

不同温度热疗联合多西紫杉醇对人乳腺癌细胞株增殖的影响

崔宝林¹, 宁晓娥² (陕西省宝鸡市妇幼保健院: 1. 乳腺科; 2. 计划生育科 721000)

【摘要】 目的 探讨亚高温热疗联合多西紫杉醇对人乳腺癌增殖的影响及其相关机制。**方法** 采取四甲基偶氮唑盐法观察多西紫杉醇对人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞增殖的影响, 且筛选出有效浓度。将体外培养的 MCF-7 细胞分为空白对照组、多西紫杉醇组及热疗与多西紫杉醇联合组, 热疗与多西紫杉醇联合组依据不同温度 (39.0 °C、39.5 °C、40.0 °C、40.5 °C、41.0 °C) 分为 5 个亚组。对各组细胞予以相应干预后, 采取流式细胞仪检测各组细胞凋亡状况及细胞生长周期变化。**结果** 随着热疗温度上升, 细胞凋亡比例渐渐增高, 41.0 °C 热疗时凋亡率 [(38.90±6.88)%] 最高, 显著高于单一应用多西紫杉醇与其他各亚组; c-Jun 氨基末端激酶在热疗温度为 41.0 °C 时达到最高值, 而细胞外调节蛋白激酶 1/2、p-p38 蛋白表达在热疗温度为 40.0 °C 达到最高值, 同其余亚组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 热疗与多西紫杉醇联合等亚组 G₂/M 期细胞比例明显多于单一使用多西紫杉醇组, 抑制 MCF-7 细胞周期进程的效应明显强于多西紫杉醇, 且随着热疗温度增加, G₂/M 期细胞比例增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。热疗与多西紫杉醇联合组丝裂原活化蛋白激酶通路蛋白表达较多西紫杉醇组显著增强, Bcl-2 蛋白表达则明显降低, 而 Bax 蛋白表达有轻微升高。**结论** 亚高温热疗联合多西紫杉醇干预能抑制人乳腺癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 具有协同抗肿瘤效应, 其治疗机制可能与激活细胞外调节蛋白激酶、c-Jun 氨基末端激酶、p38 蛋白有关。

【关键词】 热疗; 多西紫杉醇; 乳腺癌

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.23.029 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)23-3522-03

Synergistic effect of docetaxel plus hyperthermia of different temperatures on the proliferation of human breast carcinoma cells CUI Bao-lin¹, NING Xiao-e² (1. Department of Galactophore; 2. Department of Family Planning, Maternal and Child Health Hospital of Baoji City, Baoji, Shaanxi 721000, China)

【Abstract】 Objective To explore the synergistic effect of docetaxel plus mild hyperthermia on the proliferation of human breast carcinoma cells and its mechanism. **Methods** MTT assay was used to test the inhibitory effect of docetaxel on the proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells, and the effective concentration of docetaxel was screened. The human breast carcinoma MCF-7 cells cultured in vitro were divided into blank control group, docetaxel group and docetaxel plus hyperthermia group. The docetaxel plus hyperthermia group was divided into 5 subgroups (39.0 °C group, 39.5 °C group, 40.0 °C group, 40.5 °C group and 41.0 °C group), according to the different temperatures of hyperthermia. Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis and the change of cell growth cycle in every group after intervention. **Results** The apoptosis rate of cells increased with the temperature of hyperthermia. 41.0 °C group had the highest apoptosis rate of cells [(38.90±6.88)%], which was significantly higher than docetaxel group and other subgroups of docetaxel plus hyperthermia group. The activity of c-Jun amino-terminal kinase reached maximum when the hyperthermia temperature was 41.0 °C, while the activities of ERK1/2 and p-p38 reached maximum when the hyperthermia temperature was 40.0 °C, which was significantly different from other subgroups of docetaxel plus hyperthermia group ($P < 0.05$). The proportions of cells at G₂/M phase in the subgroups of docetaxel plus hyperthermia group were significantly higher than docetaxel group. The inhibitory effect of docetaxel plus hyperthermia on the MCF-7 cell cycle was stronger than docetaxel alone. The proportion of cells at G₂/M phase increased with the hyperthermia temperature, with statistical difference ($P < 0.05$). Compared with docetaxel group, the expression level of mitogen activated protein kinase pathway protein in docetaxel plus hyperthermia group was significantly higher, the expression level of Bcl-2 significantly reduced, and the expression level of Bax slightly increased. **Conclusion** Docetaxel plus hyperthermia could inhibit the proliferation of human breast carcinoma cells and induce the apoptosis, which showed a synergistic antitumor effect. The mechanism might relate with the activation of extracellular regulated protein kinase, c-Jun amino-terminal kinase and p38.

