DOI:10.16016/j.1000-5404.201911023

携载 AMD070 的靶向超声纳米泡的构建及其抑制乳腺癌细胞生长的效能评估

申戴佳,朱连华,刘 玉,方可敬,刘 灯,郭燕丽 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院超声科

[**摘要**] **目的** 构建携载 CXCR4 小分子拮抗剂 AMD070 的诊疗一体化超声靶向纳米泡,观察其在体外与乳腺癌细胞的靶向结合能力,初步探讨靶向纳米泡联合超声靶向纳米微泡破坏(ultrasound targeted nano-microbubble destruction,UTMD)对乳腺癌细胞生长的抑制作用。**方法** 通过碳二亚胺法和机械振荡法制备携载 AMD070 的靶向纳米泡,检测其物理特性,观察靶向纳米泡与乳腺癌细胞的特异性结合能力,CCK-8 法筛选 UTMD 参数并评估在体外靶向纳米泡联合 UTMD 对乳腺癌细胞的生长抑制作用。**结果** 携载 AMD070 的超声靶向纳米泡粒径(481.72±26.17)nm,电位(-7.14±0.31)mV,其中 AMD070 与脂质纳米泡有效连接,体外结合实验显示靶向纳米泡相较于空白纳米泡对 CXCR4 阳性乳腺癌细胞有更强的亲和力,靶向纳米泡联合优化的 UTMD 能明显抑制 CXCR4 阳性的乳腺癌细胞生长。**结论** 靶向纳米泡能与 CXCR4 阳性表达的乳腺癌细胞特异性结合,并在优化后 UTMD 的配合下显著抑制 CXCR4 阳性乳腺癌细胞的生长。

[**关键词**] 超声靶向纳米泡; 诊疗一体化; CXCR4; 乳腺癌
[**中图法分类号**] R445.1; R737.9; R944.9 [**文献标志码**] A

Preparation of targeted nanobubbles carrying AMD070 and its inhibitory effect on growth of breast cancer cells *in vitro*

SHEN Daijia, ZHU Lianhua, LIU Yu, FANG Kejing, LIU Deng, GUO Yanli Department of Ultrasonography, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare targeted ultrasonic nanobubbles carrying small-molecule CXCR4 antagonist AMD070, which can be used in integrated diagnosis and treatment, and investigate the binding ability to breast cancer cells *in vitro*, in order to investigate the inhibitory effect of ultrasound targeted nanobubble destruction (UTMD) on the growth of breast cancer cells. **Methods** Targeted nanobubbles carrying AMD070 were prepared using the carbodiimide method and mechanical oscillation. Their particle size and zeta potential were assessed. The specific binding ability of targeted nanobubbles to breast cancer cells *in vitro* was evaluated. CCK-8 assay was used to optimize the parameters of UTMD and evaluate the inhibitory effect of targeted nanobubbles combined with UTMD on growth of breast cancer cells. **Result** The average particle size and zeta potential of ultrasonic targeted nanobubbles carrying AMD070 was 481.72±26.17 nm and -7.14±0.31 mV, respectively. AMD070 was efficiently bound to the nanobubbles. *In vitro* experiment showed that the targeted nanobubbles displayed stronger affinity to CXCR4 positive breast cancer cells when compared with the blank nanobubbles. When combined with UTMD, targeted nanobubbles exerted a remarkable inhibitory effect on the proliferation in CXCR4 positive breast cancer cells. **Conclusion** Targeted nanobubbles can specifically bind to CXCR4 positive breast cancer cells, and when combined with optimized UTMD, and the targeted nanobubbles can significantly inhibit the growth of CXCR4 positive breast cancer cells *in vitro*.

