

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.20.005

5-氨基酮戊酸声动力疗法诱导人骨肉瘤细胞凋亡的研究*

钱贵宾¹ 李卫² 姜明久¹ 陈晓颖³ 王鹏^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨市第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 3 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨 5-氨基酮戊酸声动力疗法(5-ALA-SDT)对人骨肉瘤细胞株 U2-OS 细胞凋亡的影响。**方法:**对数生长期的 U2-OS 细胞随机分为空白对照组(control)、声敏剂组(5-ALA)、超声组(ultrasound)、声动力组(5-ALA-SDT)。采用流式细胞术检测细胞凋亡率,荧光探针及共聚焦激光扫描显微镜检测细胞内荧光定位,用 DCFH-DA 检测活性氧(ROS)的产生情况。**结果:**与单纯超声组,单纯 5-氨基酮戊酸组和对照组相比较,5-氨基酮戊酸介导的声动力组细胞存活率($40.18\% \pm 1.35\%$)均明显下降($P < 0.01$),细胞内荧光定位表明 5-ALA 扩散在细胞质和主要累积在 U2-OS 细胞线粒体内,并且 5-氨基酮戊酸介导的声动力组 ROS 产生的百分率($34.3 \pm 2.4\%$)较单纯超声组、单纯 5-氨基酮戊酸组和对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**5-氨基酮戊酸介导的声动力作用可能通过线粒体途径对诱导 U2-OS 细胞凋亡。

关键词:声动力疗法;细胞凋亡;骨肉瘤;5-氨基酮戊酸

中图分类号:R-33;R738 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)20-3823-04

5-Aminolevulinic Acid Sonodynamic Therapy Induces Apoptosis of Human Osteosarcoma Cells*

QIAN Gui-bin¹, LI Wei², JIANG Ming-jiu¹, CHEN Xiao-ying³, WANG Peng^{1Δ}

(1 The fourth affiliated hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2 The first hospital of Harbin City, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 3 The first affiliated hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether 5-aminoketovaleic acid sonodynamic therapy (5-ALA-SDT) can promote apoptosis of human osteosarcoma cell line u2-os cells and its mechanism. **Methods:** U2-os cells in logarithmic growth period were randomly divided into control group, acoustic sensitization group (5-ala), ultrasound group (ultrasound), and sonodynamic group (5-ala-sdt). Apoptosis rate was detected by flow cytometry, fluorescence probe and confocal laser scanning microscope were used to detect fluorescence localization in cells, and the production of reactive oxygen species (ROS) was detected by dcfh-da. **Results:** With simple ultrasound group, pure 5-amino ketones pentanoic acid group compared with control group, 5-amino ketones pentanoic acid mediated the acoustic power group cell survival rate ($40.18\% \pm 1.35\%$) were significantly decreased ($P < 0.01$), intracellular fluorescence localization showed that 5-ALA diffusion in the cytoplasm and mainly accumulated in U2-OS cell mitochondria, and 5-amino ketones pentanoic acid percentage of ROS mediated the acoustic power group ($34.3 \pm 2.4\%$) is relatively simple ultrasound group, 5-pure amino ketones pentanoic acid group and the control group obviously higher. **Conclusion:** The 5-aminoketovaleic acid mediated sonodynamic effect may induce U2-OS cell apoptosis through the mitochondrial pathway.

Key words: Sonodynamic therapy; Osteosarcoma; Apoptosis; 5-Aminolevulinic acid

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)20-3823-04

前言

骨肉瘤(osteosarcoma)是一种起源于间叶组织的恶性肿瘤,主要发生在儿童^[1]。随着新辅助化疗的开展,骨肉瘤患者的五年生存率有了明显提高^[2]。然而,化疗仍然存在问题,特别是化疗不敏感、化疗耐药、肿瘤复发和肿瘤远处转移及化疗耐药性也是临床难以避免的难题^[3]。因此,是否有取代骨肉瘤化疗的替代

方法,一直是临床上迫切的需要。近年来,声动力治疗(Sonodynamic Therapy,简称 SDT)成为肿瘤治疗一种新选择。其可以迅速和有效地杀死癌细胞,并且无创、可重复^[4]。本研究主要探讨了 SDT 对人类的骨肉瘤 U2-OS 细胞增殖和凋亡的影响,来作为 SDT 用于治疗骨肉瘤提供更多的参考依据。

