意义。见图 3 和表 1。

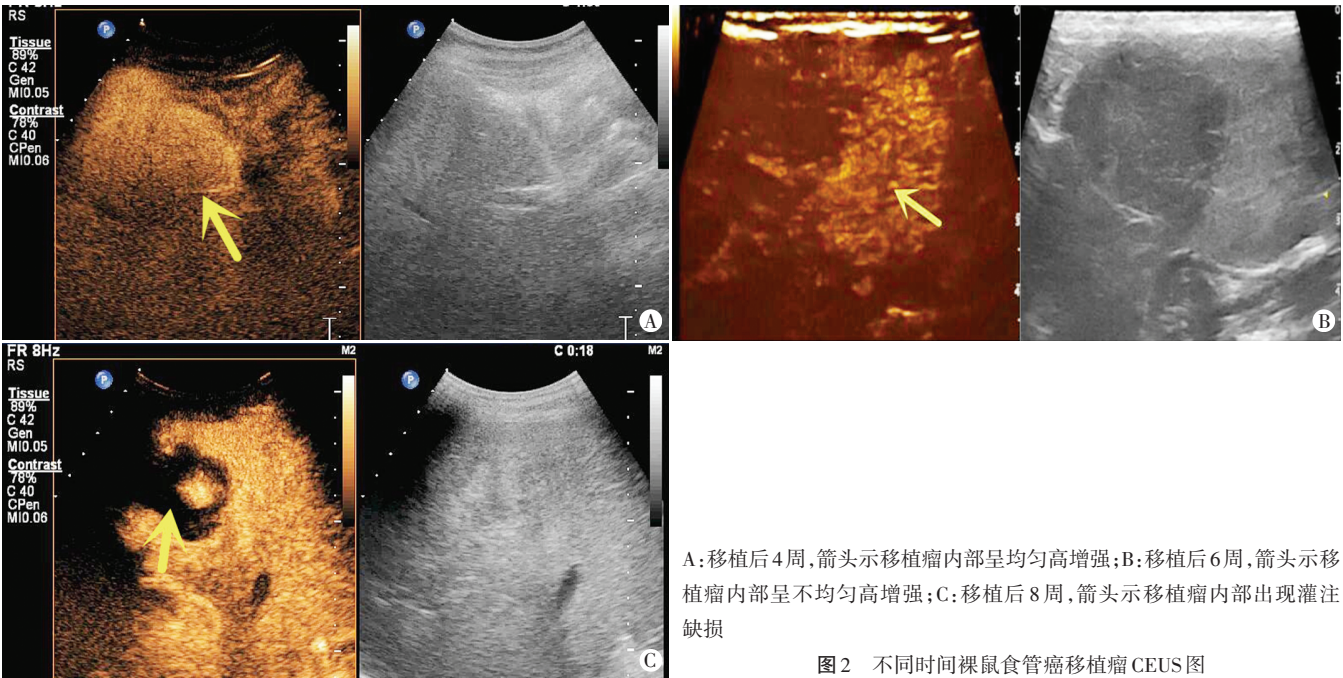
三、病理学检查结果

1. HE 染色显示, 移植后 4 周, 移植瘤见角化珠且细胞间见细胞间桥; 移植后 6 周, 移植瘤角化珠、细胞间桥均稍减少, 毛细血管增多; 移植后 8 周, 移植瘤角化珠、细胞间桥均明显减少, 毛细血管增多, 可见病理性核裂变。见图 4。



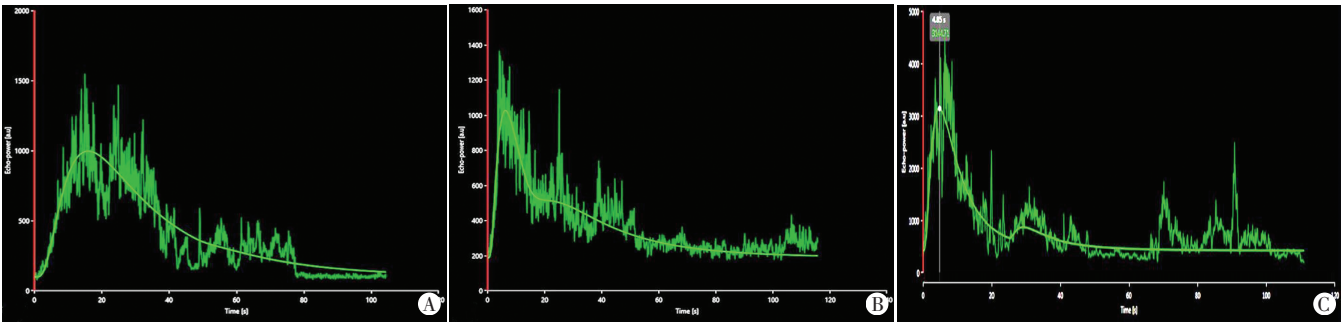
A: 移植后 4 周; B: 移植后 6 周; C: 移植后 8 周 (箭头示移植瘤肿块边界不清晰)

