

肿瘤诊断技术与基因治疗

DOI: 10.11699/cyxh20130501

载肝癌细胞 GPC3 抗体的纳米级脂质超声微泡制备及体外寻靶研究

景周宏¹, 何承俊¹, 潘万龙², 丁雄¹, 刘长安¹, 李生伟¹, 薛强¹, 龚建平¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010;

2. 重庆医科大学感染病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探索制备载肝癌细胞磷酸酰肌醇蛋白多糖-3(glypican-3, GPC3)抗体的新型纳米级脂质超声微泡造影剂的方法,并评价其体外对肝癌细胞的靶向结合效果。**方法:**以机械振荡法制备纳米级脂质微泡,并通过光学显微镜及电子显微镜检测纳米微泡大小形态、粒径分布;生物素-亲和素桥接肝癌细胞 GPC3 抗体与纳米级脂质超声微泡,流式细胞仪检测微泡与抗体结合效率;免疫组化检测常见 3 种肝癌细胞的 GPC3 阳性表达;微泡体外与肝癌细胞靶向结合,激光共聚焦显微镜检测寻靶效果。**结果:**纳米脂质微泡呈圆形,分布均匀,无明显聚集,粒径范围约 350~450 nm。微泡与抗体结合效率达 85.05%,人 SMMC-7721、HepG2 及 Huh7 肝癌细胞 GPC3 表达阳性,激光共聚焦显微镜显示载 GPC3 抗体纳米级脂质微泡可与肝癌细胞特异性结合。**结论:**本研究成功制备了具备靶向性的新型纳米级脂质超声微泡,生物素-亲和素桥接 GPC3 抗体可特异性结合肝癌细胞,达到靶向性识别效果,为微泡的靶向诊断及治疗研究奠定了基础。

【关键词】磷酸酰肌醇蛋白多糖-3 抗体;纳米级;超声微泡;肝癌细胞;体外寻靶

【中国图书分类法分类号】R735.7;R445.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-31

Preparation of nanoscale lipid microbubbles modified with hepatoma glypican 3 antibody and targeting study in vitro

JING Zhouhong¹, HE Chengjun¹, PAN Wanlong², DING Xiong¹, LIU Chang'an¹, LI Shengwei¹,
XUE Qiang¹, GONG Jianping¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objectives: To develop a method for the preparation of hepatoma glypican 3 (GPC3) antibody modified lipid microbubble and to evaluate its efficiency of targeting hepatoma cells in vitro. **Methods:** Lipid microbubbles were prepared using the mechanical oscillation method and the morphology and size of the microbubbles were determined using optical and electron microscopy. The biotin-avidin bridge was used to link the GPC3 antibody with the microbubbles and the efficiency of conjugation was determined using flow cytometry. Expressions of GPC3 in 3 kinds of common hepatoma cells were investigated using the immunocytochemical assay. GPC3 antibody modified microbubbles were targeted to hepatoma cells in vitro and the targeting efficiency was determined using confocal analysis. **Results:** Lipid microbubbles showed a round shape and were evenly distributed without significant aggregation. Diameter of the microbubbles was between 350 nm and 450 nm. 85.05% microbubbles were successfully conjugated with GPC3 antibodies. Furthermore, SMMC-7721, HepG2 and Huh7 cells showed positive GPC3 expressions and confocal analysis revealed that the microbubbles could specifically bind to SMMC-7721 cells. **Conclusions:** Nanoscale lipid microbubbles conjugated with GPC3 antibody are successfully obtained via biotin-avidin bridging. GPC3 antibody modified microbubbles could selectively target hepatoma cells. Our study provides experimental support for the application of antibody modified nanoscale microbubbles in diagnosis and treatment.

