

载3PO脂质体-微泡复合物制备及其控制释放研究

伍巍兰 吴华君 吴莎 陈君 李健豪

摘要 **目的** 制备载3PO脂质体-微泡复合物(3PO-LMC),观察其体外超声显影及控制释放能力。**方法** 采用薄膜水化法制备载3PO纳米脂质体,机械振荡法制备生物素化普通微泡,将两者通过生物素-亲和素连接方式结合获得3PO-LMC。采用激光粒度仪测定载3PO脂质体的粒径及Zeta电位,高效液相色谱仪(HPLC)测定其包封率;采用库尔特分析仪测定3PO-LMC的粒径和浓度,荧光显微镜观察其表征,HPLC测定3PO-LMC的载药量;并在琼脂模型中检测微泡的体外超声显影效果;比较不同超声强度(0.35、0.7、1.0 MPa)及作用时间(10、30、60 s)下3PO-LMC的药物释放率。**结果** 载3PO脂质体的粒径为(174.77±3.62) nm, Zeta电位为(-22.75±0.63) mV,包封率为(90.74±1.67)%。制备的3PO-LMC表现为普通微泡形态,荧光显微镜下可同时见红、绿色荧光,浓度为(0.86±0.06)×10⁹/ml,粒径为(2.54±0.15) μm,3PO-LMC的载药量为(99.58±6.63) μg/10⁸个复合物;普通微泡和3PO-LMC在体外琼脂模型中均能显示出良好的超声显影效果。在相同超声强度下,药物释放率随着超声作用时间延长而增加;在相同超声作用时间下,药物释放率随着超声强度的增加而增加;当超声强度为1.0 MPa、作用60 s时,3PO-LMC的药物释放率达到最高,为(90.93±1.79)%。**结论** 成功制备了3PO-LMC,其不仅可在体外显示出良好的超声显影效果,在超声作用下还具有良好的药物释放能力。

关键词 微泡;药物载体;3PO;控制释放

[中图分类号]R445.1;R-33

[文献标识码]A

Preparation and controlled-release characteristics of liposome-microbubbles loaded with 3PO

WU Weilan, WU Huajun, WU Sha, CHEN Jun, LI Jianhao

Department of Cardiology, Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China

ABSTRACT **Objective** To prepare liposome-microbubbles complex containing 3PO drugs (3PO-LMC), and to investigate the general characteristics, contrast-enhanced ultrasound effect and controlled-release characteristics in vitro. **Methods** 3PO-nanoliposomes were prepared by thin-film rehydration method, and microbubbles were prepared by mechanical oscillation method, while 3PO-LMC was prepared with biotin-avidin linkage. The particle size and Zeta potential of liposomes were measured by laser particle analyzer, and the encapsulation efficiency of liposomes was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), the particle size and concentration of 3PO-LMC was analyzed by Coulter analyzer, and the characteristics was observed by fluorescence microscope, and the drug loading of 3PO-LMC was determined by HPLC, as well as the effect of contrast-enhanced ultrasound of 3PO-LMC in vitro was tested in agarose model, the drug release rate was compared at different ultrasound intensity (0.35, 0.7, 1.0 MPa) and processing time (10, 30, 60 s). **Results** The average particle size of 3PO loaded liposomes was (174.77±3.62) nm, Zeta potential was (-22.75±0.63) mV, and the entrapment efficiency was (90.74±1.67)%. The results showed that the 3PO-LMC was in the form of ordinary microbubbles, and red fluorescence and green fluorescence could be seen simultaneously under fluorescence microscope. The concentration of 3PO-LMC was (0.86±0.06)×10⁹/ml, the particle size was (2.54±0.15) μm, and the drug loading of 3PO-LMC was about (99.58±6.63) μg/10⁸ complexes. Moreover, microbubbles and 3PO-LMC could show good contrast-enhanced ultrasound effect in agarose model. Under the same ultrasonic intensity, the drug release rate was increased with the ultrasonic processing time prolonged, while under the

