论著

文章编号:1000-5404(2014)23-2358-05

高强度聚焦超声诱导阿苯达唑热敏脂质体杀伤原头蚴的实验研究

王梦莹[1],张 静[1,2],叶 彬[1,2],张潞渝[2],赵毅峰[3],赵海龙[4] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:病原生物学教研室[1],分子医学与肿瘤研究中心[2];810001 西宁,青海大学:附属医院介入科[3],医学院病原生物学教研室[4])

[摘要] **目的** 探索高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)诱导阿苯达唑热敏脂质体(Albendazolethermosensitive liposomes, TSL-ABZ)杀伤原头蚴的效果。**方法** 采用薄膜分散法制备阿苯达唑热敏脂质体。设立假照超声组,单纯 HIFU 组,HIFU + ABZ 水剂 100 μL 组,HIFU + TSL-ABZ 100 μL 组,HIFU + TSL-ABZ 200 μL 组,HIFU + TSL-ABZ 300 μL 组,HIFU + TSL-ABZ 600 μL 组,HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL 组,实验组为原头蚴悬液 1 mL 加入含不同浓度的脂质体 PBS 缓冲液 1 mL,每组均予以 HIFU 75W × 12 s 进行照射,处理后悬液行伊红染色,光镜下观察原头蚴形态改变并计数死亡率;琼脂糖固定原头蚴切片,HE 染色观察。**结果** 制备的阿苯达唑热敏脂质体形态规则且分散性良好,与高强度聚焦超声联合使用后,对原头蚴的杀伤有很好的效果。其中 HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL 组杀伤效果最为显著,形态观察可见皮层破坏严重,钙颗粒消失,空泡化明显,头钩脱落,部分结构甚至消失,死亡率较其他各组更高[(88.25 ± 0.01),(P < 0.01)]。**结论** HIFU 联合 TSL-ABZ 对原头蚴的杀伤效果均优于单纯使用 HIFU 照射。HIFU 功率一定时,在一定 TSL-ABZ 浓度范围内,原头蚴的死亡率随药物浓度的增加而升高。

[关键词] 原头蚴;高强度聚焦超声;阿苯达唑;热敏脂质体

[中图法分类号] R454.3; R532.32; R978.6 [文献标志码] A

Killing effect of high intensity focused ultrasound-induced albendazole thermosensitive liposomes on protoscolices *in vitro*

Wang Mengying[1], Zhang Jing[1,2], Ye Bin[1,2], Zhang Luyu[2], Zhao Yifeng[3], Zhao Hailong[4] ([1]Department of Pathogenic Biology, [2]Center of Molecular Medicine and Cancer Research, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Qinghai University, [4]Department of Pathogenic Biology, Medical College, Qinghai University, Xining, Qinghai Province, 810001, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the killing effect of high-intensity focused ultrasound (HIFU) induced albendazole thermosensitive liposomes (TSL-ABZ) on protoscolices *in vitro*. **Methods** Film dispersion was used to prepare albendazole thermosensitive liposomes. The experiment was carried out on 8 different groups, that is, the sham ultrasound group, simple HIFU group, HIFU + ABZ agent 100 μL group and HIFU + TSL-ABZ 100, 200, 300, 600 and 1 000 μL groups. In each group, 1 mL suspension of protoscolices was added into 1 mL PBS buffer mixed with different doses of liposomes, and then exposed to HIFU irradiation of 75 W for 12 s. Eosin staining was carried out after HIFU treatment. Light microscopy was used to observe the morphological change and the instant death rates of protoscolices. HE staining was made after the suspension was fasted with 4% paraformaldehyde. **Results** The prepared TSL-ABZ liposomes were in regular shape and well dispersed, and showed better killing effect on protoscolices when combined with HIFU. HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL resulted in best killing efficiency [(88.25 ± 0.01)%, P < 0.01]. Morphological observation showed that heavily damaged membrane, disappeared calcium particles, obvious vacuolation, and fell-off hook and some structures even missing. **Conclusion** HIFU induced TSL-ABZ enhances the killing effect of HIFU on protoscolices. When the power of HIFU is constant and the dose of TSL-ABZ is within a certain range, the mortality of protoscolices is increased in a dose-dependent manner.