【Key words】glypican 3 antibody; nanoscale; ultrasound microbubble; hepatoma cell; in vitro targeting

作者介绍: 景周宏, Email: jingzhouhong@hahoo.com.cn,

研究方向: 肝癌的基因、免疫治疗。

通信作者: 丁雄, Email: dxiong@yeah.net.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81272570); 重庆

市卫生局重点资助项目(编号: 渝卫 2012-1-040)。

肝癌作为常见恶性肿瘤之一,每年全球新增发病约 50 万例,致死率在恶性肿瘤中居第 3 位,仅次于肺癌和胃癌^[1]。其隐匿性起病、高恶性程度、高死亡率的特点,导致绝大多数患者出现症状时已处于中晚期,失去了手术治疗最佳时机。即使将肿瘤切除,术后的高复发和转移也导致治疗效果较差。因此,研究并探索新型治疗策略显得尤为重要。

肿瘤靶向治疗能够特异、高效杀伤肿瘤细胞,从而有望成为肿瘤治疗的一种重要方法。目前靶向结合技术主要是将基因、抗体或多肽等与载体相连,通过表面携带的特异性抗体或配体,使其能靶向的到达目的组织或器官,并与相应的抗原或受体结合,其中,以微泡作为载体的肿瘤靶向诊断及治疗已逐渐成为研究热点^[2-5]。由于超声微泡造影剂具有安全性高、用途广、代谢快等优点使其有可能成为更为优秀的介导肿瘤靶向诊断及治疗的载体。

有研究表明,肿瘤状态下的血管内皮间隙可允许直径小于 700 nm 的微粒穿过^[6],这为小粒径的纳米级超声微泡穿透血管外靶组织显像、实现病变组织的特异性诊断及治疗提供了理论依据。纳米级超声造影剂因其制备方法、外壳材料及包载内容物不同导致所制备的造影剂粒径差别较大、成像效果也不同。粒径小、穿透力强、能靶向性识别并结合病灶是对纳米级超声造影剂的理想要求。目前文献报道的纳米微泡粒径偏大^[7-8],且缺乏靶向性识别肿瘤组织的能力。本研究旨在探索制备可靶向性识别并结合肿瘤细胞的纳米级脂质微泡的方法,为今后的微泡靶向载药治疗研究提供基础。

磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(glypican-3, GPC3)为膜性硫酸乙酰肝素多糖蛋白,在胎儿肝脏较高表达,在成人正常肝脏中无表达,但常于肝癌发生时再次激活。在原发性肝癌中 GPC3 的阳性表达约为 80%,特异性 90%左右,提示 GPC3 可作为生物标志物用于肝癌特异性诊断和预后评价,也有望成为肝癌靶向治疗的新靶点^[9-10]。本研究选择其作为特异性识别肝癌细胞的抗体与纳米级脂质超声微泡结合,通过特异性寻靶研究观察结合效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)、生物素化二硬脂酰磷脂酰乙醇(biotinylation distea-

roylphosphatidylethanolamine, Bio-DSPE)、磷酸、甘油、链霉素和素、荧光染料 DiI 均购自美国 Sigma 公司;全氟丙烷气体由重庆医科大学超声影像研究所赠送;胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;DMEM/高糖培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)购自美国 HyClone 公司;生物素化磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;人肝癌 SMMC-7721、HepG2、Huh7 细胞株、人肝细胞株 L02 由重庆医科大学感染病分子生物学教育部重点实验室赠送;人乳腺癌 MCF-7 细胞株由重庆医科大学生命科学院赠送。

1.2 生物素化纳米级脂质微泡的制备

将含 Bio-DSPE 5 mg, DPPC 2 mg, 甘油 50 μ l, PBS 450 μ l 的混悬液 0.5 ml 置于 1.5 ml 的管形瓶中, 40 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 高压充入全氟丙烷气体, 振荡 60 s, 静置 5 min, 加 0.5 ml PBS 稀释, 固定微泡浓度为 4×10^8 个/ml, 在光学显微镜下观察微泡的物理特性, 并以 ^{60}Co 射线辐射灭菌待用。

1.3 纳米微泡理化性质的测定

取制备好的纳米级脂质微泡 20 μ l, 以 PBS 缓冲液稀释成 1 ml 均匀分布的悬浮液。滴加 10 μ l 该悬浮液于载玻片, 并加入同体积 50%甘油混匀, 压片后在 400 倍显微镜下观察并拍照, 同时以细胞计数板记数微泡个数, 并按稀释比例计算微泡浓度。运用电镜负染技术测量其粒径, 观察其分布情况。

