

# 脂氟显微泡浓度和质粒浓度对基因转染效率影响的实验研究

何颖 卓忠雄

**摘要** 目的 研究脂氟显微泡浓度和质粒浓度对 pcDNA6.2-GW/EmGFP 重组质粒转染效率的影响,初步探索转染最佳条件及 shRNA 重组质粒对靶基因 Survivin 的抑制效果。方法 将重组质粒加入 6 个质粒浓度梯度组(5  $\mu\text{l/ml}$ 、10  $\mu\text{l/ml}$ 、15  $\mu\text{l/ml}$ 、20  $\mu\text{l/ml}$ 、25  $\mu\text{l/ml}$  及 30  $\mu\text{l/ml}$ ) , 向各组加入脂氟显微泡混悬液, 设置 6 个微泡浓度梯度组(50  $\mu\text{l/ml}$ 、100  $\mu\text{l/ml}$ 、150  $\mu\text{l/ml}$ 、200  $\mu\text{l/ml}$ 、250  $\mu\text{l/ml}$  及 300  $\mu\text{l/ml}$ ) , 对两种变量进行  $6 \times 6$  析因分析; 空白对照组不加入微泡和质粒。应用超声治疗仪(1.2  $\text{W/cm}^2$ 、占空比 20%) 辐照 90 s。48 h 后使用荧光显微镜及流式细胞仪检测细胞绿色荧光蛋白表达效率; 台盼蓝染色计数并获得细胞死亡率。设立阳性重组质粒组和阴性重组质粒组, Western blot 检测靶基因蛋白表达水平。结果 荧光显微镜下空白对照组未见绿色荧光蛋白表达, 其他实验组绿色荧光蛋白表达量各不相同。流式细胞仪定量检测结果显示, 与空白对照组比较, 各实验组基因转染率均增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。当质粒浓度为 20  $\mu\text{l/ml}$ 、微泡浓度为 150  $\mu\text{l/ml}$  时, 基因转染效率最高。台盼蓝染色结果显示, 质粒浓度一定时, 高微泡浓度组(250  $\mu\text{l/ml}$ 、300  $\mu\text{l/ml}$ ) 内细胞死亡率较低微泡浓度组(50  $\mu\text{l/ml}$ 、100  $\mu\text{l/ml}$ ) 增多, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果表明, 阳性重组质粒组 Survivin 基因表达受到明显抑制。结论 超声联合微泡可以有效介导基因转染, 当微泡浓度为 150  $\mu\text{l/ml}$ 、质粒浓度为 20  $\mu\text{l/ml}$  时, 基因转染率最高。阳性重组质粒可下调靶基因表达水平, 为后续基因转染的相关研究奠定基础。