1 资料与方法

* 基金项目:哈尔滨市科技创新人才专项资金项目(青年后备人才计划类)(2016RAQXJ211);

黑龙江省卫生计生委科研基金项目(2016-196;2017-153)

作者简介:钱贵宾(1977-),男,博士,主要研究方向:骨肿瘤与创伤, E-mail: 1358057674@qq.com, 电话: 15804508335

Δ 通讯作者:王鹏,男,博士,副主任医师,主要研究方向:骨肿瘤, E-mail: wangpengjms@163.com

(收稿日期:2019-04-23 接受日期:2019-05-18)

1.1 材料

人成骨肉瘤 U2-OS 细胞来自美国标准生物品收藏中心(ATCC);5-氨基酮戊酸(5-ALA)由第二军医大学研制,规格 10 mg/m;二甲基亚砜(DMSO)购于美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购于美国 Sigma 公司;单丹黄酰尸胺(MDC)购于美国 Sigma 公司;线粒体绿色荧光探针购于上海碧云天公司;Annexin-FITC/PI 凋亡试剂盒购于上海碧云天公司;电镜、流式细胞仪(美国 BD 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);倒置荧光显微镜(德国 LEICA 公司);低温高速旋转离心机(美国 Beckman 公司);细胞培养孔板(美国 NEST 公司);声动力仪器(哈尔滨工业大学自主研发,自制的超声换能器:直径:3.5 cm;共振频率:1.0 MHz;占空比:10%;重复频率:100 Hz;超声辐射频率为 1 MHz,功率为 2 W/cm²)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U2-OS 细胞系在改良 Eagle 培养基培养(DMEM, Gibco, USA),添加 10%胎牛血清(FBS, Hyclone, USA),100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素在 37℃,湿度 5% CO₂ 环境下培养,在对数生长期的细胞进行实验,随机分为 4 组:空白对照组(control)、声敏剂组(5-ALA)、超声组(ultrasound)及声动力组(5-ALA-SDT),每组个 8 块培养板。

1.2.2 细胞活力检测 噻唑蓝(MTT)分析法一种常用的检测细胞活力和增殖能力工具。将细胞接种到 35 毫米培养皿和 5-ALA 孵育浓度(20 μg/mL)在黑暗中放置三小时。然后他们被辐照于超声波中 30 秒。用 MTT 法测定细胞存活率。将细胞悬液按每孔 200 μL 移入 96 孔板,立即加入 MTT(5 mg/mL/20 μL/孔),继续培养 4 h,离心,小心吸掉上清液,加入 DMSO 每孔 200 μL,振荡 10 min,用自动酶标仪检测在 490 nm 波长下各孔 OD 值。本实验重复 3 次。依据计算公式计算细胞存活率,细胞存活率(%)=(OD 样品 / OD 对照)× 100%,然后绘制相应曲线。

1.2.3 5-氨基酮戊酸的细胞内荧光定位 U2-OS 细胞与 20 μg/mL 5-ALA 孵育 4 h,将标记 10 nm 线粒体绿色荧光探针(MT-G, Molecular Probes)和 1 μg/mL 细胞核探针 Hoechst 33342 (Ho, Molecular robes)放入加载后,5-ALA 在骨肉瘤 U2-OS 细胞中转化 PpIX,在紫外光激发下产生红色荧光,PpIX 主要聚集在胞浆及细胞膜中。细胞用倒置的共聚焦激光扫描显微镜在多通道成像,观察结果。

1.2.4 Annexin-V/PI 染色结合流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期 U2-OS 细胞,常规胰酶消化离心,制备单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10⁶ 个细胞/mL,超声辐照条件:1.0 W/cm²×30s,5-ALA 终浓度:20 μg/mL。超声辐照后,将各组细胞分别转入 50 mL 培养瓶中继续培养。常规操作,上流式细胞仪检测。

1.2.5 DCFH-DA 检测活性氧(ROS)的产生 将 4 组骨肉瘤细胞照射后 2 h 后加入 DCFH-DA,最终质量浓度为 10 mol/L,在 5%CO₂ 孵箱中避光培养 30 min 后流式细胞仪检测。

1.3 统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。全部数据经统计软件 SPSS 13.0 处理,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组

