

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.20.004

兔 VX2 肺外周肿瘤超声造影特征与 CD31 和 CD34 微血管密度的相关性研究*

陆世春¹ 蒋焯^{2Δ} 符德元³ 吴丽娟² 陆振霆⁴

(1 南京大学医学院附属苏北人民医院胸外科 江苏 扬州 225001; 2 南京大学医学院附属苏北人民医院超声科 江苏 扬州 225001; 3 南京大学医学院附属苏北人民医院甲乳外科 江苏 扬州 225001; 4 南京医科大学临床医学系 江苏 南京 211166)

摘要 目的:探讨兔 VX2 肺外周肿瘤超声造影特征与 CD31 和 CD34 微血管密度的相关性研究。**方法:**15 只雌性新西兰白兔进行 VX2 肺肿瘤模型, 总共有 30 个 VX2 癌植入 15 只兔子的肺中。通过高倍镜分析不同期 VX2 肿瘤的 MVD。通过双重免疫荧光化学染色分析不同生长期 VX2 肿瘤 Ki67 和 CD31 阳性表达。分析肿瘤形态学组织病理学结果与微血管分布和 CEUS 结果之间的相关性。**结果:**随着生长周期的进展, VX2 肿瘤的 MVD 增大 ($P<0.05$)。随着生长周期的进展, VX2 肿瘤内 Ki67 和 CD31 的阳性表达率增加 ($P<0.05$)。CEUS 显示 VX2 肿瘤在早期动脉期有明显的外周增强和短暂的内部增强。肺外周 VX2 肿瘤中 PI 和 CD31 MVD 值之间呈显著正相关性 ($r=0.734, P<0.05$)。CD31 MVD 和 CD34 MVD 之间呈负相关 ($r=-0.691, P<0.05$)。PI 和 CD34 MVD 值之间不存在显著相关性 ($r=-0.412, P>0.05$)。**结论:**与 CD34 MVD 相比, CD31 MVD 可以更有效地评估肿瘤血管生成。CEUS 作为一种无创成像方法, 可以有效评估兔周围型肺癌的肿瘤血管生成情况。

关键词:兔 VX2; CD31; CD34; MVD; 超声造影

中图分类号:R-33; R734.2; R445.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)20-3818-05

Correlation between Rabbit VX2 Pulmonary Outer Tumors Ultrasound Contrast Characteristics and CD31 and CD34 Microvascular Density*

LU Shi-chun¹, JIANG Xuan^{2Δ}, FU De-yuan³, WU Li-juan², LU Zhen-ting⁴

(1 Department of Thoracic Surgery, Subei People's Hospital Affiliated to Nanjing University School of Medicine, Yangzhou, Jiangsu, 225001, China; 2 Department of Ultrasound, Subei People's Hospital Affiliated to Nanjing University School of Medicine, Yangzhou, Jiangsu, 225001, China; 3 Department of Nail and Breast Surgery, Subei People's Hospital Affiliated to Nanjing University School of Medicine, Yangzhou, Jiangsu, 225001, China; 4 Department of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlation between rabbit VX2 pulmonary outer peripheral tumors and CD31 and CD34 microvascular density. **Methods:** Fifteen female New Zealand white rabbits were subjected to the VX2 lung tumor model, and a total of 30 VX2 carcinomas were implanted in the lungs of 15 rabbits. The MVD of different stages of VX2 tumors was analyzed by high magnification. The positive expression of Ki67 and CD31 in VX2 tumors at different growth stages was analyzed by double immunofluorescence chemical staining. The correlations between tumor morphology and histopathology results and microvascular distribution and CEUS results were analyzed. **Results:** As the growth cycle progressed, the MVD of Vx2 tumors increased ($P<0.05$). As the growth cycle progresses, the positive expression rate of Ki67 and CD31 in Vx2 tumors increased ($P<0.05$). CEUs showing VX2 tumors in the early artery period. There is a significant peripheral enhancement and short interior. There's significant positive correlation between PI and CD31 MVD values in peripheral VX2 tumors of the lung ($R=0.734, P<0.05$). The CD31 MVD and the CD34 MVD were negatively correlated ($R=-0.691, P<0.05$). There was no significant correlation between PI and CD34 MVD values ($R=-0.412, P>0.05$). **Conclusion:** CD31 MVD can be more effectively assessing tumor angiogenesis more effectively compared to CD34 MVD. As a non-invasive imaging method, CEUS can effectively assess tumor angiogenesis of rabbit surrounding lung cancer.