【Key words】 hyperthermia; docetaxel; breast carcinoma

迄今为止, 临床治疗乳腺癌的主要方法有手术切除、术后化学治疗、放射治疗、热疗及内分泌治疗等^[1]。有报道指出, 热疗能够提高化疗药物的细胞毒性, 与化学治疗联合应用具有协

同抗肿瘤的作用^[2-3]。临床上认为, 低于 41.0 °C 的亚高温热疗主要是经过调理免疫功能而起到抗肿瘤作用, 不能够协同化学治疗药物杀灭肿瘤细胞, 然而也有报道提出, 一些乳腺癌患者

在温度为 39.0 °C 时,化疗效果比较显著^[4]。鉴于此,本研究主要探讨不同温度热疗联合化疗是否对乳腺癌细胞株的增殖产生影响及其作用机制,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株 MCF-7 由中科院上海生物化学与细胞生物学研究所提供,多西紫杉醇注射液(20 毫升/支)由上海复兴医药有限公司提供,胎牛血清、高糖 DMEM(DMEM)培养基、兔抗 p-细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2、ERK 1/2、p-c-Jun 氨基末端激酶(JNK)/SAPK、JNK/SAPK、甘油醛-3-磷酸脱氢酶一抗、四甲基偶氮唑盐、p-p38 一抗、鼠抗 Bcl-2、Bax 一抗均由美国 Sigma 公司提供,FACSort 流式细胞仪由日本 Beeton Dickson 公司提供。

1.2 乳腺癌细胞培养 在 10%浓度小牛血清的 DMEM 培养基中培养乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞,将培养基置于 CO₂ 体积分数为 0.05 的 37.0 °C 培养箱中孵育,选取对数生长期的 MCF-7 细胞用于试验。

1.3 检测 MCF-7 细胞的凋亡率 选取对数生长期的 MCF-7 细胞用于试验,将其分为对照组(不作任何处理)、热疗与多西紫杉醇联合组、多西紫杉醇组,热疗与多西紫杉醇联合组又依据不同热疗温度,将其分为 39.0、39.5、40.0、40.5、41.0 °C 等 5 个亚组,与多西紫杉醇在对应温度的恒温水浴箱中共同作用 2 h 后,接着培养 24 h。收集培养后的细胞,每组细胞以 4.0 °C 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,制备成单细胞悬浮液;将细胞浓度调整为每毫升 1×10⁶ 个,另取 100 μL 细胞悬浮液,加入 10 μL PI 溶液与 5 μL Annexin V/FITC 后,充分混匀,避光常温培养 15 min,再加入 400 μL PBS 应用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4 检测 MCF-7 细胞周期 乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞分组情况及处理方法同上,操作结束后将每组细胞置于 CO₂ 体积分数为 0.05 的 37.0 °C 培养箱中培养 24 h,以 4.0 °C PBS 清洗培养过的细胞后,再经 80%乙醇固定,置于 -20.0 °C 环境下,隔日再用。用 PBS 清洗各组固定细胞后,在遮光常温环境下应用 PI 染色,30 min 后再上样,采取 Modfit 3 软件对每组细胞生长周期状况进行检测。