间比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-ALA-SDT 抑制 U2-OS 细胞的增殖

如图 1 所示,随着超声照射时间的延长,u2-OS 细胞存活率逐渐降低,与对照组相比,实验组差异有统计学意义($P < 0.05$)。如图 2 所示,随着 5-ALA 浓度的增加,u2-OS 细胞存活率显著下降,与对照组相比,实验组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

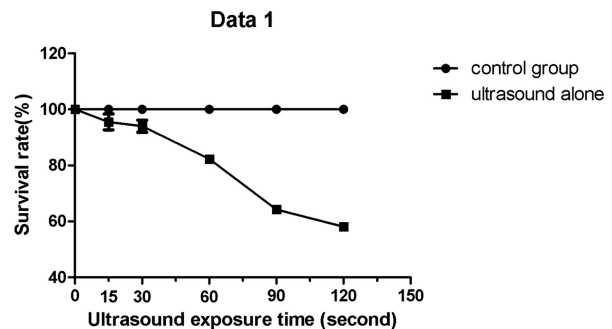


图 1 不同超声照射时间 U2-OS 细胞存活率

Fig.1 Survival rate of U2-OS cells treated for different time

注:与对照组相比,实验组差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

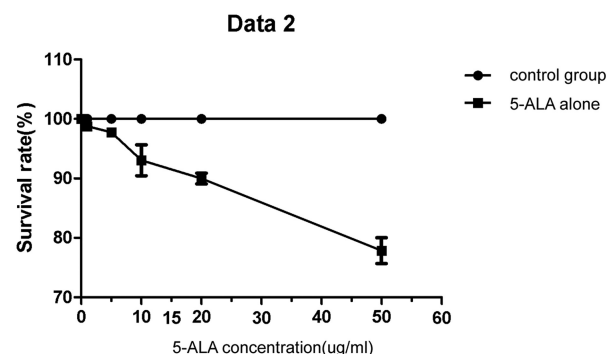


图 2 不同声敏剂浓度处理的 U2-OS 细胞存活率

Fig. 2 Survival rate of U2-OS cells treated by different concentrations of sound sensitizer

注:与对照组相比,实验组差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

如图 3 所示,单独应用 20 μg/mL 5-ALA 处理时,细胞存活率为 94.70%±0.58%,提示其对 U2-OS 细胞没有明显的细胞杀伤作用。当细胞被 1.0 w/cm² 超声辐照后,细胞存活率为 77.68%±0.89%。但是当细胞在 20 μg/mL 5-ALA 中被超声辐照处理后,细胞存活率下降到 40.18%±1.35% ($P < 0.01$),显示 5-ALA-SDT 对 U2-OS 细胞有杀伤作用,由此可见,实验组与其他三组相比,细胞存活率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 5-ALA 在细胞内的定位情况

U2-OS 细胞与 20 μg/mL 5-ALA 孵育 4h,插入标记为 10 nm 的线粒体绿色荧光探针和核探针(蓝色),如图 4 所示,5-ALA 荧光(红)与线粒体绿色荧光存在,但没有蓝色荧光重叠,表明 5-ALA 扩散在细胞质和主要累积在 U2-OS 细胞线粒体内。

