doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.025

宫颈癌组织中的 PTEN, VEGF 和 CD105 的表达及临床意义

陈 舒[1] 罗 新[1] 帅翰林[1] 周 宏[1] 梁耀中[2]

（1 暨南大学附属第一医院妇产科 广东 广州 510630；2 暨南大学附属第一医院骨科 广东 广州 510630）

摘要 目的：探讨宫颈癌组织中的人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因（PTEN）、血管内皮生长因子（VEGF）和内皮因子（CD105）的表达及临床意义。**方法：**收集 2010 年 1 月至 2016 年 2 月我院收治的宫颈癌患者组织标本 320 例和同期正常宫颈组织标本 100 例，采用 SP 免疫组化法检测宫颈癌和正常宫颈组织中的 PTEN、VEGF 和 CD105，分析各指标在宫颈癌、正常宫颈组织及不同类型宫颈癌组织中的表达，并采用 Sperman 分析三者相关关系。**结果：**宫颈癌组织 VEGF 阳性率、CD105-MVD 高于正常宫颈组织，而 PTEN 阳性率低于正常宫颈组织，差异均有统计学意义（P<0.05）；宫颈癌组织 FIGO 分期Ⅰ~Ⅱ期的 VEGF 阳性率、CD105-MVD 低于Ⅲ~Ⅳ期，而 PTEN 阳性率高于Ⅲ~Ⅳ期；宫颈癌组织伴有淋巴结转移的 VEGF 阳性率、CD105-MVD 高于无转移，而 PTEN 阳性率低于无转移，差异均有统计学意义（P<0.05）；Sperman 相关性显示 VEGF 与 PTEN，CD105-MVD 与 PTEN 呈现明显的负相关关系（rs=-0.564，-0.893，P<0.05），VEGF 与 CD105-MVD 呈现正相关关系（rs=0.825，P<0.05）。**结论：**PTEN 在宫颈癌组织表达降低，CD105 和 VEGF 升高，三个指标在宫颈癌的发生、发展、转移及预后中具有重要作用。

关键词：宫颈癌；PTEN；VEGF；CD105；临床意义

中图分类号：R737.33 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2017)09-1696-04

Expression of the PTEN, VEGF and CD105 in Cervical Cancer Tissues and its Clinical Significance

CHEN Shu[1], LUO Xin[1], SHUAI Han-lin[1], ZHOU Hong[1], LIANG Yao-zhong[2]

(1 Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, 510630, China; 2 Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, 510630, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression of the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial factors (CD105) in cervical cancer tissues and its clinical significance. **Methods:** 320 cases of cervical cancer tissue specimens and 100 cases of normal cervical tissue specimens in our hospital from January 2010 to February 2016 were selected, the PTEN, VEGF and CD105 in cervical cancer and normal cervical tissues were detected by SP immunohistochemical method. The expression of each index in the cervical cancer tissues, normal cervical tissues and different types of cervical cancer tissues were analysed. And Sperman was used to analyz the relationship between the three. **Results:** The positive rate of VEGF and CD105-MVD of cervical cancer tissues were higher than normal cervical tissues, and the positive rate of PTEN was lower than that of normal cervical tissues, the difference was statistically significant (P<0.05). The positive rate of VEGF and CD105-MVD of FIGO stage I ~ II of cervical cancer tissues were lower than FIGO stage Ⅲ~Ⅳ, and the positive rate of PTEN was higher than FIGO stage Ⅲ~Ⅳ. The positive rate of VEGF and CD105-MVD with lymph node transfer of cervical cancer tissues were higher than no transfer, and the positive rate of PTEN was lower than no transfer,the difference was statistically significant (P<0.05); The Sperman correlation display, VEGF and PTEN, CD105-MVD and PTEN showed a significant negative correlation (rs=-0.564, -0.893, P<0.05), and the VEGF showed a positive correlation with CD105-MVD (rs=0.825, P<0.05). **Conclusion:** The decrease of expression of PTEN and the increase of CD105 and VEGF in cervical cancer tissue show indicating that these three indicators play an important role in the occurrence, development, metastasis and prognosis of cervical cancer.

