

## 岩藻多糖修饰的相变型造影剂体外超声显像及 靶向肝癌的实验研究\*

黄建波, 杨林, 阳锐, 阎锋, 彭玉兰, 徐金顺<sup>△</sup>

四川大学华西医院 超声医学科/超声医学研究室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 制备岩藻多糖修饰的相变型造影剂(FPCA), 评价其体外超声显影和对肝癌细胞的靶向能力。方法 采用薄膜水化-超声乳化法制备包裹全氟戊烷的纳米脂质体, 之后化学接枝岩藻多糖, 制备FPCA纳米粒, 对其基本理化性质进行表征。使用显微镜观察FPCA在水浴加热、微波辐照后的相变情况; 使用超声诊断仪观察FPCA相变后的二维超声、超声造影成像能力; 使用荧光共聚焦、流式细胞仪分析验证FPCA对肝癌细胞的靶向能力。**结果** 制备的FPCA平均粒径(222.1±32.5) nm, 外观呈球形, 分散性好, 具有较好的稳定性和生物相容性。使用水浴加热、微波辐照均能使FPCA发生相变, 最佳相变温度为50 ℃, 最佳相变微波功率为1.5 W/cm<sup>2</sup>。并且, 相变后的FPCA对二维超声、超声造影均具有显著的增强显像能力。通过使用FITC荧光标记, FPCA能够特异地与肝癌细胞靶向结合, 结合率高达(96.19±1.62)%, 而对正常肝脏细胞的结合率不足10%。**结论** 成功制备出稳定性和生物相容性良好的新型相变超声造影剂, 其不仅可通过相变增强超声显像, 还能对肝癌细胞具有特异的主动靶向性能。

**【关键词】** 全氟化碳 岩藻多糖 相变 靶向性 增强显像

**Fucoidan-Modified Phase-Transitional Contrast Agent for Ultrasound Imaging and Targeting of Hepatoma Cells**  
HUANG Jian-bo, YANG Lin, YANG Rui, YAN Feng, PENG Yu-lan, XU Jin-shun<sup>△</sup>. Department & Institute of Ultrasound Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: xujinshun@wchscu.cn

**【Abstract】 Objective** To prepare a fucoidan-modified phase-transitional contrast agent (FPCA) and to evaluate its *in vitro* capabilities for ultrasound imaging and targeting of hepatoma cells. **Methods** Nano-liposomes encapsulated with perfluoropentane were prepared using thin-film hydration and ultrasonic emulsification methods. Then, FPCA nanoparticles were prepared through chemical grafting of fucoidan and the characterization of their physical and chemical properties was performed. After applying external stimuli of heating with hot water bath and microwave irradiation, the phase-transition status of FPCA was observed with microscope. The imaging abilities of phase-transited FPCA on two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound were observed with ultrasonic diagnostic instrument. The ability of FPCA to target at hepatoma cells was evaluated and verified with fluorescence confocal observation and flow cytometry analysis. **Results** The FPCA prepared in the study had an average diameter of (222.1±32.5) nm, displaying spherical appearance, good dispersion, good stability, and good biocompatibility. The phase-transition of FPCA was induced by both heating with hot water bath and microwave irradiation. For phase transition, the optimal temperature was found to be 50 ℃ and the preferred microwave power was 1.5 W/cm<sup>2</sup>. Moreover, after phase transition, FPCA showed significant imaging enhancement on both two-dimensional ultrasonography and contrast-enhanced ultrasonography. Through fluorescein isothiocyanate (FITC) labeling, FPCA could specifically bind with hepatoma cells at a high binding rate of (96.19±1.62)%, while it rarely bound with normal liver cells, showing a binding rate of less than 10%. **Conclusion** A new type of phase-transitional ultrasound contrast agent with good stability and biocompatibility was successfully prepared. It not only could enhance ultrasound imaging through phase transition, but also had specific active hepatoma cell-targeting properties.