图 1 不同时间裸鼠食管癌移植瘤二维超声图



A:移植后4周,箭头示移植瘤内部呈均匀高增强;B:移植后6周,箭头示移植瘤内部呈不均匀高增强;C:移植后8周,箭头示移植瘤内部出现灌注缺损

图2 不同时间裸鼠食管癌移植瘤CEUS图



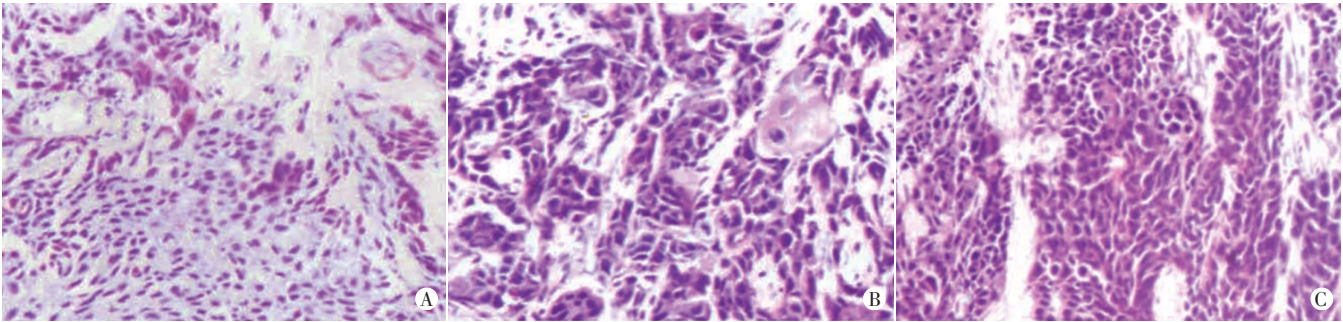
A:移植后4周;B:移植后6周;C:移植后8周

图3 不同时间裸鼠食管癌移植瘤TIC图

表1 不同时间裸鼠食管癌移植瘤TIC定量参数比较($\bar{x} \pm s$)

时间	PI(dB)	TTP(s)	MTT(s)	AWI(dB)	AWO(dB)
移植后4周	3.04±1.68	24.85±10.15	49.62±12.78	41.11±18.98	118.32±46.54
移植后6周	10.47±2.97*	40.14±18.45	68.54±30.58	211.35±125.11*	445.21±285.45*
移植后8周	18.40±8.37*#	38.54±19.97	90.58±51.32	318.25±125.31*	987.21±192.21*#
F值	12.999	1.509	2.027	11.088	28.770
P值	<0.001	0.253	0.166	0.001	<0.001

与移植后4周比较,* $P<0.05$;与移植后6周比较,* $P<0.05$ 。PI:峰值强度;TTP:达峰时间;MTT:平均通过时间;AWI:曲线下流入面积;AWO:曲线下流出面积



A:移植后4周;B:移植后6周;C:移植后8周

图4 不同时间裸鼠食管癌移植瘤病理图(HE染色,×200)

2.免疫组化显示,移植后4、6、8周MVD和VEGF蛋白表达比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与移植后4周比较,移植后6、8周MVD均升高,移植后8周VEGF蛋白表达升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。见表2和图5。