Key words: Cervical cancer; PTEN; VEGF; CD105; Clinical significance

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)09-1696-04

前言

宫颈癌是妇科常见恶性肿瘤，宫颈癌具有较高的发病率，并且发病年龄逐渐年轻化，严重的威胁人们的生活质量和生命安全[1]。研究表明宫颈癌的发生发展是由各种高危因素和致癌因子共同作用的结果，而其中肿瘤的侵袭转移较为复杂，涉及到多种基因以及产物的作用，肿瘤的生长涉及到新生血管生成，并且肿瘤细胞生成的多种细胞因子促进肿瘤血管生成，但是肿瘤变化是一个长期的过程，因此寻找具有特异性的指标早发现、早诊断、早治疗宫颈癌，对于降低其发病率至关重要[2]。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor,VEGF）是目

作者简介：陈舒（1983-），女，博士，主治医师，从事妇科肿瘤及妇科内分泌方面的研究，E-mail：chenshcsu123@163.com

(收稿日期：2016-12-03 接受日期：2016-12-21)

前临床已知作用最强的促血管因子，直接参与肿瘤血管的生成[3]；人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因（phosphate and tensin homology deleted on chromose ten，PTEN）是一种肿瘤抑制基因，研究发现PTEN表达可能与肿瘤的发生、发展具有密切关系。CD105是一种二聚体糖蛋白，参与内皮细胞上TGF-e 1的信息转导，可能促进肿瘤的增长和转移[4]。本文通过收集我院320例宫颈癌组织标本，探讨PTEN、VEGF和CD105在宫颈癌组织中的表达及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2010年1月至2016年2月我院的住院宫颈癌患者标本320例，纳入标准：① 患者通过影像学诊断和病理切片确诊。② 能够搜集到患者完整的病例资料，患者均经过根治性手术治疗。③ 研究经过伦理委员会批准，并且经过患者知情同意。排除标准：① 患者病理类型、分期诊断不明确及患有其他恶性肿瘤者。② 患者术前接受过化疗治疗。③ 不依从、不配合、容易产生失访及可能拒绝参加试验者。④ 患者为死亡病例，具有明显的偏倚者。320例患者年龄20~75岁，平均(46.52± 2.48)岁，病理分型：鳞癌225例，腺癌66例，混合癌29例；宫颈癌病变类型：结节型160例、菜花型102例、溃疡型58例。分化程度：高分化80例、中分化150例、低分化90例。宫颈癌按FIGO分期[5]：期20例、Ⅱa期45例、Ⅱb期79例、Ⅲ期109例、Ⅳ期67例，其中具有淋巴结转移102例，无淋巴结转移218例。正常宫颈组织取同期良性子宫肌瘤手术切除患者100例，年龄22~76岁，平均(45.89± 3.46)岁，宫颈癌组织和正常宫颈组织年龄经比较后无统计学差异(P>0.05)。

1.2 实验试剂与仪器

试剂：VEGF多克隆抗体(兔抗人，南京建成生物工程研究所)、CD105单克隆抗体(鼠抗人，艾美捷科技有限公司)、PTEN多克隆抗体(兔抗人，南京建成生物工程研究所)、SP免疫组化试剂盒(欣博盛生物科技有限公司)。仪器：石蜡切片机、Olympus倒置光学显微镜、微量加样器、-20℃及-80℃冰箱、不锈钢高压锅或电炉或微波炉等。

