

本文引文格式:黄钊希,陆柳桂,高泳,等.载阿霉素超声纳米泡的制备及其特性研究[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):336-340,358.

【论著与临床报道】

载阿霉素超声纳米泡的制备及其特性研究

黄钊希¹,陆柳桂¹,高泳²,廖新红²

(1. 广西医科大学,广西南宁 530021;

2. 广西医科大学第一附属医院超声科,广西南宁 530021)

摘要:目的 制备载阿霉素超声纳米泡(doxorubicin-loaded nanobubbles, Dox-NBs)并观察其理化特性。方法 通过薄膜水化法及机械振荡法制备空白超声纳米泡(nanobubbles, NBs)和 Dox-NBs。以空白 NBs 组为对照组, Dox-NBs 为实验组,采用纳米粒度电位仪检测比较两组的粒径、Zeta 电位,采用光学显微镜、血球计数板检测 Dox-NBs 形态及浓度,酶标仪检测阿霉素的载药量与封装率,观察 Dox-NBs 组与 Dox-NBs 联合超声治疗仪组的体外药物释放率,并在超声下观察其体外显影情况。结果 Dox-NBs 组与空白 NBs 组的平均粒径分别为(286.93±14.45) nm、(119.20±16.89) nm,两者差异有统计学意义($P < 0.01$),Zeta 电位分别为(-13.30±2.17) mV、(-11.07±1.33) mV,两者差异无统计学意义($P = 0.056 > 0.05$)。Dox-NBs 大小、形态均匀,无聚集,浓度(3.17±2.37)×10⁸ 个/毫升。阿霉素平均载药量为(45.85±2.17) μg/mg,封装率为(42.40±4.62)%,Dox-NBs 组与 Dox-NBs 联合超声治疗仪组所有时间点的阿霉素体外累计释放量差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。前 24 h 阿霉素累计释放量: Dox-NBs 组为(48.05±4.88)%, Dox-NBs 联合超声治疗仪组为(72.20±0.85)%, Dox-NBs 联合超声治疗仪组在时长为 5 h 时药物释放达 50% 以上, Dox-NBs 组时长为 5 h 药物释放仅为 25% 左右,经 24 h 释放至 50% 左右,前 3 h Dox-NBs 组药物释放曲线较联合超声辐射组平缓。体外超声显影结果可见点状均匀强回声。结论 本实验成功制备了性质稳定的载阿霉素超声纳米泡,体外超声显影效果良好,为今后载药超声纳米泡进行体内肿瘤显像与治疗研究提供了实验依据。

关键词:超声造影剂;阿霉素;纳米泡;超声治疗仪

中图分类号:R730.41

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)03-0336-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.03.006

Preparation and characteristics of doxorubicin-loaded nanobubbles

Huang Zhaoxi¹, Lu Liugui¹, Gao Yong², Liao Xinhong²

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China;

2. Department of Ultrasound, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To prepare Dox-NBs(doxorubicin-loaded nanobubbles) and observe their physical and chemical properties. **Methods** Blank ultrasonic NBs (nanobubbles) and Dox-NBs were prepared by the methods of membrane hydration and mechanical oscillation. The blank NBs group was taken as the control group, and the Dox-NBs was taken as the experiment group. The particle size and Zeta potential of the two groups were detected and compared by nano-particle potentiometer. The morphology and concentration of Dox-NBs were detected by optical microscope and blood counting plate. The drug loading and encapsulation rate of

基金项目:广西自然科学基金面上项目(2018GXNSFAA281171)