**关键词** 微泡; 声孔效应; 肝癌; 转染

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] A

## Optimization of ultrasound microbubble and plasmid concentration for gene transfection

HE Ying, ZHUO Zhongxiong

Department of Ultrasound, Xinqiao Hospital Affiliated to Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the effect of microbubble and recombinant plasmid concentration on the transfection efficiency of pcDNA6.2-GW/EmGFP, and to explore the optimal condition for gene transfection and suppressive effect of the shRNA recombinant plasmid on the target gene. **Methods** Different concentration gradient groups of recombinant plasmid (5  $\mu\text{l/ml}$ , 10  $\mu\text{l/ml}$ , 15  $\mu\text{l/ml}$ , 20  $\mu\text{l/ml}$ , 25  $\mu\text{l/ml}$ , 30  $\mu\text{l/ml}$ ) and microbubbles (50  $\mu\text{l/ml}$ , 100  $\mu\text{l/ml}$ , 150  $\mu\text{l/ml}$ , 200  $\mu\text{l/ml}$ , 250  $\mu\text{l/ml}$ , 300  $\mu\text{l/ml}$ ) were set up, respectively. No plasmid or microbubbles were added in the blank control group. The factorial analysis was performed according to the two types of variables. Therapeutic ultrasound (1.2  $\text{W/cm}^2$ , 20% duty cycle) was chosen to irradiate cells in each group for 90 s. Forty-eight hours after transfection, the expression of GFP was detected by fluorescence microscopy and flow cytometry. The cells were count by trypan blue staining method and the cell mortality was calculated. The expression level of target gene was detected by Western blot. **Results** Under fluorescence microscopy, no GFP expression was found in the blank control group, and the fluorescence expression of GFP varied in the experimental groups. The results of flow cytometry test showed that the gene transfection rate in experimental groups was significantly increased compared with that in the control group ( $P < 0.05$ ). When the plasmid and microbubble concentration were 20  $\mu\text{l/ml}$  and 150  $\mu\text{l/ml}$  respectively, the gene transfection rate was the highest ( $P < 0.05$ ). Trypan blue staining showed that the cell mortality in the high-microbubble concentration (250  $\mu\text{l/ml}$  and 300  $\mu\text{l/ml}$ ) groups was lower than that in the low-microbubble concentration (50  $\mu\text{l/ml}$  and 100  $\mu\text{l/ml}$ ) groups ( $P < 0.05$ ). Western blot results showed that the survivin gene expression was suppressed in P(+) group. **Conclusion** Ultrasound combined with microbubble can be used for effective gene delivery. The system concentration of 150  $\mu\text{l/ml}$  microbubble and 20  $\mu\text{l/ml}$  plasmid is the optimal condition for gene transfection.

**KEY WORDS** Microbubbles; Sonoporation; Hepatocellular carcinoma; Transfection

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81350919)

作者单位:400037 重庆市,第三军医大学新桥医院超声科

通信作者:卓忠雄, Email: zzz64120@163.com

原发性肝癌发病率居于恶性肿瘤前列,其侵袭性强且预后较差,至今仍缺乏有效的治疗方法,极大地威胁人类健康。Survivin 基因作为凋亡抑制蛋白家族成员,在多数肿瘤中过表达被认为是理想的抗癌治疗靶点。基因治疗的关键技术之一是如何高效地靶向运输外源基因<sup>[1-2]</sup>。超声靶向破坏微泡(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)通过运输造影剂微泡,特异性提高基因转运效率,提高基因治疗的疗效<sup>[3-4]</sup>。本实验在成功构建 pcDNA6.2-GW/EmGFP 重组质粒及前期参数优化研究的基础上,将重组质粒导入人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞,探索获得最优转染效率及较低细胞死亡率时的超声微泡浓度和质粒浓度,并在最优条件转染时检测 shRNA 阳性重组质粒对 Survivin 基因的抑制效率。

### 材料与方 法

#### 一、主要试剂与仪器

pcDNA6.2-EmGFP 重组质粒和 Lipofectamine2000 (美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(FBS)、DMEM 高糖型培养基和胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),DMSO(美国 Sigma 公司),ab93274 鼠抗人 Survivin 单克隆抗体(美国 Abcam 公司),去内毒素质粒抽提试剂盒(北京天根公司),台盼蓝和台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒(上海碧云天公司),脂氟显微泡造影剂(新桥医院超声科实验室自制)。1 MHz Acuson 超声治疗仪(德国 Metron 公司),核酸仪 Nanodrop(美国 Thermo 公司),FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

#### 二、细胞培养

人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞株购于 ATCC 细胞库,常规培养于含 10%FBS 的高糖型 DMEM 培养基,置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 的孵箱。取对数生长期的细胞,以 1×10<sup>5</sup>/ml 浓度交叉间隔接种,待单层细胞覆盖于培养板底部时,进行后续实验。