基金项目:广州市卫生健康科技项目(20191A010082)

作者单位:511400 广州市番禺区中心医院心内科 广州市番禺区心血管病研究所

通讯作者:李健豪, Email: 18922238032@163.com

same ultrasonic time, the drug release rate was also increased with the ultrasonic intensity increased. When the ultrasonic intensity was 1.0 MPa and acted for 60 s, the drug release rate of 3PO-LMC could reach the peak (90.93±1.79)%. **Conclusion** 3PO-LMC is successfully constructed, which showed a good contrast-enhanced ultrasonic development effect in vitro and a good drug release ability under the action of ultrasound.

KEY WORDS Microbubbles; Drug carrier; 3PO; Controlled release

恶性肿瘤目前已严重危害人类的健康, 肿瘤血管新生理论指出肿瘤的生长和转移取决于新生血管形成, 其所需的 ATP 85% 来自糖酵解。磷酸果糖激酶-2/果糖-2, 6-二磷酸酶(PFKFB3)作为糖酵解途径中的一个关键限速酶, 其小分子抑制剂 3PO 可以显著降低糖酵解速率, 抑制内皮细胞的增殖和迁移, 减少血管萌芽及新生^[1-3], 抑制肿瘤新生血管生成, 从而发挥抗肿瘤作用。然而抗肿瘤药物缺乏靶向性且存在一定程度的毒副作用, 降低了药物的疗效, 限制了其临床应用。超声脂质体-微泡复合物作为一种良好的药物载体, 具有载药量高和声学性能良好的优点, 可以将药物靶向输送到局部组织, 并结合超声破坏技术局部释放药物, 进而提高药物的靶向性和治疗效果, 减少全身毒副作用^[4]。本实验拟通过生物素-亲和素系统将载 3PO 脂质体连接到普通微泡表面, 获得载 3PO 脂质体-微泡复合物(3PO-LMC), 观察其一般特征, 探讨其体外超声显影及控制释放能力, 旨在为联合超声辅助给药体系在肿瘤治疗领域提供一种新的、有效的药物载体。

材料与方法

一、主要实验材料

二硬脂酸磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、生物素化脂质(DSPE-PEG 2000-Biotin)、聚乙二醇(PEG)-40 硬脂酸酯、胆固醇(美国 Avanti 公司); 异硫氰酸荧光素(FITC)、链亲和素、Triton X-100(美国 Sigma 公司); 3PO(美国 Selleck 公司); 氯仿(CHCl_3)、甲醇、丙二醇、甘油(上海化学试剂厂); 乙腈、磷酸盐(国药集团化学试剂有限公司); 细胞膜红色荧光探针(DiI, 中杉金桥); 磷酸盐缓冲液(PBS)粉末(广州尚鸿生物科技有限公司); 全氟丙烷(C_3F_8 , 广东华特气体股份有限公司); 生理盐水(广东大冢制药有限公司); 三氟乙酸(TFA, 上海吉至生化科技有限公司)。

二、主要实验仪器

倒置荧光显微镜(BX51, 日本 Olympus 公司); 透射电子显微镜(HT770, 日本 Hitachi 公司); 低温高速

离心机(Avanti JXN-30, 美国 Beckman Coulter 公司); 激光粒度仪(Mastersizer 3000, 英国马尔文仪器有限公司); 库尔特分析仪(Multisizer III, 美国 Beckman Coulter 公司); 高效液相色谱仪(SHIMADZU/LC-16, 日本岛津公司); 水浴超声清洗仪(PS-80, 深圳洁康超声科技有限公司); 银汞调和器(YJT, 上海医疗器械股份有限公司); 彩色多普勒超声诊断及超声成像系统(Acuson Sequoia 512, 德国西门子公司); 反相色谱柱(Zorbax RP-C18, 美国 Agilent 公司)。