Key words: Rabbit VX2; CD31; CD34; MVD; Ultrasound angiography

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2; R445.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)20-3818-05

* 基金项目:江苏省第十六批“六大人才高峰”项目(YJ-217)

作者简介:陆世春(1972-),男,硕士,主任医师,研究方向:肺部疾病相关研究,电话:18051062528, E-mail:edcp85285@163.com

Δ 通讯作者:蒋焯(1976-),女,本科,主任医师,研究方向:超声结合肺部疾病相关,电话:13182003218, E-mail:edcp85285@163.com

(收稿日期:2022-04-25 接受日期:2022-05-21)

前言

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其早期发现和治疗都取得了长足的进步^[1,2]。对比增强超声(Contrast enhanced ultrasound, CEUS)已成为传统超声的公认扩展,具有无数实用性^[3]。超声造影剂(UCA)由包裹六氟化硫(一种惰性气体)的磷脂壳组成,其大小约为红细胞大小^[4]。当受到低声压时,静脉内给药的微泡的共振会导致振荡和非线性信号,并且可以在对比特定模式下检测到^[5]。肿瘤血管生成成为肿瘤细胞提供氧气和营养并从肿瘤细胞中清除代谢废物,在肿瘤细胞增殖和转移中发挥重要作用^[6]。因此,血管生成是肿瘤研究的主要焦点。血管内皮生长因子促进信号传导过程网络,诱导内皮细胞从预先存在的脉管系统生长、迁移和存活并介导血管通透性,是肿瘤血管生成的关键介质^[7,8]。它还是新形成的血管的抗凋亡因子,并作为内皮祖细胞从骨髓移动到远处部位的诱导剂。微血管密度(Microvascular density, MVD)已被证明与血管内皮生长因子表达相关。随着MVD的增加,肿瘤的侵袭性也会增加。目前,MVD被认为是测量肿瘤血管生成的"金标准"。CD31通常在分化和未分化的内皮细胞中表达,而CD34在分化的内皮细胞中表达。VX2肿瘤模型是目前应用最广泛的动物模型。本研究的目的是通过无创定量CEUS评估血管分布测量,并通过免疫组织化学分析将CEUS参数与不同的MVD相关联。

1 材料和方法

1.1 实验动物和模型建立

本研究共使用了15只雌性新西兰白兔,体重2.5~3.6 kg(平均2.7 kg),由南京大学医学院提供。

在模型建立之前,用1.0 mg/kg马来酸乙酰丙嗪和50 mg/kg盐酸氯胺酮对兔子进行镇静。对于兔VX2肺肿瘤模型,如前所述制备VX2癌。首先进行中线剖腹手术,其中使用16号针头将1-2个体积约为1 mm³的VX2癌碎片注入暴露的肺实质。在植入表面进行电凝以防止肿瘤溢出。总共有30个VX2癌被植入15只兔子的肺中。

1.2 病理分析

在VX2癌被植入的5 d、9 d、13 d和第21 d后,通过静脉推注氯化钾对兔子实施安乐死(每次2只)。将肺取出并在冠状平面上进行切片。每对标本中的一个固定在10%中性缓冲福尔马林中,包埋在石蜡中,切成4 μm切片用于苏木精和伊红(H&E)染色和Ki67免疫组织化学分析。对于抗Ki67抗体的免疫组织化学染色,石蜡包埋切片在二甲苯中脱蜡,在分级酒精中再水化,转移到0.01 M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中。用柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)在121 °C下热诱导表位修复3 min以显示隐藏的抗原表位后,在室温下用3%过氧化氢在PBS中封闭内源性过氧化物酶10 min。在PBS缓冲液中洗涤后,切片在室温下用无血清蛋白封闭液处理20 min以封闭非特异性结合。切片与抗Ki67兔多克隆抗体(1/200;美国Novus Biologicals公司)在室温下孵育60 min。在PBS中洗涤后,将切片在室温下与HRP标记的针对兔IgG(丹麦Dako公司)的聚合物偶联二抗孵育30 min。使用即用型DAB(3,3'-二氨基联苯胺)底物-色原溶液(丹麦Dako公司)显色反应5 min,用蒸馏水洗涤。最