#### 三、重组质粒构建、抽提与鉴定

根据生物信息学分析<sup>[5]</sup>,选择针对靶基因 Survivin (NM\_001168) 外显子的 siRNA 序列:5'-GGACCACC

GCAUCUCUACAdTdT-3', 构建 shRNA(表 1),并与 pcDNA6.2-EmGFP 质粒合成阳性重组质粒,同时基于此 shRNA 序列,构建非同源阴性重组质粒。分别挑取单菌落并置于 37 ℃、250 r/min 孵箱内扩增 12~16 h,提取质粒进行测序鉴定。

#### 四、实验分组

将脂氟显安瓿瓶置于机械振荡器中,以 4500 次/min 的速率充分振荡 2~3 min,获得新鲜制备的脂氟显微泡悬液。直径 2~8 μm 的微泡以密度约 5×10<sup>8</sup> 均匀分布。选择生长状态优良的人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞,分别加入不同量的阴性重组质粒及脂氟显微泡混合孵育,随后进行超声辐照。使用超声治疗仪(强度 1.2 W/cm<sup>2</sup>,占空比 20%)将探头紧贴涂布耦合剂的培养板底部,分别辐照各组细胞 90 s,将辐照后的细胞放入培养箱,6 h 后换液(各实验操作分别重复 3 次)。具体分组如下:①空白对照组:不加入质粒和脂氟显微泡;②实验组:根据阴性重组质粒的不同终浓度将其分为 6 组:5 μl/ml、10 μl/ml、15 μl/ml、20 μl/ml、25 μl/ml 及 30 μl/ml,向各实验组分别加入脂氟显微泡,设置 6 个微泡浓度梯度:50 μl/ml、100 μl/ml、150 μl/ml、200 μl/ml、250 μl/ml 及 300 μl/ml;共计 36 个亚组。

#### 五、检测重组质粒转染率

超声辐照 48 h 后,荧光显微镜观察各组绿色荧光蛋白(GFP)的表达。PBS 冲洗细胞 3 次,制备单细胞悬液并调整细胞密度,使用流式细胞仪定量检测 GFP 表达率,即重组质粒转染效率。

#### 六、计算细胞死亡率

超声辐照 48 h 后,使用光学显微镜观察各组细胞形态,制备并调整单细胞悬液密度。取 100 μl 按 1:1 与台盼蓝染液混匀后染色,使染液终浓度为 0.04%,3 min 后计数。细胞死亡率(%)=蓝染细胞数/细胞总数×100%。

#### 七、检测 Survivin 蛋白抑制率

选择最佳微泡浓度和质粒浓度,选取处于对数生长期的细胞,分别加入等量阳性重组质粒和阴性重组质粒,同时设置不加入任何质粒的空白对照组。超声辐照 48 h 后,提取细胞总蛋白,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min

表 1 干扰序列信息

名称	序列信息
目的基因 F	5'-TGCTGGGACCACCGCATCTCTACAGTTTTGGCCACTGACTGACTGTAGACAGGTGGTCC-3'
目的基因 R	5'-CCTGGGACCACCGTCTCTACAGTCACTGAGTGGCCAAAACGTAGAGATGCGGTGGTCCC-3'
阴性对照 F	5'-TGCTGAAATGTAAGTGGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACTGCTCCACGCAGTACATTT-3'
阴性对照 R	5'-CCTGAAATGTAAGTGGCGTGGAGACGTCAGTCACTGAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTT-3'

后取上清液,BCA 法定量测定蛋白浓度。分别加入 50 μg 蛋白到4%~12%Bis-Tris 预制胶上样孔内,恒压 200 V 电泳分离 40~50 min。30 V 转膜 1 h 后孵育抗体。将现配 ECL 显色液覆盖 PVDF 膜,凝胶成像仪曝光显影及分析处理。

### 八、统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较和分析交互效应采用单因素方差分析和析因分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、重组质粒的构建

重组质粒经基因测序结果表明,目的片段已插入 pcDNA6.2-GW/EmGFP 质粒载体。

### 二、GFP 转染效率

荧光显微镜下随机选择视野观察,对照组未见 GFP 荧光表达,其他实验组 GFP 荧光表达量各不相同。流式细胞仪定量检测结果显示,与对照组比较,各实验组基因转染率均增加,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见图 1。