三、主要实验方法

(一) 3PO-LMC 的制备

1. 生物素化载 3PO 脂质体(3PO-LPs)的制备及其特征检测: 将 DPPC、胆固醇和 DSPE-PEG 2000-Biotin 按摩尔比 60: 40: 5 溶解于 CHCl_3 中, 然后加入 5 mg 3PO, 通过氮气吹干形成磷脂膜, 于 45℃ 真空干燥箱内去除残余 CHCl_3 , 将 PBS(pH 值 7.4) 加入试管中, 置于 62℃ 水浴超声清洗仪中直至脂质体澄清, 磷脂最终浓度为 10 mg/ml。采用激光粒度仪测定脂质体的粒径及 Zeta 电位; 高效液相色谱(HPLC)法测定脂质体的包封率。

2. 生物素化普通微泡(MBs)的制备及其特征检测: 应用机械振荡法制备核心气体为 C_3F_8 的脂质微泡。将 DPPC、PEG-40 硬脂酸酯和 DSPE-PEG 2000-Biotin 按摩尔比 82: 10: 8 溶解于装有丙二醇的三角锥形瓶中, 另加入适量的生理盐水和甘油(体积比 95: 5), 分别置于 70℃ 水浴锅中至溶液变澄清透明时混合, 以恒量持续通入氮气至混合液再次变清澈, 即可制得磷脂分散液。然后分装于西林瓶中加盖密封, C_3F_8 气体置换, 使用银汞调和器机械振荡 45 s 后制得微泡悬浮液。采用库尔特分析仪测定微泡的粒径及浓度。

3. 3PO-LMC 的制备: 通过生物素-亲和素连接方式偶联 MBs 和 3PO-LPs, 向 MBs 中加入 0.5 mg/ml 亲和素蛋白孵育 15 min 后, 使用 PBS 离心洗涤 3 次去除未结合的亲和素蛋白, 再加入 200 μl 3PO-LPs 孵育 30 min, PBS 离心洗涤 3 次后获得 3PO-LMC。

(二) 一般特征检测

1. 形态学观察: 取 100 μl 微泡浓度为 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 的 MBs 和 100 μl 3PO-LPs 各用 PBS 稀释至 1 ml, 分别与

FITC、DiI 孵育 30 min, PBS 洗涤、纯化后获得 FITC 标记的 MBs 和 DiI 标记的 3PO-LPs, 然后再通过上述 3PO-LMC 制备方式获得双荧光标记的 3PO-LMC。于荧光显微镜下观察并拍照。

2. 浓度及粒径: 采用库尔特分析仪测定 3PO-LMC 的粒径和浓度。作为对照, 测定 MBs 的粒径和浓度。

3. 载药量测定: ① 药物 3PO 标准曲线绘制。精密称取 3PO 至容量瓶中, 加入甲醇充分溶解并定容配置成 1 mg/ml 储备液, 用甲醇逐步稀释, 配置成浓度为 120.0 $\mu\text{g/ml}$ 、60.0 $\mu\text{g/ml}$ 、30.0 $\mu\text{g/ml}$ 、15.0 $\mu\text{g/ml}$ 、7.5 $\mu\text{g/ml}$ 溶液。分别吸取以上溶液 20 μl , 过滤后采用高效液相色谱仪测定样品在 304 nm 波长处的吸收峰面积。具体色谱条件为: 流动相为乙腈-水(体积比 2.5:97.5)添加 0.1% TFA, Zorbax RP-C18 反相色谱柱(4.6 mm \times 250.0 mm, 5 μm), 流速 1.0 ml/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 绘制 3PO 浓度-吸收峰面积的标准曲线。② 3PO-LMC 载药量的测定。将 1 ml 微泡浓度为 $1\times 10^8/\text{ml}$ 的 3PO-LMC 烘干, 加入 CHCl_3 以溶解并释放出脂质体内容物, 待挥发后加入甲醇稀释溶解, 通过 HPLC 和标准曲线法测定 3PO-LMC 中 3PO 的含量。