1.4 纳米微泡与 GPC3 抗体结合的靶向微泡的制备及检测

1.4.1 靶向超声微泡的制备 取 2 ml 微泡造影剂, 加入按 1:200 稀释的生物素化 GPC3 单克隆抗体, 室温下充分混匀, 调其混悬液 pH 值至 4.5, 置入 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应, 其间每 30 min 振荡 1 次, 使其充分混合, 孵育 2 h 后静置, 出现自然分层后, 取上浮液, PBS 洗涤 2 次, 再加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记二抗 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗涤后涂片, 光镜下观察微泡粒径、分布, 测定其 pH 值。所制备的微泡于 4 $^{\circ}$ C 下保存。

1.4.2 纳米微泡与 GPC3 抗体结合率的检测

1.4.2.1 流式细胞仪定量检测配体结合率 分别取甲、乙 2 管微泡约为 1×10^7 个/管, 其中甲管作为对照, 乙管与按比例稀释的生物素化 GPC3 单克隆抗体孵育、洗涤后, 加入 FITC 标记二抗再次孵育、洗涤, 用流式细胞仪分析两管微泡的荧光强度及乙管微泡与生物素化 GPC3 单克隆抗体的结合率。实验重复 2 次。

1.4.2.2 激光共聚焦显微镜定性检测纳米微泡与 GPC3 抗体结合情况 取上述荧光标记过的乙管靶向微泡 10 μ l 加入 50%甘油充分混匀后涂片, 激光共聚焦显微镜下照相。实验重复 3 次。

1.5 人肝癌细胞 SMMC-7721, 人肝细胞 HepG2、Huh7、L02 GPC3 抗性免疫组化检测

收集对数生长期的各组细胞用 0.25%的胰酶消化, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM/高糖培养液终止消化, 于 24 孔板中培养, 待细胞长满单层时 PBS 液充分洗净, 滴加入甲醇, 放入 -20 $^{\circ}$ C 低温冰箱中固定 10 min, 倾液, 用 PBS 洗涤 5 min $\times$

3次。滴加内源性过氧化物酶封闭液,放入 37 ℃烤箱中孵育 30 min;加入封闭用正常羊血清工作液,放入 37 ℃烤箱中孵育 30 min;甩干后,加入兔抗人 GPC3 单克隆抗体(1:200),4 ℃孵育过夜。次日,滴加生物素标记的羊抗兔IgG,于 37 ℃烤箱孵育 30 min;PBS 洗涤 5 min × 3 次,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,放入 37 ℃烤箱中 30 min;PBS 洗涤 5 min × 3 次,标本上滴加二氨基联苯胺显色工作液,镜下观察直至细胞中出现黄色后,自来水终止显色,滴加苏木精,约 2 min,自来水冲洗;滴加 1%盐酸酒精,2~10 s,自来水冲洗;滴加饱和碳酸锂溶液,10 s~1 min,自来水冲洗;干燥后中性树胶封片。Nikon2000 倒置显微镜观察、拍照。

1.6 激光共聚焦观察靶向微泡体外寻靶实验

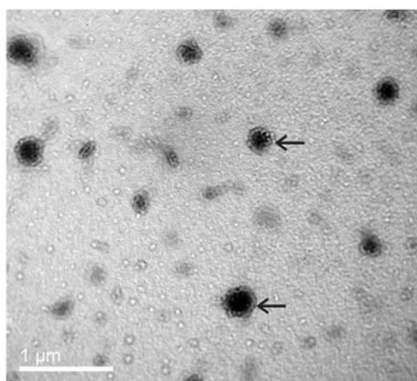
分别取对数期生长状态良好的人肝癌细胞 SMMC-7721、人肝细胞 L02 及人乳腺癌细胞 MCF-7,以 0.25%的胰酶消化,制成玻璃爬片。95%乙醇固定 15 min,1 × PBS 冲洗 5 min × 3 次,5%牛血清白蛋白封闭过夜。将 DiI 用二甲亚砜配成 2 g/L 溶液,以 10 μmol/L 的浓度标记细胞,在 37 ℃、体积分数为 5%的 CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中恒温静置孵育 5 min后,置于 4 ℃冰箱继续孵育 15 min,PBS 洗 2 遍后放入细胞培养箱待用。