**【Key words】** Perfluorocarbons Fucoidan Phase transition Targeting Enhanced ultrasound imaging

恶性肿瘤是人类主要的致死性疾病, 虽然手术、放疗、化疗及多种联合疗法等已广泛用于肿瘤的治疗, 但上述治疗具有严重的副作用<sup>[1]</sup>。目前, 基于分子影像的靶向精准诊疗成为肿瘤疾病研究的新方向。超声分子影像通

过实时显示组织的灌注情况<sup>[2]</sup>, 已在肿瘤疾病的诊治过程中发挥了重要作用, 然而尚不能满足临床靶向精准诊疗的需求<sup>[3]</sup>。相变型纳米超声造影剂(phase-transitional contrast agent, PCA)是目前研究的一大热点, 其不仅能借助肿瘤渗透滞留效应, 实现纳米造影剂在肿瘤区域的被动靶向聚集, 还能通过相变显著提升靶区超声显像能力<sup>[4]</sup>, 同时还能通过化学修饰, 实现主动靶向的功能<sup>[5]</sup>。然而,

\* 北京市自然科学基金(No. 7192200)、成都市科技局项目(No. 2019-YF05-00376-SN)和四川省卫生健康委员会项目(No. 20PJ011)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xujinshun@wchscu.cn

目前研究的靶向分子仍存在一些不足,如特异性差、显像能力弱等。因此寻求一种靶向特异性高、成像效果好的超声造影剂成为亟待解决的问题<sup>[6-8]</sup>。

岩藻多糖(fucoidan, Fi)具有天然的抗肿瘤特性、良好的药物传递特性和特异的肿瘤靶向性,可用于乳腺癌、胰腺癌、肝癌等肿瘤的治疗<sup>[9-15]</sup>,且对正常细胞无毒副作用,是一种理想的靶向分子。全氟正戊烷(perfluoropentane, PFP)不仅具有良好的稳定性、低毒性和生物相容性,而且具有在较低温度下发生液气相变的优点,因此用PFP制备的纳米粒转化为微泡后可显著增强超声成像的效果<sup>[16-18]</sup>。本研究拟用Fi化学修饰PFP纳米脂质体,制备特殊的靶向型相变超声造影剂(fucoidan modified phase-transitional contrast agent, FPCA),为癌症早期的影像分子诊断提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和设备

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)、磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇[DSPE-PEG(2000)-amine]和胆固醇(CHOL)购于Avanti Polar Lipids(Alabaster, USA)。Fi( $20 \sim 300 \times 10^3$ ), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)购于Sigma Aldrich(St. Louis, USA)。肝癌细胞SMMC-7721和正常肝脏细胞L02购于中国科学院细胞库,4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)和FITC购于Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)。PFP购于北京华丰化学试剂。细胞计数、增殖/凋亡试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购于中国Dojindo分子技术公司。

主要实验设备:流式细胞仪(BD公司),全自动倒置荧光显微镜(IX83, 奥林巴斯),超声波细胞破碎仪(SCIENTZ-II, 新芝公司),超声诊断仪(Acuson antares, 德国西门子股份公司),透射电镜(JEM-2100F, 日本电子),激光粒度及Zeta电位分析仪(Zetasizer Nano ZS, 英国马尔文仪器有限公司),激光共聚焦显微镜(Leica公司),cytoflex流式细胞仪(Beckman)等。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 FPCA制备和表征** 称取DPPC(4 mg)、DSPE-PEG(2000)-amine(2 mg)和CHOL(1 mg)溶解于10 mL氯仿中。将溶液转移到25 mL梨形瓶中,旋转蒸发仪35 °C下形成薄脂膜。用2 mL去离子水将脂膜水化,形成半透明悬浮液,逐滴加入PFP 200  $\mu$ L,冰浴条件下,将混合液用超声破碎仪声振2 min(80 W, 开3 s, 关6 s),得到PFP脂质体悬浊液。为进一步靶向修饰,使用碳二亚胺法将Fi

(1 mg)在室温下与过量EDC混溶,轻轻摇晃24 h。将活化的Fi加入PFP脂质体悬浊液中,再用上述方法超声处理20 s,离心( $20\ 000 \times g$ , 30 min)、洗涤各3次,最后将沉淀与无菌PBS混合得到FPCA。使用相同实验条件,在氯仿溶液中加入FITC染料,在避光环境下制得荧光标记的FPCA,避光储存备用。在相同实验条件下,使用DSPE代替DSPE-PEG(2000)-amine,省略靶向修饰步骤,制备非靶向的PCA作为对照,同样方法制备带荧光标记的PCA。

使用显微镜、透射电镜观察FPCA形貌,使用激光粒度及Zeta电位分析仪检测FPCA粒径和电位,观察FPCA在不同介质(去离子水、细胞培养基和新鲜血浆)中的粒径和电位变化情况,以及FPCA静置一定时间后的粒径变化情况。