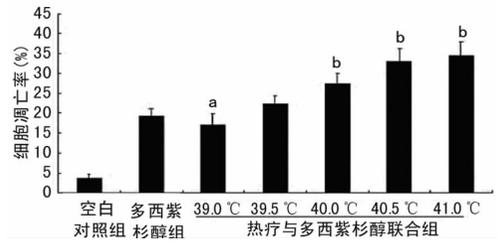
1.5 多药耐药基因产物 P 糖蛋白、丝裂原活化蛋白激酶、Bcl-2、Bax 及 MCF-7 细胞热休克因子检测 各组细胞处理方法同上,结束后应用蛋白裂解缓冲液(含苯甲磺酰氨 1 mmol/L、正钒酸钠 1 mmol/L、十二烷基磺酸钠 0.1%、去氧胆酸钠 1%、NP-40、1%、氯化钠 150 mmol/L)分别水解每组细胞,获得总蛋白,检测总蛋白浓度,标准品为牛血清蛋白。按照蛋白定量试剂盒说明书拟定蛋白定量标准曲线,采取紫外分光光度计测定吸光度 A 值(595 nm 处),算出蛋白浓度。将全部蛋白样品的浓度调节成等浓度后,经电泳分离后转至 PVDF 膜上,密闭后加入一抗,培养后滴加对过氧化物酶结合的二抗。采用 ECL 化学发光试剂盒测定杂交信号,分别检测各样品中 ERK1/2、JNK、p38 及 Bcl-2/Bax 蛋白表达状况。

1.6 统计学处理 所获数据采用 SPSS19.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 t 检验,采用单因素方差分析进行组间比较,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同温度热疗与多西紫杉醇联合对 MCF-7 细胞凋亡的影响 见图 1。通过显微镜观察 MCF-7 细胞凋亡状态,细胞发生皱缩,体积变小,变圆,细胞轮廓清晰,细胞透明度减小,呈棕黑色。随着热疗温度上升,细胞凋亡比例渐渐增高,41.0 °C

热疗时凋亡率[(38.90±6.88)%]最高,显著高于单一应用多西紫杉醇与其他亚组的细胞凋亡率。



注:与对照组相比,^aP<0.05;与多西紫杉醇组相比,^bP<0.05。

图 1 热疗联合多西紫杉醇对 MCF-7 细胞凋亡的影响

2.2 热疗联合多西紫杉醇对 MCF-7 细胞生长周期的影响 见表 1。热疗与多西紫杉醇联合等亚组 G₂/M 期细胞比例明显多于单一使用多西紫杉醇组,抑制 MCF-7 细胞周期进程的效应明显强于多西紫杉醇,且随着热疗温度增加,G₂/M 期细胞比例增高,差异有统计学意义(P<0.05)。

表 1 热疗与多西紫杉醇联合对 MCF-7 细胞生长周期影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞生长周期		
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白对照组	45.49±2.10	45.46±4.58	8.78±2.12
多西紫杉醇组	35.78±4.62	37.65±5.19	26.59±3.99
39.0 °C 热疗联合多西紫杉醇组	37.70±4.49	33.58±4.58	28.23±3.39 ^a
39.5 °C 热疗联合多西紫杉醇组	41.88±4.39	28.09±4.99	29.69±4.19 ^a
40.0 °C 热疗联合多西紫杉醇组	40.28±5.03	25.76±5.29	33.67±6.70 ^a
40.5 °C 热疗联合多西紫杉醇组	41.11±6.49	22.12±3.29	36.77±5.19 ^a
41.0 °C 热疗联合多西紫杉醇组	39.08±5.46	22.69±4.19	38.09±4.65 ^a

注:与多西紫杉醇组相比,^aP<0.05。

2.3 热疗与多西紫杉醇联合对 MCF-7 细胞丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)表达的影响 见图 2。热疗与多西紫杉醇联合会导致 MCF-7 细胞中 MAPK p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 蛋白表达显著增强,其中 p-JNK 蛋白在热疗温度为 41.0 °C 时达最高值,p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达在热疗温度为 40.0 °C 达最高值,同其余亚组相比,差异均有统计学意义(P<0.05)。

