❖实验研究

Preparation of nanoparticle combining with high intensity focused ultrasound for treating three negative breast cancer: *In vitro* experiment

KANG Zhengyue, FENG Xiaoling, LIAO Hongjian, ZHANG Zhifei, DU Yonghong*

(College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, State Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare nanoparticle (NP) AS1411/PFH-NP that specifically targeting triple negative breast cancer (TNBC), and to observe the value of AS1411/PFH-NP combining with high intensity focused ultrasound (HIFU) for treating TNBC. **Methods** The liquid fluorocarbon (PFH) was loaded into PLGA@PEG using double emulsification method, and the aptamer AS1411 was connected with PFH-NP to prepare AS1411/PFH-NP. The physical properties, targeting ability and ultrasonic imaging ability of AS1411/PFH-NP were observed. The value of HIFU combining with AS1411/PFH-NP for ablation of isolated bovine liver and killing MB-231 TNBC cells were analyzed. **Results** AS1411/PFH-NP was successfully prepared, which had good morphology and good targeting ability to MB-231 TNBC cells. The gray value of CEUS of AS1411/PFH-NP group was higher than that of phosphate buffer solution (PBS) group and NP group (t=17.24, 5.60, both P<0.05). The volume of coagulation necrosis in bovine liver tissue after HIFU+ AS1411/PFH-NP ablation was larger than that after HIFU+PBS (t=7.99, P<0.01) and HIFU+NP (t=4.33, P<0.05) ablations, and the energy efficiency factor of HIFU+AS1411/PFH-NP ablation was significantly lower than that of HIFU+PBS (t=5.41, P<0.01) and HIFU+NP (t=4.82, P<0.01) ablations. The apoptosis rate of MB-231 cells of HIFU+ AS1411/PFH-NP group was higher than that of the other groups (all P<0.05). **Conclusion** AS1411/PFH-NP that specifically targeting TNBC could improve the ablation efficiency of HIFU *in vitro*.

[**Keywords**] triple negative breast neoplasms; nanoparticles; perfluorooctylbromide; high-intensity focused ultrasound ablation; ultrasonography

DOI:10.13929/j.issn.1003-3289.2022.07.001

制备纳米粒联合高强度聚焦超声治疗三阴性乳腺癌:体外实验

康正樾,冯潇铃,廖洪建,张志飞,杜永洪*

(重庆医科大学生物医学工程学院 超声医学工程国家重点实验室 重庆市生物医学工程学重点实验室,重庆 400016)

[**摘 要**] **目的** 制备特异性靶向三阴性乳腺癌(TNBC)纳米粒(NP)AS1411/PFH-NP,评估其联合高强度聚焦超声(HIFU)治疗 TNBC 的价值。**方法** 以双乳化法将十四氟己烷(PFH)装载于 PLGA@PEG,以 AS1411 核酸适配体与

[**基金项目**] 重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jscx-msxmX0255)。

[**第一作者**] 康正樾(1996—),男,四川达州人,在读硕士。研究方向:超声生物学效应。E-mail:979973876@qq.com

[**通信作者**] 杜永洪,重庆医科大学生物医学工程学院 超声医学工程国家重点实验室 重庆市生物医学工程学重点实验室,400016。E-mail:duyonghong@cqmu.edu.cn

[**收稿日期**] 2021-11-03 [**修回日期**] 2022-03-06

PFH-NP 连接，制备 AS1411/PFH-NP，观察其物理特性、靶向能力及体外超声显像能力，评价 HIFU 联合 AS1411/PFH-NP 消融离体牛肝组织及杀伤 MB-231 TNBC 细胞的价值。**结果** 成功制备 AS1411/PFH-NP，其形态较佳，对 MB-231 TNBC 细胞具有良好靶向能力。AS1411/PFH-NP 组 CEUS 图像灰度值大于磷酸盐缓冲液(PBS)组及 NP 组(t=17.24、5.60，P 均<0.05)。经 HIFU+AS1411/PFH-NP 消融后，牛肝组织凝固性坏死体积大于经 HIFU+PBS(t=7.99，P<0.01)及 HIFU+NP 消融后(t=4.33，P<0.05)；且 HIFU+AS1411/PFH-NP 消融能效因子显著低于 HIFU+PBS(t=5.41，P<0.01)及 HIFU+NP 消融(t=4.82，P<0.01)。HIFU+AS1411/PFH-NP 组 MB-231 细胞凋亡率高于其他组(P 均<0.05)。**结论** 特异性靶向 TNBC AS1411/PFH-NP 可提高 HIFU 体外消融效率。

[**关键词**] 三阴性乳腺肿瘤；纳米微粒；液态氟碳；高强度聚焦超声消融术；超声检查
[**中图分类号**] R737.9；R445.1 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1003-3289(2022)07-0961-07