后,切片用Mayer's苏木精轻轻复染1 min。所有切片也使用标准技术用H&E染色以进行组织学分析。

1.3 CEUS

使用配备15 L8线性阵列探头的Acuson Sequoia 512机器进行美国成像,该探头以14 MHz的传输频率运行。该程序由一位有12年经验的超声医师操作。将兔子置于仰卧位,通过从耳缘以1.0 mL/kg的剂量注射3%戊巴比妥钠进行麻醉。针对每个肿瘤优化了包括声学增益、深度和焦点在内的US参数。肿瘤首先通过灰度US扫描,彩色多普勒US以获得最佳成像平面。按照标准超声,在注射血管内示踪剂SonoVue(米兰布拉科意大利)后,通过实时CEUS检查肿瘤,该示踪剂由平均直径为2.5 μm、浓度为1的磷脂稳定的六氟化硫微泡组成。微泡可以自由地流过微小毛细血管的组织,但不能进入组织空间。注射前,在六氟化硫气氛下向冻干粉中加入5 mL盐水溶液,并彻底摇匀。造影剂(0.2 mL/kg)在2-3 s内通过耳缘静脉快速推注,2 mL盐水推注。在注射超声造影剂前不久开始连续扫描,持续90 s,机械指数(MI)低为0.16。整个过程中,操作人员保持换能器稳定。所有的CEUS图像都被记录为数字视频图像。使用安装在Acuson Sequoia 512上的时间信号强度曲线分析软件对肿瘤增强进行离线量化。该软件可以在增强期间显示感兴趣区域(ROI)中的信号时间强度曲线。定量数据由两名独立工作的研究者进行回顾性分析。研究人员手动独立选择感兴趣区域(ROI),以高度增强肿瘤区域并避免肿瘤坏死区域。ROI的大小尽可能保持在大约2~3 mm直径。对于每个肿瘤,选择三个ROI绘制对比增强时间-强度曲线,并对结果进行平均。记录了时间-强度曲线的以下参数:到达时间(AT)、峰值时间(TTP)、基线强度(BI)和峰值强度(PI)。

1.4 微血管密度分析

CEUS检查后,通过注射过量的麻醉剂处死兔子,并收集肿瘤进行进一步的组织学研究。对肿瘤进行标记以确保其与CEUS分析的结果一致。病理标本用4%多聚甲醛固定30 min,5%驴血清封闭30 min。接下来,将切片分别与小鼠抗人CD31单克隆抗体和小鼠抗人CD34单克隆抗体在4 °C下孵育过夜。切片用二氨基联苯胺着色。计算MVD需在低倍视野(100倍总放大倍率)下寻找血管生成的高密度区域,切换到高功率场(总放大倍数200倍)来计算微血管的数量。每个高功率场记录5个数字图像,计算平均值并将其视为肿瘤的MVD。

1.5 统计分析

使用统计软件SPSS 21.0分析统计数据。连续变量表示为平均值±标准。Spearman相关分析用于确定CEUS的PI与不同MVD(组织学CD31计数或CD34计数)之间的相关性。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 兔VX2肺外周肿瘤生长

实验中15只实验兔中共有30个VX2肿瘤。实验第5 d平均肿瘤体积是 56.24 ± 11.68 mm³,第21 d平均肿瘤体积是 3364.21 ± 54.37 mm³。第21 d合计有6个肿瘤坏死,肿瘤坏死占比17%,2只兔子最终死亡(表1)。

表 1 兔 VX2 肺外周肿瘤生长记录

Table 1 Records of peripheral tumor growth in the rabbit VX2 lung

Groups	5 d	9 d	13 d	21 d
Tumor volume(mm ³)	56.24±11.68	374.69±18.47	1054.26±28.33	3364.21±54.37
Neoplasm necrosis(n)	0	0	3	6
Proportion of tumor necrosis(%)	0	6	14	17
Death(n)	0	0	1	2