第一作者简介:黄钊希(1997-),女,在读硕士研究生,研究方向:超声分子成像,E-mail:2336899193@qq.com

通讯作者简介:高泳(1980-),女,博士,副主任医师,研究方向:超声分子成像、泌尿系统的超声诊断及介入超声,E-mail:21412066@qq.com

adriamycin were determined by the microplate reader. It was necessary to observe the drug release rate in vitro of the Dox-NBs group and the Dox-NBs combined with ultrasound group, and their development was observed in vitro under ultrasound. **Results** The average particle size of the Dox-NBs group and the blank NBs group were (286.93 ± 14.45) nm and (119.20 ± 16.89) nm, respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Their Zeta potentials were (-13.30 ± 2.17) mV and (-11.07 ± 1.33) mV, respectively, and there was no significant difference between them ($P = 0.056 > 0.05$). Dox-NBs was uniform in size and shape, without aggregation, and the concentration was $(3.17 \pm 2.37) \times 10^8$ PCS/mL. The average doxorubicin loading was (45.85 ± 2.17) $\mu\text{g}/\text{mg}$, and the encapsulation rate was $(42.40 \pm 4.62)\%$. There were statistically significant differences in doxorubicin release at all time points between the Dox-NBs group and the Dox-NBs combined with ultrasound group ($P < 0.05$). Cumulative release of doxorubicin in the first 24 h was $(48.05 \pm 4.88)\%$ in the Dox-NBs group and $(72.20 \pm 0.85)\%$ in the Dox-NBs combined with ultrasound group. In the Dox-NBs combined with ultrasound group, the drug release reached more than 50% after 5 h; in the Dox-NBs group, the drug release reached only about 25% after 5 h, and about 50% after 24 h. In the first 3 h, the drug release curve of the Dox-NBs group was more gentle than that of Dox-NBs combined ultrasound group. In vitro ultrasonography showed pointy and strong echo. **Conclusion** In this experiment, stable Dox-NBs are successfully prepared and the ultrasonic development effect is good in vitro. It provides experimental basis for the imaging and treatment of tumor in vivo by drug-loaded ultrasonic nanobubbles in the future.

Key words: ultrasound contrast agent; doxorubicin; nanobubble; therapeutic ultrasound

癌症是严重危害中国居民健康的重大慢性疾病之一,其发病率及死亡率分别占全球的 23.7%、30%^[1]。尽管近年来靶向治疗、免疫治疗等新兴疗法已逐步应用于临床,化疗依然是绝大多数恶性肿瘤的主要治疗手段。以阿霉素为代表的蒽环类药物仍是大多数实体肿瘤和血液系统恶性肿瘤治疗的基础药物,但由于阿霉素毒性大,引发心脏毒性、胃肠道反应、骨髓抑制、脱发和药物外渗等不良反应,限制了其临床应用^[2]。

已有研究表明,载药超声纳米泡能作为药物载体,高效运载化疗药物,联合超声辐射作用下,可实现化疗药物定向释放提高疗效,同时减少化疗药物在肿瘤以外的部位聚集,减轻全身毒副作用^[3]。目前,载药超声纳米泡的研究众多,其制备条件及成膜材料不同,制备出来的超声纳米泡在各项物理特性和成像特性上均存在一定的差异^[4-6],因而,如何制备安全性高且稳定性好的载药超声纳米泡仍是目前分子影像研究的热点及难点。本实验通过添加聚合物 N,N-二乙基丙烯酰胺(N,N-diethyl acrylamide, NNDEA)和表面活性剂 Pluronic 124,拟制备一种既安全、稳定且操作简单、成本低的载药超声纳米泡造影剂,通过优化关键制备参数,观察其理化特性,为后续探究载药超声纳米泡的体内肿瘤成像及治疗提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 二棕榈酰磷脂酰胆碱(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇(1,2-distearoyl-phosphatidylethanol amine-methyl-poly ethylene gly-

col conjugate-2000, DSPE-mPEG2000)购自北京谨明生物科技有限公司;二棕榈酰磷脂酰胆碱(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamin, DPPE)、二棕榈酰磷脂酸(1,2 dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphate, DPPA)、甘油、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、盐酸阿霉素(doxorubicin, Dox)、Irgacure 2959、N,N'-双(丙稀酰)胱胺[N,N-bis(acryoyl) cystamine, BAC]均购自上海麦克林生化科技有限公司;N,N'-二乙基丙酰胺(NNDEA)购自上海贤鼎生物科技有限公司;Pluronic 124 购自美国 Sigma-Aldrich;氯仿购自成都科隆化学品有限公司;全氟丙烷气体(C3F8)购自深圳金谷气体有限公司。