(三) 体外超声显影效果评估

取 200 μl 微泡浓度为 $1\times 10^6/\text{ml}$ 的 MBs 和 3PO-LMC 分别置于琼脂模型中, 以 PBS 为对照, 使用彩色多普勒超声诊断仪(15L8-S 探头, 频率 7.0 MHz, 机械指数 0.18, 帧频 16 Hz) 进行对比成像后, 使用 MCE 2.7 软件获取超声显影强度(VI), 评估其体外超声显影效果。

(四) 体外超声控释药物能力检测

将 3PO-LMC 分为 11 组, 每组 3 份(每份 1 ml, $1\times 10^8/\text{ml}$), 分别为空白对照组(不做任何处理)、裂解组(用 1% Triton X-100 溶液完全裂解微泡), 余 9 组进行超声相应处理, 超声强度分别为 0.35、0.70、1.00 MPa, 辐照时间分别为 10、30、60 s, 采用频率 1 MHz 的聚焦探头, 占空比为 1% 的脉冲波辐照。辐照后离心去除上层液, 再将各组溶液定容至 1 ml, 采用 HPLC 法测定 3PO 药物的含量。释放率 = $(C_{\text{US}} - C_0) / (C_{\text{TX100}} - C_0)$, 其中 C_{US} 为超声辐照后药物的浓度, C_0 为空白对照组药物的浓度, C_{TX100} 为经 1% Triton X-100 溶液完全裂解微泡后药物的浓度。

四、统计学处理

应用 SPSS 23.0 统计软件, 计量资料

以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、3PO-LPs 的粒径、Zeta 电位及包封率

由激光粒度仪测得 3PO-LPs 的粒径为 (174.77 ± 3.62) nm, 分散性良好, Zeta 电位为 (-22.75 ± 0.63) mV, 包封率为 $(90.74\pm 1.67)\%$, 制备重复性良好。

二、3PO-LMC 的表征

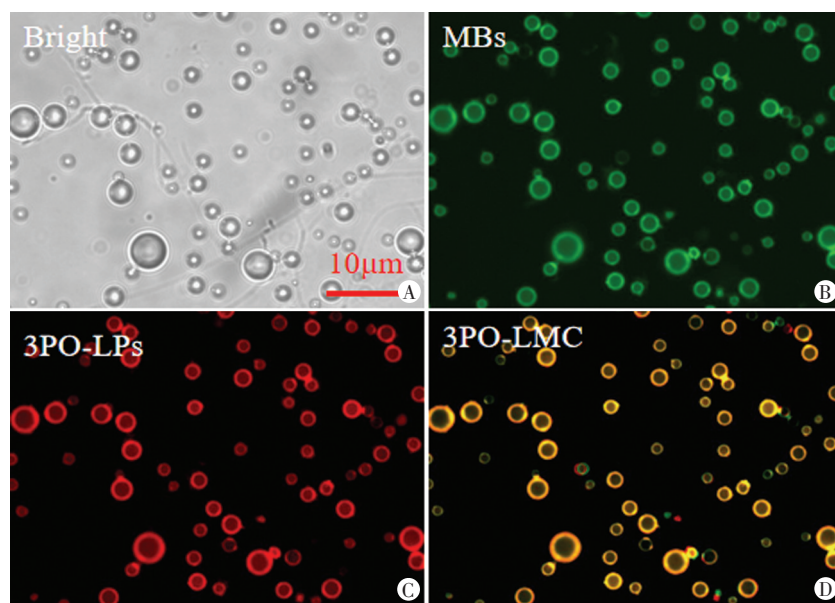
制备的 3PO-LMC 混悬液为乳白色, 微泡镜下表现为球形, 大小分布均匀, 分散度较好, 无明显粘连和聚集; 荧光显微镜下可同时见红、绿色荧光(图 1), 表明 DiI 标记的 3PO-LPs 成功连接到 FITC 标记的生物素化微泡表面。库尔特分析仪测得 MBs 制备成 3PO-LMC 后, 粒径由 (2.10 ± 0.12) μm 增大至 (2.54 ± 0.15) μm , 而浓度由 $(1.33\pm 0.08)\times 10^9/\text{ml}$ 减少至 $(0.86\pm 0.06)\times 10^9/\text{ml}$, 表明在制备的过程中微泡存在一定的耗损。