[**Key words**] protoscolices; high intensity focused ultrasound; albendazole; thermosensitive liposomes

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10032). Corresponding author: Zhang Jing, E-mail: zhangjingcq@sohu.com, Ye Bin, E-mail: yebina@sohu.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10032)

[通信作者] 张 静,E-mail:zhangjingcq@sohu.com

叶 彬,E-mail:yebina@sohu.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1605.013.html (2014-11-6)

包虫病是细粒棘球蚴绦虫中绦期幼虫(即原头蚴)感染所致的一种常见人畜共患病,该病好发于肝脏、肺脏及脑等人体最重要的器官,其中肝脏发病率高达 64.96%[1],严重影响人类健康。目前,手术仍是治疗的首选,但术中囊液泄露和术后留有的空腔,常导致包虫残腔感染、胆漏、复发和播散等并发症。高强度聚焦超声(high intensity focused ultarasound,HIFU)作为一项新兴技术已普遍应用于实体肿瘤的治疗,无创或微创是其最突出的特点[2]。我们前期的研究已证实 HIFU 具有热效应、机械效应及空泡效应,对杀伤原头蚴有显著的作用,但无法杀灭病变部位全部的原头蚴。

阿苯达唑为临床治疗包虫病的首选药物,其在体内分布广泛,无法集中于靶组织,治疗效果欠佳[3]。近年来,脂质体(Liposome)作为药物载体成为国内外研究的热点,热敏脂质体是脂质体的一个新分支,具有广阔的发展前景[4]。本实验旨在利用 HIFU 的热效应诱导热敏脂质体靶向释药,提高阿苯达唑的生物利用度,探讨两者结合能否增强对离体原头蚴的杀伤效力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原头蚴标本 感染棘球蚴的羊肝采集于青海省西宁市某屠宰场,从自然感染细粒棘球蚴的藏西羊体内取出病肝放入冰盒中备用。75% 的乙醇溶液洗净棘球蚴包囊表面,10 mL 无菌针筒垂直穿刺包囊,抽取含有原头蚴的囊液,收集于 20 mL 试管中。活力较好的原头蚴很快沉淀于管底,弃上清后再加入含有双抗(青霉素和链霉素)的生理盐水反复漂洗。0.4% 伊红染液观察其活力,调整悬液密度,装于聚乙烯试管中,制成 5 000 ~ 6 000 个/mL 的悬液,每管 1 mL。

1.1.2 主要试剂 热敏脂质体(批号 20130710),采用薄膜分散法制备阿苯达唑热敏脂质体(TSL-ABZ)和热敏空白脂质体,颗粒粒径为 800 ~ 1 000 nm,灭菌操作,钴 60 照射消毒后使用,用前混匀溶液)。阿苯达唑标准品(中国食品药品检定研究所)、阿苯达唑标准品悬液(ABZ 水剂,批号 20130710 ,称量后混合制得),配置浓度与 TSL-ABZ 一致。

1.1.3 主要仪器 JC-200 型 HIFU 治疗系统,由青海大学附属医院介入科提供。该系统主要由可调功率发生器、治疗探头、治疗床、机械控制系统及 B 超监控系统等组成。治疗头工作参数:探头直径 150 mm,聚焦焦距 110 mm,输出功率 0 ~ 400 W,频率 1.0 MHz。ZX98-1 型旋转蒸发仪(上海仪表电机厂生产),热电偶探针和温度测量仪(重庆仪表厂,精确度为 ±0.1°)

1.2 方法

1.2.1 热敏脂质体相关指标检测 电镜、动态激光粒度分析仪观测含药热敏脂质体镜下形态结构和粒径,低温离心法测定药物包封率。

1.2.2 温度测试 HIFU 最适辐照剂量 取若干个相同聚乙烯试管,加入 1 mL PBS 缓冲液,以超声辐照,测试辐照后液体升温情况。HIFU 辐照功率选取 50、75、100 W 3 个功率进行测试,单次辐照时长分别选取 2 s 和 3 s。根据实验结果选取使热敏脂质体达相变温度(42 ℃)[5]的最适 HIFU 辐照功率和时间。