目前临床对三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer，TNBC)多采用联合治疗[1]。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound，HIFU)将超声波聚焦于体内病灶靶点区，通过热效应、机械效应和空化效应对病灶进行消融[2]；但长时间 HIFU 辐照可致机体升温，并存在声通道损伤等安全问题。液态氟碳纳米粒(nanoparticle，NP)可于 HIFU 辐照下发生液气相变而产生空化核，降低空化效应阈值，增强其生物学效应[3]。本研究制备包载 PFH 并与 AS1411 适配体连接的特异性靶向 TNBC 可降解 AS1411/PFH-NP[4]，观察其与 HIFU 联合治疗 TNBC 的价值。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备 聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid)，PLGA]-PEG50/50-COOH(济南岱罡生物科技有限公司)；$CHCl_3$，异丙醇(重庆市川东有限公司)；聚乙烯醇(polyvinyl alcohol，PVA)，十四氟己烷(perfluorohexane，PFH)，1，1-dioctadecyl-3，3，3′，3′-tetramethylindocarbocyanine perchlorate(DiI)，4′，6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)，1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC)，N-hydroxysuccinimide(NHS)，琼脂糖(Sigma)；MES(Thermo Fisher Scientific)；核酸适配体 AS1411，FAM 荧光标记核酸适配体 AS1411-FAM[生工生物工程(上海)股份有限公司]。细胞计数试剂盒(cell counting kit-8，CCK-8，Dojindo)，XL2020 型声振仪(Sonics)，透射电镜(transmission electron microscope，TEM，Hitachi)，马尔文激光粒度仪(Zetasizer)，光学显微镜(Olympus)，激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope，CLSM，Nikon)，CytoFLEX(Beckman Counter，Inc.)，聚焦超声肿瘤治疗系统(JC200 型，重庆海扶医疗科技股份有限公司)，Mylab 90(Esaote)，ImageJ 软件(美国国立卫生研究院)，多功能酶标记仪器(ThermoFisher)。

1.2 制备 AS1411/PFH-NP 取 40 mg PLGA-PEG50/50-COOH 完全溶解于 2 ml $CHCl_3$ 溶液作为油相，加入 200 ml PFH 作为水相，在冰浴中采用声振仪乳化得到初乳，再加入 4% PVA 溶液 4 ml，继续在冰浴中以声振仪乳化形成复乳，之后加入 8 ml 异丙醇溶液并搅拌、离心、洗涤，冻干后得到 PFH/PLGA@NP。采用碳二亚胺法称取 20 mg PFH/PLGA@NP 完全重悬于 5 ml MES 中(pH 为 5.5，0.1 mol/L)，并按 PFH/PLGA@ NPs∶EDC∶NHS=1∶2∶2 比例加入 EDC、NHS，充分活化后重悬于 5 ml MES 中(pH 为 8.0，0.1 mol/L)，加入 1 ml AS1411(1 μmol/L)后置于摇床上振荡过夜，经离心(10 000 rpm，10 min)洗涤后得到靶向 AS1411/PFH-NP。以双蒸水为水相，采用双乳化法得到空白 NP。

1.3 检测物理特性 采用马尔文粒径仪检测 AS1411/PFH-NP 粒径和 Zeta 电位，以 TEM 观察其形态。以上述方法制备 DiI 荧光标记的 AS1411-FAM/PFH-NP 后，采用 CLSM 观察经 FAM 绿色荧光修饰的核酸适配体 AS1411 与经 DiI 红色荧光标记的 AS1411/PFH-NP 的连接情况，以流式细胞仪定量检测其连接率。将 1 ml AS1411/PFH-NP 悬液(1 mg/ml)置于 1.5 ml EP 管，分别置于 37、58 及 80℃水浴中 30 s，以光学显微镜观察其相变能力。

1.4 检测细胞毒性 将处于对数生长期的 MB-231 TNBC 细胞和 LO-2 人正常肝脏细胞以 2×10^4/孔接种于 96 孔培养板并孵育 24 h(37℃，5% CO_2)，去除培养基后，以无血清细胞培养基(100 μl/孔)将消毒的 AS1411/PFH-NP 配制为不同浓度溶液(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mg/ml)，置于 96 孔培养板中，各设 6 个重复孔；孵育 24 h 后，以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution，PBS)洗涤；再向每孔中加入含 10% CCK-8 试剂的无血清培养基 100 μl，孵育 4 h后，以多功能酶标记仪器检测细胞在 450 nm 波长下的吸光度，即光密度(optical density，OD)，计算各

浓度下细胞存活率：细胞存活率＝(OD_{NP}－OD_{blank})/($OD_{control}$－OD_{blank})×100%；其中 NP 表示含细胞、培养基及 AS1411/PFH-NP，blank 表示含培养基、不含细胞及 AS1411/PFH-NP，control 表示含细胞及培养基、不含 AS1411/PFH-NP。

1.5　检测 MB-231 TNBC 细胞靶向能力　以 1×10^5/孔将 MB-231 细胞接种于 CLSM 培养皿中孵育 24 h；按照上述方法分别制备 DiI 荧光标记的 PFH-NP 和 AS1411/PFH-NP；将所有细胞分为 2 组：①非靶向组，含 DiI 荧光标记 PFH-NP 的培养基(2 mg/ml)；②靶向组，含 DiI 荧光标记 AS1411/PFH-NP 的培养基(2 mg/ml)。将 2 组细胞分别与相应培养基共孵育 4 h后，以 4%多聚甲醛固定细胞 15 min，再以 DAPI 进行细胞核染色 10 min；每个步骤结束后均以 PBS 洗涤细胞 3 次。最后在 CLSM 下观察 NP 与细胞的结合情况。