不同质粒浓度和微泡浓度时的基因转染率见表 2。当质粒浓度为 20 μl/ml,微泡浓度为 150 μl/ml 时,基因转染效率最高。微泡浓度和质粒浓度作为主因素进行析因分析,结果显示差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两

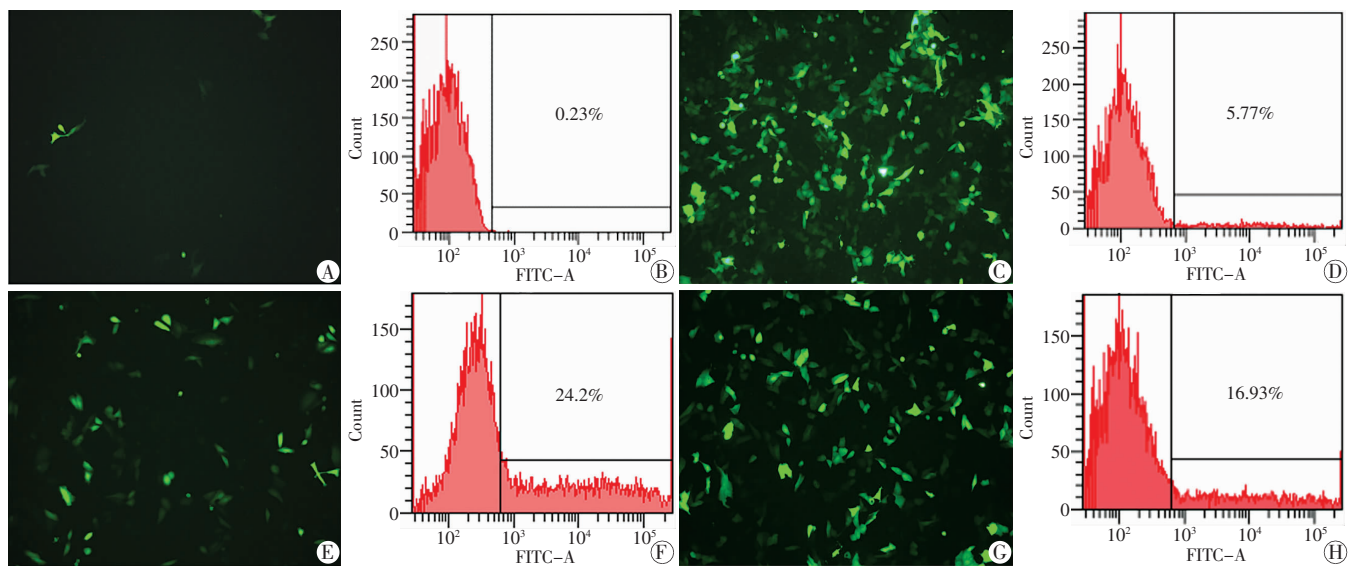


图 1 不同微泡浓度和质粒浓度时 GFP 表达效果

者存在交互效应( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 3。

### 三、细胞死亡率

质粒浓度一定时,低浓度微泡组(50 μl/ml 和 100 μl/ml)细胞生长状态良好,未见明显悬浮死亡细胞;高浓度微泡组(250 μl/ml 和 300 μl/ml)细胞状态较低浓度差,培养液中可见不等量悬浮死亡细胞。台盼蓝染色结果显示,高微泡浓度组内蓝染细胞数目较低微泡浓度组增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。不同质粒浓度和微泡浓度时的细胞死亡率见表 4。当微泡浓度一定时,各质粒浓度实验组内蓝染细胞数增加不明显,细胞死亡比较率差异无统计学意义。析因分析结果显示,微泡浓度与质粒浓度之间不存在交互效应,质粒浓度的变化不会影响细胞死亡率,差异无统计学意义。见表 5。