2.2 不同生长期 VX2 肿瘤 MVD 分析

通过高倍镜分析不同期 VX2 肿瘤的 MVD,结果发现随着生长周期的进展,VX2 肿瘤的 MVD 增大($P<0.05$)(表 2)。

2.3 不同生长期 VX2 肿瘤 Ki67 和 CD31 阳性表达

通过双重免疫荧光化学染色分析不同生长期 VX2 肿瘤 Ki67 和 CD31 阳性表达,随着生长周期的进展,VX2 肿瘤内 Ki67 和 CD31 的阳性表达率增加($P<0.05$)(表 3)。

表 2 兔 VX2 肺外周肿瘤生长记录

Table 2 Rabbit VX2 lung peripheral tumor growth record

Time	MVD
5 d	14.26±2.49
9 d	18.54±3.22
13 d	22.37±5.68
21 d	27.19±5.37
<i>F</i>	13.305
<i>P</i>	0.003

表 3 不同生长期 VX2 肿瘤 Ki67 和 CD31 阳性表达率

Table 3 Positive expression rates of Ki67 and CD31 in VX2 tumors at different growth stages

Time	Ki67(%)	CD31(%)
5 d	7.26±2.11	13.68±3.28
9 d	15.47±3.27	16.36±3.75
13 d	19.32±4.38	21.28±4.08
21 d	26.34±6.88	33.16±5.19
<i>F</i>	14.526	9.773
<i>P</i>	0.005	0.016

2.4 超声造影

CEUS 显示 VX2 肿瘤在早期动脉期有明显的外周增强和短暂的内部增强,然后快速冲洗造影剂。所有肿瘤在注射造影剂后约 6 s 时显示边缘增强(图 2A),在 12~18 s 时有少量瘤内增强(图 2B 和 2C)。

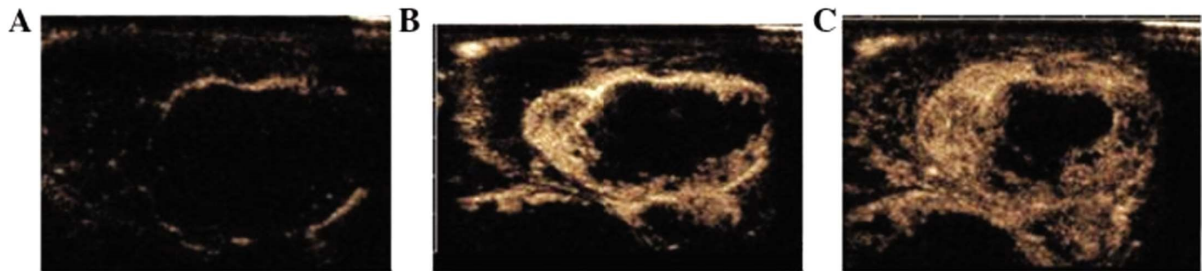


图 2 兔 VX2 肿瘤的对比增强超声检查

Fig.2 Contrast enhanced ultrasound examination of rabbit VX2 tumor

2.5 对比增强参数和 MVD

通过实时 CEUS 检查肿瘤并分析 MVD,具体分析数值如下(表 4)。

2.6 VX2 肿瘤对比增强参数与 CD31MVD 的相关性分析

分析肿瘤形态学组织病理学结果与微血管分布和 CEUS 结果之间的相关性,结果显示肺外周 VX2 肿瘤中 PI 和 CD31 MVD 值之间呈显著正相关($r=0.734, P<0.05$)。CD31 MVD 和 CD34 MVD 之间呈显著负相关($r=-0.691, P<0.05$)。(表 5)

2.7 VX2 肿瘤对比增强参数与 CD34 MVD 的相关性分析

分析肿瘤形态学组织病理学结果与微血管分布和 CEUS 结果之间的相关性,结果显示 PI 和 CD34 MVD 值之间无显著

相关性($r=-0.412, P>0.05$)。CD31 MVD 和 CD34 MVD 之间存在显著负相关性($r=-0.691, P<0.05$)(表 6)。

表 4 对比增强参数和 MVD

Table 4 Contrast the enhancement parameters and the MVD

Parameter	MVD
AT (s)	1.46±0.86
TTP (s)	12.97±3.29
PI (dB)	24.37±4.66
CD31	26.53±3.25
CD34	16.41±1.73