1.6　体外超声成像　预先制备 3%琼脂糖凝胶体膜，内有 1.5 ml 离心管形状的半开放凹槽，用于盛放样品液。将 1 ml PBS、1 ml 空白 NP(2 mg/ml)及 1 ml AS1411/PFH-NP(2 mg/ml)分别置于 3%琼脂糖凝胶体模中，即 PBS 组、NP 组及 AS1411/PFH-NP 组；以 HIFU 辐照凹槽中心处(距开口 20 mm，100 MHz，120 W/cm^2，5 s)。于 B-Mode 和增强超声造影(contrast enhanced ultrasound，CEUS)模式下以 MyLab90 采集超声图像，以 ImageJ 软件定量测量 CEUS 图像中的 ROI(HIFU 辐照焦点及凹槽内垂直于声束方向的圆形截面，Φ＝12.7 mm)的平均灰度值。

1.7　HIFU 联合 AS1411/PFH-NP 消融离体牛肝组织　以真空脱气装置去除 3 块长方体离体牛肝组织(12 cm×10 cm×8 cm)中的空气，分别针对超声聚焦超声换能器声束方向距牛肝组织表面 4 cm 处(即消融区)注射 200 μl PBS、200 μl 空白 NP(2 mg/ml)及 200 μl AS1411/PFH-NP(2 mg/ml)后行 HIFU 辐照，消融点间距＞3 cm；采用机载超声诊断仪监测消融区 HIFU 辐照前、后图像平均灰度值变化。之后沿平行于声束方向切开牛肝组织，以 ImageJ 软件计算 3 块牛肝组织的消融体积和超声能效因子(energy efficiency factor，EEF)[5]：消融体积＝π/6×消融后凝固性坏死区长度×凝固性坏死区宽度×凝固性坏死区厚度；EEF＝ηPt/V，其中 η＝0.7，为换能器聚焦系数，P 为总辐照声功率(W)，t 为总辐照时间(s)，V 为凝固性坏死体积(mm^3)。

1.8　HIFU 联合 AS1411/PFH-NP 杀伤体外 MB-231 TNBC 细胞　将处于对数生长期的 MB-231 细胞以 1×10^6/孔接种于 6 孔板中并孵育 24 h 并分为 HIFU 组、AS1411/PFH-NP 组、HIFU＋AS1411/PFH-NP 组及未干预组；清除培养基后，对 HIFU 组和未干预组均加入不含 AS1411/PFH-NP 的无血清培养基，对 AS1411/PFH-NP 组和 HIFU＋AS1411/PFH-NP 组均加入含 AS1411/PFH-NP(2 mg/ml)的无血清培养基，共同孵育 4 h 后以 PBS 清洗并以 0.25%胰酶(不含 EDTA)消化 3 min，加入 PBS 制成细胞悬液并转移至 1.5 ml 离心管中；对 HIFU 组和 HIFU＋AS1411/PFH-NP 组以 HIFU 辐照(100 MHz，120 W/cm^2，5 s)离心管中心处，对 AS1411/PFH-NP 组和未干预组不作辐照处理；对各组以1 000 rpm离心 5 min、洗涤 2 次，最终分别将 1×10^6个细胞重悬于 PBS(pH 为 7.2)500 μl 中备用。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.9　统计学分析　采用 GraphPad Prism 8.0 统计分析软件。以 $\bar{x}\pm s$ 表示符合正态分布的计量资料，采用单因素方差分析进行多组间比较，以 Dunnett 法进行 2 组间比较，针对差异有统计学意义的数据行 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　AS1411/PFH-NP 物理特性　透射电镜下 AS1411/PFH-NP 呈球形，形态良好、大小均一，分散性较佳(图 1A)，粒径为(249.70±4.72)nm，Zeta 电位为(－3.46±0.77)mV(图 1B、1C)。光镜下观察，37℃条件下 AS1411/PFH-NP 未见明显相变，58℃及 80℃条件下均可见显著相变，且程度随温度升高而增加(图 1D～1F)，表明 PFH 成功包载。

CLSM 下，FAM 修饰的核酸适配体 AS1411 呈绿色荧光(图 2A)，DiI 标记的 AS1411/PFH-NP 呈红色荧光(图 2B)，并见显著荧光重叠(图 2C)；流式细胞仪检测显示二者连接良好，连接率 58.11%(图 2D)。

2.2　AS1411/PFH-NP 细胞毒性　共孵育的 AS1411/PFH-NP 浓度为 0.25～2.00 mg/ml 时，不同浓度下 LO-2 人正常肝脏细胞活性无明显差异；浓度升至 4.00 mg/ml 时，LO-2 细胞活性降低(t＝2.335，$P<0.05$，图 3A)；与浓度 0.25 mg/ml 相比，AS1411/PFH-NP 浓度为 2.00 mg/ml 时，TNBC MB-231 细胞活性降低(t＝2.952，$P<0.05$，图 3B)，故本研究以 2.00 mg/ml 为 AS1411/PFH-NP 最适浓度进行后续实验。