分别将 100 μl FITC 标记并结合 GPC3 抗体的靶向微泡,加入 3 组培养皿中,再将 3 种细胞爬片分别盖上(细胞面朝下)室温下作用 2 h。1 × PBS 轻柔冲洗 3 次,激光共聚焦显微镜观察其特异性结合效果。

2 结果

2.1 纳米级脂质超声微泡的检测结果

生物素化脂质超声微泡呈乳白色外观,浓度约 4×10^8 个/ml,通过电镜负染图像直径测量微泡粒径范围约 350~450 nm,微泡分布较均匀,无明显聚集成团,单一微泡外观圆形、完整(图 1)。



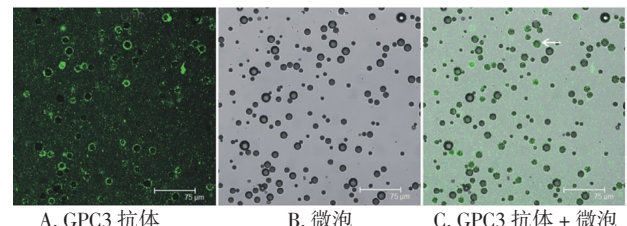
黑色箭头为纳米脂质超声微泡

图 1 电子显微镜负染微泡 (20 000 ×)

Fig.1 Moticbubbles shown by electron microscopy negative staining (20 000 ×)

2.2 微泡与肝癌细胞 GPC3 抗体结合检测

激光共聚焦显微镜检测 GPC3 抗体呈绿色荧光,普通白光显示微泡分布位置,图像原位叠加显示于微泡周围紧密包裹绿色荧光,表明微泡与 GPC3 抗体通过生物素-亲和素桥接方式结合(图 2)。



白色箭头为叠加后结合的 GPC3 抗体与微泡

图 2 激光共聚焦显微镜检测 GPC3 抗体与微泡结合 (400 ×)

Fig.2 Confocal analysis of microbubble binding to GPC3 antibody (400 ×)

流式细胞仪通过荧光强度检测微泡与 GPC3 抗体的结合效率,结果显示微泡与 GPC3 抗体特异性结合比率为 85.05% (图 3)。

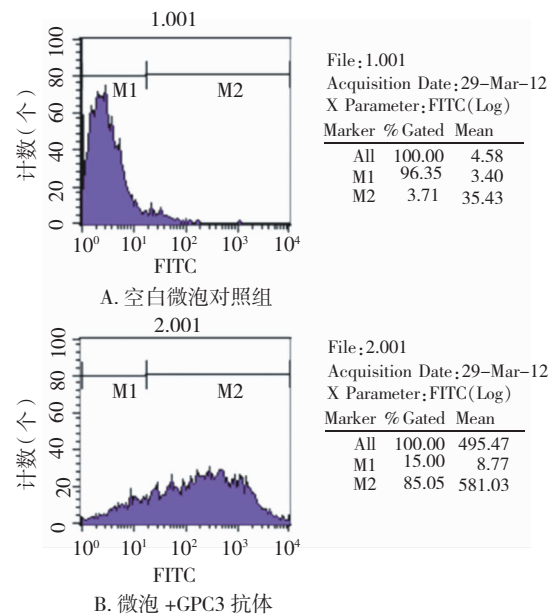


图 3 流式细胞仪检测抗体与微泡的结合率

Fig.3 Binding rate of microbubbles and antibodies determined by flow cytometry

2.3 人肝癌细胞 SMMC-7721、HepG2、Huh7, 人肝细胞 L02 GPC3 表达检测及人肝癌细胞 SMMC-7721 激光共聚焦观察靶向超声微泡的体外寻靶

倒置显微镜下,表达 GPC3 阳性的细胞胞膜及部分细胞质呈现特异性棕褐色(图 4A、B、C),提示人肝癌细胞 SMMC-7721、HepG2、Huh7 细胞胞膜及部分细胞质表达 GPC3 呈阳性。而人肝细胞 L02 只有胞核蓝染,胞膜及细胞质未表现特有棕褐色,提示人肝细胞 L02 表达 GPC3 阴性(图 4D)。