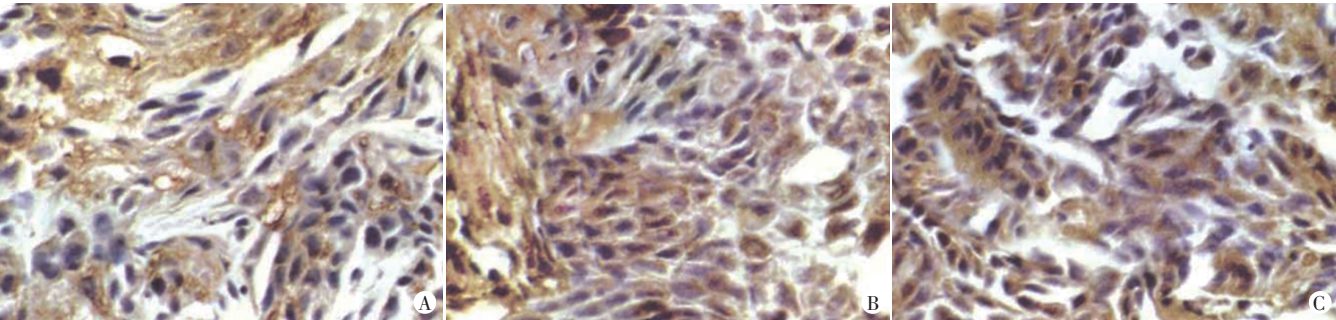
四、相关性分析

裸鼠食管癌移植瘤PI、AWI、AWO与MVD、VEGF蛋白表达均呈正相关(均 $P<0.001$)。见表3。

表2 不同时间裸鼠食管癌移植瘤MVD和VEGF蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

时间	MVD(条)	VEGF蛋白表达
移植后4周	8.41±1.87	2.14±1.01
移植后6周	12.12±2.98*	3.98±2.45
移植后8周	13.54±2.54*	5.87±2.34*
F值	6.707	5.010
P值	0.008	0.022

与移植后4周比较,* $P<0.05$;与移植后6周比较,* $P<0.05$ 。MVD:微血管密度;VEGF:血管内皮生长因子



A: 移植后4周;B: 移植后6周;C: 移植后8周

图5 不同时间裸鼠食管癌移植瘤免疫组化图(×200)

表3 TIC定量参数与移植瘤MVD和VEGF蛋白表达的相关性分析

参数	MVD		VEGF蛋白表达	
	r值	P值	r值	P值
PI	0.495	<0.001	0.423	<0.001
AWI	0.349	<0.001	0.367	<0.001
AWO	0.367	<0.001	0.339	<0.001

MVD:微血管密度;VEGF:血管内皮生长因子

讨 论

食管癌患者主要临床表现为吞咽困难、哽噎感、胸骨后异物感,随着病情进展会出现进食、饮水困难,严重影响其生活质量和生命安全^[7]。因此,及早诊断和治疗是改善食管癌患者预后的关键。影像学检查是临床诊断组织病变的常用检查方式,常规超声检查可以明确病变位置、大小等基本情况^[8],但不能显示肿瘤内部血管生成。肿瘤病变组织具有恶性增殖的特点,其血流分布情况直接影响临床治疗方案的制定,临床一般采用病理学检查评估组织内部血管生成情况,但其结果易受样本采集部位的影响,且重复性较差^[9]。CEUS可弥补上述不足,本实验通过建立裸鼠食管癌移植瘤模型,探讨CEUS对移植瘤血管生成的评估价值。

本实验通过皮下注射人食管癌细胞株Eca-109成功建立裸鼠食管癌移植瘤模型,通过观察不同时间移植瘤影像学变化发现,移植后4周裸鼠移植瘤二维超声表现为类椭圆形低回声肿块、边界清晰、内部回声

不均匀,CEUS表现为移植瘤内部呈均匀高增强;移植后6、8周,移植瘤二维超声表现为内部回声仍不均匀,且肿瘤边界由欠清晰转变为不清晰,CEUS表现为移植瘤内部由不均匀高增强转变为灌注缺损,说明移植后4周移植瘤周围已经存在血流分布,随着其生长,瘤内血流信号更丰富。移植后6、8周CEUS表现由不均匀高增强转变为灌注缺损,分析原因可能为肿瘤组织生长过快,瘤内血管供养出现不足,导致缺氧坏死,从而出现灌注缺损。表明随着移植瘤的生长,其内血流灌注逐渐增多,CEUS能为评估病灶内血流灌注情况提供更多信息^[10-11]。本实验还发现,移植后6、8周,移植瘤PI、AWI和AWO均高于移植后4周,且移植后8周移植瘤PI和AWO均高于移植后6周,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与文献^[12]报道结果相似。TIC定量参数包括PI、TTP和曲线下面积等,组织内血管越多,血流量越大,造影剂进入量越多,PI越高,AWI和AWO也越高,因此能准确反映病变组织内血流灌注情况^[13-14];TTP、MTT分别反映病灶组织内超声造影剂浓度达到最高时的时间和平均通过时间,其由组织内微循环血流灌注速度决定;本实验结果显示不同时间移植瘤TTP、MTT比较差异均无统计意义,分析原因可能与成瘤时间较短有关。