2.3　以 AS1411/PFH-NP 检测 MB-231 细胞靶向能力

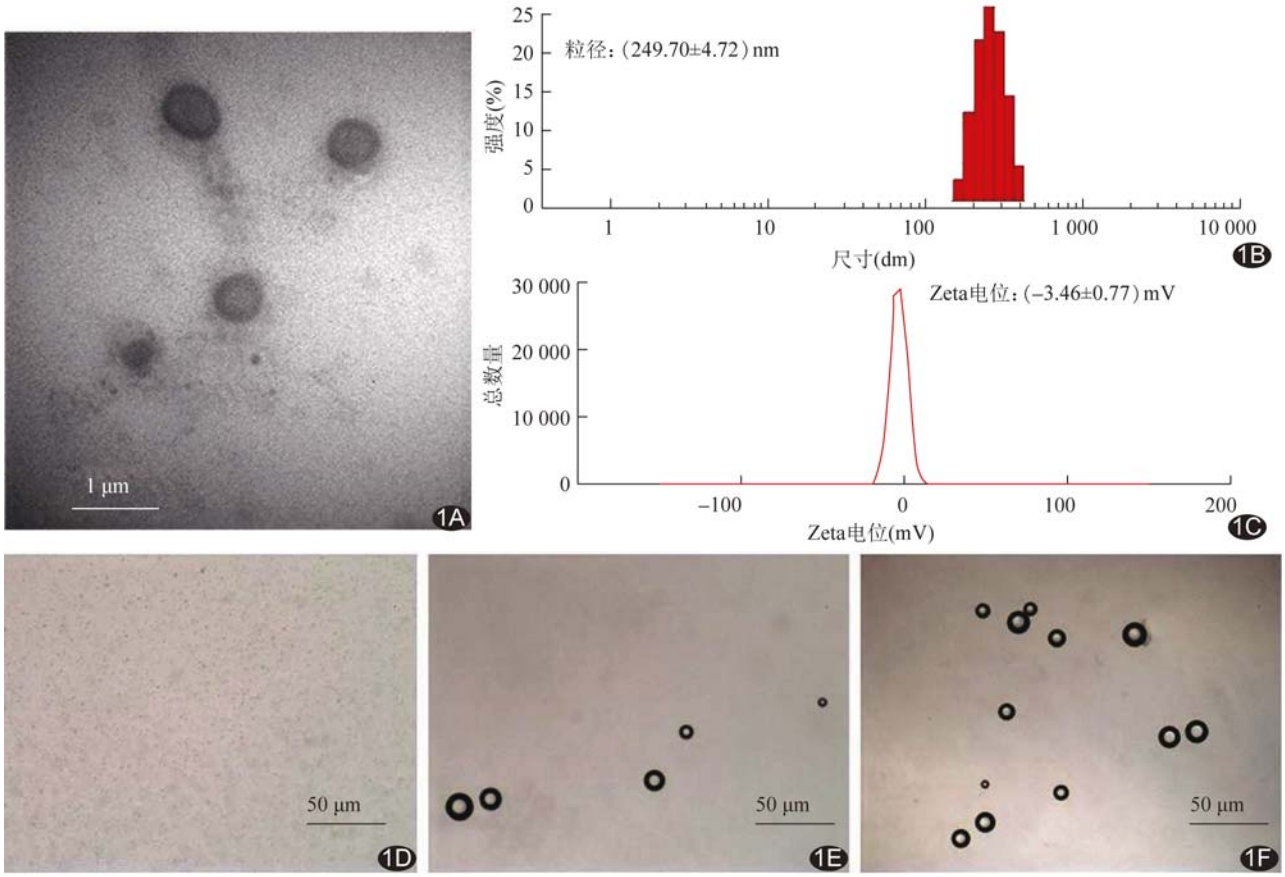


图 1　AS1411/PFH-NP 物理特性　A. 透射电镜下 AS1411/PFH-NP 形态(×20 000)；B、C. AS1411/PFH-NP 粒径(B)及 Zeta 电位图(C)；D～F. 光镜所见 AS1411/PFH-NP 于 37℃(D)、58℃(E)及 80℃(F)下的形态(×200)

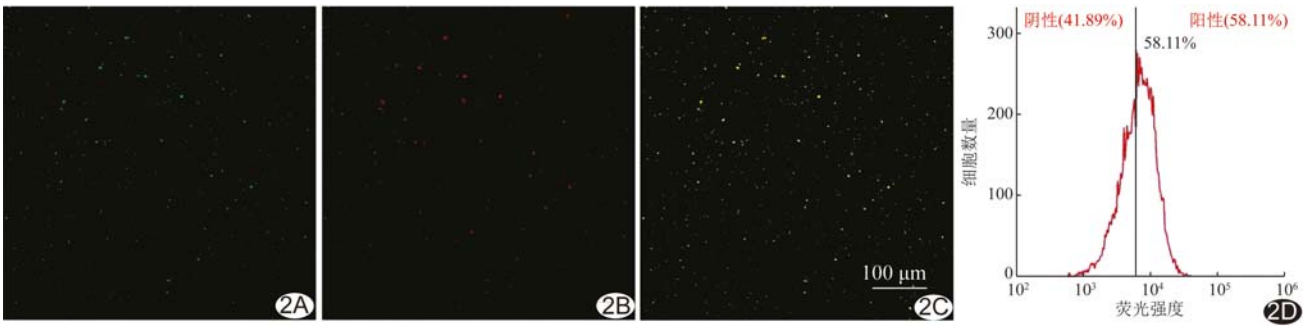


图 2　适配体与 AS1411/PFH-NP 连接　A～C. CLSM(×200)显示经 FAM 修饰的核酸适配体 AS1411(A)、DiI 标记的 AS1411/PFH-NP(B)及二者连接(C)；D. 流式细胞仪所示适配体与 AS1411/PFH-NP 连接率图