[**Key words**] ultrasonic targeted nanobubbles; integrated diagnosis and treatment; CXCR4; breast cancer

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81771856) and the Project of Technology Innovation Plan in Major Fields of the First Affiliated Hospital of Army Medical University (SWH2016ZDCX4101). Correspondence: GUO Yanli, E-mail: guoyanli71@aliyun.com

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81771856);陆军军医大学第一附属医院重大领域技术创新项目(SWH2016ZDCX4101)
[**通信作者**] 郭燕丽,E-mail:guoyanli71@aliyun.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率呈逐年上升趋势[1]。目前针对乳腺癌特异性靶点的治疗药物不断增多。CXC 型趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor type 4,CXCR4)在包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤中均有表达。它的配体为趋化因子基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor,SDF-1),SDF-1/CXCR4 信号转导轴在肿瘤的生长、增殖、转移、侵袭过程中扮演重要角色[2-4],阻断这一信号转导轴能有效抑制肿瘤的生长和转移。而 AMD070 是针对 CXCR4 的小分子拮抗剂,并已经进入临床前试验[5]。探讨具有靶向、安全、高效的药物递送系统是 AMD070 能发挥治疗作用的基础和关键环节。我们的前期研究显示,超声纳米泡不仅是良好的超声造影剂,而且还可以作为一种良好的药物递送系统参与治疗[6]。它具有结构简单,稳定性好,无免疫反应的优点,在超声靶向纳米微泡破坏(ultrasound targeted nano-microbubble destruction,UTMD)的配合下将药物或者基因递送到肿瘤内部,从而提高肿瘤局部药物浓度或转染效率[7]。但是目前 UTMD 的参数并不统一,需要对其进行优化,从而提高超声纳米泡联合 UTMD 对肿瘤的治疗效果[8]。基于此,本研究拟将 AMD070 连接在脂质纳米泡上形成诊疗一体化的靶向纳米泡(targeted nanobubbles,TBs),研究其与 CXCR4 阳性表达的乳腺癌细胞特异性结合能力,同时优化 UTMD 参数(包括声强、辐照时间、纳米泡浓度),研究靶向纳米泡联合优化后的 UTMD 促进 AMD070 靶向释放,抑制乳腺癌细胞生长的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人乳腺癌系 MCF-7 细胞(CXCR4 阳性)、MDA-MB-468 细胞(CXCR4 阴性)购自中科院上海细胞库。

1.2 主要材料

DPPC(1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DPPE(1,2-二棕榈酰基-snglycero-3-磷酸乙醇胺)、DPPG(1,2-dipalmitoyl-sn-glycem-3-磷酸甘油)、DPPA(1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸酯)和 DSPE-PEG2000-COOH(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸)购自中国西安瑞禧公司;胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素、细胞培养基 DMEM、胰酶 EDTA 购自以色列 BI 公司;5%牛血清白蛋白(5%BSA)购自中国北京索莱宝试剂公司;CCK-8 试剂盒购自中国上海碧云天生物技术公司;八氟丙烷(C_3F_8)购自中国天津核工业理化工程研究所。CXCR4 兔抗人一抗购自美国 Abcam 公司。碳酰二亚胺盐酸盐[1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyloar bodlimide hydrochloride, EDC · HCl]、N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysullinimide,NHS)均购自美国 Sigma 公司。

ST-B 系列混合器购自北京 AT&MBiomaterials 公司;IX71 光学显微镜购自日本 Olympus Corporation 公司;Malvern Zetasizernano ZS90 检测器购自 Malvem Instmments Inc 公司;JEM-1400 透射电子显微镜(JEOL)购自日本 Tokyo 公司;WED-100 超声治疗设备购自中国深圳医疗电子有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人乳腺癌 MCF-7 细胞和 MDA-MB-468 细胞接种于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,在 37 ℃、5%CO_2 的孵箱中培养,取对数生长期的细胞用 0.25%胰蛋白酶消化后传代或进行实验。