激光共聚焦显微镜视野下,FITC 标记的载肝癌细胞 GPC3 抗体靶向微泡发出绿色荧光,DiI 标记的细胞膜发红色荧

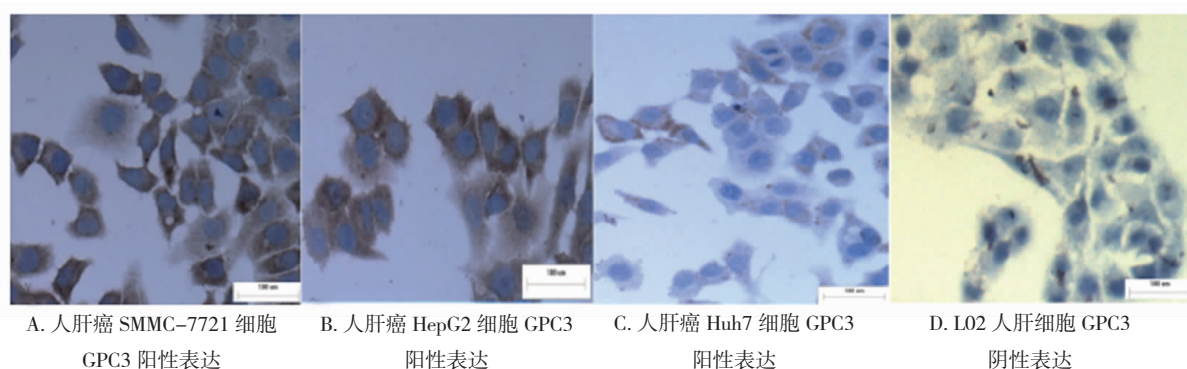
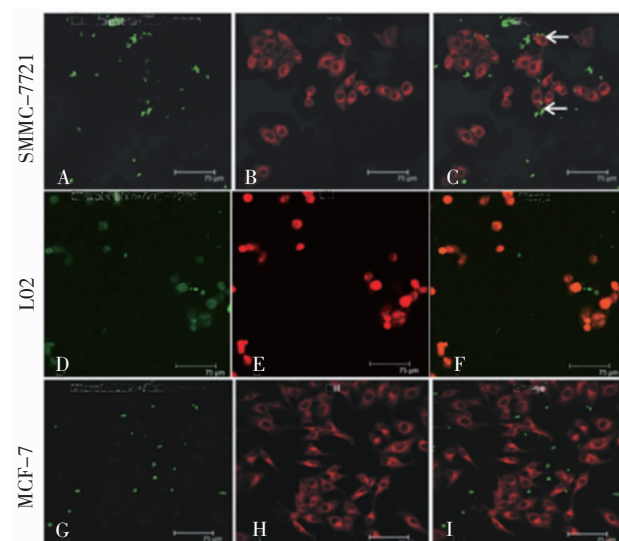


图 4 3 种常见人肝癌细胞及肝细胞 GPC3 表达 (倒置显微镜, 200 ×)

Fig.4 GPC3 expressions in three common hepatoma cells and hepatic cells (inverted microscope, 200 ×)

光,较光镜下能更清晰、准确的定位靶向微泡与靶细胞的分布及结合情况。结果显示,较多的靶向微泡黏附于靶细胞人肝癌细胞 SMMC-7721 周围,用吸管吹打靶向微泡与靶细胞形成的复合体,没有发现结合率减低,表明靶向微泡与靶细胞之间有很牢固的结合(图 5C);观察不到靶向微泡与人肝细胞 L02 及人乳腺癌 MCF-7 细胞结合,大量靶向微泡游离于培养基中(图 5F、图 5I)。