CLSM 示 MB-231 细胞核呈蓝色荧光，所制 DiI 荧光标记 PFH-NP 和 DiI 荧光标记 AS1411/PFH-NP 均呈红色荧光；靶向组见 AS1411/PFH-NP 显著聚集于细胞核及细胞周围，非靶向组未见明显红色荧光聚集，表明 AS1411/PFH-NP 对 MB-231 乳腺癌细胞具有良好靶向能力。见图 4。

2.4　体外超声成像　AS1411/PFH-NP 组 CEUS 图像灰度值大于 PBS 组及 NP 组(t=17.24、5.60，P 均＜0.05)。见图 5。

2.5　HIFU 联合 AS1411/PFH-NP 消融离体牛肝组织　经 HIFU＋AS1411/PFH-NP 消融后，牛肝组织凝固性坏死区体积大于 HIFU＋PBS(t=7.99，P＜0.01)及 HIFU＋NP 消融(t=4.33，P＜0.05)；经 HIFU＋AS1411/PFH-NP 后，消融区 EEF 显著小于 HIFU＋PBS(t=5.41，P＜0.01)及 HIFU＋NP 消融区(t=4.82，P＜0.01)。见表 1 及图 6。

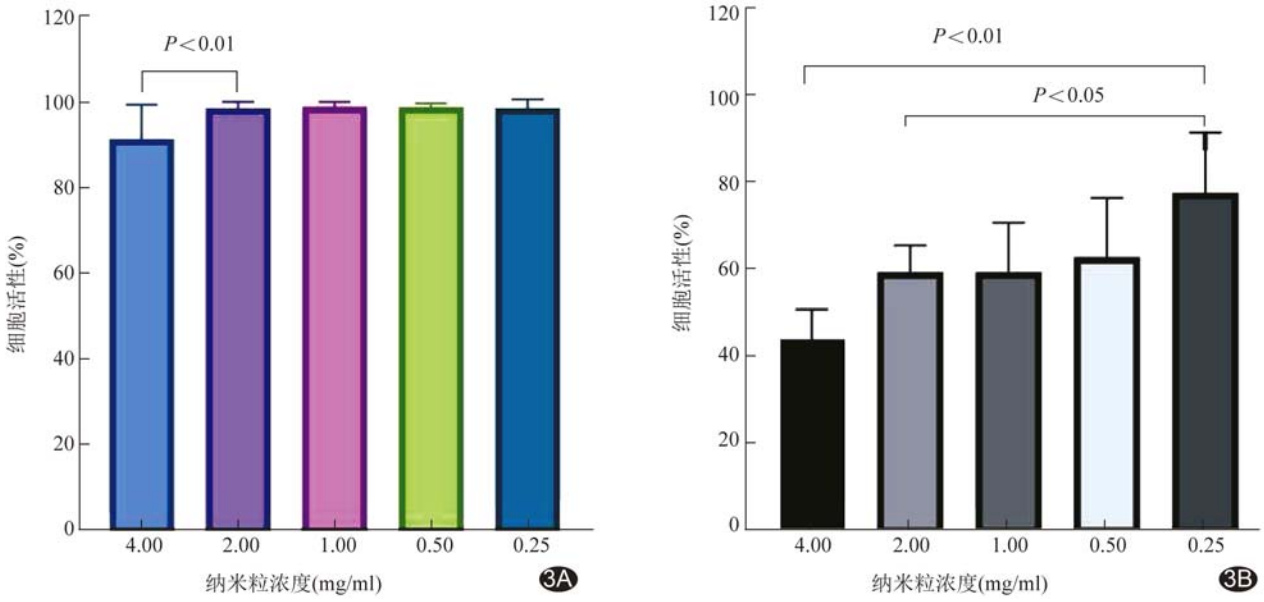


图 3　与不同浓度 AS1411/PFH-NP 共孵育 24 h 后的细胞活性　A. L-O2 细胞；B. MB-231 细胞

2.6　HIFU 联合 AS1411/PFH-NP 杀伤 MB-231 乳腺癌细胞　流式细胞仪检测结果显示，HIFU ＋ AS1411/PFH-NP 组 MB-231 细胞凋亡率高于其他组（P 均＜0.05）。见图 7 及表 2。

3　讨论

应用 HIFU 协同增效剂可提高 HIFU 消融效率及安全性。传统微泡造影剂成像效果虽佳，但无法透过血管内皮细胞间隙，故不能用于细胞水平成像及治疗，且其热、化学稳定性差，难以实现临床转化。液态氟碳具有化学和生物学惰性等特殊理化性质，且能降低空化效应阈值，加强 HIFU 对靶区组织的杀伤效果[6]。PLGA 生物安全性良好，已用于临床[7]。本研究制备的载 PLGA 的 AS1411/PFH-NP 可于 HIFU 辐照下发生液气相变，增加空化核，提高 HIFU 消融效率及杀伤肿瘤细胞效果。