三、3PO-LMC 载药量测定

采用标准曲线法测定 3PO-LMC 中 3PO 的浓度。在 0.5~120.0 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内, 3PO 浓度与吸收峰面积呈良好的线性关系, 见图 2; 线性回归方程为: $y = 99.009x - 224.07$, $R^2 = 0.9989$ 。根据标准曲线法测得 3PO-LMC 载药量为 (99.58 ± 6.63) $\mu\text{g}/10^8$ 个复合物。

四、体外超声显影特征

超声对比成像探头下, 琼脂模型中 MBs 和 3PO-LMC 的回声较 PBS 明显均匀强化, 显示出良好的超声



A: 3PO-LMC 光镜下观; B: FITC 标记的 MBs 呈绿色; C: DiI 标记的 3PO-LPs 呈红色; D: FITC 和 DiI 双标记的 3PO-LMC 荧光显微镜下观

图 1 MBs、3PO-LPs 及 3PO-LMC 显微镜下观($\times 200$)

造影效果 (图 3); MBs 和 3PO-LMC 的 VI 分别为 (120.20±6.68) IU 和 (119.40±6.21) IU, 均较 PBS 的 VI [(17.68±5.53) IU] 明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 3PO-LMC 与 MBs 的 VI 比较差异无统计学意义。

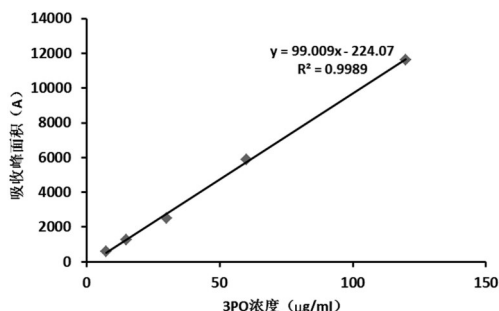


图 2 3PO 浓度-吸收峰面积的标准曲线

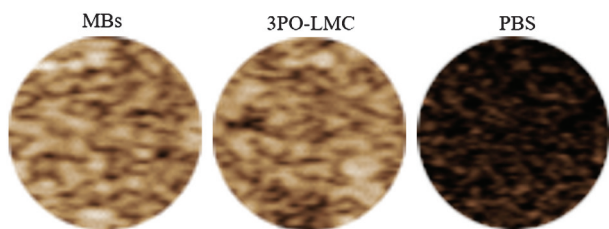
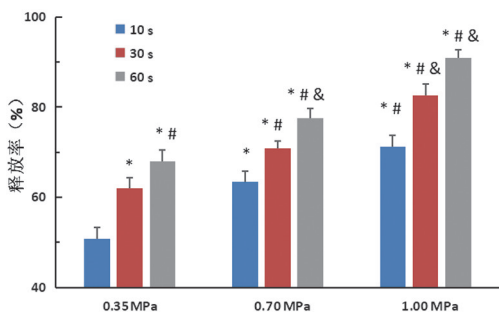


图 3 MBs、3PO-LMC 及 PBS 在琼脂模型中的超声造影图

五、体外超声控释药物

低频超声可以靶向破坏 3PO-LMC 释放出药物, 在相同超声强度下, 药物释放率随着超声作用时间延长而增加 ($P < 0.05$); 在相同超声作用时间下, 药物释放率随着超声强度的增加而增加 ($P < 0.05$); 当超声强度为 1.00 MPa、作用 60 s 时, 3PO-LMC 的药物释放率达到最高, 为 (90.93±1.79)%。见图 4。



与超声强度 0.35 MPa、超声时间 10 s 比较, * $P < 0.05$; 与超声强度 0.35 MPa、超声时间 30 s 比较, # $P < 0.05$; 与超声强度 0.35 MPa、超声时间 60 s 比较, & $P < 0.05$