1.3 研究方法

1.3.1 SP免疫组化法 ① 脱蜡和水化：开始脱蜡前组织芯片在室温放置60 min后，连续采用二甲苯侵泡20 min，分2次，接着置于无水乙醇5 min，然后采用福尔马林固定和石蜡包埋组织芯片，贴附于经过APES处理的防脱磨砂玻片，置于-70℃恒温孵育器孵育2h，之后进行免疫组化学染色。② 免疫组化学染色：提前配好PBS缓冲液、柠檬酸抗原修复液、1%盐酸酒精；将组织片放在三个二甲苯溶液中，依次侵泡15 min后，再进行脱蜡；再分别放入两罐无水乙醇溶液中，浸泡5 min，依次放入90%乙醇、85%乙醇、75%乙醇的玻璃瓶中，每瓶浸泡2 min，再用自来水、蒸馏水清洗，完成水化过程；③ 抗原修复和封闭内源性过氧化氢酶：将切片浸入1× 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中，高压煮沸后继续加热2 min，停止加热让切片自然冷却；再放入3% H_2O_2溶液的玻璃瓶中，浸泡15 min后用蒸馏水清洗，重复3次，然后放入PBS缓冲液的玻璃瓶中，浸泡5 min。④ 抗体杂交：将PBS余液甩掉，湿盒中平辅好组织片，加入1滴20 μL正常山羊血清，置于28℃中20 min，甩干；加1滴稀释好的一抗，置于湿盒4℃过夜，放入PBS缓冲液的玻璃瓶中缓慢振荡清洗5 min。生物素偶联的二抗20~50 μL，放置湿盒，37℃放置20 min。⑤ 显色：加链亲和素-辣根过氧化物酶20~50 μL，湿盒内28℃放置5~20 min，甩干、放入PBS缓冲液的玻璃瓶中，缓慢振荡清洗5 min，替换PBS缓冲液，重复操作3次，甩干、滴加100 μL新鲜配制的DAB工作液(覆盖组织即可)，放置观察反应部位为黄褐色时（3~5 min），放入自来水玻璃缸中清洗3次。⑥ 复染：置于苏木精溶液里复染5 min，反复自来水冲洗直至水不变色，接着采用酸酒精分化2 s，反蓝水洗2 min。⑦ 脱水、透片及封片：置入95%乙醇溶液，侵泡5 min，无水乙醇2次，每次5 min，再放入二甲苯的溶液中，侵泡5 min，滴加适当中性树胶，封片，晾干。

1.3.2 结果判断[6] ① VEGF和PTEN免疫组化结果判定：定性定量指标为免疫显色强度和阳性细胞密度，染色强度评分：0(无染色)，1(弱染色)，2(中染色)，3(强染色)。肿瘤细胞阳性率评分：0分（0~9%)，1分（10%~25%)，2分（26%~50%)，3分(51%~75%)，4分(76%~100%)，切片评分值=染色强度评分*阳性细胞率评分；阳性细胞百分率：每个高倍镜(400×)随机抽取10个视野，每个视野计数100个，计算平均百分率，0分(<9%)，1分(10%~25%)，2分(26%~50%)，3分(>50%)；根据染色和阳性率评分将VEGF和PTEN免疫组化结果结合分为4级：阴性为0分，弱阳性为2分，阳性为3~4分，强阳性为5~6分。② CD105免疫组化结果判断方法：采用Weidner法测定CD105蛋白标记物肿瘤组织微血管密度（Microvessl Density，MVD)，低倍镜观察切片确认MVD最高处，高倍镜下计数3个视野微血管术，该切片的MVD值等于其平均值。

1.4 统计学方法

采用SPSS13.0软件进行统计分析，计量资料以均值± 标准差($\bar{x}$± s)表示，符合正态分布且方差齐性的数据行组间的t检验；计数资料用率(%)表示，采用卡方检验；采用Sperman分析相关性。以P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF、PTEN及CD105-MVD在正常宫颈组织、宫颈癌组织的表达比较

宫颈癌组织中VEGF阳性率74.06%(237/320)高于正常宫颈组织的24.00%(24/100)，宫颈癌组织中PTEN阳性率57.19%(183/320）低于正常宫颈组织的100.00%(100/100)，差异均具有统计学意义（P<0.05)；宫颈癌组织CD105-MVD为(29.8± 2.3)，高于正常宫颈组织的(1.2± 0.9)，差异具有统计学意义(t=5.273，P=0.019)，见表1。