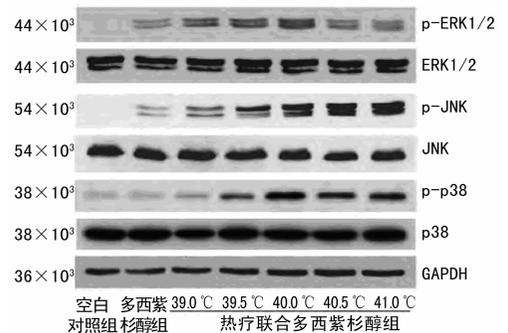


图 2 热疗与多西紫杉醇联合对 MCF-7 细胞 MAPK 表达的影响

2.4 MCF-7 细胞凋亡蛋白 Bax 及 Bcl-2 表达的影响 见图 3。MCF-7 细胞经过热疗与多西紫杉醇联合应用后,Bax 蛋白表达较空白对照组及多西紫杉醇组略有增多,但差异无统计学意义,不同热疗温度亚组间差异也无统计学意义(P>0.05)。多西紫杉醇可导致 MCF-7 细胞凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少,热疗

与多西紫杉醇联合应用后,细胞内 Bcl-2 表达较单一应用多西紫杉醇进一步减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),不同热疗温度亚组间 Bcl-2 蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

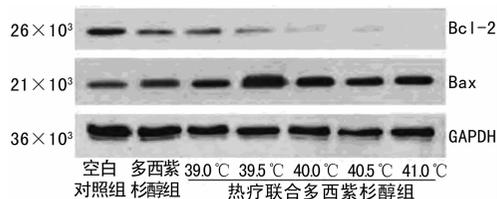


图 3 热疗与多西紫杉醇联合对 MCF-7 细胞 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

3 讨论

乳腺癌对全球范围内女性健康构成严重威胁,其发病率逐年增加^[5]。随着医学研究的持续拓展,广大临床工作者已经接受了乳腺癌为全身性疾病这一理念,治疗方案也发生改变,手术切除不再是仅有的治疗手段,治疗重点由乳腺组织渐渐转至全身,新的分子靶向治疗、内分泌治疗、辅助治疗、热疗及放射治疗等成为医治乳腺癌的重要方法^[6-7]。因热疗具有不良反应轻微,且与化疗、放疗联合应用具有协同效应等优势,逐渐得到临床关注。

3.1 不同热疗温度联合多西紫杉醇对乳腺癌细胞株凋亡率的影响 临床上关于热疗治疗肿瘤的有效温度一直都存在很大争议^[8]。大量基础研究表明,不论是应用水浴箱加热、红外线辐射,还是微波热疗等加热方式,热疗发挥抗肿瘤作用的有效温度范围为 42.0~45.0 °C^[9-11]。由于热疗对治疗设备有较高要求及人体体温限制,42.0~45.0 °C 热疗在临床实践中不能大量应用,而且单一热疗杀灭肿瘤细胞存在局限性,总体治疗效果欠佳。因而近年来,国内外对热疗适宜温度的研究重点主要集中于 40.0~41.0 °C。关于 40.0~41.0 °C 热疗有无抗肿瘤效应的临床结论不一致。蒋东等^[12]在对肺癌细胞予以加热时,40.0 °C 即可诱导细胞凋亡。Yamada 等^[13]认为,39.0~41.0 °C 可以进一步激活人体体液免疫及细胞免疫系统,从而提高人体的抗肿瘤免疫功能。