1.2.3 实验分组 将制备好的原头蚴悬液分为 8 组,分别为 A 组(仅超声假照,设为对照组),B 组(单纯 HIFU 辐照);C 组(HIFU 辐照 + ABZ 水剂 100 μL),D 组(HIFU + TSL-ABZ 100 μL),E 组(HIFU + TSL-ABZ 200 μL),F 组(HIFU + TSL-ABZ 300 μL),G 组(HIFU + TSL-ABZ 600 μL),H 组(HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL)。选择温度测试中适宜强度的 HIFU 治疗功率和辐照时间作为实验用超声剂量。以上各组每管悬液设定 4 个平行管重复实验。

1.2.4 原头蚴死亡率测定 辐照结束后,立即测定悬液温度,轻轻混匀并取 20 μL 悬液滴到载玻片上,与 0.4% 伊红染液按 1∶1 比例涂片,染色 2 min,在低倍镜下观察原头蚴形态,记录存活和死亡原头蚴数目。取每组中各平行管中活、死原头蚴数的平均值,计算死亡率。

$$\text{死亡率} = \frac{1 - \text{处理后原头节数目}}{\text{处理前活原头节数目}} \times 100\%$$

1.2.5 处理后病理检查 将所有经过 HIFU 及热敏脂质体作用的原头蚴保存在 4% 多聚甲醛中,利用琼脂糖包埋原头蚴制作石蜡切片,HE 染色观察原头蚴的形态变化。

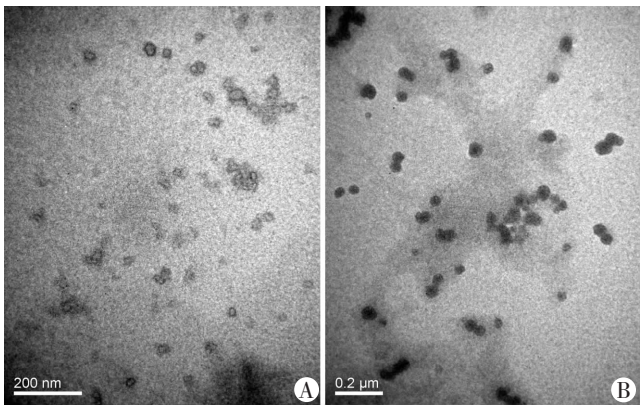
1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,死亡率用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 热敏脂质体制备结果观察

2.1.1 透射电镜观察 制备的热敏脂质体基本呈现均匀圆球状,稍有粘连。空白热敏脂质体为中空球形,颜色较浅;含药热敏脂质体为实心球形,颜色较深(图 1)。



A:空白热敏脂质体(TSL);B:阿苯达唑热敏脂质体(TSL-ABZ)

图 1 透射电镜观察各种脂质体的变化

2.1.2 热敏脂质体粒径和包封率 TSL-ABZ 的粒径在 800 ~ 1 000 nm,制备的 TSL-ABZ 粒径较均一,符合正态分布(图 2)。包封率计算结果为 82% 左右。

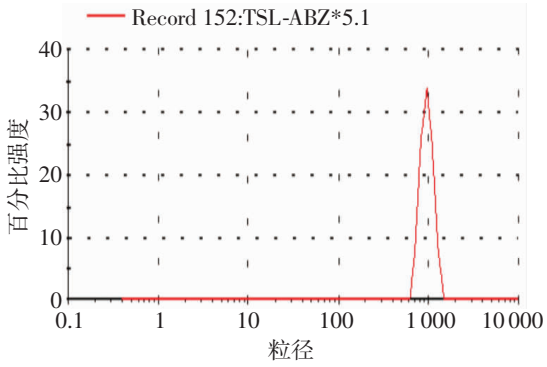


图 2 TSL-ABZ 的粒径分布

2.2 达相变温度时的 HIFU 辐照时间

以 HIFU 50、75、100 W 3 种功率辐照，结果可知单次辐照时长为 3 s 较 2 s 能使 PBS 缓冲液温度能更快达到热敏脂质体相变温度。另外，测试选择 HIFU 辐照单次时长 3 s，达到 42 ℃的辐照功率时间为(75 W，12 s)和(100 W，6 s)两组，出于安全性考虑，选择前者作为本次实验的 HIFU 辐照剂量(表 1、2)。