2.2 VEGF、PTEN及CD105-MVD在不同疾病类型比较

VEGF FIGO分期Ⅰ~Ⅱ期阳性率为69.4%(100/144）低于Ⅲ~Ⅳ期阳性率99.8%(175/176)，PTEN FIGO分期Ⅰ~Ⅱ期阳性率52.1%(75/144）高于Ⅲ~Ⅳ期阳性率19.3%(34/176)，VEGF淋巴结转移患者阳性率90.2%(92/102)高于无转移阳性率53.7%(117/218)，PTEN淋巴结转移患者阳性率14.7%(15/102)低于无转移阳性率70.6%(154/218)，差异具有统计学意义(P<0.05)；FIGO分期Ⅰ~Ⅱ期CD105-MVD低于Ⅲ~Ⅳ期，而伴有淋巴结转移的CD105-MVD高于无转移，差异具有统计学意义(P<0.05)；VEGF、PTEN及CD105-MVD在年龄、分化程度、组织类型和病变类型比较差异较小，无统计学意义(P>0.05)，见表2。

表 1 VEGF、PTEN 在正常和癌组织中免疫组化结果

Table 1 Immunohistochemical results of VEGF and PTEN in normal and cancer tissues

Groups	n	VEGF					PTEN				
		Negative	Weakly positive	Positive	Strong positive	Positive rate(%)	Negative	Weakly positive	Positive	Strong positive	Positive rate(%)
Cervical cancer tissue	320	83	102	115	20	74.06	137	89	67	27	57.19
Normal cervical tissue	100	76	19	5	0	24.00	0	20	33	47	100.0
x^2	-	-	-	-	-	4.675	-	-	-	-	4.728
P	-	-	-	-	-	0.023	-	-	-	-	0.020

表 2 宫颈癌组织中 VEGF、PTEN 及 CD105-MVD 在不同疾病类型比较

Table 2 Comparison of VEGF, PTEN and CD105-MVD in different disease types in cervical cancer

Pathologic features		Cases	VEGF				PTEN				CD105-MVD
			Positive	Negative	x^2	P	Positive	Negative	x^2	P	
Age(year)	≤ 50	189	132	57	0.788	0.234	98	91	0.786	0.217	30.4± 2.7
	>50	131	92	39			67	64			31.2± 3.9
FIGO stages	Ⅰ~Ⅱ	144	100	44	5.897	0.008	75	69	4.123	0.019	25.8± 2.7*
	Ⅲ~Ⅳ	176	175	1			34	142			32.5± 3.1
Degree of differentiation	Well-differentiation	80	49	31	0.587	0.453	37	43	0.687	0.321	29.3± 2.4
	Middle differentiation	150	120	30			68	82			30.4± 3.5
	Poorly differentiation	90	81	9			43	47			30.8± 2.6
Organization type	Adenocarcinoma	66	52	14	0.897	0.129	21	45	0.572	0.451	29.6± 5.2
	Squamous cell carcinoma	225	170	55			120	105			31.2± 3.0
	Mixed carcinoma	29	15	14			14	15			30.7± 2.4
Lymph gland	Transfer	102	92	10	3.889	0.027	15	57	3.885	0.034	36.8± 4.1#
	No transfer	218	117	101			154	64			26.5± 3.5
Lesion type	Nodular type	160	123	37	0.745	0.209	87	73	0.723	0.237	31.3± 5.5
	Cauliflower type	102	80	22			40	62			32.1± 4.6
	Ulcer type	58	32	26			28	30			31.5± 3.1

Note: Compared with Ⅲ~Ⅳ period, *P<0.05; Compared with No transfer, #P<0.05.

2.3 VEGF、PTEN 及 CD105-MVD 三者相关性分析

经过 Sperman 相关性分析显示，VEGF 与 PTEN，CD105-MVD 与 PTEN 呈现明显的负相关关系（rs=-0.564，-0.893，P<0.05），VEGF 与 CD105-MVD 呈现正相关关系（rs=0.825，P<0.05），见表 3。