使 NP 具有主动靶向性有助于 HIFU 增效剂尽可能聚集于乳腺癌靶区、延长 NP 在肿瘤组织中的滞留时间。本研究以核酸

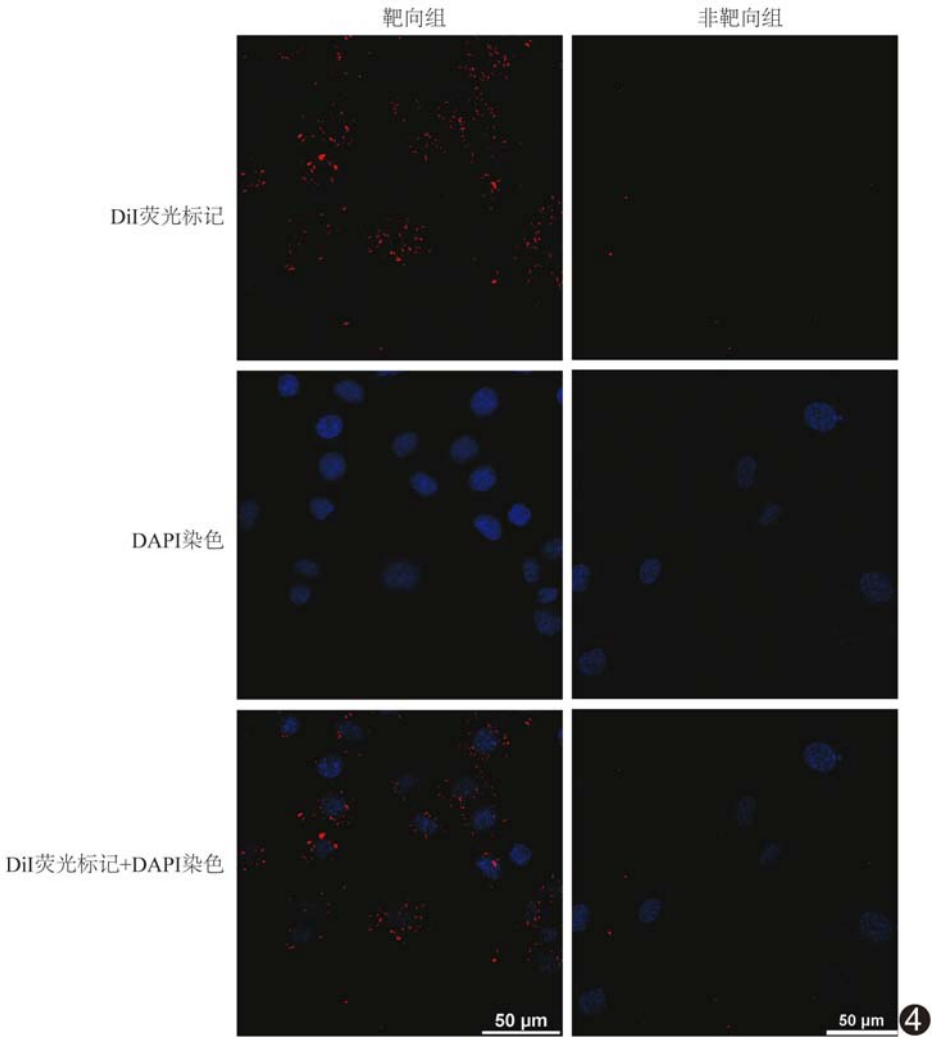


图 4　CLSM 示 AS1411/PFH-NP 靶向 MB-231 细胞（×600）

适配体 AS1411 修饰载 PFH 的 NP，使其可借助 AS1411 与 MB-231 细胞连接并被摄取入胞，MB-231 细胞活力在与 AS1411/PFH-NP 结合 24 h 后下降，考虑主要原因在于 TNBC 细胞表面过表达核仁素，可特异性识别适配体 AS1411，后者对不同肿瘤细胞均有抑制生长作用[8]。

超声观察显示，AS1411/PFH-NP 组均可见细小点状中等回声信号，PBS 组及 NP 组均见弱回声，且 AS1411/PFH-NP 组 CEUS 图像灰度值显著大于 PBS 组及 NP 组，表明 AS1411/PFH-NP 具有良好超声显影能力，