表 1 不同剂量 HIFU 单次作用时长 2 s 辐照后的 PBS 缓冲液温度变化(℃)

辐照时间	50 W	75 W	150 W
0 s	26	18	22
2 s	28	21	25
4 s	33	25	29
6 s	34	26	34
8 s	37	27	38
10 s	38	32	43
12 s	39	36	44
14 s	39	40	45
16 s	41	42	48
18 s	43	43	49

表 2 不同剂量 HIFU 单次作用时长 3 s 辐照后的 PBS 缓冲液温度变化(℃)

辐照时间	75W	100W
0 s	22	26
3 s	27	37
6 s	30	42
9 s	38	45
12 s	42	47
15 s	45	53

2.3 HIFU 联合 ABZ 水剂或 TSL-ABZ 的效果比较

2.3.1 伊红染色 光学显微镜下观察可见 A 组视野范围内原头蚴数目较多，未被染色，呈透明状，体积未有改变，内部结构清晰可见；B 组原头蚴部分死亡，浅红染，形态基本正常，结构完整；C 组和 D 组原头蚴固缩变小，染色稍加深，石灰小体数目略有减少，未见皮层被膜破坏(图 3)。

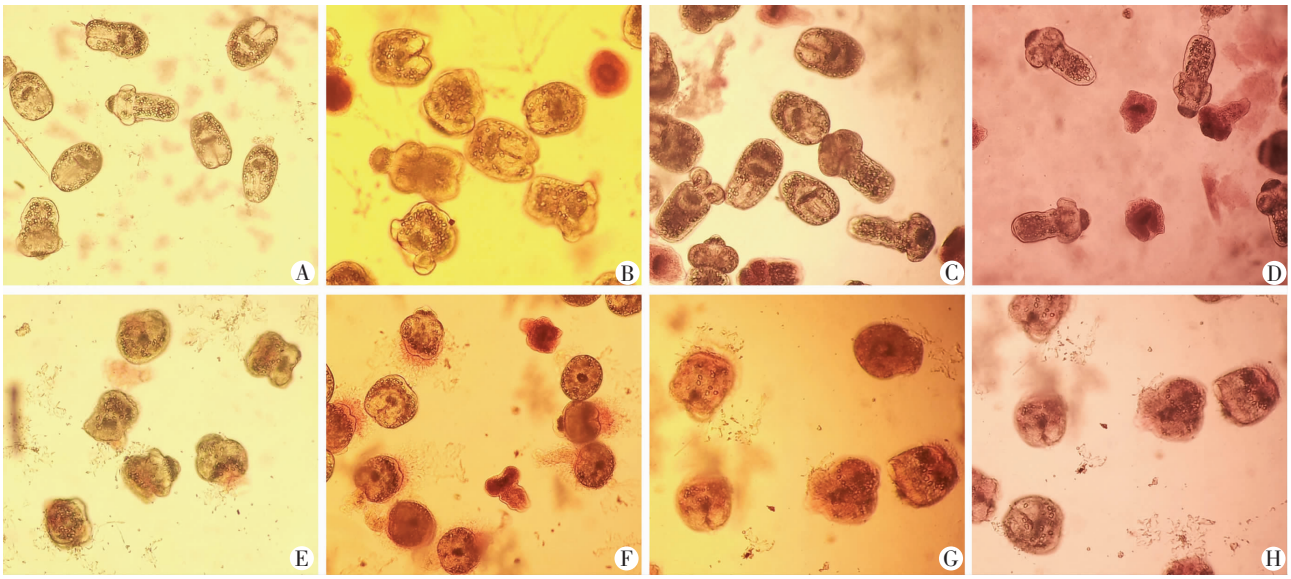
2.3.2 死亡率统计结果 单纯 HIFU 组、HIFU + ABZ 水剂 100 μL 组、HIFU + TSL-ABZ 100 μL 组死亡率均高于假照超声组($\chi^2 = 14.538$，$\chi^2 = 46.007$，$\chi^2 = 83.855$，$P < 0.01$)，其中 HIFU + ABZ 水剂 100 μL 组和 HIFU + TSL-ABZ 100 μL 组又高于单纯 HIFU 组($\chi^2 = 9.495$，$P < 0.02$；$\chi^2 = 31.131$，$P < 0.01$)，HIFU + ABZ 水剂 100 μL 组和 HIFU + TSL-ABZ 100 μL 组两组无统计学差异($\chi^2 = 6.445$，$P > 0.05$，表 3)。