表 3 VEGF、PTEN 及 CD105-MVD 三者相关性（rs/P 值）

Table 3 The three correlation of VEGF, PTEN and CD105-MVD

Indexes	VEGF	PTEN	CD105-MVD
VEGF	-	-0.564/0.041	0.825/0.031
PTEN	-	-	0.893/0.019
CD105-MVD	-	-	-

3 讨论

宫颈癌的发病率位居女性生殖系统首位，严重危害健康，对于大部分癌症来讲，癌基因激活与抑癌基因的失活是癌症发生最为主要的机制，其中包括复杂的新生血管的生成，细胞间质等各种因子或者基因表达的变化[7]，其中宫颈癌组织中血管生长因子与抑制因子表达失衡，血管生长因子没有任何规律的生长，血管生长浸透入宫颈癌中便产生浸润[8]，研究发现目前可以早期通过筛检或者特异性指标发现宫颈癌或者宫颈上皮瘤变，因此早发现、早治疗比较重要[9]。宫颈癌通过新生血管生长，通过淋巴转移绵延，因此临床设想通过抗肿瘤血管靶向治疗对于控制宫颈癌病情至关重要，抗肿瘤血管治疗也是目前宫颈癌

治疗的新方向,并且目前研究从分子及基因方向探讨治疗效果[10],并且对于不同病情患者采用抗血管因子相关药物联合基因药物治疗可能效果会更加显著[11],提高患者生活质量。

本文通过收集 320 例宫颈癌患者，采用 SP 免疫组化法检测 VEGF、PTEN 及 CD105 的表达，结果显示 VEGF 在癌组织中阳性率高于正常组织，并且患者病情越严重及转移性越高 VEGF 阳性表达越高，由于 VEGF 是一种促进血管生成因子，并且是特异性血管内皮细胞因子,因此 VEGF 参与肿瘤血管形成和癌症细胞的转移等过程，大量研究表明 [12,13] 肿瘤组织中 VEGF 表达水平较高，与本文研究结果一致，临床研究 VEGF 具有刺激血管内皮细胞发生有丝分裂以及迁移,促进血管形成和细胞迁移,此外还具有增加血管通透性作用,作用于毛细血管后静脉和小静脉,引起血红蛋白外渗到细胞外基质,为成纤维细胞核血管内皮细胞迁入提供条件,是最强的额血管渗透因子[14],还有研究发现 VEGF 具有抑制肿瘤细胞凋亡及免疫抑制等作用[15]。PTEN 在癌组织中阳性率低于正常组织,并且早期宫颈癌及淋巴转移性小的组织中低表达,PTEN 是一种肿瘤抑制基因,具有蛋白磷酸酶活性,抵抗细胞增殖,促进细胞凋亡等作用,并且在维持免疫系统稳定性中发挥重要作用,因此 PTEN 低表达促进肿瘤生长,高表达抑制肿瘤生长[15,16],但是有研究发现 PTEN 低表达或者不表达与宫颈癌的侵袭有关,是为非独立影响宫颈癌患者预后因素,与本文研究结果吻合[17,18]。癌组织 MVD 平均值高于正常组织,说明正常组织低表达或者不表达,肿瘤组织中高表达,因此 CD105 高表达与肿瘤生长、发育关系密切,CD105 可作为宫颈癌患者新生血管的标志物[19]。三者关系分析显示 VEGF 与 PTEN,CD105-MVD 与 PTEN 呈现明显的负相关关系($P<0.05$),VEGF 与 CD105-MVD 呈现正相关关系($P<0.05$),近年来有关 CD105 对恶性肿瘤诊断、治疗及评估价值的研究逐渐增靶向治疗恶性肿瘤是一种新途径，并且 VEGF 与 PTEN,CD105-MVD 与 PTEN 及 VEGF 与 CD105-MVD 之间可以联合检测作为判断癌症侵袭能力的客观指标[20],对判断患者治疗预后具有重要指导意义。

综上所述,PTEN 在宫颈癌组织表达降低,CD105 和 VEGF 升高,说明这三个指标在宫颈癌的发生、发展、转移及预后中具有重要作用,可以作为临床早期预判和临床治疗效果的重要方向,但是疾病变化复杂,所有还需要更加深层长期研究。

参 考 文 献(References)

[1] Herboltová P, Roztočil A. Sexual morbidity of cervical carcinoma survivors[J]. Ceska Gynekol, 2016, 81(5): 349-354