1.3.2 DSPE-PEG2000-AMD070 的合成与鉴定 将 DSPE-PEG2000-COOH 与 NHS、EDC 按照 1∶2∶2的摩尔比例溶于二甲基亚砜中(DMSO),在室温下振荡活化 2 h,再加入 AMD070(DSPE-PEG2000-COOH 与 AMD070 摩尔比为 1∶1.5),活化的脂质 DSPE-PEG2000-COO-琥珀酰亚胺与 AMD070 发生酰胺反应,反应结束后将溶液转移至 4 ℃透析袋中(截留分子量),除去未反应的 NHS、EDC · HCl 和 AMD070,放于冻干机中去除 DMSO 和无离子水,得到 DSPE-PEG2000-AMD070 的固体。取 DSPE-PEG2000-COOH 固体用质谱仪检测相对分子质量。

1.3.3 靶向纳米泡(targeted nanobubbles,TBs)与空白纳米泡(blank nanobubbles,NBs)的制备 将 DPPA、DPPC、DPPE、DPPG 和 DSPE-PEG2000-AMD070 按照一定比例混合,溶解于 1 mL 甘油 PBS 溶液(甘油∶PBS=1∶9),充分溶解,次日将溶液转移至西林瓶中,充入 C_3F_8 置换瓶内空气,用 ST 型银汞胶囊震荡仪震荡 90 s,振荡后悬液 300×*g* 离心 3 min,去除未溶解的脂质和微泡,获得 TBs,置于 4 ℃冰箱中备用。以 DPPA、DPPC、DPPE、DPPG 以及 DSPE-PEG2000-COOH 为原料按照上述方法制备空白纳米泡(NBs)。

1.3.4 TBs 的物理性质检测 马尔文粒径分析仪(Malvern Instruments Inc,Worcestershire,UK)测量 TBs 的粒径和电位。通过光学显微镜观察 TBs 的分布,用 DiI 对 TBs 进行标记,置于荧光显微镜下观察。透射电镜观察 TBs 的表面形态与内部结构。

1.3.5 TBs 和 NBs 与乳腺癌细胞结合 将对数期的 MCF-7 细胞和 MDA-MB-468 细胞以 5×10^4 个/孔接种在 24 孔板中,过夜培养后用 4%多聚甲醛固定,用 5%BSA 室温封闭 1 h,将细胞分成 3 组,第 1 组加入

50 μL 的 TBs,第 2 组加入 50 μL 等浓度的 NBs,第 3 组先用 CXCR4 抗体孵育 2 h,漂洗后加入 50 μL 等浓度的 TBs,3 组均在 4 ℃冰箱中孵育 2 h,爬片清洗 3 次后,将爬片倒置于载玻片上,在光学显微镜下观察。

1.3.6　TBs 联合 UTMD 对乳腺癌细胞生长抑制的检测　为了尽可能降低超声辐照的作用对细胞生长的不利影响,需要筛选合适的超声辐照参数,将对数生长的 MCF-7 细胞以 5×10^3 个/孔接种在 96 孔板中,过夜培养后,以超声声强(0、1.0、1.75、2.0 W/cm^2)、培养基中空白纳米泡浓度(0、5×10^6、1×10^7、2×10^7、4×10^7 个/mL)及超声辐照时间(0、5、10、20、40 s)的条件处理细胞,其中无辐照、无纳米泡处理组设为对照组,继续培养 48 h 后,加入 CCK-8 试剂并在培养箱中孵育 2 h,用酶标仪在波长 450 nm 处读取光密度值[D(450)],计算细胞生存率,筛选出与对照组无统计学差异的超声辐照条件。

1.3.7　TBs 联合 UTMD 对乳腺癌细胞的生长抑制作用　用不同浓度梯度(0、2.5×10^6、5×10^6、1×10^7、2×10^7、4×10^7 个/mL)的 TBs 联合筛选出的超声辐照条件处理两种乳腺癌细胞,无辐照、无纳米泡处理组设为对照组,培养 48 h 后,加入 CCK-8 试剂并在培养箱中孵育 2 h,用酶标仪在波长 450 nm 处读取光密度值[D(450)],计算细胞生存率,实验重复 3 次。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　DSPE-PEG2000-AMD070 的合成与鉴定