A. 绿色荧光为 FITC 标记的载肝癌细胞 GPC3 抗体靶向微泡;B. 红色荧光为 DiI 标记的人肝癌 SMMC-7721 细胞膜;C. 白色箭头所示为 A 和 B 叠加后靶向微泡与人肝癌 SMMC-7721 细胞之间的结合;D. 绿色荧光为 FITC 标记的载肝癌细胞 GPC3 抗体靶向微泡;E. 红色荧光为 DiI 标记的人肝细胞 L02 细胞膜;F. D 和 E 叠加后观察不到靶向微泡与人肝细胞 L02 细胞之间的结合;G. 绿色荧光为 FITC 标记的载肝癌细胞 GPC3 抗体靶向微泡;H. 红色荧光为 DiI 标记的人乳腺癌 MCF-7 细胞膜;I. G 和 H 叠加后观察不到靶向微泡与人乳腺癌 MCF-7 细胞之间的结合

图 5 靶向微泡与人肝癌细胞 SMMC-7721、人肝细胞 L02、人乳腺癌细胞 MCF-7 结合检测 (激光共聚焦显微镜, 400 ×)

Fig.5 Binding of microbubbles to human hematoma cell SMMC-7721, human hepatic cells L02 and human breast cancer cell MCF-7 (confocal microscope, 400 ×)

3 讨论

目前肝癌等恶性肿瘤的治疗已趋于多元化的综合治疗阶段,超声微泡因其安全、高效、无创等优点已广泛应用于基因治疗、药物输送、肿瘤治疗等领域,但超声微泡因其载基因、药物治疗靶向性差、基因转染率低、载药率低的缺点,导致其临床效果难以达到理想水平。靶向微泡是表面连接有针对特异性抗原的抗体或针对特定组织、特异性受体的配体,使得微泡经静脉注射后通过肺循环选择性的到达与有相应抗原或受体的组织或器官并与之结合^[11],实现靶组织或靶器官的精确治疗,构建靶向超声微泡并实现微泡靶向诊断、治疗的基础在于成功将特定的抗体或配体牢固、有效的连接到微泡外壳上,从根本上解决目前超声微泡治疗上的不足。

原发性肝癌最常用肿瘤标志物是甲胎蛋白(α-fetal protein, AFP),而 AFP 是分泌性蛋白,在循环中可能会被抗体所中和,同时 AFP 在肝细胞中定位于细胞质,因此不适合作为抗体识别位点。而 GPC3 为膜分子,正好克服了上述缺陷,可作为抗体识别部位的较好选择。GPC3 在大部分患者血清中含量较低不易检出,而在肝癌细胞表面则呈高表达且在 AFP 阴性的肝癌中,GPC3 也呈部分表达^[12-13],本实验通过免疫组化证实,人肝癌细胞株 SMMC-7721 胞膜表达 GPC3 呈阳性,具备与其相应抗体结合的能力。

常用的抗体或配体与微泡的连接方式有共价连接、静电吸附、碳化二甲胺、戊二醛及生物素-亲和素桥接等,生物素-亲和素技术^[14]因亲和素与生物素的结合具有亲和力高、特异性强,稳定性好等优点

势,已成为近几年发展迅速的生物学技术。1 个亲和素能结合 4 个生物素分子,两者之间亲和力极强,较抗原与抗体之间亲和力至少高出 1 万倍^[15],因此具有极强的特异性和稳定性,由于生物素-亲和素桥连的作用,使靶向微泡与靶点结合更加紧密、牢固,可极大增强机体内抵抗血流冲刷的作用,同时该桥接的实验条件易于控制,是目前国内外应用较为广泛的一种靶向微泡的构建方法^[3-4,16-17]。本研究正是采用了生物素-亲和素桥接的方法构建载肝癌细胞 GPC3 抗体的靶向超声微泡,将生物素化的微泡与链霉-亲和素孵育结合,再将生物素化的特异性 GPC3 抗体连接到含链霉-亲和素的微泡上,从而成功构建载肝癌细胞 GPC3 抗体的靶向超声微泡。结合进一步的体外寻靶实验结果,载 GPC3 抗体的靶向超声微泡能主动识别并牢固的结合到靶细胞人肝癌细胞 SMMC-7721 表面,经反复 PBS 洗涤后仍不脱落;而人乳腺癌 MCF-7 细胞未能实现与靶向微泡结合。说明本研究构建的载肝癌细胞 GPC3 抗体的靶向超声微泡具有较强的特异性,为深入进行载药等相关研究奠定基础。但是,靶向微泡稳定性的增强、与靶组织结合效率的提高以及潜在的免疫反应等问题尚需进一步研究解决。