2.3 5-ALA-SDT 诱导 U2-OS 细胞凋亡

采用 Annexin-V/PI 染色检测 U2-OS 细胞的凋亡情况^[9]。结果显示在频率为 1MHz、强度为 2 W 的单纯超声波照射下,骨

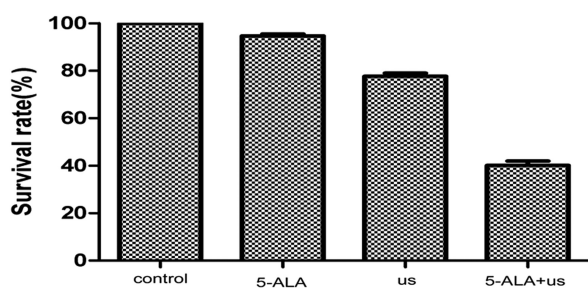


图3 各组对 U2-OS 细胞存活率

Fig.3 The survival rate of U2-OS cells in each group

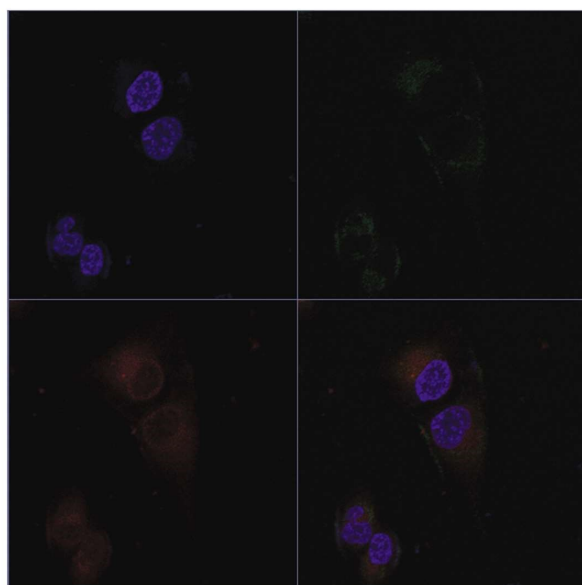
注:与其他 3 组比较,实验组 $P<0.05$ 。

图4 5-ALA 的细胞内荧光定位

Fig.4 Intracellular fluorescence localization of 5-ala

肉瘤 U2-OS 细胞发生了凋亡和坏死,在 5-氨基酮戊酸介导的声动力治疗组凋亡率明显增高。而单纯 5-氨基酮戊酸组和对照组中凋亡率明显降低(图 5)。

2.4 5-ALA -SDT 诱导 U2-OS 细胞活性氧(ROS)的产生

声动力组 (ROS) 产生的百分率 ($33.6\pm 2.5\%$),对照组 ($11.3\pm 1.5\%$), 5-氨基酮戊酸组 ($11.6\pm 1.6\%$)和单纯超声组 ($14.2\pm 1.7\%$)(图 6)。声动力组与其他 3 组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。

3 讨论

细胞凋亡是一个复杂的机制,调节细胞数量是必不可少的^[4,5]。诱导细胞凋亡可能是对抗肿瘤的最有效的防御。本研究表明 5-ALA 介导的 SDT 疗法对人骨肉瘤 U2-OS 细胞显著的抗肿瘤作用。5-氨基酮戊酸(5-ALA)是目前声动力领域用的比较多的声敏剂之一。5-氨基酮戊酸可以在体内代谢并合成原卟啉 IX(ProtoporphyrinIX, PpIX),原卟啉 IX 是非常强的内源性声敏剂,它在组织中清除较快,而且对正常生物组织光毒性低,同时还有给药后避光期短等优点。有学者发现在肿瘤等异常组织中比正常组织中聚集更多 PpIX,为声动力这种选择治疗提供基础条件^[6-9]。我们用 MTT 法检测细胞存活率,发现