质谱检测合成的 DSPE-PEG2000-AMD070 相对分子质量为 3 152.39(图 1),理论计算 DSPE-PEG2000-AMD070 的相对分子质量为 3 149.48,故合成的 DSPE-PEG2000-AMD070 的相对分子质量与理论值一致,说明 AMD070 已与 DSPE-PEG2000-COOH 相连接。

2.2　TBs 的物理性质检测

TBs 粒径为(481.72±26.17)nm,电位为(−7.14±0.31)mV,在光镜下靶向纳米泡分布均匀(图 2A),荧光显微镜下 TBs 呈均匀红色,表明脂质纳米泡质地均匀,结构完整,无明显聚集或破碎(图 2B)。电镜下 TBs 呈圆形,大小匀称,与光镜、荧光显微镜观察结果基本一致(图 2C)。

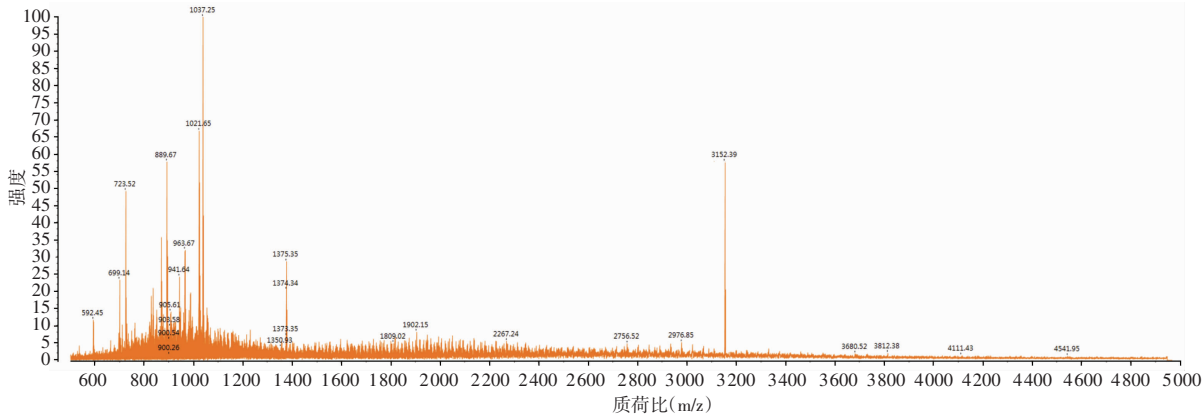
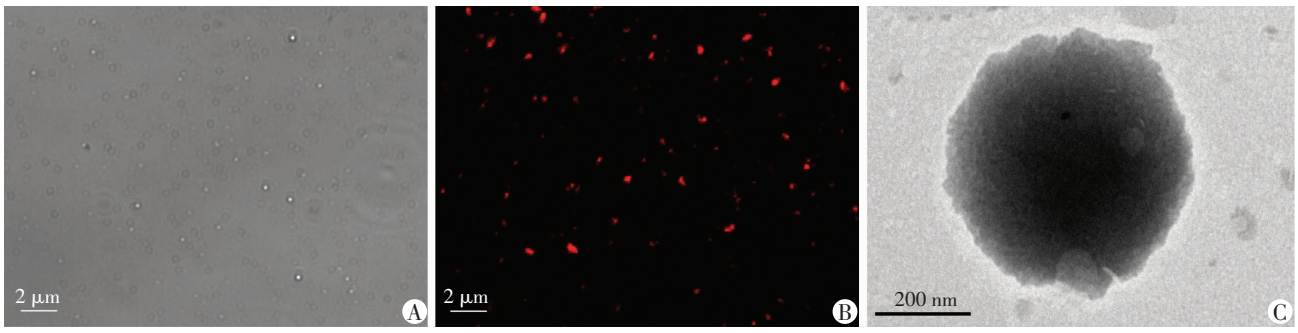