表 3 原头蚴在 HIFU 协同不同阿苯达唑脂质体下的死亡率变化
(总计 300 个原头蚴)

组别	活原头蚴数目(个)	死亡率(%)
A 组(假超声照射)	255.32 ± 8.24	12.89 ± 0.03
B 组(单纯 HIFU 组)	213.97 ± 1.51[a]	28.68 ± 0.01[a]
C 组(HIFU + ABZ 水剂 100 μL 组)	177.99 ± 3.56[ab]	40.67 ± 0.01[ab]
D 组(HIFU + TSL-ABZ 100 μL)	146.31 ± 5.21[ab]	51.23 ± 0.02[ab]

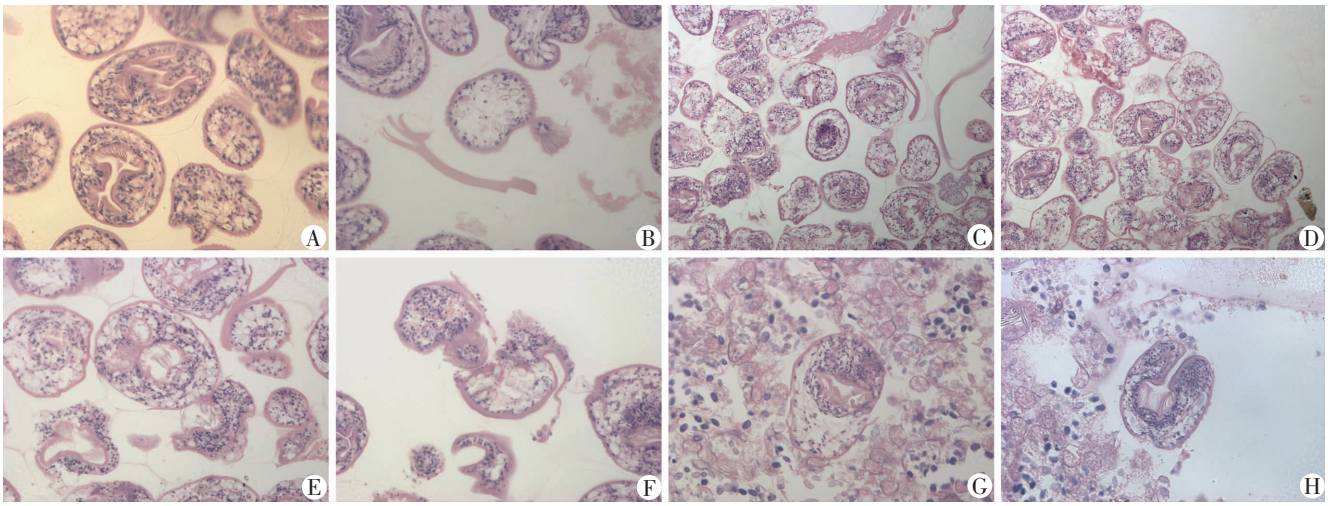
a：$P < 0.05$，与 A 组比较；b：$P < 0.01$，与 B 组比较