表 5 对比增强参数和 CD31MVD 的相关性分析

Table 5 Correlation analysis of contrast enhancement parameters and CD31MVD

Parameter	r	P
AT (s)	0.246	0.116
TTP (s)	-0.194	0.416
PI (dB)	0.734	0.012
CD34	-0.691	0.003

表 6 对比增强参数和 CD34 MVD 的相关性分析

Table 6 Correlation analysis of contrast enhancement parameters and CD34MVD

Parameter	r	P
AT (s)	-0.354	0.117
TTP (s)	0.512	0.518
PI (dB)	-0.412	0.1192
CD34	-0.691	0.003

3 讨论

胸部 CT 是目前筛查肺癌的最佳和重要技术,CT 具有潜在的辐射暴露风险,且确实存在对 CT 造影剂过敏的患者^[9,10]。如果肺部病变位于胸壁附近,超声可能为这些患者提供潜在的诊断方法。对于增强 CT 未明确诊断的患者,CEUS 可以提供综合或补充的诊断信息^[11,12]。此外,CEUS 引导的活检对周围型肺癌患者的病理诊断具有很高的敏感性和特异性^[13]。血管侵犯是肿瘤分级最重要的决定因素之一,据报道,它与组织学分化程度相关^[14,15]。MVD 是一个独立的预后指标,被认为是评估肿瘤血管生成的金标准。在临床实践中,不仅需要评估肿瘤血管生成,还需要获得有关肿瘤形态的信息(例如,肿瘤大小、形状和坏死的存在)。由于这些原因,需要一种同时获得血管生成和肿瘤形态数据的新方法。CEUS 可以反映肿瘤中微血管灌注的形态和功能变化。先前的一项研究报告称,CEUS 可能有助于区分恶性乳腺病变和良性病变。已经报道了使用 CEUS 评估化疗或其他局部抗血管生成治疗后的肿瘤灌注的可能性。CEUS 可以检测肿瘤血管生成过程中新血管的形成,从而在发生形态变化之前预测肿瘤组织内的血管变化^[16,17]。此外,使用 CEUS 准确检测微血管变化有助于早期诊断子宫内膜癌,具有更高的敏感性和特异性^[18-20]。

本研究发现所有 VX2 肿瘤都表现出相同的增强模式:动脉期快速灌注和瞬时增强,未观察到明显毛细血管或静脉相,另外增强首先出现在肿瘤的周边区域,其次为内部网状血管中,并未观察到完全的肿瘤内增强;此外,本研究通过免疫组织化学标记了肿瘤血管内皮细胞,发现肿瘤周围区域的新血管增加,表明:VX2 肿瘤在动脉期的短暂增强与肿瘤中形成新的动脉有关,结合相关研究^[21-23]分析:肿瘤生长依赖于肿瘤供血动脉,VX2 肿瘤的 CEUS 图像显示肿瘤边缘明显增强,病理检查还显示 CD31 阳性区域增加并聚集在靠近正常血管的肌肉中,说明新的肿瘤供应血管是从现有血管的部位形成的,并为肿瘤