图 4 3PO-LMC 体外超声控释药物柱状图

讨 论

肿瘤新生血管已成为肿瘤治疗的靶点, 目前阻断血管内皮生长因子 (VEGF) 是减少新生血管形成的主

要策略, 然而即使同时使用多种阻断剂, 其临床疗效也有限, 且存在明显的毒副作用^[5-7]。因此, 需要寻找一种新的抗血管新生治疗靶点, 考虑到内皮细胞 85% 的能量依赖于糖酵解^[8], 以内皮细胞代谢为目标可能会成为一种抑制新生血管形成的新策略。3PO 作为一种 PFKFB3 的小分子抑制剂, 在内皮细胞增殖过程中可以降低内皮细胞的糖酵解, 抑制内皮细胞的能量供应^[9], 从而抑制内皮细胞的增殖和迁移, 减少血管的萌芽及新生血管的形成, 进而抑制肿瘤的生长达到治疗肿瘤的目的^[1-3]。但是目前相关动物实验^[1,3]的给药方式均为腹腔注射, 其水溶性低, 需与一些增溶剂如二甲基亚砜、无水乙醇等一起使用, 易引起机体的局部组织坏死、神经毒性甚至死亡, 而且长期全身使用药物存在一定程度的毒副作用, 限制了该药物未来的临床应用。因此, 如何将 3PO 药物安全、有效、高选择性地传输到肿瘤部位成为治疗研究的难点。

超声微泡作为一种超声造影剂, 不仅具有疾病诊断的作用, 而且可以作为化疗药物或基因载体, 在一定强度的超声辐照下, 局部发生空化效应破裂, 从而靶向控制释放化疗药物或基因^[9-10]。但是由于造影剂微泡外壳为较薄的脂质膜或蛋白膜, 在膜上能携带的药物量或基因量有限, 而且微泡中心为惰性气体所占据, 减少了微泡携带药物或基因的能力, 难以达到临床治疗的有效剂量。脂质体-微泡复合物作为一种良好的声敏药物载体, 具有无创安全、有效、靶向等特点, 研究^[11-13]表明, 该复合物载体对脂溶性药物和水溶性药物均具有较高的载药量, 不但满足临床肿瘤治疗的用量需求, 还可以将抗肿瘤药物或基因特定传输到肿瘤部位, 以增强肿瘤治疗效果, 体现了该复合物在体内治疗肿瘤的临床意义。本实验拟采用生物素-亲和素非共价键结合方式制备 3PO-LMC, 并探讨其一般特征、体外超声显影效果及超声控制释放能力。结果显示, 制备的 3PO-LMC 具有普通微泡形态, 粒径约 (2.54±0.15) μm , 符合临床上微泡的使用要求, 可以顺利通过肺循环, 而且实验中所采用的磷脂材料具有生物相容性良好的特性, 保证了临床使用的安全性; 其中脂质体-微泡复合物制备所采用的生物素-亲和素连接系统为高强度的非共价结合方式, 难以被体内蛋白溶解酶解离, 具有高效、稳定的特点, 可以保证药物的靶向输送。理想的超声造影剂应具有良好的超声显影增强效果以实现体内有效的识别追踪, 本实验制备的 3PO-LMC 在体外琼脂模型中可显示出与普通微泡一致的超声显影效果, 具有良好的超声声学特性,

可为进一步体内实验提供有效的识别追踪及效果评价。

微泡在超声波的作用下会产生空化效应^[14],即微泡周期性振荡、膨胀、收缩以致内爆等一系列动力学过程,并伴随着多种能量释放。空化效应的大小与超声能量密切相关,能量越高,空化效应越明显,对病变及周围正常组织所造成的损伤越严重,从而造成严重的病理生理后果。对于载药超声造影剂,期望能在保证体内局部药物释放率的同时,尽量避免或减少因超声辐照对机体正常组织造成损害,保证使用的安全性。因此,在超声介导载药脂质体-微泡复合物的治疗过程中,超声相关参数的合理选择尤其重要。本实验中,在相同超声强度条件下,药物释放率与超声辐照时间呈正相关($P<0.05$);而在相同超声辐照时间下,药物释放率也与超声强度呈正相关($P<0.05$),与既往研究^[15-16]结果相符。而且本实验结果显示,超声强度1.00 MPa、作用60 s时药物释放率达到最大[(90.93±1.79)%],为后续低能超声介导载3PO脂质体微泡的体内外治疗研究提供超声条件参考。