2.3.3 HE 染色 超声假照组可见原头蚴虫体外膜完整，皮层细胞清晰可见，吸盘周围细胞呈梭性，排列整齐；单纯 HIFU 组发现少量原头蚴吸盘消失，皮层结构基本完整；HIFU + ABZ 100 mL 组中原头蚴体积稍有减小，钙颗粒减少，皮层细胞不完整；HIFU + TSL-ABZ 100 mL 组的原头蚴整体结构变疏松，头节伸出，外翻者增多，空泡形成(图 4)。



A：假照超声组；B：单纯 HIFU 组；C：HIFU + ABZ 100 μL 组；D：HIFU + TSL-ABZ 100 μL 组；E：HIFU + TSL-ABZ 200 μL 组；F：HIFU + TSL-ABZ 300 μL 组；G：HIFU + TSL-ABZ 600 μL 组；H：HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL 组

图 3 光学显微镜观察各种处理对原头蚴结构的影响 (×100)



A :假照超声组; B:单纯 HIFU 组; C :HIFU + ABZ 100 μL 组; D: HIFU + TSL-ABZ 100 μL 组; E :HIFU + TSL-ABZ 200 μL 组; F :HIFU + TSL-ABZ 300 μL 组;G:HIFU + TSL-ABZ 600 μL 组;H:HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL 组

图 4 各种处理后原头蚴的形态变化 (HE ×400)

2.4 HIFU 联合不同浓度 TSL-ABZ 的效果比较

2.4.1 伊红染色 E、F、组原头蚴结构不完整,小钩掉落,石灰小体部分消失,染色进一步加深;G 组原头蚴数目减少,深染,内部结构破坏明显;H 组光镜视野里大部分原头蚴消失,结构破坏严重(图 3)。

2.4.2 死亡率统计 HIFU + TSL-ABZ 600 μL 组和 HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL 组杀伤效果都优于 HIFU + TSL-ABZ 100 μL、HIFU + TSL-ABZ 200 μL、HIFU + TSL-ABZ 300 μL(χ^2 = 97.478, χ^2 = 67.779, χ^2 = 60.438, χ^2 = 38.320, χ^2 = 19.657, χ^2 = 15.553, P > 0.05),其中 HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL 组杀伤率高于 HIFU + TSL-ABZ 600 μL(χ^2 = 16.305, P < 0.01),HIFU + TSL-ABZ 100 μL、HIFU + TSL-ABZ 200 μL、HIFU + TSL-ABZ 300 μL 相比无统计学差异(P > 0.05,表 4)。

表 4 原头蚴在 HIFU 协同不用浓度 TSL-ABZ 的死亡率变化
(总计 300 个原头蚴)

组别	活原头蚴数目(个)	死亡率(%)
D 组(HIFU + TSL-ABZ 100 μL)	146.31 ± 5.21^{ab}	51.23 ± 0.02^{ab}
E 组(HIFU + TSL-ABZ 200 μL)	124.99 ± 6.59^{ab}	58.34 ± 0.02^{ab}
F 组(HIFU + TSL-ABZ 300 μL)	118.40 ± 2.53^{ab}	60.53 ± 0.01^{ab}
G 组(HIFU + TSL-ABZ 600 μL)	72.31 ± 6.57^{c}	75.90 ± 0.02^{c}
H 组(HIFU + TSL-ABZ 1 000 μL)	35.25 ± 1.29	88.25 ± 0.01

a:P < 0.05,与 G 组比较;b:P < 0.05,c:P < 0.01,与 H 组比较

2.4.3 HE 染色 处理组原头蚴受到不同程度的损害,体积不规则,结构疏松,外翻增多,外翻者头钩伸出。可见板层样皮层并向周边扩张,变薄甚或断裂、缺损。吸盘结构戳乱不清或边移,小钩脱落,钙颗粒减少,核致密浓染,染色质浓缩,大量空泡形成。严重者组织解体,不能识别(图 4)。