本研究结果显示,41.0 °C 热疗与多西紫杉醇联合组乳腺癌细胞株凋亡率明显高于其他热疗亚组及多西紫杉醇组,说明与单一应用多西紫杉醇相比,热疗与多西紫杉醇联合应用可引起乳腺癌细胞株凋亡增加。提示亚高温热疗(41.0 °C)联合多西紫杉醇具有协同杀灭肿瘤细胞的作用。且随着热疗温度上升至 41.0 °C,凋亡的细胞数目持续增加。分析可能的原因有:(1)多西紫杉醇对乳腺癌细胞株 MCF-7 比较敏感,抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 的效用与剂量相关,细胞毒性随浓度提高而增强。(2)热疗温度控制在 40.5~43.0 °C 时,多种化疗药物的细胞毒性效应达到最大。(3)MAPKs 经一系列信号传导途径,将胞外刺激传导至细胞内,是细胞内最关键的一条信号传导通路,在肿瘤的发生与发展中有重大意义。有关研究指出,MAPK 蛋白在乳腺癌发病机制中也有参与,哺乳动物细胞 MAPK 蛋白家族中多个成员(如 ERK、JNK、p38 等)均已证实同乳腺癌紧密相关^[14];MAPK 通路被激活以后,ERK、JNK、p38 等通路也会随着激活。本研究结果显示,MCF-7 细胞经热疗及多西紫杉醇联合处理后,细胞内 p-p38、p-JNK 及 p-ERK1/2 蛋白表达均显著增多,其中 p38、JNK 等通路活化产生的生物作用同细胞凋亡相关,这也可能是热疗与多西紫杉醇联合应用促进肿瘤细胞凋亡作用优于单一应用多西紫杉醇的

原因之一。另外,p-p38 与 p-ERK1/2 蛋白表达在热疗温度高于 40.0 °C 时开始渐渐下降,具体机制尚不明确。

3.2 不同温度热疗联合多西紫杉醇对乳腺癌细胞株增殖的影响 本研究结果显示,多西紫杉醇能使 MCF-7 细胞的生长周期停滞于 G₂/M 期,热疗联合多西紫杉醇处理可促进 G₂ 期 MCF-7 细胞数量上升,且滞留在 G₂ 期的细胞比例随热疗温度升高而增多。此外,40.0、40.5、41.0 °C 热疗与多西紫杉醇联合等亚组 G₂/M 期细胞比例明显多于单一使用多西紫杉醇组,抑制 MCF-7 细胞周期进程的效应明显强于多西紫杉醇,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着热疗温度上升至 41.0 °C,G₂/M 期细胞比例逐渐增加。提示热疗可协同多西紫杉醇引起更多肿瘤细胞生长停滞于 G₂/M 期,进而发挥阻碍肿瘤细胞分裂及增殖的作用。

有研究指出,肿瘤细胞中 Bcl-2 基因的高表达与肿瘤的发生与发展紧密相关,Bcl-2 基因表达缺失或者下调能够提高 MCF-7 细胞对多西紫杉醇化疗的敏感性,此现象可能与乳腺癌细胞株 MCF-7 雌激素受体的表达有关^[15]。本研究发现,多西紫杉醇可导致 MCF-7 细胞凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少,热疗与多西紫杉醇联合应用后,细胞内 Bcl-2 表达较单一应用多西紫杉醇进一步减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),不同热疗温度亚组间 Bcl-2 蛋白表达差异也有统计学意义($P < 0.05$)。提示热疗与多西紫杉醇联合应用可显著抑制 Bcl-2 通路,促进细胞凋亡,进而抑制 MCF-7 细胞增殖。

综上所述,亚高温热疗联合多西紫杉醇干预能抑制人乳腺癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,具有协同抗肿瘤效应,其治疗机制可能与 p-ERK、JNK、p38 蛋白有关。