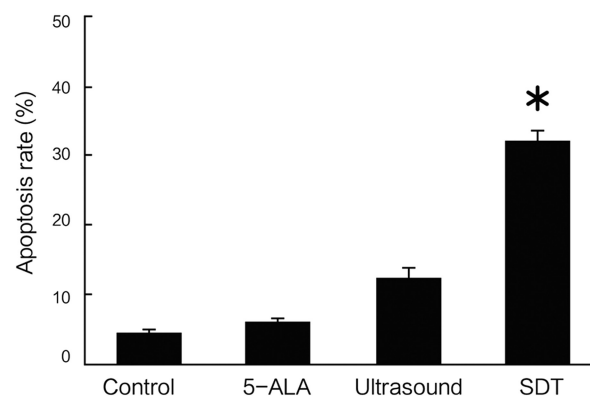


图5 5-ALA-SDT 诱导 U2-OS 细胞凋亡率

Fig.5 The apoptosis rates of U2-OS cells were induced in each group

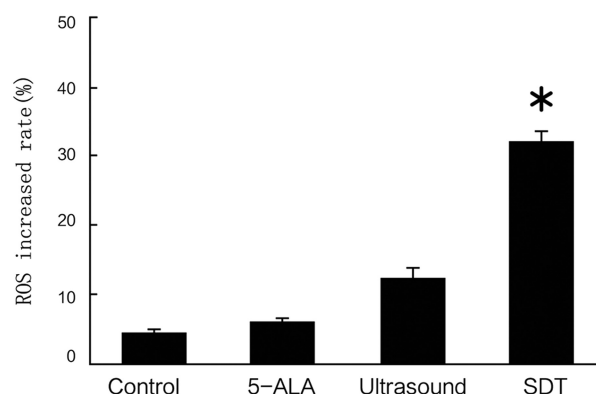
注:与其他 3 组比较,* $P<0.05$ 。

图6 各组活性氧的产生率

Fig.6 Production rate of reactive oxygen species in each group

注:与其他 3 组比较,* $P<0.05$ 。

U2-OS 细胞减少是随着 5-ALA 浓度和超声波照射时间的增加存活率下降,显示 5-ALA -SDT 对 U2-OS 细胞有杀伤作用。

本实验通过用低强度超声联合 5-氨基酮戊酸诱导人骨肉瘤 U2-OS 细胞发生凋亡,结果提示 5-ALA-SDT 具有良好的诱导人骨肉瘤 U2-OS 细胞凋亡作用。关于声动力疗法如何诱导骨肉瘤细胞凋亡机制目前有很多种,研究比较多的有单线态氧机制,单线态氧的激发态分子具有氧化性,扩散半径大,使细胞通透性增加,导致线粒体肿胀破坏内质网结构,并且使胞膜脂质过氧化,从而破坏肿瘤细胞的分子结构,最终促进肿瘤细胞凋亡^[10-13];还有学者认为超声空化作用激活声敏剂或空泡,从而产生大量的氧自由基,可对肿瘤细胞产生杀伤作用;并且在声动力诱导人骨肉瘤 U2-OS 细胞凋亡过程中有大量活性氧(ROS)的产生。活性氧在机体内处于动态平衡,是细胞有氧呼吸过程中产生的小分子,当细胞受到外来刺激时,ROS 的产生和清除出现障碍,导致 ROS 在细胞内异常增多,还原氧化过程失去平衡,细胞结构破坏,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[13-16]。本实验中声动力组(ROS)产生的百分率($33.6\pm 2.5\%$),与其他 3 组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。声动力组 ROS 大量增加,提示超声波激活肿瘤细胞内的 5-氨基酮戊酸产生的大量原卟啉 PpIX,从而使大量 ROS 在骨肉瘤细胞内产生,它们破坏细胞膜使其通透性明显增强,并且损伤线粒体膜,造成膜电位下降,从而诱导肿瘤细胞凋亡。

还有一种说法是线粒体损伤可能是 5-ALA -SDT 诱导的细胞毒性的主要原因。本实验首先检测 U2-OS 细胞 5-ALA 亚细胞定位,如图 4 所示,5-ALA 荧光(红)与线粒体绿色荧光存在,但没有蓝色荧光重叠,表明 5-ALA 扩散在细胞质和主要累积在 U2-OS 细胞线粒体内,这意味着 5-ALA 主要定位在 U2-OS 细胞线粒体,这表明卟啉物质存在丰富的线粒体内,这往往是在 SDT 处理最有效的破坏位置。作为主要能源的发电机,5-ALA -SDT 介导的线粒体细胞凋亡是一个广泛的刺激。细胞凋亡有两个主要的凋亡途径:第一是外源性途径,由 TRAIL, FAS/FasL 等死亡受体介导^[17-20];第二是内源性途径,由线粒体相关因子介导,内在的细胞凋亡途径可能是通过内部和外部的刺激引起的,包括许多介质,可以促进或抑制的过程^[21-25]。线粒体损伤可能是 5-ALA -SDT 诱导的细胞毒性主要累积在 U2-OS 细胞的线粒体,表明卟啉物质丰富的线粒体,而 5-ALA 往往是在 SDT 处理最有效的破坏点^[26-28]。在一些实验中发现 SDT 能影响基因的表达,诱导细胞凋亡,改善肿瘤治疗的基因转染,诱导细胞凋亡^[29,30]。

本实验研究表明低强度超声联合 5-氨基酮戊酸对人骨肉瘤 U2-OS 细胞具有促进凋亡作用,其机制主要是声敏剂特异性聚集在肿瘤细胞内,特别是在线粒体内,超声波作用于肿瘤细胞并且活化声敏剂,使肿瘤细胞发生内源性凋亡,具体机制还要进一步的研究及在体内试验证实。

参考文献(References)