1.2 主要仪器 XS205DU 十万分之一天平购自梅特勒-托利多, KQ-501DB 超声波清洗仪购自昆山市超声仪器有限公司, XD-W2308 加热板购自深圳市兴达恒业科技有限公司, HH-420 恒温水浴锅购自金坛市易晨仪器有限公司, HL-AH(G8)银汞调和器购自杭州中润医疗器械有限公司, Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电位仪购自英国马尔文仪器有限公司;光学显微镜购自 Olympus, 血球计数板购自上海市求精生化试剂仪器有限公司, 冷冻干燥机购自德国 ALPHA 1-2 LD plus, Synergy H1 多功能酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司, 85-2 恒温磁力加热搅拌器购自常州翔天实验仪器厂, 超声治疗仪 UT1021 购自深圳东迪欣科技有限公司, 诊断超声仪 GELOGIQ E9。

1.3 实验方法

1.3.1 NBs 的制备及优化 ①以质量比为 1:1.5:

4 : 1 准确称取 DPPA、DPPE、DPPC 和 DSPE-mPEG2000 于离心管中,加入氯仿,在 37 °C 超声波清洗仪中振荡充分溶解;②随后将澄清的脂质材料混合液转移至样品瓶中,开盖置于 65 °C 加热板上作用,去除溶剂,直至瓶内脂质材料呈薄膜状;③取甘油 50 μL ,以及一定比例的 Pluronic 124、Irgacure 2959 溶液的混合液 1 mL 加入薄膜瓶中,加盖密封,65 °C 水浴 30 min;④以 2 : 1 的比例加入 NNDEA、BAC。⑤抽出瓶内空气并充入 C3F8 气体。使用银汞调和仪以恒定振荡频率下调整振荡时间,4 °C 倒置分层,下层清液为所需 NBs。

1.3.2 Dox-NBs 的制备 ①以质量比为 1 : 1.5 : 4 : 1 准确称取 DPPA、DPPE、DPPC 和 DSPE-mPEG2000 于离心管中,加入氯仿,在 37 °C 超声波清洗仪中振荡充分溶解;②随后将澄清的脂质材料混合液转移至样品瓶中,开盖置于 65 °C 加热板上作用,去除溶剂,直至瓶内脂质材料呈薄膜状;③取甘油 50 μL ,以及一定比例的 Pluronic 124、Dox、Irgacure 2959 溶液的混合液 1 mL 加入薄膜瓶中,加盖密封,65 °C 水浴 30 min;④以 2 : 1 的比例加入 NNDEA、BAC;⑤抽出瓶内空气并充入 C3F8 气体,用银汞调和仪高速振荡 60 s,置于 254 nm 紫外灯下照射 30 min,4 °C 倒置分层,下层清液为所需 Dox-NBs,以上操作避光进行。

1.3.3 超声纳米泡的表征检测 将 Dox-NBs 及 NBs 用 PBS 稀释相同倍数,采用纳米粒度电位仪检测样本的粒径大小及分散度、Zeta 电位(仪器设置条件: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, laser wavelength = 660 nm, angle = 90),光学显微镜 $\times 400$ 下观察 Dox-NBs 的一般形态,血球计数板计数 Dox-NBs 浓度 [25×16 规格,计数公式: $a = (b/5) \times 25 \times 10000 \times \text{稀释倍数}$]。

1.3.4 Dox-NBs 中 Dox 的载药量与包封率测定 采用酶标仪波长 $\lambda = 483\text{ nm}$ 条件下绘制阿霉素浓度—吸光度标准曲线方程备用。将样品瓶中 Dox-NBs 转移至分子截留量为 12 000 ~ 14 000 Da 透析袋中透析过夜,以去除游离的 Dox。采用冷冻干燥机将透析后的样品冻干。将冻干的载 Dox 纳米颗粒称重,并以 1 : 1 的体积比溶解在甲醇和 PBS 的混合液中。随后使用酶标仪测混合液的吸光度,利用回归方程计算出 NBs 包封 Dox 的量。平均载药量 = 包封 Dox 的量 (μg)/冻干的载 Dox 纳米颗粒的重量 (mg)。包封率 = 包封 Dox 的量 (μg)/初始 Dox 投入的量 (μg) $\times 100\%$ 。