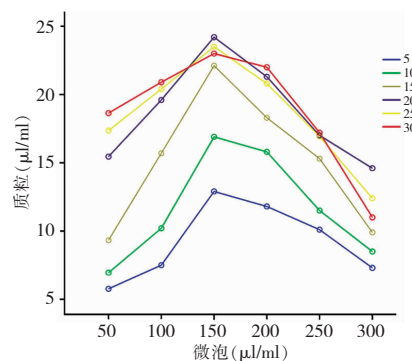


图 2 两因素交互作用轮廓图

### 四、Survivin 蛋白抑制率

Western blot 检测结果显示,阳性重组质粒组蛋白条带浓度浅于阴性重组质粒组和对照组,说明 HepG2 细胞中 Survivin 蛋白被有效抑制。见图 3。

表 2 不同质粒和微泡浓度时的基因转染率

%

微泡浓度(μl/ml)	质粒浓度(μl/ml)					
	5	10	15	20	25	30
50	5.77±0.47	6.95±1.57	9.33±0.78	15.45±2.01	17.36±2.88	18.64±2.11
100	7.50±0.29	10.20±2.06	15.70±0.61	19.60±1.60	20.40±1.42	20.90±0.74
150	12.90±1.19	16.90±1.25	22.11±0.92	24.20±1.23	23.50±2.24	23.00±2.54
200	11.80±0.30	15.80±0.91	18.30±1.05	21.30±0.82	20.80±0.93	22.00±2.16
250	10.10±0.66	11.50±1.12	15.30±1.82	17.00±0.59	16.93±1.84	17.20±1.42
300	7.30±1.28	8.50±2.25	9.90±1.60	14.60±1.38	12.40±2.31	11.00±0.94

表 3 微泡浓度和质粒浓度对基因转染率影响的析因分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
质粒浓度	5	1588.085	317.617	634.881	0.000
微泡浓度	5	1297.576	259.515	518.742	0.000
微泡浓度×质粒浓度	25	228.392	9.136	18.261	0.000

### 讨 论

超声造影剂微泡主要由脂质外壳填充高分子惰性气体构成,具有稳定、易降解的优点<sup>[6]</sup>,常规用于超声临床功能成像诊断。近年来,超声造影剂微泡应用于肿

表 4 不同质粒和微泡浓度时的细胞死亡率

%

微泡浓度(μl/ml)	质粒浓度(μl/ml)					
	5	10	15	20	25	30
50	10.80±1.25	10.7±1.88	10.5±0.62	10.5±1.62	11.5±0.86	11.70±2.27
100	11.20±0.95	11.7±0.95	12.4±1.45	12.4±2.11	12.0±1.43	11.80±1.09
150	13.40±2.33	13.9±0.91	13.8±2.01	13.8±1.38	13.8±1.27	13.10±0.82
200	23.48±1.57	24.0±1.59	24.5±1.84	24.5±0.85	24.3±1.74	24.40±0.77
250	35.50±1.89	34.7±1.61	34.4±0.66	34.4±2.49	33.6±2.37	34.40±2.54
300	45.30±2.44	45.4±2.11	44.4±1.74	44.4±0.95	44.4±2.42	45.77±3.14

表 5 微泡浓度和质粒浓度对细胞死亡率影响的析因分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
质粒浓度	5	0.780	0.156	0.043	0.999
微泡浓度	5	17459.560	3491.912	959.313	0.000
微泡浓度×质粒浓度	25	21.074	0.843	0.232	0.000

异性基因输送,得到了良好的治疗效果,且治疗安全、高效、无创<sup>[8-9]</sup>。其基本原理主要是瞬时空化和声孔效应。微泡溶解于液体中形成空化核,并在超声波传播的正、负压力区内交替拉伸膨胀和迅速收缩,最终在剪切力的作用下崩塌,以冲击波的形式瞬间释放高达百兆的压力,称为瞬时空化过程。瞬态空化释放的冲击波诱发“声孔效应”,可损伤血管内皮细胞,促进毛细血管血栓形成,阻断肿瘤细胞血液供应;同时暂时性增加细胞膜的通透性,诱导局部细胞膜可逆性开放,促进 DNA 细胞内传送。