本实验的局限性:①3PO-LMC在制备时需经过多次离心洗涤,消耗较大,使得制备出的3PO-LMC浓度低于普通微泡造影剂;②尽管生物素-亲和素连接方式是目前最有效的靶向结合系统,但是亲和素受内源性生物素竞争,存在免疫原性,在临床应用可能会产生排异反应;③3PO-LMC的治疗效果尚有待体内外实验的进一步验证;④超声参数有待于今后治疗研究的进一步优化及评估,尤其对于体内实验,需评估不同超声参数对于周围正常组织的损伤情况,以提高超声使用的安全性。

综上所述,本实验成功构建了3PO-LMC,其不仅在体外显示出良好的超声显影效果,在超声辐照下还可获得良好的药物释放,为后续体内外治疗研究奠定了基础,有望为体内肿瘤治疗提供一种新的、安全、有效的药物载体和方法。

参考文献

- [1] De Bock, Georgiadou M, Schoors S, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting[J]. Cell, 2013, 154(3): 651-663.
- [2] Xu Y, An X, Guo X, et al. Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(6): 1231-1239.
- [3] Schoors S, De Bock K, Cantelmo AR, et al. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis [J]. Cell Metab, 2014, 19(1): 37-48.
- [4] Kheiriloom A, Dayton PA, Lum AF, et al. Acoustically-active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle[J]. J Control Release, 2007, 118(3): 275-284.
- [5] Ferroni P, Formica V, Roselli M, et al. Thromboembolic events in patients treated with anti-angiogenic drugs[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2010, 8(1): 102-113.
- [6] Qi WX, Shen Z, Tang LN, et al. Congestive heart failure risk in cancer patients treated with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis of 36 clinical trials[J]. Br J Clin Pharmacol, 2014, 78(4): 748-762.
- [7] Moreo A, Vallerio P, Ricotta R, et al. Effects of cancer therapy targeting vascular endothelial growth factor receptor on central blood pressure and cardiovascular system[J]. Am J Hypertens, 2016, 29(2): 158-162.
- [8] Cruys B, Wong BW, Kuchnio A, et al. Glycolytic regulation of cell rearrangement in angiogenesis[J]. Nat Commun, 2016, 7(1): 12240.
- [9] Geis NA, Katus HA, Bekeredjian R. Microbubbles as a vehicle for gene and drug delivery: current clinical implications and future perspectives[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(15): 2166-2183.
- [10] Kang ST, Yeh CK. Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design[J]. Chang Gung Med J, 2012, 35(2): 125-139.
- [11] Klibanov AL, Shevchenko TI, Raju BI, et al. Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: a tool for targeted drug delivery[J]. J Control Release, 2010, 148(1): 13-17.
- [12] Yan F, Li L, Deng Z, et al. Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers [J]. J Control Release, 2012, 166(3): 246-255.
- [13] Deng Z, Yan F, Jin Q, et al. Reversal of multidrug resistance phenotype in human breast cancer cell using doxorubicin-liposome-microbubble complexes assisted by ultrasound[J]. J Control Release, 2014, 174(1): 109-116.
- [14] Miller DL. Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2007, 93(1-3): 314-330.
- [15] 李露, 陈娟娟, 刘先俊. 载紫杉醇-阿霉素微泡的制备以及控制释放研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(5): 427-430.
- [16] 周美君, 刘红梅, 严飞, 等. 超声介导iRGD靶向载药脂质体-微泡复合物的体外溶栓作用[J]. 中华超声影像学杂志, 2018, 27(4): 342-347.

(收稿日期: 2020-12-27)