1.3.5 Dox-NBs 体外药物释放实验 分为 Dox-NBs 组和 Dox-NBs 联合超声治疗仪组。分别取等量 Dox-NBs 样品加至 5 mL 置于透析袋中,封口。Dox-NBs 组立即放入 200 mL PBS 容器中,Dox-NBs 联合超声

治疗仪组在超声治疗仪作用(参数设置:频率 3 MHz, 占空比 20%,声强 1 W/cm^2 ,辐照时间 3 min)后再加入。将容器置于磁力搅拌器上以 100 r/min 的速度旋转作用。分别于设定的时间点(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、8 h、11 h、24 h)取容器中透析出的 Dox 溶液 1 mL 于小管中,同时补加 1 mL 的 PBS。用酶标仪检测不同时间点所取样品中 Dox 含量,计算 Dox-NBs 的累计释放百分比,做出累积释放率—时间曲线图。

1.3.6 Dox-NBs 的体外超声显影 将 Dox-NBs 用 PBS 按 1 : 100 稀释,置入琼脂糖凝胶制成的孔洞模具中,以 PBS 为空白对照组。用诊断超声仪(GELOGIQ E9)进行超声造影成像显影(仪器设置:9 L 探头,频率 8 MHz,机械指数 0.13, TIS 0.0,增益 6 dB)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计分析软件,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两样本组间差异采用 t 检验,多样本组间差异采用单因素方差检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 振荡时间对 NBs 粒径大小的影响 粒径检测结果显示,振荡时间为 45 s、60 s、90 s 制备的 NBs 平均粒径分别为 (557.69 ± 19.73) nm、(119.20 ± 16.89) nm、(364.00 ± 18.06) nm,三组间平均粒径比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),振荡时间为 60 s 时,制备所得 NBs 粒径大小最佳,见图 1。

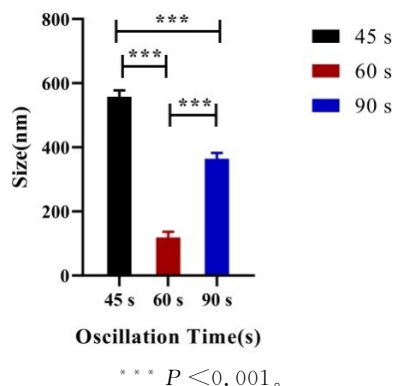


图 1 不同振荡时间粒径大小

2.2 Dox-NBs 的表征 成功制备 Dox-NBs,外观呈红色浊液,光学显微镜下观察呈球形,大小形态分布均匀,无聚集,见图 2。振荡时间均为 60 s 的 Dox-NBs 组与对照组 NBs 的平均粒径分别为 (286.93 ± 14.45) nm、(119.20 ± 16.89) nm,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)、Zeta 电位分别为 (-13.30 ± 2.17) mV、(-11.07 ± 1.33) mV,两者差异无统计学意义 ($P = 0.056 > 0.05$),见图 3。血球计数板计数 Dox-NBs 浓度 (3.17 ± 2.37) $\times 10^8$ 个/毫升。

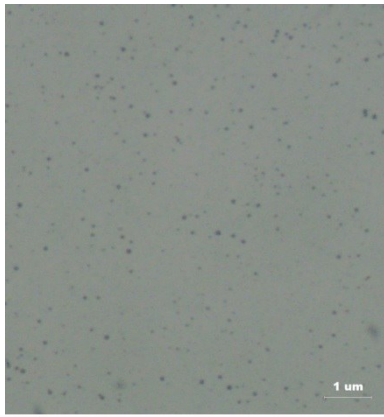


图 2 光镜载药纳米泡形态(×400)