- [1] Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants [J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 125: 555-581
- [2] Won KY, Lee CH, Kim YW, et al. Primary giant-cell-rich osteosarcoma of the urinary bladder: usefulness of osteocalcin and osteonectin immunohistochemical staining and literature review [J]. *Pathology*, 2011, 43(4): 161-164
- [3] Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(2): 2425-2429
- [4] 戴绍春, 胡韶山, 詹奇. 血卟啉甲醚声动力疗法诱导体外 C6 胶质瘤细胞凋亡作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(5): 727-729
- [5] Lv Y, Fang M, Zheng J, et al. Low-intensity ultrasound combined with 5-aminolevulinic acid administration in the treatment of human tongue squamous carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(3): 321-333
- [6] Ribe EM, Serrano-Saiz E, Akpan N, et al. Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players [J]. *Biochem J*, 2012, 41(5): 165-182
- [7] Park JW, Ryter SW, Choi AM. Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *COPD*, 2007, 4(4): 347-353
- [8] Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(P16): 684-688
- [9] Inoue K. 5-Aminolevulinic Acid-mediated Photodynamic Therapy for Bladder Cancer [J]. *International Journal of Urology*, 2017, 24(2): 97-101
- [10] Tang W, Liu Q, Zhang J, et al. In vitro activation of mitochondria-caspase signaling pathway in sonodynamic therapy-induced apoptosis in sarcoma 180 cells[J]. *Ultrasonics*, 2010, 50(2): 567-576
- [11] Li Y, Wang P, Zhang J, et al. Low-intensity ultrasound combined with 5-aminolevulinic acid administration in the treatment of human tongue squamous carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(2): 321-333
- [12] Hu Z, Fan H, Lv G, et al. 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Sonodynamic Therapy Induces Anti-Tumor Effects in Malignant Melanoma via P53-Mir-34a-Sirt1 Axis [J]. *Journal of Dermatological Science*, 2015, 79(2): 155-162
- [13] Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Effect of Natural Uranium on The UMR-106 Osteoblastic Cell Line: Impairment of The Autophagic Process as an Underlying Mechanism of Uranium Toxicity [J]. *Archives of Toxicology*, 2017, 91(4): 1903-1914
- [14] You DG, Deepagan VG, Um W, et al. ROS-Generating Tio2 Nanoparticles for Non-Invasive Sonodynamic Therapy of Cancer[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(4): 23200
- [15] Moloney JN, Cotter TG. ROS Signalling in The Biology of Cancer [J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2017, S1084-9521 (16): 30383-4
- [16] Yue XL, Lehri S, Li P, et al. Insights on a new path of pre mitochondrial apoptosis regulation by a glycosaminoglycan mimetic [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(5): 770-810
- [17] Flarakos C, Weiskopf A, Robinson M, et al. Metabolism of Selective 20-epi-vitamin D3 Analogs in Rat Osteosarcoma UMR-106 Cells: Isolation and Identification of Four Novel C-1 Fatty Acid Esters of Lalpha, 25-dihydroxy-16-fene-20-epi-vitamin D3 [J]. *Steroids*, 2017, 119(5): 18-30
- [18] 王建华, 焦晓辉, 胡掙. 低强度超声联合 5-氨基酮戊酸对大鼠骨肉瘤 UMR-106 细胞的杀伤机制研究 [J]. *大连医科大学学报*, 2014, 36(3): 216-220
- [19] Park JW, Ryter SW, Chio AM. Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *COPD*, 2007, 4(2): 347-353
- [20] Teerapornpuntakit J, Wongdee K, Krishnamra N, et al. Osteoclastogenic Factor Transcripts In Osteoblast-like UMR-106 Cells After Exposure to FGF-23 or FGF-23 Combined with Parathyroid Hormone [J]. *Cell Biology International*, 2016, 40(3): 329-340
- [21] Inoue K. 5-Aminolevulinic Acid-mediated Photodynamic Therapy for Bladder Cancer [J]. *International Journal of Urology*, 2017, 24(2): 97-101
- [22] Teerapornpuntakit J, Wongdee K, Krishnamra N, et al. Expression of Osteoclastogenic Factor Transcripts In Osteoblast-like UMR-106 Cells After Exposure to FGF-23 or FGF-23 Combined with Parathyroid Hormone [J]. *Cell Biology International*, 2016, 40(3): 329-340
- [23] Hoogenboom M, Eikelenboom D, Brok M H, et al. Mechanical High-Intensity Focused Ultrasound Destruction of Soft Tissue: Working Mechanisms and Physiologic Effects [J]. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 2015, 41(6): 1500-1517
- [24] Li J, Yang Z, Li Y, et al. Cell Apoptosis, Autophagy and Necroptosis in Osteosarcoma Treatment[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44763-44778