图 1　DSPE-PEG2000-AMD070 的质谱



A:光学显微镜下的 TBs 形态;B:荧光显微镜下 DiI 标记的 TBs 形态;C:透射电镜观察 TBs 形态

图 2　TBs 的物理性质检测

2.3 TBs 体外靶向能力

光学显微镜下观察 TBs 能与 CXCR4 阳性的 MCF-7 细胞大量结合,与 CXCR4 阴性的 MDA-MB-468 细胞几乎不结合,NBs 与两种细胞均不结合。在用 CXCR4 抗体阻断乳腺癌细胞的 CXCR4 位点后,TBs 与两种细胞都没有明显结合(图 3),说明 TBs 能特异性的结合于 CXCR4 阳性细胞的细胞膜周围。

2.4 UTMD 参数筛选

CCK-8 检测分析 UTMD 参数对细胞生存率的影响,在超声功率的筛选中,声强 1.0 W/cm^2 的细胞生存率与对照组(0 W/cm^2)差异无统计学意义,但是声强 1.75、2.0 W/cm^2 的细胞生存率较对照组显著降低(P<0.05,图 4A),说明声强 1.0 W/cm^2 对细胞生长没有明显影响。在辐照时间的筛选中,辐照 5、10 s 的细胞生存率与对照组(0 s)差异无统计学意义,当辐照 20、40 s 时细胞生存率较对照组显著降低(P<0.05,图 4B),说明辐照时间不超过 10 s 对细胞生长无明显影响。在纳米泡浓度筛选中,空白纳米泡浓度在 5×10^6~2×10^7 个/mL 之间对细胞生存率无明显影响,当浓度达到 4×10^7 个/mL 时,细胞生存率较对照组(0 个/mL)显著降低(P<0.05,图 4C)。由此可得超声声强 1.0 W/cm^2、辐照时间 10 s、超声纳米泡浓度 5×10^6~2×10^7 个/mL 为最佳超声辐照参数。