本实验通过观察移植瘤的病理学变化发现,移植后4周见角化珠和细胞间桥;移植后6周移植瘤角化珠和细胞间桥均稍减少,且瘤内毛细血管增多;移植

后 8 周除了角化珠和细胞间桥均明显减少和毛细血管增多外,还可见明显的病理性核裂变,表明随着移植瘤的生长,肿瘤恶性程度也增加。研究^[15]显示,造影剂微泡浓度越高表示病灶血流灌注量越大,组织内血流灌注量与其血管生成情况直接相关,即血管生成密度越高其血流灌注越大;VEGF 对肿瘤组织血管重建有很强的促进作用,其表达升高能反映 MVD 升高。既往实验^[16]发现裸鼠乳腺癌移植瘤 MVD、VEGF 蛋白表达均升高,本实验结果显示,移植后 6、8 周移植瘤 MVD 较移植后 4 周升高,且移植后 8 周移植瘤 VEGF 蛋白表达均高于移植后 4、6 周,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与其结果一致。本实验相关性分析显示,裸鼠食管癌移植瘤 PI、AWI、AWO 与 MVD、VEGF 蛋白表达均呈正相关(均 $P < 0.001$),与文献^[17]报道结果相似,表明随着移植瘤的生长其血管生成越丰富,CEUS 能够很好地评估裸鼠食管癌移植瘤的血管生成情况。

综上所述,CEUS 能够有效观察裸鼠食管癌移植瘤内部血流灌注情况,TIC 定量参数 PI、AWI、AWO 随着移植瘤的生长而逐渐升高,其与移植瘤 MVD、VEGF 蛋白表达均呈正相关,可以较好地评估移植瘤血管生成情况。

参考文献

- [1] Morgan E, Soerjomataram I, Rumgay H, et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040; new estimates from globocan 2020[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(3):649-658.
- [2] Shou Y, Wang X, Liang Y, et al. Exosomes-derived miR-154-5p attenuates esophageal squamous cell carcinoma progression and angiogenesis by targeting kinesin family member 14[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2):4610-4620.
- [3] 李敏, 李海文, 陶运亮, 等. 超声造影定量参数对肺部良恶性病变鉴别诊断的价值研究[J]. *重庆医学*, 2020, 49(16):2686-2689, 2693.
- [4] 陈雨娜, 周玫娟, 范娜. 超声造影时间-强度曲线参数评估膀胱癌分期的研究[J]. *影像科学与光化学*, 2022, 40(2):439-442.
- [5] Jung EM, Wertheimer T, Putz FJ, et al. Contrast enhanced ultrasound (CEUS) with parametric imaging and time intensity curve analysis (TIC) for evaluation of the success of prostate arterial embolization (PAE) in cases of prostate hyperplasia[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2020, 76(2):143-153.
- [6] Guan B, Li H, Yang Z, et al. Inhibition of farnesoid X receptor controls esophageal cancer cell growth in vitro and in nude mouse xenografts[J]. *Cancer*, 2013, 119(7):1321-1329.
- [7] Yang CS, Chen XL. Research on esophageal cancer: with personal perspectives from studies in China and Kenya[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(2):264-276.
- [8] 刘春, 成雪晴, 何宏伟, 等. 甲状腺转移癌的超声表现和临床特点研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2021, 37(8):941-944.
- [9] 曹利锋, 马凯, 范卡, 等. 磁共振成像灌注参数与 COL5A2、Galectin-3 的相关性及对食管癌的诊断价值[J]. *西部医学*, 2023, 35(12):1857-1861.
- [10] 冯玉仪, 何杨成, 金海, 等. 超声造影血流灌注定量参数与肿瘤组织氧分压相关性: 实验研究[J]. *中国医学影像技术*, 2023, 39(1):1-5.
- [11] 晏和国, 李可基, 寇森. 超声造影定量参数与 MSCT 对肺良恶性病变鉴别诊断价值[J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2021, 19(12):49-52.
- [12] 张炎晶, 郝艳红, 刘利平, 等. 裸鼠胆囊癌移植瘤血流灌注特征的超声造影研究[J]. *山西医科大学学报*, 2021, 53(2):165-169.
- [13] 王媚瑜, 张一峰, 陈捷, 等. 超声造影定量分析技术在乳腺导管内病变良恶性鉴别中的应用价值[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2020, 40(4):514-518.
- [14] 汪玲, 陆英慧, 王天佑. 原发性肝癌患者超声造影定量灌注参数与分化程度及微血管密度的关系[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2020, 55(5):681-685.
- [15] 李爱静, 林雪君, 尹玲, 等. 超声造影观察小鼠两种皮下移植瘤的血管生成[J]. *实验动物科学*, 2020, 37(4):27-32.
- [16] 张昊, 闫金银, 李淑英, 等. 桑黄提取物诱导人乳腺癌移植瘤模型细胞凋亡及其作用机制[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2020, 23(2):113-117.
- [17] 丁波, 李秀兰, 肖艳, 等. 乳腺癌超声造影血流动力学参数与 VEGF、Flk-1/KDR 表达相关性研究[J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2018, 16(9):47-50.

(收稿日期:2023-07-31)