复,值得在临床上借鉴应用。

参考文献(References)

- [1] 中国康复医学会儿童康复专业委员会. 中国脑性瘫痪康复指南(2015):第一部分[J].中国康复医学杂志, 2015, 30(7): 747-754
- [2] Stallings VA, Charney EB, Davies JC, et al. Nutritional status and growth of children with diplegic or hemiplegic cerebral palsy[J]. Dev Med Child Neurol, 2010, 35(11): 997-1006
- [3] 王军, 李梦月, 朱登纳, 等. 脑瘫患儿营养状况及其生活质量的横断面研究[J].中国妇幼保健杂志, 2018, 9(2): 31-35
- [4] 陈雪梅, 暨铎. 脑瘫中医古代文献溯源[J].中国民族民间医药, 2018, 27(22): 8-10
- [5] 韩亮, 尚清, HANLiang, 等. 运脾方治疗脑性瘫痪合并营养不良临床研究[J].中医学报, 2015, 30(11): 1653-1655
- [6] 李馨, 刘丽伟, 曾玲, 等. 小儿脑性瘫痪 312 例病因分析[J].贵州医药, 2015, 39(9): 810-811
- [7] 李研, 钟斌, 陈青, 等. 小儿脑性瘫痪的病因及治疗进展[J].当代临床医刊, 2018, 31(1): 3692-3693+3689
- [8] 李洲义. 小儿脑性瘫痪中医证型的分布规律及临床特征[D].广州中医药大学, 2016
- [9] 赵斌, 高晶, 薛晶晶. 109 例脑性瘫痪患儿康复治疗体会[J].中国实用神经疾病杂志, 2015, 18(6): 76-77
- [10] 高长玉, 李冀, 姜志梅. 中医古籍对五软论述探要[J].长春中医药大学学报, 2017, 33(4): 671-673
- [11] Fujiwara T, Ushiba J, Soekadar SR. Neurorehabilitation: Neural Plasticity and Functional Recovery 2018[J]. Neural Plast, 2019, 2019 (21): 1-3
- [12] 李晓捷, 唐久来. 以循证医学为依据的脑性瘫痪早期诊断与早期干预[J].华西医学, 2018, 33(10): 1213-1216
- [13] 蓝靖文. 儿童脑性瘫痪临床中医证候学调查及相关中药干预研究[D].北京中医药大学, 2009
- [14] 刘茜茜, 李云华, 王默然. 张奇文治疗五迟五软医案 1 则[J].光明中医, 2016, 31(13): 1958-1959
- [15] 赵德智, 鲍超, 陈栋. 浅析吴旭教授从肾脑论治脑瘫的理论依据[J].浙江中医药大学学报, 2018, 42(3): 197-199
- [16] 尚立虎, 悠然康. 绿色医疗 - 小儿推拿对治疗儿童常见病的疗效浅谈[J].养生保健指南:医药研究, 2016, 46(5): 196-196
- [17] 叶正飞, 郭荣爱. 针灸推拿结合运动疗法在脑瘫康复中的应用效果分析[J].四川中医, 2019, 37(2): 190-192
- [18] 李铁山. 痉挛的评估与治疗[C]//.山东省中西医结合神经内科学术研讨会. 2008: 35-40
- [19] 郭铁成, 卫小梅. 改良的 Ashworth 分级应用于上下肢肌张力评估时的比较[J].中国康复, 2008, 23(5): 313-315
- [20] 何恒, 王辉. 痉挛贴治疗小儿痉挛型脑性瘫痪的中医理论研究[J].河北中医, 2018, 40(7): 1097-1099
- [21] 施镇国, 叶志英. 小儿脑瘫治疗进展概况[J].实用中西医结合临床, 2018, 18(11): 180-183
- [22] 张月. 小儿脑瘫中医证候及证素规律的临床研究[D].辽宁中医药大学, 2016
- [23] 贾美云, 闫安平, 刘艳红. 早期综合护理干预模式在脑损伤患儿神经智力发育及脑瘫中的影响[J].中国实用神经疾病杂志, 2017, 20 (12): 139-140
- [24] 唐久来, 王宝田, 李晓捷. 脑性瘫痪早期诊断和脑性瘫痪高风险儿诊断及早期干预进展 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(15): 1121-1125
- [25] 高青. 健脾益肾推拿法治疗小儿脑瘫姿势运动发育异常的临床观察[D].云南中医学院, 2017
- [26] 叶正飞, 郭荣爱. 健脑益智推拿防治新生儿缺氧缺血性脑病后遗症[J].四川中医, 2019, 37(2): 190-192
- [27] 钟新. 中医推拿和中药浴对脑瘫患儿神经运动发育的影响[J].四川中医, 2017, 35(9): 180-181