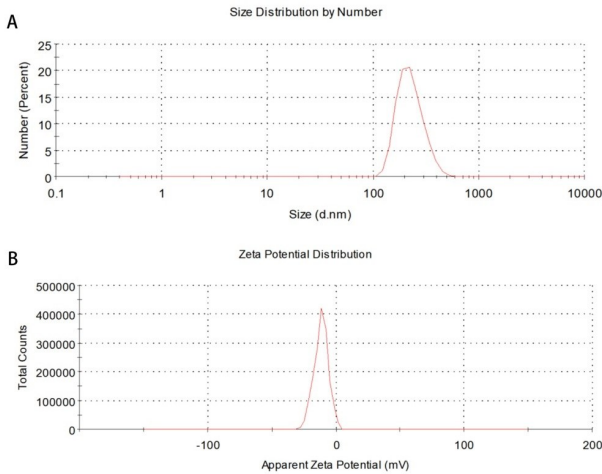


图 3 Dox-NBs 粒径及 Zeta 电位分布结果

2.3 Dox-NBs 的平均载药量、包封率、体外药物释放酶标仪阿霉素浓度-吸光度标准曲线为 $y = 0.0005x + 0.0417$, $R^2 = 0.9959$, 测定 Dox-NBs 中阿霉素的平均载药量为 $(45.85 \pm 2.17) \mu\text{g}/\text{mg}$, 包封率为 $(42.40 \pm 4.62)\%$ 。体外释放实验结果显示, 两组所有时间点比较累计释放量差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), Dox-NBs 联合超声治疗仪组在时长为 5 h 时药物释放达 50% 以上, 单纯 Dox-NBs 组时长为 5 h 药物释放仅为 25% 左右, 经 24 h 释放至 50% 左右, 见表 1。Dox-NBs 联合超声治疗仪组和单纯 Dox-NBs 组 3 h 内的药物释放曲线见图 4。

2.4 Dox-NBs 的体外显影评价 在超声造影模式下, 体外显影结果显示, Dox-NBs 组显示点状强回声, 分布均匀。空白对照组的 PBS 显示为无增强的液性暗区, 见图 5。

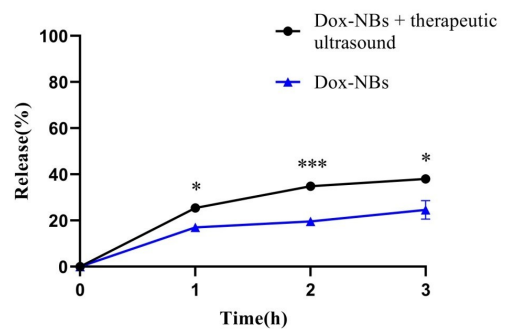
3 讨论

稳定性能是载药超声纳米泡发挥作用的重要影响因素。超声纳米泡的制备处方不同, 其稳定性不同^[7-9]。目前纳米泡的制备多为脂质类外壳, 其生物相容性良好, 回声强度满意, 但稳定性较差^[10-11]。因此,

表 1 Dox-NBs 组、Dox-NBs 联合超声治疗仪组体外阿霉素累积释放率比较

时间/h	单纯 Dox-NBs 组	Dox-NBs 联合超声治疗仪组	<i>t</i>	<i>P</i>
1	17.05 ± 1.20	25.70 ± 0.28	9.906	0.010 ^a
2	19.65 ± 0.21	34.90 ± 1.27	16.714	<0.001 ^c
3	24.65 ± 4.03	38.00 ± 1.41	4.420	0.048 ^a
4	26.55 ± 1.77	46.40 ± 2.40	9.407	0.011 ^a
5	28.50 ± 0.57	52.35 ± 0.07	59.165	<0.001 ^c
8	38.35 ± 1.63	60.30 ± 0.28	18.805	0.003 ^b
11	42.20 ± 3.11	66.45 ± 3.04	7.883	0.016 ^a
24	48.05 ± 4.88	72.20 ± 0.85	6.896	0.020 ^a

注: ①表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示; ②与 Dox-NBs 联合超声治疗仪组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$ 。



与 Dox-NBs 联合超声治疗仪组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 阿霉素体外释放曲线图