**1.2.2 相变实验** FPCA按一定倍数稀释后,取1 mL密封于容器中,再分别置于30 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C恒温水浴箱中分别加热10 min,再取适量FPCA悬液滴于载玻片上,用光学显微镜观察纳米粒子的大小及形态,以观察在不同温度下的相变情况。采用相同的方法,将1 mL FPCA置于容器中,分别给予不同功率的微波(0.6、0.9、1.2、1.5、1.8 W/cm<sup>2</sup>; 450 MHz)辐照5 min后,用光学显微镜观察。选取各组有代表性的图片进行保存,并随机选取5个高倍视野,计算各组中相变的FPCA个数,进行分析比较。

**1.2.3 显像实验** 制备30 g/L琼脂糖凝胶模型,在琼脂糖冷凝时顶部制备1 mL容量的孔洞,将FPCA纳米颗粒稀释一定倍数后,取200  $\mu$ L置入孔洞内,插入微波针进行辐照,功率为1.5 W/cm<sup>2</sup>,同时用温度计记录实时温度,当温度分别达到30 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C时,用超声诊断仪(探头频率5.71 MHz,机械指数0.18)对凝胶模型内纳米粒乳液进行超声显像,使用二维成像模式和Cadence造影剂成像(CCAI)模式观察其在相变前后超声显影情况,并以去离子水为对照组进行对比,应用Image J软件定量分析。

**1.2.4 FPCA纳米粒的细胞寻靶** 分别将正常肝脏细胞L02和肝癌细胞SMMC-7721置于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中,培养至对数增长后期后,接种于激光共聚焦培养皿中继续培育24 h。将每种细胞各分为两组,靶向FPCA组和非靶向PCA组,分别加入用FITC标记过的FPCA和非靶向PCA 100  $\mu$ L,共同培养4 h,加入DAPI孵育20 min对细胞核染色,再进行2~3次冲洗,用激光共聚焦显微镜( $\times 400$ )下观察靶向FPCA、非靶向PCA分别与正常肝脏细胞L02和肝癌细胞SMMC-7721的结合情况。

此外,使用流式检测FPCA对细胞的靶向能力,将24孔培养板中的正常肝脏细胞L02和肝癌细胞SMMC-7721分别

分为3组:靶向组,非靶向组,对照组。靶向组和非靶向组分别加入用FITC标记过的FPCA颗粒和非靶向PCA颗粒100  $\mu\text{L}$ ,对照组中加入100  $\mu\text{L}$ 无菌PBS溶液,共同培养12 h,各组细胞用胰酶消化后流式细胞仪检测FITC结合率。

### 1.3 统计学方法

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用非配对 $t$ 检验,多组间比较采用单因素或多因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FPCA理化性质表征

FPCA溶液为乳白色液体(图1A),在显微镜和透射电镜下可看到纳米粒子为球形、大小均匀、呈单分散的状态(图1B、图1C),激光粒度仪测得FPCA在25  $^{\circ}\text{C}$ 去离子水中的平均粒径( $222.1\pm 32.5$ ) nm, Zeta表面电位( $-15.2\pm 3.6$ ) mV。

化学接枝前,包载PFP的纳米脂质体表面电位为正[( $15.1\pm 2.4$ ) mV],使用碳二亚胺法接枝Fi以后,表面电位

为负( $-15.2\pm 3.6$ ) mV],证明FPCA成功合成(图1D)。使用共聚焦显微镜观察发现, FITC标记的FPCA显示为绿光,证明通过相似相溶原理制备的FITC-FPCA成功合成(图1E)。

为了观察FPCA的稳定性和生物相容性,在25  $^{\circ}\text{C}$ 和37  $^{\circ}\text{C}$ 下的去离子水、细胞培养基和血浆中分别测量FPCA的平均粒径和表面电位,发现不同条件下FPCA的粒径与电位变化差异均无统计学意义(表1)。进一步将FPCA置于去离子水中室温下动态观察发现, FPCA在48 h内粒径均无明显变化(图1F)。上述实验证明,所制备的FPCA超声造影剂具有良好的稳定性和生物相容性。

### 2.2 相变实验

如图2A所示,在水浴加热至30  $^{\circ}\text{C}$ 时FPCA未见明显改变。随着加热时间延长, FPCA相变成微泡的数量逐渐增多。当温度进一步升高至55  $^{\circ}\text{C}$ ,部分微气泡发生破裂,部分融合为更大气泡。通过计数比较发现,温度升至50  $^{\circ}\text{C}$ 时, FPCA相变成微气泡数量最多(图2C)。接着,在微波辐照刺激FPCA相变中也发现相似的现象,并得出微波刺激FPCA相变的最佳功率为1.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ (图2B、图2D)。