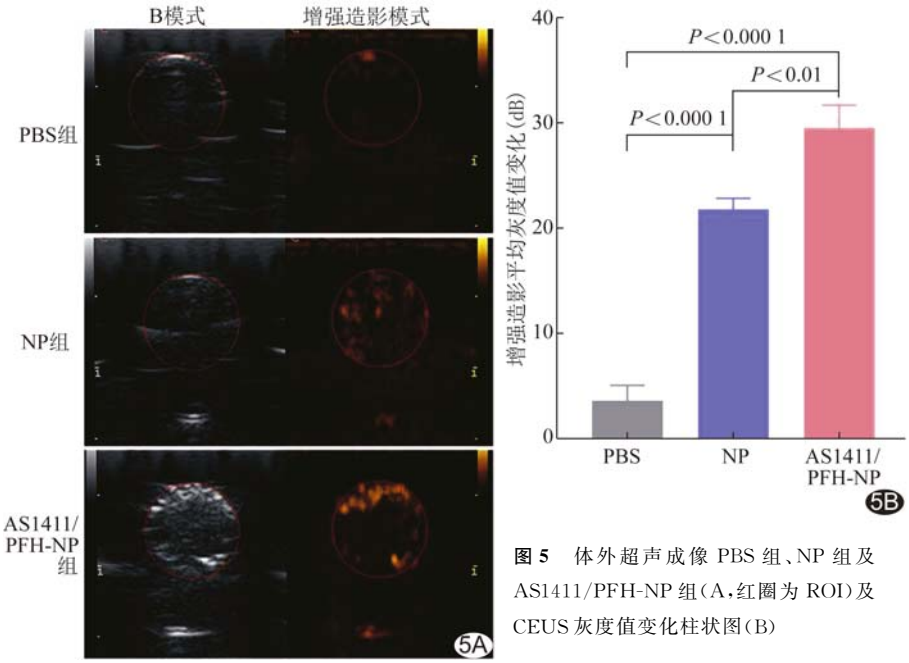


图 5　体外超声成像 PBS 组、NP 组及 AS1411/PFH-NP 组（A，红圈为 ROI）及 CEUS 灰度值变化柱状图（B）

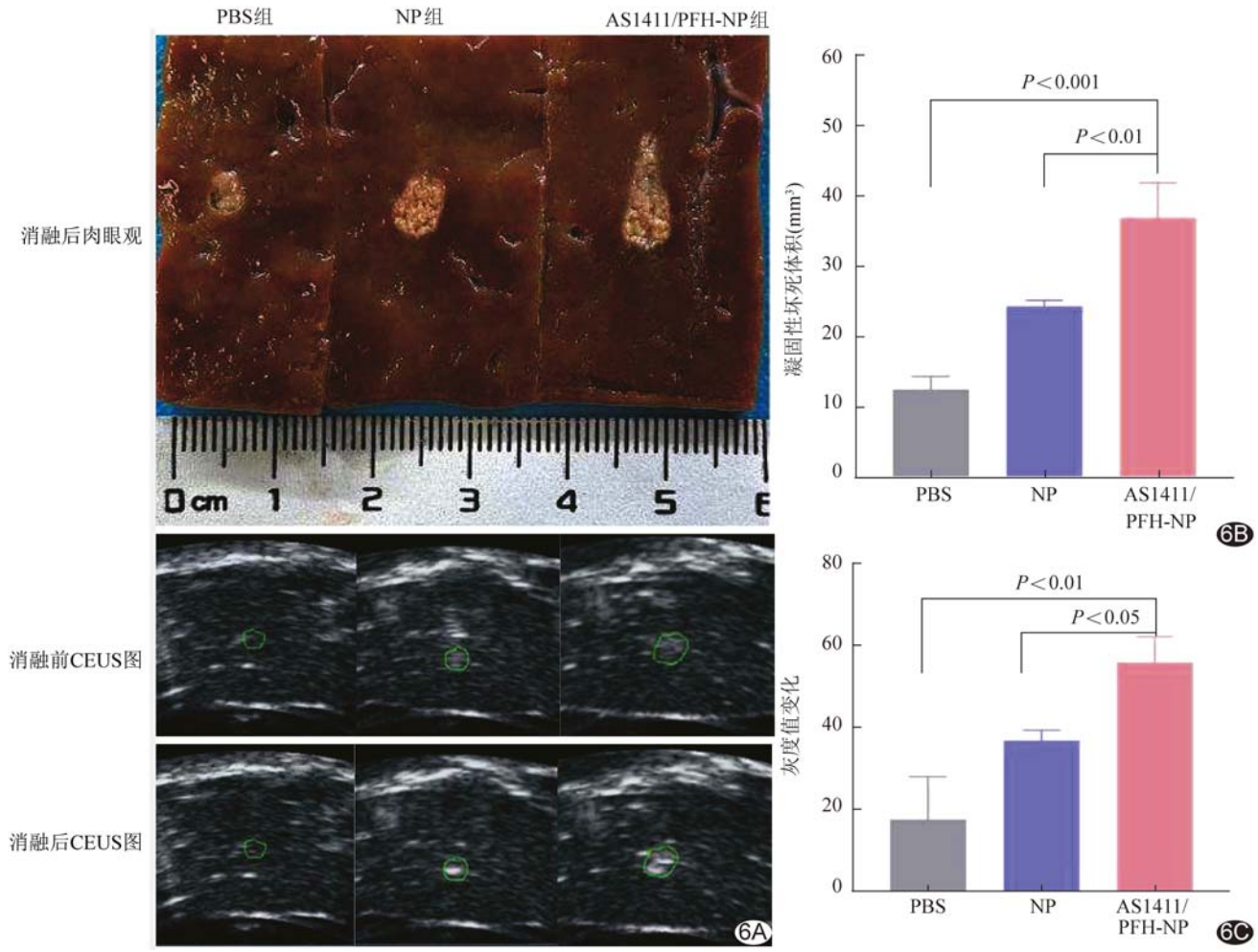


图 6　体外 HIFU 联合不同方法消融牛肝组织　A～C. 凝固性坏死肉眼观、消融区 CEUS 变化（A）及体积直方图（B）、CEUS 灰度直方图（C）

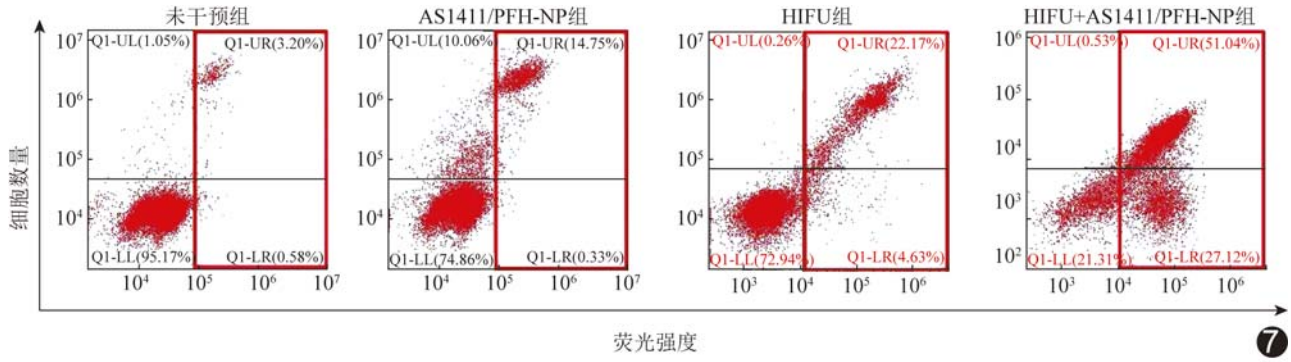


图 7　流式细胞仪所示 MB-231 细胞凋亡情况　（红方框表示细胞凋亡占比）

表 1　HIFU 联合不同方法体外消融离体牛肝组织效果比较（n=3）

HIFU 联合方案	牛肝组织消融体积（mm^3）	EEF（J/mm^3）
PBS	12.48±1.88	34.17±5.02
NP	24.32±0.87*	17.29±0.61*
AS1411/PFH-NP	36.89±5.00*#	11.53±1.65*#
F 值	46.62	44.07
P 值	<0.001	<0.001

注：*：与 PBS 组比较 P<0.05；#：与 NP 组比较 P<0.05

表 2　各组处理人乳腺癌 MB-231 细胞后的细胞凋亡率（%，n=3）

组别	细胞凋亡率
HIFU 组	28.00±1.49
AS1411/PFH-NP 组	15.17±0.99*
HIFU＋AS1411/PFH-NP 组	71.23±8.80*#
未干预组	3.39±0.21*#&
F 值	134.2
P 值	<0.000 1

注：*：与 HIFU 组比较 P<0.05；#：与 AS1411/PFH-NP 组比较 P<0.05；&：与 HIFU＋AS1411/PFH-NP 组比较 P<0.05

有助于监控 HIFU 消融；这是由于 AS1411/PFH-NP 直径较大，具有液态氟碳内核的空腔结构，可于超声作用下产生背向反射[9]。

本研究以离体牛肝组织作为实验对象检测 AS1411/PFH-NP 联合 HIFU 消融效果，发现经 HIFU＋AS1411/PFH-NP 消融后，牛肝组织凝固性坏死体积显著大于 HIFU＋PBS 及 HIFU＋NP 消融后，而 HIFU＋AS1411/PFH-NP 消融区 EEF 显著低于 HIFU＋PBS 及 HIFU＋NP 消融区，表明 AS1411/PFH-NP 联合 HIFU 可提高消融能力；分析原因，主要在于 HIFU 辐照使 PFH 发生液气相变，改变了局部声学环境，导致能量沉积增加[10]，且外来空化核亦可增强 HIFU 生物学效应。HIFU 联合 AS1411/PFH-NP 亦能协同杀伤体外 MB-231 细胞、促进肿瘤细胞凋亡，可能由于 AS1411/PFH-NP 增强 HIFU 空化效应、热效应及机械效应，且伴随空化效应产生的高速微射流及剪切力亦对杀灭肿瘤细胞具有一定作用[11]。

综上所述，本研究制备的特异性靶向 TNBC AS1411/PFH-NP 可提高体外 HIFU 消融效率。

［参考文献］

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.