目前,UTMD 常与 RNAi 技术联合使用。RNAi 技术作为基因治疗的新兴技术,可诱导肿瘤细胞内特定基因沉默,具有高效低毒的特点,在肿瘤研究中具有重要应用价值。Li 等<sup>[10]</sup>成功将热休克蛋白 HSP70-shRNA 与 HTERT/CMV 启动子质粒嵌合,证实 UTMD 与低剂量的脂质体可促进重组质粒转染前列腺癌 22RV1 细胞,具有较低细胞毒性。Han 等<sup>[11]</sup>研究表明,采用 UTMD 作为输送系统,可以提高肝癌细胞内 siRNA 转染效率,诱导靶基因 mRNA 降解,沉默肿瘤相关因子 NET-1。Chen 等<sup>[12]</sup>种植人宫颈癌 HeLa 细胞于裸鼠皮下,尾静脉注入 shRNA 重组质粒和声诺维微泡,超声

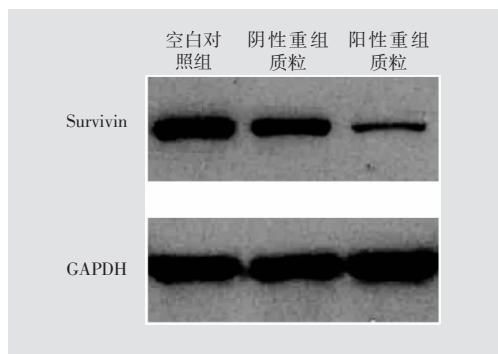


图 3 Survivin 蛋白 RNA 干扰效果图

瘤治疗的靶向研究,取得了不同程度的进展<sup>[7]</sup>,其作为基因载体,主要通过静电作用、与外壳非共价结合连接、整合于微泡内部获双分子层间等方式与特异性基因连接,从而携带核苷酸、DNA 片段,甚至整个染色体。UTMD 通过定向破坏微泡,释放所携带的基因,增加特

辐照肿瘤后发现, 治疗组 Survivin 和 bcl-2 的表达得到有效下调, 促进肿瘤细胞凋亡, 明显抑制瘤体的生长。

本实验首先设计 shRNA 序列, 与 pcDNA6.2-GW/EmGFP 构建阳性重组质粒和阴性重组质粒, 通过观察基因增强型 GFP 的表达, 检测重组质粒转染效率, 以及基因测序证实插入序列与设计吻合。在前期优化超声辐照参数研究的基础上, 尝试寻找最佳质粒浓度和微泡浓度, 以达到提高基因转染率, 减少细胞损伤的最终目的, 同时节约质粒、微泡的用量, 这也是临床应用载基因微泡前亟待解决的问题。本实验结果表明, 超声辐照微泡可以有效介导基因转染, 在相同的超声辐照下, 微泡浓度和质粒浓度对基因转染率和细胞死亡率具有不同影响。随着微泡浓度的增加, 细胞死亡率呈上升趋势, 这可能与细胞膜损伤加重或不能及时修复有关。在一定范围(150  $\mu\text{l/ml}$ )内增加微泡浓度, 基因转染率明显增加, 其原因可能是超声微泡浓度的增加, 导致单位体积液体中空化核数目增加, 降低空化效应阈值, 同时缩小微泡与细胞间的距离, 更有利于空化效应作用, 从而增加基因转染率。但继续增加微泡浓度, 基因转染率却呈现下降趋势, 原因可能是高浓度微泡产生高强度空化效应, 提高了细胞死亡率。当微泡浓度一定时, 随着质粒浓度的增加, 细胞死亡率比较差异无统计学意义, 基因转染率随质粒浓度增加而增加( $P<0.05$ ); 但当质粒浓度超过 20  $\mu\text{l/ml}$  时, 各质粒浓度比较差异无统计学意义, 表明载基因量未饱和时, 提高质粒浓度可使微泡携带更多质粒进入细胞, 提高基因转染效率。