细胞提供营养。

研究发现,如果没有足够的氧气和营养或免受有毒分子的保护,肿瘤细胞就无法生存^[24-26]。氧气从距离肿瘤细胞 150 μm 到 200 μm 的毛细血管中传播,为了继续生长,肿瘤细胞需要由新血管提供持续的营养^[27,28]。另外,肿瘤血管的形成是一个复杂的过程,目前无法直接或有效地评估,而通过评估 CD31 阳性血管的分布和密度有助于确定肿瘤血管生成^[29,30]。本研究发现随着肿瘤生长周期的进展,VX2 肿瘤内 Ki67 和 CD31 的阳性表达率增加,且在 CD31 MVD 与 CEUS 参数 PI 之间存在显著相关性,而 CD34 MVD 与 CEUS 参数 PI 之间存在非线性相关性。其他 CEUS 参数如 AT 和 TTP 与 MVD 没有显著相关性。这表明,CEUS 定量参数能有效评价兔周围型肺癌血管生成情况,CD31 MVD 更能反映肿瘤血管状态。此外,CD31 MVD 与 CD34 MVD 呈负相关($r=-0.691, P<0.05$)。这说明在同一肿瘤组织中,当分化的成熟内皮细胞占优势(CD34 MVD 呈高表达)时,未分化的内皮细胞数量相对较少,恶性程度相对较低,反之亦然。目前,在活检标本上确定 MVD 的技术是血管内皮细胞的免疫组化染色。MVD 是一个独立的预后指标,被认为是评估肿瘤血管生成的金标准,一般来说,肿瘤 MVD 计数越高,恶性程度越高,预后越差,生存时间越短。肾肿瘤的存在。CD31 存在于未分化和分化的成熟内皮细胞中,而 CD34 仅存在于分化的成熟血管内皮细胞中。高表达的 CD31 MVD 可能表明患者的恶性程度更高,生存时间更短。相比之下,高表达的 CD34 MVD 可能表明恶性程度较低,但存活时间显著延长。由于实验兔的肺在解剖结构上与人类相似,因此实验兔被广泛用于肺癌的实验研究。在本研究中,我们使用实验兔来研究周围型肺癌模型中的血管生成。以前的研究一直选择肿瘤内皮细胞标志物,无论是 CD31 还是 CD34,作为血管生成的单一评估,以便与 CEUS 定量参数相关联。然而,这些研究并未进一步探讨肿瘤血管内皮细胞的分化程度。肺癌不同 MVDs 与 CEUS 的相关性需要进一步研究。

综上所述,与 CD34 MVD 相比,CD31 MVD 可以更有效地评估肿瘤血管生成,CEUS 作为一种无创成像方法,可以有效评估兔周围型肺癌的肿瘤血管生成情况,因此在肺癌的临床诊断及预后评估中具有较高应用价值。

参考文献(References)

- [1] Zhang F, Wu X, Zhu J, et al. 18F-FDG PET/CT and circulating tumor cells in treatment-naive patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 48: 3250-3259
- [2] Xu Y, Xiang Z, Alnaggar M, et al. Allogeneic V γ 9V δ 2 T-cell immunotherapy exhibits promising clinical safety and prolongs the survival of patients with late-stage lung or liver cancer [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18: 427-439
- [3] 江华,刘发生,冯晓曦,等.对比增强超声造影联合多层螺旋CT评估老年胃癌患者术前 TNM 分期 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2021, 26(05): 632-636
- [4] Chu X, Zhao J, Zhou J, et al. Association of baseline peripheral-blood eosinophil count with immune checkpoint inhibitor-related pneumonitis and clinical outcomes in patients with non-small cell lung cancer receiving immune checkpoint inhibitors [J]. *Lung Cancer*,