[2] Park H, Lee M, Kim DW, et al. Glycogen synthase kinase 3β and cyclin D1 expression in cervical carcinogenesis [J]. Obstet Gynecol Sci, 2016, 59(6): 470-478

[3] Assad DX, Elias ST, Melo AC, et al. Potential impact of mTOR inhibitors on cervical squamous cell carcinoma: A systematic review [J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 4107-4116

[4] Grsic K, Opacic IL, Sitic S, et al. The prognostic significance of estrogen receptor β in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3861-3865

[5] Chiou WY, Chen CA, Lee MS, et al. Pelvic inflammatory disease increases the risk of a second primary malignancy in patients with cervical cancer treated by surgery alone [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(47): e5409

[6] Wang JY, Wang Y, Meng X. Chitosan Nanolayered Cisplatin-Loaded Lipid Nanoparticles for Enhanced Anticancer Efficacy in Cervical Cancer[J]. Nanoscale Res Lett, 2016, 11(1): 524

[7] Smith B, McCann GA, Phillips G, et al. Less radical surgery for early-stage cervical cancer: Can conization specimens help identify patients at low risk for parametrial involvement?[J]. Gynecol Oncol, 2016, S0090-8258(16): 31598-31600

[8] Yan S, Li X, Jin Q, et al. MicroRNA-145 sensitizes cervical cancer cells to low-dose irradiation by downregulating OCT4 expression[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(5): 3130-3136

[9] Yang J, Dai LX, Chen M, et al. Inhibition of antiviral drug cidofovir on proliferation of human papillomavirus-infected cervical cancer cells[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(5): 2965-2973

[10] Omarniyaz Z, Yu Y, Yang T, et al. Anti-tumor effects of Abnormal Savda Munziq on the transplanted cervical cancer (U27) mouse model [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1): 477

[11] Dixit J, Mohammed N, Shetty P. Splenic Metastasis from Cancer of Uterine Cervix-a Rare Case [J]. Indian J Surg Oncol, 2016,7 (4): 479-483

[12] Wakewich P, Wood B, Davey C, et al. Colonial legacy and the experience of First Nations women in cervical cancer screening: a Canadian multi-community study[J]. Crit Public Health, 2016, 26(4): 368-380

[13] Zehbe I, Wood B, Wakewich P, et al. Teaching tools to engage Anishinaabek First Nations women in cervical cancer screening: Report of an educational workshop [J]. Health Educ J, 2016, 75(3): 331-342

[14] Perkins AC, Skinner EN. A Review of the Current Cervical Cancer Screening Guidelines[J]. N C Med J, 2016, 77(6): 420-422

[15] Rashid S, Labani S, Das BC. Knowledge, Awareness and Attitude on HPV, HPV Vaccine and Cervical Cancer among the College Students in India[J]. PLoS One, 2016,1 1(11): e0166713

[16] Huang B, Cai J, Xu X, et al. High-Grade Tumor Budding Stratifies Early-Stage Cervical Cancer with Recurrence Risk [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166311

[17] Hanprasertpong J, Jiamset I, Geater A, et al. Clinical Aspects and Prognostic Factors for Survival in Patients with Recurrent Cervical Cancerafter Radical Hysterectomy[J]. Oncol Res Treat, 2016, 39(11): 704-711

[18] Zhang F, Wang C, Cui Y, et al. Effects of Propofol on Several Membrane Characteristics of Cervical Cancer Cell Lines [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(1-2): 172-182

[19] 罗淑红, 石慧萍, 张青冬, 等.PVB 与 PF 方案对局部晚期宫颈癌 PTEN、VEGF 和 CD105 表达的影响[J].现代生物医学进展,2015,15 (16): 3100-3102,3172
Luo Shu-hong, Shi Hui-ping, Zhang Qing-dong, et al. Comparison of PVB and PF on the Expressions of PTEN, VEGF and CD105 in Advanced Cervical Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(16): 3100-3102, 3172

[20] Zakariaee R, Hamarneh G, Brown CJ, et al. Bladder accumulated dose in image-guided high-dose-rate brachytherapy for locally advancedcervical cancer and its relation to urinary toxicity [J]. Phys Med Biol, 2016, 61(24): 8408-8424