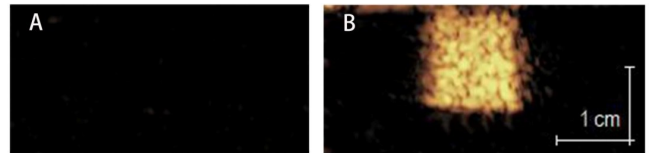


图 5 超声造影下载药纳米泡的体外显影情况

本研究在脂质类外壳基础上尝试通过添加 Pluronic 124、NNDEA 来提高超声纳米泡的稳定性。Zeta 电位结果提示, 制备的空白 NBs 和 Dox-NBs 在 PBS 溶液中均有较好的稳定性。表面活性剂 Pluronic 是一类两亲性高分子材料, 可在脂质材料之间排列构成外壳。脂质壳流动性在一定程度上与脂质类纳米泡的稳定性和回声性质相关, Pluronic 则通过改变脂质堆积结构及增加外膜流动性降低纳米泡表面张力^[12-13]。同时, 本研究添加的 NNDEA 可与 Pluronic 组成的胶束互穿交联形成更为稳定的网状结构^[14], 从而保持纳米泡不被破坏。体外释放实验中, 在模拟体内血液循环条件下, 没经超声治疗仪作用的 Dox-NBs 药物释放曲线平缓, 药物释放到 50% 需时间较长, 提示 Dox-NBs 可较好保持稳定的结构, 没有外力加促纳米泡破裂的情况下, 其装载的药物释放缓慢, 有利于下一步药物的定点定位释放研究, 这与 PERERA R H 等^[15]研究一致。

稳定性良好的 Dox-NBs 体外超声显影结果显示呈点状均匀强回声,效果良好,为后续进行体内肿瘤诊疗实验提供了良好基础。

超声触发药物递送系统是目前肿瘤诊疗研究中的热点及研究方向。利用肿瘤增强的渗透和滞留效应,以及多数肿瘤内皮间隙可扩大至 380~780 nm^[16],因此粒径在此范围内的超声纳米泡可穿过血管抵达肿瘤血管外间质,实现肿瘤细胞显像,还可通过装载药物、基因、连接靶点等形成功能化超声纳米泡,实现靶向治疗。由此可见,除了纳米泡的稳定性以外,粒径大小是影响靶向超声分子成像的另一关键因素。超声纳米泡通过高速振荡使微泡分裂产生^[17],因此,这过程中的振荡参数对粒径大小的影响至关重要。振荡程度不够,微泡不足以分裂产生纳米泡;振荡程度过度,使产生的纳米泡破裂融合,粒径会增加,所以振荡参数的设置非常关键。本实验中采用的是高速水平往复式振荡,振荡频率与振荡幅度相对恒定,因此需对振荡时间的 3 组设定参数进行筛选。3 组样品粒径结果显示,振荡时间为 60 s 时粒径最佳。本实验制备的 Dox-NBs 平均粒径为(286.93±14.45) nm,呈单峰分布,分散度好,粒径范围窄,大小形态均匀,无聚集,完全能实现穿越血管内皮细胞间隙实现血管外显像的能力。

近年来,已有较多研究利用载药超声纳米泡降低阿霉素的毒副作用^[18-20]。本实验中制备的 Dox-NBs 平均载药量与包封率实验结果与 NITTAYACHARN P 等^[21-23]研究结果相近。体外阿霉素释放实验显示, Dox-NBs 联合超声治疗仪组前 24 h 阿霉素累计释放量高于 Dox-NBs 组。表明本实验制备的载药超声纳米泡可有效包裹药物,联合超声辐射作用,可实现肿瘤部位的药物定点定位释放,有望发挥肿瘤精准治疗作用,提高在肿瘤部位的药物浓度,减少全身毒副作用。

综上所述,本实验成功制备了一种粒径小、稳定性好、体外显像效果良好的载阿霉素超声纳米泡,为后续开展体内肿瘤超声分子精准治疗提供了实验依据。

参考文献:

[1] FERLAY J, ERVIK M, BRAY F, et al. Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: international agency for research on cancer[EB/OL]. <https://gco.iarc.fr/today>.