- 2020, 150: 76-82
- [5] Li P, Qin P, Fu X, et al. Associations between peripheral blood lymphocyte subsets and clinical outcomes in patients with lung cancer treated with immune checkpoint inhibitor [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10: 3039-3049
- [6] Orr A, Liu H, Mariani R, et al. Bilateral Lung Metastases From a Phalangeal Giant Cell Tumor of Bone [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2021, 24: 51-55
- [7] 白国栋, 全建峰, 魏辉, 等. 低氧诱导因子基因沉默对胃癌细胞 BGC-823 微血管生成和血管内皮生长因子表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(22): 4229-4233
- [8] Xing H, Yang X, Xu Y, et al. Anti-tumor effects of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor binding domain-modified chimeric antigen receptor T cells [J]. *Cytotherapy*, 2021, 23(9): 810-819
- [9] Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, et al. CD4(+) T-cell Immunity in the Peripheral Blood Correlates with Response to Anti-PD-1 Therapy [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8: 334-344
- [10] Abe M, Osoegawa A, Miyawaki M, et al. Ciliated muconodular papillary tumor of the lung: a case report and literature review[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2020, 68: 1344-1349
- [11] Onishi Y, Kusumoto M, Motoi N, et al. Ciliated Muconodular Papillary Tumor of the Lung: Thin-Section CT Findings of 16 Cases [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2020, 214: 761-765
- [12] Wang S, Lin D, Yang X, et al. Clinical significance of PET/CT uptake for peripheral clinical N0 non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Med*, 2020, 9: 2445-2453
- [13] 唐敏, 宋建琼, 郑小雪, 等. 超声造影与常规超声引导下肺周围型病变穿刺对比分析[J]. *中国超声医学杂志*, 2020, 36(5): 404-408
- [14] Tsuda Y, Tsoi K, Stevenson JD, et al. Is Microscopic Vascular Invasion in Tumor Specimens Associated with Worse Prognosis in Patients with High-grade Localized Osteosarcoma? *Clin Orthop Relat Res*, 2020, 478(6): 1190-1198
- [15] 何旭昶, 安文慧, 赵海泉, 等. 肝细胞癌微血管侵犯定义和病理分级标准[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(5): 1181-1184
- [16] Moon SM, Kim JH, Kim SK, et al. Clinical Utility of Combined Circulating Tumor Cell and Circulating Tumor DNA Assays for Diagnosis of Primary Lung Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2020, 40: 3435-3444
- [17] Zhang J, Ji Z, Caushi JX, et al. Compartmental Analysis of T-cell Clonal Dynamics as a Function of Pathologic Response to Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 1327-1337
- [18] Ma C, Yang X, Xing W, et al. Detection of circulating tumor DNA from non-small cell lung cancer brain metastasis in cerebrospinal fluid samples[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11: 588-593
- [19] Akcay M, Etiz D, Duruer K, et al. Dosimetric comparison of single-arc/partial-arc volumetric modulated arc therapy and intensity-modulated radiotherapy for peripheral and central lung cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2021, 17: 80-87
- [20] Zhang F, Bai H, Gao R, et al. Dynamics of peripheral T cell clones during PD-1 blockade in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69: 2599-2611
- [21] Safonova EA, Lopatina KA, Razina TG, et al. Effects of Tussilago farfara L. Polysaccharides on the Expression of PD-1 (CD279) and PD-L1 (CD274) in Peripheral Blood and Tumor Tissue Lymphocytes in Mice with Lewis Lung Carcinoma [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2020, 169: 378-382
- [22] Román A, Perez-Rozos A, Otero A, et al. Efficacy and safety of a simplified SBRT regimen for central and peripheral lung tumours[J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22: 144-150
- [23] DuComb EA, Tonelli BA, Tuo Y, et al. Evidence for Expanding Invasive Mediastinal Staging for Peripheral T1 Lung Tumors [J]. *Chest*, 2020, 158: 2192-2199
- [24] 王化香, 杨会波, 周静, 等. 恶性肿瘤患者营养评估与临床营养支持的应用[J]. *中国医药指南*, 2016, 14(27): 67-68
- [25] 童舟, 罗芸, 刘璐璐, 等. 艰难梭菌感染对结肠癌患者营养及代谢的影响[J]. *中华危重症医学杂志(电子版)*, 2016, 9(4): 217-221
- [26] Wu C, Mao Y, Wang X, et al. Deep-Tissue Fluorescence Imaging Study of Reactive Oxygen Species in a Tumor Microenvironment [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(1): 165-176
- [27] Pei P, Shen W, Zhang Y, et al. Radioactive nano-oxygen generator enhance anti-tumor radio-immunotherapy by regulating tumor microenvironment and reducing proliferation [J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121326
- [28] Wang H, Yang W, Bian K, et al. Oxygen-Deficient BiOCl Combined with L-Buthionine-Sulfoximine Synergistically Suppresses Tumor Growth through Enhanced Singlet Oxygen Generation under Ultrasound Irradiation[J]. *Small*, 2022, 18(9): e2104550
- [29] Martel-Lafay I, Monnet I, Lardy-Cleaud A, et al. Feasibility of Stereotactic Body Radiation Therapy on Unresectable Stage III NSCLC with Peripheral Primary Tumor: A Prospective Study (GFPC 01-14)[J]. *Curr Oncol*, 2021, 28: 3804-3811
- [30] Wang HL, Wu JQ, Wang Y, et al. Heterogeneity and prognosis of programmed cell death-ligand 1 expression in the circulating tumor cells of non-small cell lung cancer[J]. *Neoplasma*, 2021, 68: 823-831