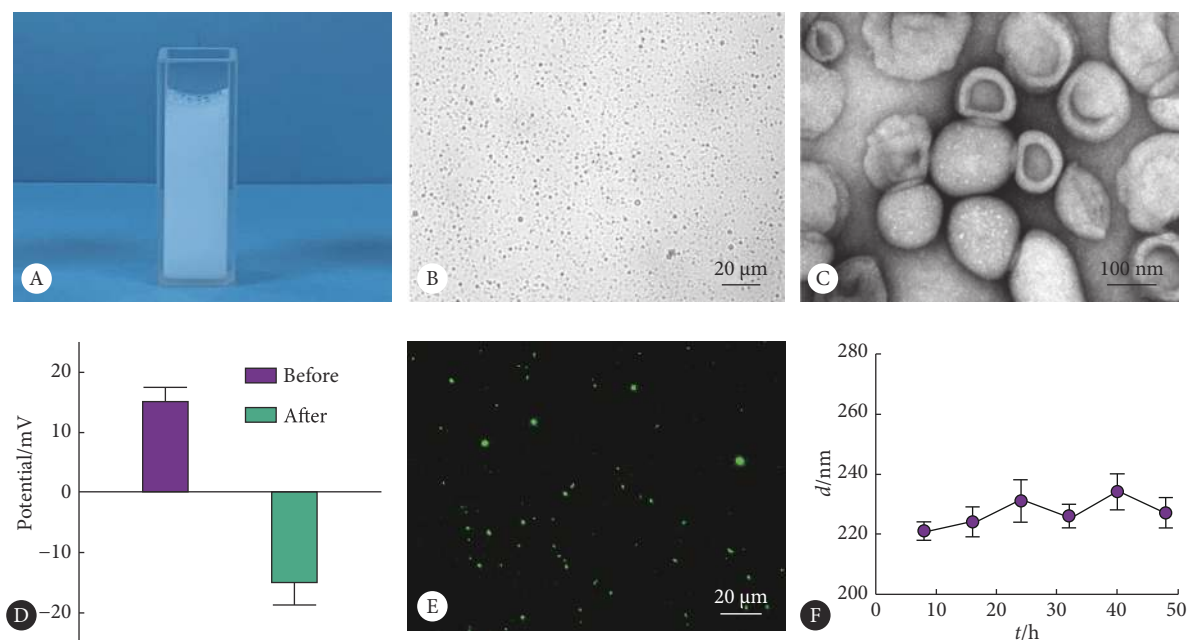


图1 制备的FPCA理化性质表征

Fig 1 Physicochemical characterization of FPCA

A: Visual appearance of FPCA emulsions; B: Microscopical observation of FPCA emulsions; C: Transmission electron microscope image of FPCA; D: Surface potential of FPCA before and after chemical grafting of fucoidan ( $n=3$ ); E: Fluorescence image of FPCA stained with FITC; F: FPCA sizes in deionized water over time at room temperature ( $n=3$ ).

表1 FPCA纳米粒子在25  $^{\circ}\text{C}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$ 下不同溶剂中的平均粒径和表面电位

Table 1 Average size and surface potential of FPCA nanoparticles in different solvents at 25  $^{\circ}\text{C}$  and 37  $^{\circ}\text{C}$ , respectively

Characterization	Deionized water		Medium		Plasma		P
	25 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$	
Average size/nm	222.1 $\pm$ 32.5	256.4 $\pm$ 27.8	300.6 $\pm$ 34.7	302.5 $\pm$ 33.3	302.6 $\pm$ 32.8	307.9 $\pm$ 30.6	>0.05
Potential/mV	-15.2 $\pm$ 3.6	-14.4 $\pm$ 3.4	-16.7 $\pm$ 2.8	-14.4 $\pm$ 2.6	-13.8 $\pm$ 2.5	-15.5 $\pm$ 3.1	>0.05