[2] 石远凯, 巴一, 冯继锋, 等. 中国萘环类药物特性专家共识[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(3): 110-112.

[3] 张梦娜, 闫国珍, 何俊峰, 等. 载紫杉醇靶向 LHRH 脂质微泡造影剂体外寻靶及其致人卵巢癌细胞(OVCAR-3)凋亡的研究[J]. 中国超声医学杂志, 2021, 37(2): 221-224.

[4] 董琪, 张雨, 杜晶, 等. 载阿霉素-全氟溴辛烷纳米级聚乳酸超声造影剂体外显像和抗肿瘤效果实验研究[J]. 医学

影像学杂志, 2018, 28(9): 1552-1556.

[5] 姜一弘, 吕苇, 杨佳琪, 等. 双模态纳米级肿瘤靶向超声造影剂的制备及对对比研究[J]. 中国超声医学杂志, 2020, 36(10): 950-953.

[6] 辛莹, 周厚妊, 张月, 等. 纳米级靶向超声造影剂在癌症诊疗中的研究进展[J]. 医学影像学杂志, 2021, 31(6): 1067-1070.

[7] 叶鸣, 王志刚, 周鸿, 等. 靶向 VEGFR-3 载阿霉素脂质微泡超声造影剂体外显影及寻靶能力的实验研究[J]. 中国临床医学影像杂志, 2015, 26(7): 509-511.

[8] HU C, JIANG D P, WU M, et al. Ultrasound-mediated nanobubble destruction (UMND) facilitates the delivery of VEGFR2-targeted CD-TK-loaded cationic nanobubbles in the treatment of bladder cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(6): 1415-1426.

[9] KIDA H, NISHIMURA K, OGAWA K, et al. Nanobubble mediated gene delivery in conjunction with a handheld ultrasound scanner[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 363.

[10] 张子栋, 严飞, 李翔, 等. 包裹阿霉素超声造影剂的制备及体外抗肿瘤作用研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2010, 27(5): 2161-2165.

[11] EXNER A A, KOLIOS M C. Bursting microbubbles: how nanobubble contrast agents can enable the future of medical ultrasound molecular imaging and image-guided therapy[J]. Curr Opin Colloid Interface Sci, 2021, 54: 101463.

[12] 刘欣欣, 王衍戈, 朱佩娟, 等. 纳米级载药微泡的制备及其超声介导下的抑瘤研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2010, 49(6): 874-879.

[13] KRUPKA T M, SOLORIO L, WILSON R E, et al. Formulation and characterization of echogenic lipid-Pluronic nanobubbles[J]. Mol Pharm, 2010, 7(1): 49-59.

[14] HUSSEINI G A, PITT W G, CHRISTENSEN D A, et al. Degradation kinetics of stabilized Pluronic micelles under the action of ultrasound[J]. J Control Release, 2009, 138(1): 45-48.

[15] PERERA R H, WU H P, PEIRIS P, et al. Improving performance of nanoscale ultrasound contrast agents using N,N-diethylacrylamide stabilization[J]. Nanomedicine, 2017, 13(1): 59-67.

[16] THAKOR A S, GAMBHIR S S. Nano-oncology: the future of cancer diagnosis and therapy[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(6): 395-418.

[17] NIRMALKAR N, PACEK A W, BARIGOU M. Bulk nanobubbles from acoustically cavitated aqueous organic solvent mixtures[J]. Langmuir, 2019, 35(6): 2188-2195.

[18] WU Y, LU C T, LI W F, et al. Preparation and antitumor activity of bFGF-mediated active targeting doxorubicin microbubbles[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2013, 39(11): 1712-1719.