3 讨论

HIFU 是一种新型非侵入性技术,将高能超声波聚焦后可产生瞬间的热效应(可达 65 ℃以上)、机械效应和空化效应,使蛋白质变性,发生不可逆坏死,从而导致细胞和组织坏死[6]。细粒棘球蚴囊腔内的囊液是 HIFU 的良好传播媒介和热传导体。当焦点汇聚在囊液中时,超声传导产生的热量可迅速发散性的传递在周围,此时,囊液温度会高于周围组织温度,而正常组织不会因此受到损伤。因此,考虑到 HIFU 产生的热效应也属于热疗的范畴,而与传统的热疗不同,HIFU 能在 1 s 内使靶组织迅速升温,其显著特点是对组织的损伤具有很高的精确性和可控性[7]。我们的前期研究工作已经证实 HIFU 对细粒棘球蚴的破坏性影响,以及对原头蚴的生长抑制作用,但单纯应用 HIFU 并不能够完全杀灭原头蚴,治疗后仍有复发的可能[8]。因此我们考虑将 HIFU 和药物联合来对原头蚴进行杀伤。

阿苯达唑为苯丙咪唑类抗包虫药,是临床公认最有效的药物之一[9-10],但其在体内分布广泛使得其生物利用度较低,只有近 30% 的包虫病可以得到治愈。因此研究新型肝靶向药物制剂成为新的研究方向。脂质体已被证明是一种多用途的、成功的全身给药系统[11]。脂质体通常可以用来延长药物的循环时间和提高药物在体内的滞留浓度,从而增加药物疗效[12-13]。国内脂质体的研究也只是近几年才兴起,其中专属性强的热敏脂质体引起人们的更大兴趣和关注。作为新兴药物载体,热敏脂质体结合热疗具有以下两大特性[14]:①提高加热部位血管的通透性,增加脂质体在热疗部位的聚集,增强靶向性。②控制药物的释放,当环境温度达到脂质体的相变温度时,通透性及流动性增高,药物在加热部位快速释放,从而提高加

热部位的药物浓度。

HFIU对病变局部进行高强度超声效应,不仅可以提高药物的生物利用度,还增强了组织的精确定位及温度调控,克服了传统热疗的缺点,虽然不能完全消灭原头蚴,但这时化疗药物就可以弥补其不足。目前的脂质体在体内普遍存在的问题是释药速率不高,温度可以调节热敏脂质体的释药情况,但其靶向性较弱,难以躲避单核吞噬系统的作用,影响其临床疗效。因此,选择恰当的局部加热方式和温度,使之适用于临床治疗,具有非常重要的意义[15]。

本研究使用自制的阿苯达唑水剂及阿苯达唑热敏脂质体,观察二者结合HIFU后对于原头蚴的影响作用。结果表明,HIFU结合阿苯达唑水剂可以增强杀伤效应,而热敏脂质体的应用优于水剂,其原因一部分可能是自制阿苯达唑热敏脂质体具有热靶向性,HIFU照射使局部温度升高,导致阿苯达唑释放,形成治疗区域的高浓度;另一部分归根于脂质体本身就具有微泡特性,其作用原理类似于微泡造影剂,孔璟等[16]的研究已经证实了微泡作为外源性空化壳,当产生爆破后可以改变组织对入射声波的反应,使靶区能量聚集,增强超声的空化效应,提高杀伤率。已有研究指出HIFU联和药物化疗有满意的治疗效果[17]。本实验可以得到这样一个结论,在加入处理因素之前原头蚴已有一定比例的死亡数目(死亡率为16%),单纯HIFU辐照过的原头蚴死亡率有增加(29%),加入了阿苯达唑水剂和阿苯达唑热敏脂质体后死亡率又有上升(41%和51%),结果显示热敏脂质体疗效稍优于阿苯达唑水剂。另外,比较不同剂量的TSL-ABZ联合HIFU对原头蚴的杀伤效果。在HIFU辐照下,当热敏脂质体浓度达到一定范围时,随着TSL-ABZ浓度的增加,对原头蚴的杀伤率亦呈增长趋势。