2.3 显像实验

使用1.5 W/cm<sup>2</sup>微波加热,在琼脂凝胶空洞模型中观察相变后的FPCA超声显像能力。相比于对照去离子水

组,相变FPCA在二维超声和超声造影模式下均具有良好的成像能力,并在微波加热至50 °C时成像效果最显著(图3A、图3B)。进一步使用定量软件对二维超声图像和

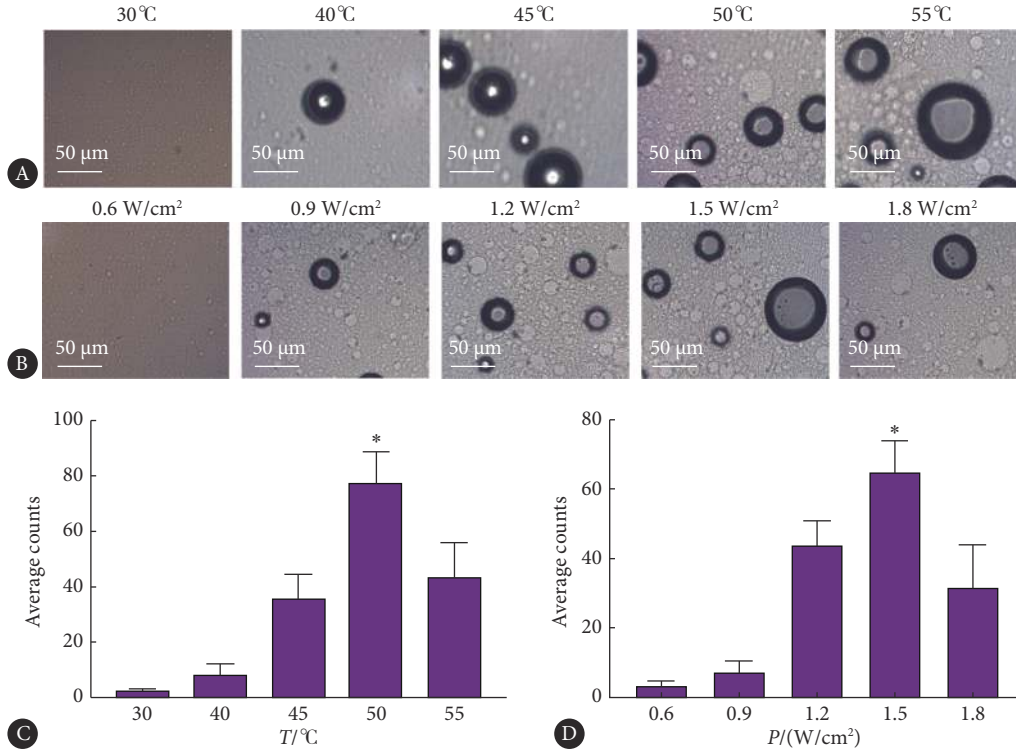


图 2 FPCA相变实验

Fig 2 Phase transition assay of FPCA

Microscopical images of FPCA after water bath heated (A) at different temperature (30, 40, 45, 50, and 55 °C) for 10 min and microwave irradiation (B) at different power levels (0.6, 0.9, 1.2, 1.5, and 1.8 W/cm<sup>2</sup>) for 5 min, respectively; counting and analytical comparison of phase transformed FPCA after heating with water bath (C, n=5) and microwave irradiation (D, n=5), respectively. \* P<0.05, vs. other groups.