参考文献

- [1] 宋向巍,张辉,郑维民,等. 榄香烯联合热疗诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及其对细胞周期的影响[J]. 中国实验诊断学,2010,14(10):1527-1529.
- [2] 李永强,廖思娜. 聚束微波亚高温热疗诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡的研究[J]. 广西医科大学学报,2011,28(4):515-516.
- [3] 王颖杰. 微波热疗联合 GP 方案治疗晚期乳腺癌的临床观察[J]. 肿瘤防治研究,2009,36(1):63-65.
- [4] 黄乾鹏,朱立新,许小亮,等. 乳腺癌治疗中热疗的研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2013,7(5):370-373.
- [5] 廖思娜. 聚束微波亚高温热疗联合紫杉醇诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡的协同作用研究[D]. 南宁:广西医科大学,2010.
- [6] 王丽. 纳米热控释载药脂质体的制备和体外治疗乳腺癌及其分子机制的实验研究[D]. 南京:东南大学,2010.
- [7] 廖群好,张子丽. 针灸疗法结合热疗治疗 36 例乳腺癌术后上肢水肿疗效观察[J]. 按摩与康复医学,2014,30(1):73-74.
- [8] 管静辉. 乳腺癌治疗中热疗的研究进展[J]. 医学信息,2014,28(21):674-675.
- [9] 陈道植,唐秋莎,项静英,等. 磁感应加热和 HSV-tk 自杀基因及核素内照射联合治疗乳腺癌的实验研究[J]. 中华核医学杂志,2011,31(2):82-86.
- [10] 裴玲,马昌义,唐文,等. 局部微波热疗与化疗联合应用于胸壁复发乳腺癌的疗效观察[J]. 四川医学,2011,32(4):489-491.

2.5 两组患者肝功能恢复情况比较 见表 4。随访 2 年后评价两组患者肝功能恢复情况, 抗病毒组好转率为 53.26% (49/92), 对照组好转率为 13.16% (5/38), 差异有统计学意义 ($\chi^2=12.596, P<0.05$)。

3 讨 论

既往认为乙肝肝硬化一旦形成则不可逆转, 尤其是失代偿期肝硬化, 其主要治疗措施为支持、对症、预防和控制并发症, 发展到终末期肝移植是治疗的最好方案。随着第一口服抗病毒药物拉米夫定问世, 乙肝的抗病毒治疗成为慢性乙肝治疗的新突破, 标志着慢性乙肝治疗进入核苷(酸)类似物治疗时代。越来越多的临床研究证明, 乙肝肝硬化采用抗病毒治疗可显著改善肝脏纤维化及降低肝癌的风险^[5,9-10]。目前临床上常用的核苷类抗病毒药物有恩替卡韦、替比夫定及阿德福韦酯等, 虽各种核苷类抗病毒药物临床疗效的优劣方面存在一定争议, 但其对失代偿期乙肝肝硬化的治疗作用是肯定的^[8,11]。本研究 103 例抗病毒治疗的患者中 71 例患者采用了拉米夫定, 24 例患者采用了恩替卡韦, 8 例患者采用拉米夫定联合阿德福韦酯治疗。

本研究 2 年随访结果显示, 抗病毒组患者的肝功能指标 ALT、AST 及 TBIL 水平较治疗前明显改善, 血清 ALB 及 CHE 水平较治疗前显著升高, 凝血功能也得到一定改善。这一结果说明经过抗病毒治疗后患者肝细胞炎性反应坏死减轻, 肝脏功能显著改善, 患者在治疗后期基本不需要输入外源性 ALB。对照组采用常规护肝及对症治疗, 患者肝功能相关生化指标无明显改善, 其中 ALB 水平较之前下降, 但差异无统计学意义, 考虑可能与输入外源性 ALB 有关。CHE 水平下降明显, 提示应用核苷类抗病毒治疗对失代偿期乙肝肝硬化患者的肝脏合成功能有明显改善作用。与对照组相比, 抗病毒组经过治疗后 HBV DNA、肝脏纤维化指标 HA 及 PCⅢ均得到改善, 优于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 这一结果说明核苷类抗病毒药物抑制病毒的复制, 延缓了肝脏纤维化的进程。