Survivin 基因参与控制细胞有丝分裂, 与肿瘤细胞增殖、转移密切相关。本实验通过 UTMD 实现稳定转染, 达到靶向稳定抑制靶基因表达, 减弱肿瘤细胞的抗凋亡能力, 发挥抗癌功效。在达到优化转染条件目的后, 本实验设立阳性重组质粒组和阴性重组质粒组, Western blot 检测结果显示阳性重组质粒组 Survivin 蛋白表达量明显低于阴性重组质粒组, 从蛋白水平证实效应片段已被成功导入细胞内, 且阳性重组质粒组中的效应 shRNA 可高效抑制靶基因表达, 为后续实验奠定基础。

综上所述, 本实验通过优化微泡浓度和质粒浓度, 达到最高转染基因转染率和较低细胞死亡率, 同时从蛋白水平验证针对靶基因 shRNA 的抑制效力, 为后续提高基因转染率的相关研究奠定基础。但本实验仅着眼于体外培养的细胞, 而动物体内具有复杂生物系统, 各

参数将受到更复杂的影响, 相关研究还需进一步探索。

#### 参考文献

- [1] Lim EJ, Heo J, Kim YH. Tunicamycin promotes apoptosis in leukemia cells through ROS generation and downregulation of survivin expression[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(8): 1087-1098.
- [2] Brun SN, Markant SL, Esparza LA, et al. Survivin as a therapeutic target in sonic hedgehog-driven medulloblastoma [J]. *Oncogene*, 2014, 34(29): 3770-3779.
- [3] Kwekkeboom RF, Lei Z, Bogaards SJ, et al. Ultrasound and microbubble-induced local delivery of MicroRNA-based therapeutics[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2015, 41(1): 163-176.
- [4] Li Y, Zhou Y, Zheng J, et al. Downregulation of survivin inhibits proliferation and migration of human gastric carcinoma cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1731-1736.
- [5] Paduano F, Villa R, Pennati M, et al. Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(1): 179-186.
- [6] Bian AN, Gao YH, Tan KB, et al. Preparation of human hepatocellular carcinoma-targeted liposome microbubbles and their immunological properties[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(23): 3424-3427.
- [7] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology[J]. *Int J Pharm*, 2008, 354(12): 49-55.
- [8] Zheng X, Du L, Wang H, et al. A novel approach to attenuate proliferative vitreoretinopathy using ultrasound-targeted microbubble destruction and recombinant adeno-associated virus-mediated RNA interference targeting transforming growth factor-beta2 and platelet-derived growth factor-B[J]. *J Gene Med*, 2012, 14(5): 339-347.
- [9] Zhang Y, Chang S, Sun J, et al. Targeted microbubbles for ultrasound mediated short hairpin RNA plasmid transfection to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis of ovarian cancer A2780/DDP cells[J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(9): 133-138.
- [10] Li YH, Jin LF, Du LF, et al. Enhancing HSP70-ShRNA transfection in 22RV1 prostate cancer cells by combination of sonoporation, liposomes and HTERT/CMV chimeric promoter[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1): 151-158.
- [11] Han X, Cheng W, Jing H, et al. Neuroepithelial transforming protein 1 short interfering RNA-mediated gene silencing with microbubble and ultrasound exposure inhibits the proliferation of hepatic carcinoma cells in vitro[J]. *J Ultrasound Med*, 2012, 31(6): 853-861.
- [12] Chen Z, Liang K, Liu J, et al. Enhancement of survivin gene downregulation and cell apoptosis by a novel combination: liposome microbubbles and ultrasound exposure[J]. *Med Oncol*, 2009, 26(4): 491-500.

(修回日期: 2016-05-15)