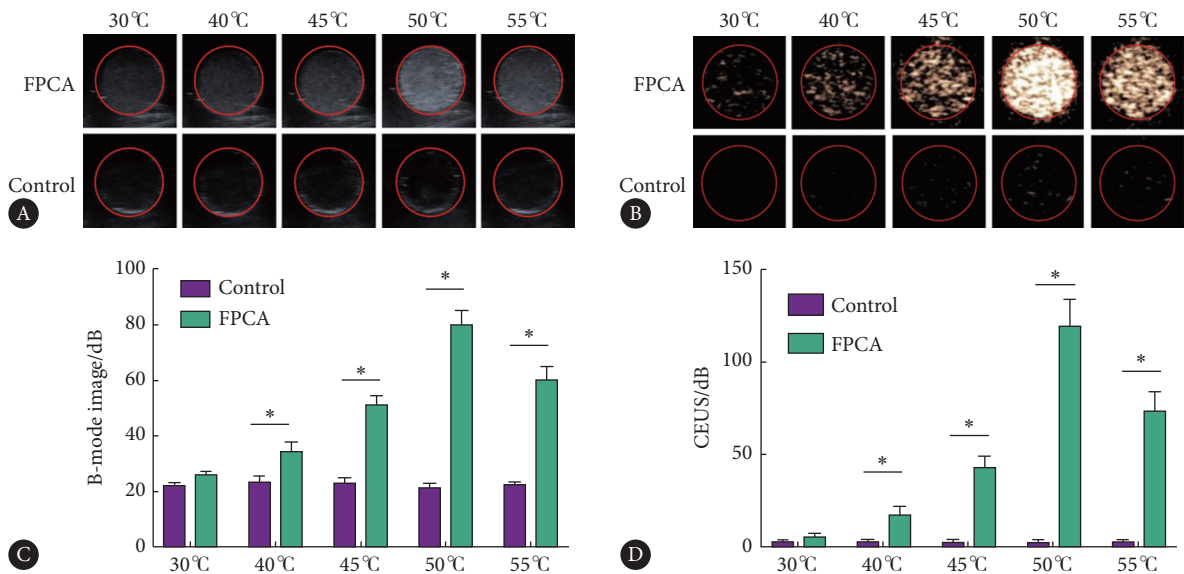


图 3 FPCA超声显像实验

Fig 3 Ultrasound imaging assay of FPCA

B-mode images (A) and CEUS images (B) of FPCA at 30, 40, 45, 50 and 55 °C, respectively, after microwave irradiation, with deionized water as control. C, D: Quantitative analysis in A and B, respectively, n=3, \* P<0.05.

CCAI造影图像进行灰度值分析,在微波加热至40~55℃时相变FPCA组的灰度值大于对照去离子水组( $P < 0.05$ ),说明FPCA相变后具有增强回声散射的特性(图3C、图3D)。

## 2.4 FPCA细胞寻靶

如图4所示,带绿色荧光的FPCA和PCA与L02共孵育后,细胞周围均未见结合的绿色荧光,表明制备的纳米粒对正常肝脏细胞不具有靶向性。当靶向组和非靶向组与SMMC-7721共孵育后,可见FPCA特异性地结合在肝癌细胞周围,而PCA未见与肝癌细胞结合,表明FPCA对肝癌细胞具有主动靶向的能力。进一步流式分析得出(图5),FPCA、PCA与正常肝脏细胞的结合极少,结合率不足10%,相比之下,FPCA与肝癌细胞的结合率为(96.19±1.62)%,而PCA与肝癌细胞的结合率仅为(11.72±2.13)%,二者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

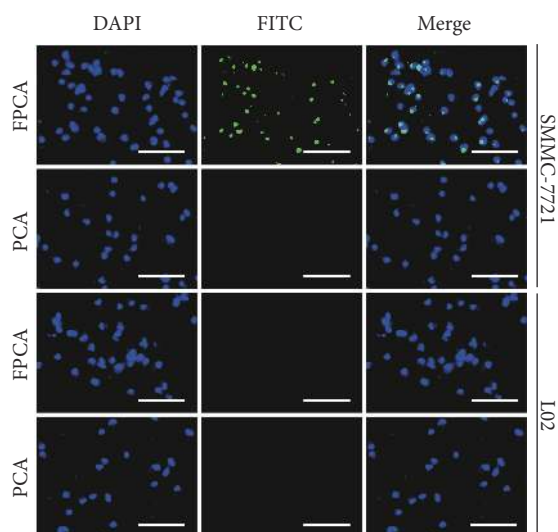


图4 激光共聚焦显微镜观察FPCA对细胞靶向性结果

Fig 4 Targeting assay of FPCA by laser confocal microscopy

Blue shows DAPI nuclear stain; green shows FITC cytoplasm stain. Scale bar=50  $\mu\text{m}$ .