(下转第 358 页)

- rats by modulating miR-21-3p/MAT2B signaling transduction[J]. *Croat Med J*, 2019, 60(5): 439-448.
- [28] NASIRISHARGH A, KUMAR P, RAMASUBRAMANIAN L, et al. Exosomal microRNAs from mesenchymal stem/stromal cells: biology and applications in neuroprotection[J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(7): 776-794.
- [29] ZHAN L, PANG Y, JIANG H, et al. Butylphthalide inhibits TLR4/NF- κ B pathway by upregulation of mir-21 to have the neuroprotective effect[J]. *J Healthc Eng*, 2022: 4687349.
- [30] HENTZEN N B, MOGAKI R, OTAKE S, et al. Intracellular photoactivation of caspase-3 by molecular glues for spatiotemporal apoptosis induction[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(18): 8080-8084.
- [31] LUO S Y, LI R, LE Z Y, et al. Anfibatide protects against rat cerebral ischemia/reperfusion injury via TLR4/JNK/caspase-3 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 807: 127-137.
- [32] ERFANI S, MOGHIMI A, ABOUTALEB N, et al. Nesfatin-1 improve spatial memory impairment following transient global cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting microglial and caspase-3 activation[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 65(3): 377-384.
- [33] LORENTE L, MARTIN M M, PEREZ-CEJAS A, et al. Serum caspase-3 levels and early mortality of patients with malignant middle cerebral artery infarction[J]. *Neurocrit Care*, 2019, 31(3): 486-493.
- [34] ZHU H, JIAN Z H, ZHONG Y, et al. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation via JAK2/STAT3 pathway inhibition[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 714943.
- [35] CHEN S, DONG Z P, CHENG M, et al. Homocysteine exaggerates microglia activation and neuroinflammation through microglia localized STAT3 overactivation following ischemic stroke[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 187.
- [36] XIA Y G, LING X Z, HU G W, et al. Small extracellular vesicles secreted by human iPSC-derived MSC enhance angiogenesis through inhibiting STAT3-dependent autophagy in ischemic stroke[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 313.
- [37] LIM C, LIM S, LEE B, et al. Licorice pretreatment protects against brain damage induced by middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *J Med Food*, 2018, 21(5): 474-480.
- [38] SETYOPRANOTO I, SADEWA A H, WIBOWO S, et al. Comparison of mean VEGF-A expression between acute ischemic stroke patients and non-ischemic stroke subjects[J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(5): 747-751.
- [39] SUN P, MA F F, XU Y, et al. Genetic deletion of endothelial microRNA-15a/16-1 promotes cerebral angiogenesis and neurological recovery in ischemic stroke through Src signaling pathway[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(10): 2725-2742.
- [40] LIANG Z, CHI Y J, LIN G Q, et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3485-3492.
- [41] LIU B W, LUO C, ZHENG Z G, et al. Shengui sansheng san extraction is an angiogenic switch via regulations of AKT/mTOR, ERK1/2 and notch1 signal pathways after ischemic stroke[J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 20-31.
- [42] ZHANG R R, WU Y P, XIE F, et al. RGMa mediates reactive astrogliosis and glial scar formation through TGF β 1/Smad2/3 signaling after stroke [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(8): 1503-1516.

收稿日期: 2022-02-04; 修回日期: 2022-02-18

(上接第 340 页)

- [19] 秦颢诚, 武俊, 于明, 等. MUC1 靶向性载紫杉醇超声造影剂的制备及体外靶向实验[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2021, 32(6): 445-448.
- [20] CAI Y, LIANG P P, TANG Q Y, et al. Diketopyrrolopyrrole-triphenylamine organic nanoparticles as multifunctional reagents for photoacoustic imaging-guided photodynamic/photothermal synergistic tumor therapy [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(1): 1054-1063.
- [21] NITTAYACHARN P, YUAN H X, HERNANDEZ C, et al. Enhancing tumor drug distribution with ultrasound-triggered nanobubbles[J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(9): 3091-3098.
- [22] WU M, WANG Y, WANG Y R, et al. Paclitaxel-loaded and A10-3. 2 aptamer-targeted poly(lactide-co-glycolic acid) nanobubbles for ultrasound imaging and therapy of prostate cancer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 5313-5330.
- [23] GUO L, SHI D D, MENG D, et al. New FH peptide-modified ultrasonic nanobubbles for delivery of doxorubicin to cancer-associated fibroblasts[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2019, 14(22): 2957-2971.

收稿日期: 2022-03-22; 修回日期: 2022-04-22