[2] FERIL L B, FERNAN R L, TACHIBANA K. High-intensity focused ultrasound in the treatment of breast cancer[J]. Curr Med Chem, 2021,28(25):5179-5188.

[3] 陈澄，宫玉萍，王志刚，等. 制备包裹吲哚菁绿和液态氟碳的纳米级双模态造影剂[J]. 中国医学影像技术，2015，31(2)：186-190.

[4] GARRIDO-CASTRO A C, LIN N U, POLYAK K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: Improving patient selection for treatment[J]. Cancer Discov, 2019,9(2):176-198.

[5] GONG C, YANG B, SHI Y, et al. Factors influencing the ablative efficiency of high intensity focused ultrasound (HIFU) treatment for adenomyosis: A retrospective study[J]. Int J Hyperthermia, 2016,32(5):496-503.

[6] 陈杰，易华容，王彬，等. 高强度聚焦超声治疗中的空化及其与回声、热效应之间的关系[J]. 中国医学影像技术，2009，25(10)：1896-1898.

[7] ACHARYA S, SAHOO S K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011,63(3):170-183.

[8] YAZDIAN-ROBATI R, BAYAT P, OROOJALIAN F, et al. Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review[J]. Int J Biol Macromol, 2020,155:1420-1431.

[9] ALIABOUZAR M, KRIPFGANS O D, WANG W Y, et al. Stable and transient bubble formation in acoustically-responsive scaffolds by acoustic droplet vaporization: Theory and application in sequential release[J]. Ultrason Sonochem, 2021,72:105430.

[10] 张婷，李发琪. HIFU 治疗中的空化效应及其应用[J]. 中国医学影像技术，2007，23(7)：1097-1099.

[11] CARLISLE R, CHOI J, BAZAN-PEREGRINO M, et al. Enhanced tumor uptake and penetration of virotherapy using polymer stealthing and focused ultrasound[J]. J Natl Cancer Inst, 2013,105(22):1701-1710.