- [28] 苏春娅. 补肾健脑针法对痉挛型脑瘫患儿功能恢复及日常生活能力的影响[J].光明中医, 2019, 34(3): 426-428
- [29] 蔡霞, 英林敏, 肖玲, 等. 中医针刺结合补脾健肾汤治疗小儿脑瘫(痉挛型)的临床研究[J].辽宁中医杂志, 2019, 46(2): 400-402
- [30] 李桂英. 康复训练结合健脾补肾调督针刺法治疗痉挛型脑瘫患儿 43 例临床观察[J].中医儿科杂志, 2018, 14(2): 72-75
- [31] 杨静. 体针联合推拿法治疗脾肾虚弱型小儿脑瘫的临床疗效观察[J].光明中医, 2014, 29(03): 551-552
- [32] 李业龙. 健脾益肾推拿法治疗小儿脑瘫姿势运动发育异常的临床研究[J].名医, 2018, 59(4): 50-50
- [33] 贾玉敏. 通督补肾健脾按摩法治疗小儿脑瘫临床观察[J].实用中医药杂志, 2017, 33(4): 430-430
- [34] 张扬, 许建霞. 针灸推拿联合康复训练对脑卒中后偏瘫患者预后影响观察[J].亚太传统医药, 2017, 13(2): 114-115
- [35] 吴涛, 张霞. 现代康复理念结合针灸推拿对小儿脑瘫的康复效果观察[J].四川中医, 2016(3): 193-195
- [36] 孙师钢, 刘春华. 中医针灸联合推拿法对小儿脑瘫功能康复的效果观察[J].中国继续医学教育, 2017, 9(18): 172-17
- [37] 梁晓琛, 黄佳莹, 孟红旗, 等. 小儿脑性瘫痪的早期诊断与康复[J].科教导刊, 2018, 20(7): 153-154
- [38] 李芳. 穴位注射联合现代医学康复技术治疗小儿脑性瘫痪的疗效[J].现代医药卫生, 2018, 34(5): 751-752
- [25] Wang X, Jia Y, Wang P, et al. Current Status and Future Perspectives of Sonodynamic Therapy in Glioma Treatment [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 37(3): 592-599
- [26] Kawczyk-Krupka A, Bugaj AM, Latos W, et al. ALA-mediated photodynamic effect on apoptosis induction and secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and of monocyte chemotactic protein (MCP-1) by colon cancer cells in normoxia and in hypoxia-like conditions in vitro[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2015, 12(1): 27-35
- [27] Nakamura T, Oinuma T, Yamagishi H, et al. Evaluation of a novel high-resolution magnifying videoendoscope that is capable of photodynamic diagnosis and therapy for gastric cancer [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017, 16(3): 115-122
- [28] Ishikawa T, Kajimoto Y, Inoue Y, et al. Critical role of ABCG2 in ALA-photodynamic diagnosis and therapy of human brain tumor[J]. Adv Cancer Res, 2015, 125(3): 197-216
- [29] 刘至昱, 史玉玲, 顾俊琪, 等. 5-氨基酮戊酸光动力疗法治疗头面部基底细胞癌的疗效观察[J].同济大学学报(医学版), 2016, 36(1): 110-116
- [30] Haak CS, Togsverd-Bo K, Thaysen-Petersen D, et al. Fractional laser-mediated photodynamic therapy of high-risk basal cell carcinomas—a randomized clinical trial [J]. Br J Dermatol, 2018, 172 (1): 215-222

(上接第 3826 页)