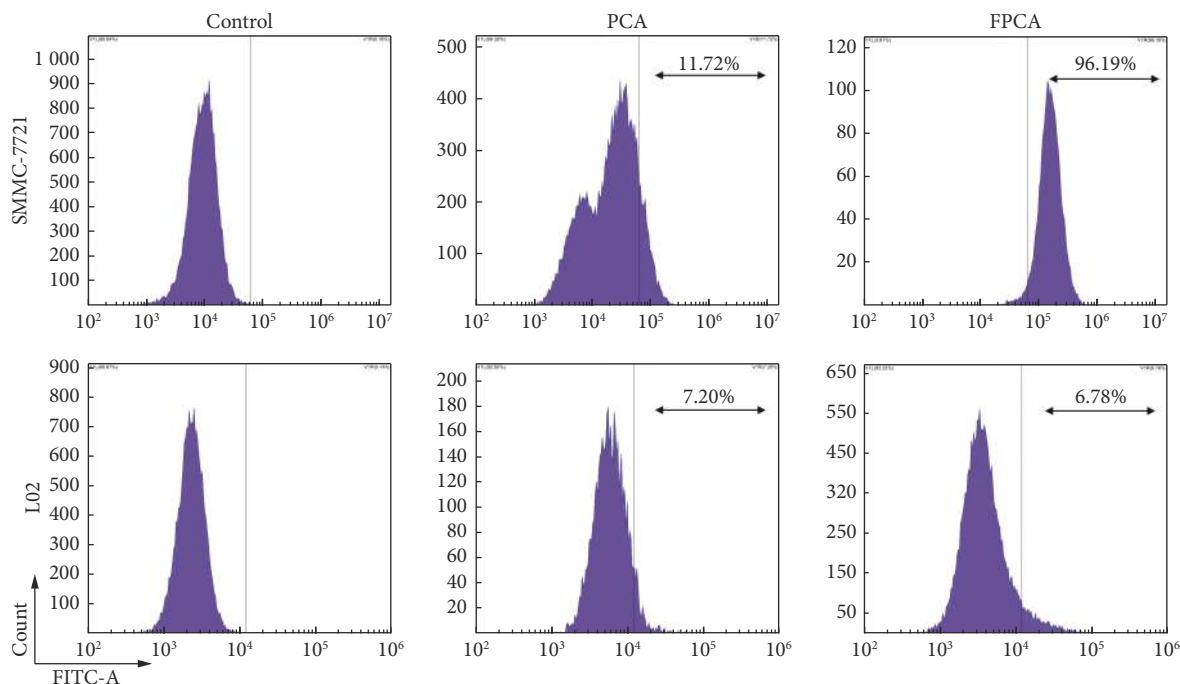


图5 流式细胞术检测PCA和FPCA在两种细胞中的结合率

Fig 5 Binding assay of FPCA and PCA in SMMC-7721 and L02 cell lines by flow cytometry

## 3 讨论

本研究成功制备了Fi修饰的相变型超声造影剂FPCA,其粒径小、形状规则、大小均一,具有较好的稳定性和生物相容性。FPCA以PF6为内核具备良好的相变特性,以脂质体为外壳具备较好的膜流动性,研究发现微波辐照和水浴加热均能促使FPCA发生相变,实现增强超声

显像的功能。其潜在的机理可能为相变的FPCA逐渐转化为微气泡,与周围环境产生巨大的声阻抗差异,从而增强背向散射同时也可以低机械指数下增强超声对比显影<sup>[19-21]</sup>。在肝癌细胞靶向实验中,FPCA与肝癌细胞SMMC-7721紧密结合,而与正常肝细胞L02未见明显特异性结合,表明FPCA具有良好的靶向癌细胞的能力。进一步使用流式细胞定量分析FPCA对肝癌细胞的靶向性能,

发现FPCA与肝癌细胞的结合率为(96.19±1.62)%,表明FPCA纳米粒子能够特异性的靶向肝癌细胞。因此,FPCA有望发展成为一种极具发展潜力的特异性对比成像和靶向诊疗的多功能超声造影剂。

Fi具有的天然抗肿瘤特性、良好药物传递性和主动靶向性,可用于多种肿瘤治疗。微波具有高热转换效率、组织深度穿透、不易受肋骨和肺部气体干扰的优点,可为靶向药物释放提供有利的控释方案。本研究结合二者的优点,合成新型相变超声造影剂,以期推动超声分子影像领域研究的深入发展。然而,本研究尚有一定局限性:包括因技术限制而缺乏机制探讨、仅在体外验证了FPCA的相变和主动靶向功能。课题组将在后续研究中进一步完善动物实验和相关机制研究,从而为FPCA在肿瘤临床治疗中的潜在应用提供更有力的科学依据。