因热敏脂质体可以携带化疗药物进入人体,HIFU又可对包虫病变部位进行热疗,热敏性脂质体在局部释放,提高药物生物利用度。同时热敏脂质体可以减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性,从而达到局部化疗的作用。本实验证实了在离体条件下HIFU联合热敏脂质体可以增强对原头蚴的杀伤效应,为下一步体内实验提供研究基础,从而进一步完成探讨HIFU干预下的热敏脂质体对包虫病作用的相关机制,为临床进行靶向治疗提供新的探索途径及理论依据。

参考文献:

[1] 王羽. 3736例包虫病的统计分析[J]. 新疆医学院学报, 1993, 16(3): 244.

[2] Zhao W P, Chen J Y, Zhang L, *et al*. Feasibility of ultrasound-guided high intensity focused ultrasound ablating uterine fibroids with hyperintense on T2-weighted MR imaging[J]. Eur J Radiol, 2013, 82(1): e43 - e49.

[3] Altas M, Aras M, Serarslan Y, *et al*. A medically treated multiple cerebral hydatid cyst disease[J]. J Neurosurg Sci, 2010, 54(2): 79 - 82.

[4] Ta T, Porter T M. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy[J]. J Control Release, 2013, 169(1/2): 112 - 125.

[5] Ding X, Cai K, Luo Z, *et al*. Biocompatible magnetic liposomes for temperature triggered drug delivery[J]. Nanoscale, 2012, 4(20): 6289 - 6292.

[6] Reznik N, Williams R, Burns P N. Investigation of vaporized submicron perfluorocarbon droplets as an ultrasound contrast agent[J]. Ultrasound Med Biol, 2011, 37(8): 1271 - 1279.

[7] Woo J, Chiu G N, Karlsson G, *et al*. Use of a passive equilibration methodology to encapsulate cisplatin into preformed thermosensitive liposomes[J]. Int J Pharm, 2008, 349(1/2): 38 - 46.

[8] 邹晓毅, 叶彬, 王俊安, 等. 高强度聚焦超声波对细粒棘球绦虫原头节酶活性的影响[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(11): 1097 - 1100.

[9] Neghina R, Neghina A M, Marincu I, *et al*. Epidemiology and history of human parasitic diseases in Romania[J]. Parasitol Res, 2011, 108(6): 1333 - 1346.

[10] 赵晓威. 肝靶向性壳聚糖基纳米载药体系的研究与应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(38): 7193 - 7196.

[11] Allen T M, Cullis P R. Drug delivery systems: entering the mainstream[J]. Science, 2004, 303(5665): 1818 - 1822.

[12] Lim H J, Masin D, Madden T D, *et al*. Influence of drug release characteristics on the therapeutic activity of liposomal mitoxantrone[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 281(1): 566 - 573.

[13] Lim H J, Masin D, McIntosh N L, *et al*. Role of drug release and liposome-mediated drug delivery in governing the therapeutic activity of liposomal mitoxantrone used to treat human A431 and LS180 solid tumors[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 292(1): 337 - 345.

[14] de-Smet M, Langereis S, van-den-Bosch S, *et al*. Temperature-sensitive liposomes for doxorubicin delivery under MRI guidance[J]. J Control Release, 2010, 143(1): 120 - 127.

[15] Ninomiya K, Kawabata S, Tashita H, *et al*. Ultrasound-mediated drug delivery using liposomes modified with a thermosensitive polymer[J]. Ultrason Sonochem, 2014, 21(1): 310 - 316.

[16] 孔璟, 叶彬, 张静, 等. 高强度聚焦超声结合微泡造影剂杀伤原头蚴的效果[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(8): 687 - 691.

[17] Smith B, Lyakhov I, Loomis K, *et al*. Hyperthermia-triggered intracellular delivery of anticancer agent to HER2(+) cells by HER2-specific affibody (ZHER2-GS-Cys)-conjugated thermosensitive liposomes (HER2(+) affisomes)[J]. J Control Release, 2011, 153(2): 187 - 194.

(**收稿**:2014-05-21;**修回**:2014-09-07)

(编辑 邓强庭)