本研究结果显示, 抗病毒组肝功能好转率为 53.26%, 显著高于对照组的 13.16%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 2 年生存率 (88.04%) 显著高于对照组 (55.26%), 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 进一步说明核苷类抗病毒药物明显改善了失代偿期乙肝肝硬化患者的长期疗效。但本研究样本量比较小, 有必要在此基础上开展多中心、大样本、前瞻性研究, 并延长随访时间, 进一步确定核苷类抗病毒药物治疗对乙肝肝硬化失代偿患者的长期获益和安全性。

参考文献

- [1] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Reprint of: Epidemiological serosurvey of Hepatitis B in China-declining HBV prevalence due to Hepatitis B vaccination[J]. Vaccine, 2013, 31 (Suppl 9): 21-28.
- [2] 鲁凤民, 王杰, 杨紫伟, 等. 乙型肝炎表面抗原检测技术演变及对隐匿性乙型肝炎病毒感染实验室检测的思考[J/CD]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2013, 5(7): 3-7.
- [3] 胡沛, 赵钢德, 李海, 等. 乙型肝炎肝硬化失代偿患者核苷类抗病毒治疗的长期疗效[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22 (11): 806-811.
- [4] 戚敬虎, 石小枫, 刘杞. 核苷(酸)类似物治疗乙型肝炎肝硬化的研究进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(3): 296-298.
- [5] 马萍, 薛燕, 王磊, 等. 长期抗病毒治疗对失代偿期乙型肝炎肝硬化患者预后的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(13): 22-24.
- [6] 司慧远, 靳雁斌, 李晓娟, 等. 恩替卡韦对肝硬化失代偿期、代偿期及慢性乙型肝炎患者的 2 年抗病毒临床疗效对比[J/CD]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2014, 6(9): 33-35.
- [7] 姜宏伟, 王哲培. 拉米夫定联合阿德福韦酯对失代偿期乙型肝炎肝硬化的临床疗效观察[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(4): 902-903.
- [8] 窦爱华, 徐斌. 失代偿期乙型肝炎肝硬化患者三种抗病毒方案长期随访疗效比较[J]. 中国全科医学, 2014, 17 (34): 4097-4100.
- [9] 胡沛, 赵钢德, 李海, 等. 乙型肝炎肝硬化失代偿患者核苷类抗病毒治疗的长期疗效[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22 (11): 806-811.
- [10] Calvaruso V, Craxi A. Regression of fibrosis after HBV antiviral therapy. Is cirrhosis reversible [J]. Liver Int, 2014, 34(Suppl 1): 85-90.
- [11] 李磊, 刘伟, 陈玉涵, 等. 不同核苷(酸)类似物抗病毒治疗方案治疗失代偿期乙肝肝硬化的临床研究[J]. 北京医学, 2014, 36(12): 1017-1021.

(收稿日期: 2015-04-13 修回日期: 2015-06-29)

(上接第 3524 页)

- [11] 袁春鑫, 王忠明, 蒋华, 等. PF 方案同步化放疗联合热疗治疗中晚期宫颈癌的临床观察[J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(23): 139-140.
- [12] 蒋东, 李芳, 沈文明, 等. 热疗对肺癌 A549 细胞周期和凋亡的影响[J]. 南通大学学报: 医学版, 2008, 28(3): 172-174.
- [13] Yamada Y, Itoh Y, Aoki S, et al. Preliminary results of M-VAC chemotherapy combined with mild hyperthermia, a new therapeutic strategy for advanced or metastat-

ic transitional cell carcinoma of the urothelium[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(6): 1079-1083.

- [14] 廖小莉, 胡晓桦, 谢伟敏, 等. 微波热疗对人乳腺癌阿霉素细胞 MCF-7 多药耐药蛋白及耐药性的影响[J]. 广西医学, 2008, 30(8): 1126-1128.
- [15] 吴辰. 局部微波热疗与化疗联合应用于胸壁复发乳腺癌的近期疗效分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11 (24): 1940-1941.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-06-12)