\* \* \*

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] MASSAGUÉ J, BATLLE E, GOMIS R R. Understanding the molecular mechanisms driving metastasis. *Mol Oncol*, 2017, 11(1): 3–4.
- [2] SCHOEN S, KILINC M S, LEE H, *et al*. Towards controlled drug delivery in brain tumors with microbubble-enhanced focused ultrasound. *Adv Drug Delivery Rev*, 2022, 180: 114043[2022-02-23]. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114043>.
- [3] YARMOSKA S K, YOON H, EMELIANOV S Y. Lipid shell composition plays a critical role in the stable size reduction of perfluorocarbon nanodroplets. *Ultrasound Med Biol*, 2019, 45(6): 1489–1499.
- [4] 庄连婷, 黄瑛. 靶向纳米粒超声造影剂的研究进展. *中国医科大学学报*, 2018, 47(9): 842–846.
- [5] 姚元志, 王志刚, 张亮, 等. 制备叶酸受体靶向载阿霉素/黑色素多功能造影剂及体外超声/光声显像. *中国介入影像与治疗学*, 2018, 15(5): 286–290.
- [6] 赵佳雯, 张亮, 周岷, 等. 载硫化铋及阿霉素靶向相变型纳米粒多模态显像及联合治疗卵巢癌体外实验. *中国医学影像技术*, 2021, 37(1): 13–18.
- [7] XU J, CHENG X, TAN L, *et al*. Microwave responsive nanoplatfrom via P-selectin mediated drug delivery for treatment of hepatocellular carcinoma with distant metastasis. *Nano Letters*, 2019, 19(5): 2914–2927.
- [8] KANG R K, MISHR N, RAI V K. Guar Gum micro-particles for targeted co-delivery of doxorubicin and metformin HCL for improved specificity and efficacy against colon cancer: *In vitro* and *in vivo* studies. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2020, 21(2): 48.
- [9] 王莹莹, 张振坤, 李亚, 等. 岩藻多糖在肿瘤治疗中的作用. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(1): 47–52.
- [10] YAN M D, LIN H Y, HWANG P A. The anti-tumor activity of brown seaweed oligo-fucoidan via lncRNA expression modulation in HepG2 cells. *Cytotechnology*, 2019, 71(1): 363–374.
- [11] HE X, XUE M, JIANG S, *et al*. Fucoidan promotes apoptosis and inhibits EMT of breast cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(3): 442–447.
- [12] DELMA C R, THIRUGNANASAMBANDAN S, SRINIVASAN G P, *et al*. Fucoidan from marine brown algae attenuates pancreatic cancer progression by regulating p53-NFκB crosstalk. *Phytochemistry*, 2019, 167: 112078[2022-02-23]. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112078>.
- [13] OLIVEIRA C, NEVES N M, REIS R L, *et al*. A review on fucoidan antitumor strategies: From a biological active agent to a structural component of fucoidan-based systems. *Carbohydr Polym*, 2020, 239: 116131[2022-02-23]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116131>.
- [14] MABATE B, DAUB C D, MALGAS S, *et al*. Fucoidan structure and its impact on glucose metabolism: Implications for diabetes and cancer therapy. *Marine Drugs*, 2021, 19(1): 30.
- [15] AHMAD T, EAPEN M S, ISHAQ M, *et al*. Anti-inflammatory activity of fucoidan extracts *in vitro*. *Marine Drugs*, 2021, 19(12): 702.
- [16] LI S, LIN S, CHENG Y, *et al*. Quantifying activation of perfluorocarbon-based phase-change contrast agents using simultaneous acoustic and optical observation. *Ultrasound Med Biol*, 2015, 41(5): 1422–1431.
- [17] VIDALLON M L P, GILES L W, POTTAGE M J, *et al*. Tracking the heat-triggered phase change of polydopamine-shelled, perfluorocarbon emulsion droplets into microbubbles using neutron scattering. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 607: 836–847.
- [18] GAO B, XU J, ZHOU J, *et al*. Multifunctional pathology-mapping theranostic nanoplatfroms for US/MR imaging and ultrasound therapy of atherosclerosis. *Nanoscale*, 2021, 13(18): 8623–8638.
- [19] ZHU Y I, YOON H, ZHAO A X, *et al*. Leveraging the imaging transmit pulse to manipulate phase-change nanodroplets for contrast-enhanced ultrasound. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2019, 66(4): 692–700.
- [20] WANG F, WANG Z, PANG L, *et al*. Preparation and *in vitro* study of stromal cell-derived factor 1 targeted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/poly(lactidoglycolic acid)/perfluorohexane nanoparticles. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2003–2012.
- [21] GAO J, YU B, LI C, *et al*. Ultrasound triggered phase-change nanodroplets for doxorubicin prodrug delivery and ultrasound diagnosis: An *in vitro* study. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 174: 416–425.

(2021-09-26收稿, 2022-05-30修回)

编辑 余琳