参 考 文 献

- [1] Golfieri R, Marini E, Bazzocchi A, et al. Small (<or=3 cm) hepatocellular carcinoma in cirrhosis: the role of double contrast agents in MR imaging vs. multidetector-row CT[J]. Radiol Med, 2009, 114(8): 1239-1266.
- [2] Klivanov A L. Ultrasound molecular imaging with targeted microbubble contrast agents[J]. J Nucl Cardiol, 2007, 14(6): 876-884.
- [3] Willmann J K, Paulmurugan R, Chen K, et al. US imaging of tumor angiogenesis with microbubbles targeted to vascular endothelial growth factor receptor type 2 in mice[J]. Radiology, 2008, 246(2): 508-518.
- [4] Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Encapsulated ultrasound microbubbles; therapeutic application in drug/gene delivery[J]. J Controlled Release, 2006, 114(1): 89-99.
- [5] Rapoport N, Kennedy A M, Shea J E, et al. Ultrasonic nanotherapy of pancreatic cancer: lessons from ultrasound imaging[J]. Mol Pharm, 2010, 7(1): 22-31.
- [6] Oeffinger B E, Wheatley M A. Development and characterization of a nano-scale contrast agent[J]. Ultrasonics, 2004, 42(1-9): 343-347.
- [7] Wang D, Yang K, Gao Y H, et al. Preparation and characterization of a nanoscale ultrasound contrast agent[J]. Clin Imaging, 2010, 34(4): 288-292.
- [8] 李攀, 郑元义, 陈松, 等. 自制脂质纳米级超声造影剂体外基本特性和造影增强的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2008, 24(2): 100-102.
- [9] Li P, Zheng Y Y, Chen S, et al. Characteristics and enhancement effect of a self-made nano-lipid ultrasound-enhanced contrast; in vitro and in vivo experimental study[J]. Chinese Journal of Ultrasound in Medicine, 2008, 24(2): 100-102.
- [10] Wang H L, Anatelli F, Zhai Q J, et al. Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions[J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(11): 1723-1728.
- [11] Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(3): 649-656.
- [12] 赵金花, 惠春, 陈亚珠. 超声微泡造影剂的发展及最新临床应用研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2010, 27(2): 1802-1805.
- [13] Zhao J H, Hui C, Chen Y Z. Development and new clinical applications of ultrasound microbubble contrast agents[J]. Chinese Journal of Medical physics, 2010, 27(2): 1802-1805.
- [14] Suzuki M, Sugimoto K, Tanka J, et al. Up-regulation of glypican-3 in human hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2010, 30(12): 5055-5061.
- [15] Kandil D H, Cooper K. Glypican-3; a novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma and more[J]. Adv Anat Pathol, 2009, 16(2): 125-129.
- [16] Teulon J M, Delcuze Y, Odorico M, et al. Single and multiple bonds in (strept) avidin_biotin interactions[J]. J Mol Recognit, 2011, 24(3): 490-502.
- [17] 容跃, 冉海涛, 王志刚, 等. 包裹紫杉醇的高分子纳米粒与超声脂质微泡复合体的制备研究[J]. 中国超声医学杂志, 2012, 28(2): 97-100.
- [18] Rong Y, Ran H T, Wang Z G, et al. Production of the complex of paclitaxel loaded PLGA-COOH nanoparticles and ultrasound microbubbles[J]. Chinese Journal of Ultrasound in Medicine, 2012, 28(2): 97-100.
- [19] Rychak J J, Lindner J R, Ley K, et al. Deformable gas-filled microbubbles targeted to P-selection[J]. J Control Release, 2006, 114(3): 288-299.
- [20] Ferrante E A, Pickard J E, Rychak J, et al. Dual targeting improves microbubble contrast agent adhesion to VCAM-1 and P-selectin under flow[J]. J Control Release, 2009, 140(2): 100-107.

(责任编辑: 关蕴良)