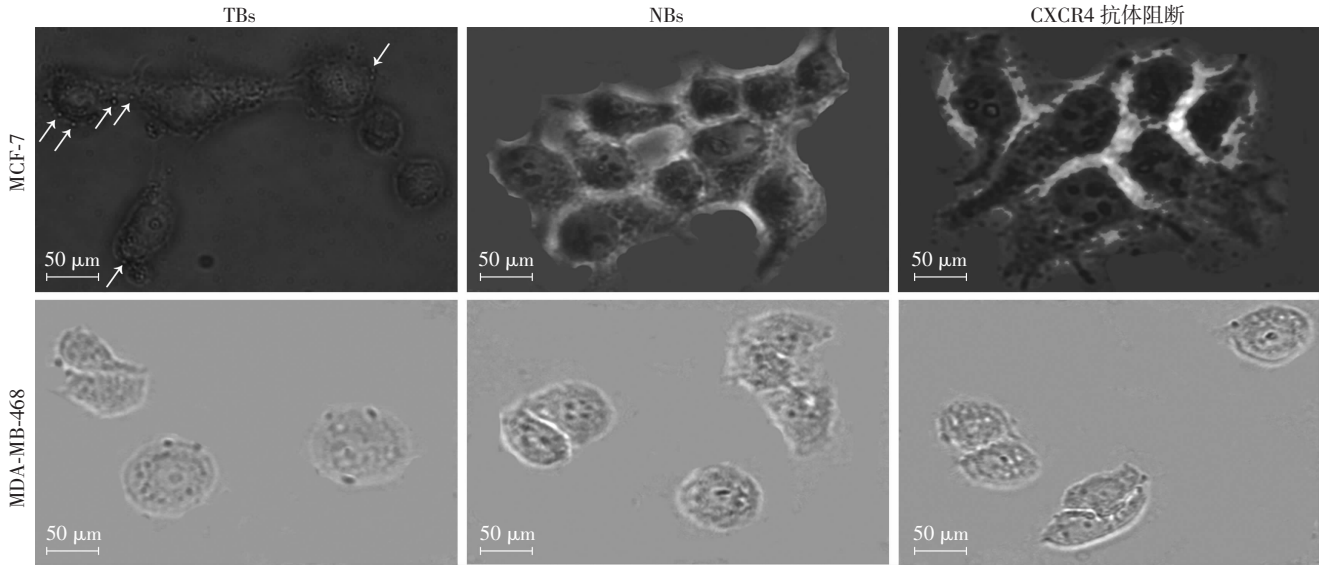
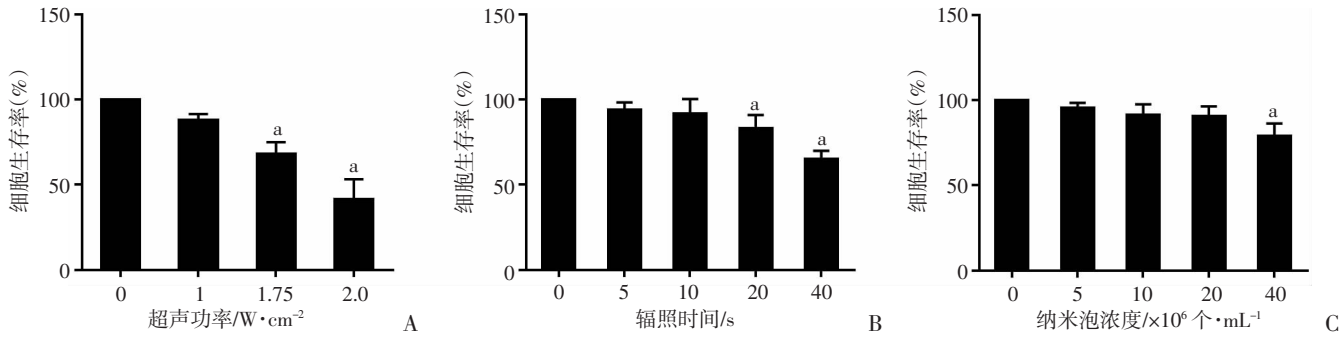
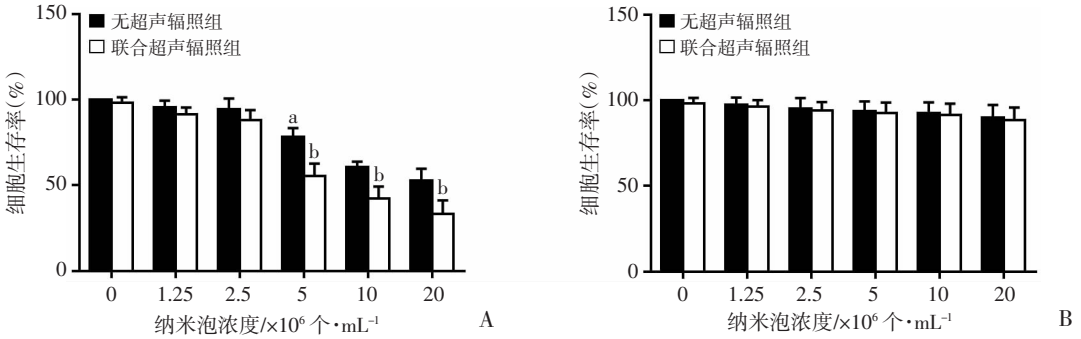


图 3 TBs 和 NBs 与 CXCR4 阳性表达的 MCF-7 细胞和阴性表达的 MDA-MB-468 细胞的结合情况 (箭头示 TBs)



A:不同超声声强下细胞生存率(辐照时间 10 s,纳米泡浓度 1.0×10^7 个/mL) a:P<0.05,与 0 W/cm^2 对照组比较;B:不同超声辐照时间下的细胞生存率(超声声强 1.0 W/cm^2,纳米泡浓度 1.0×10^7 个/mL) a:P<0.05,与 0 s 对照组比较;C:不同纳米泡浓度下的细胞生存率(超声声强 1.0 W/cm^2,辐照时间 5 s) a:P<0.05,与 0 个/mL 比较

图 4 CCK-8 法检测不同超声条件下 MCF-7 细胞的生存率



A:MCF-7 细胞 a:$P<0.05$,与 0 个/mL 的无超声辐照组比较;b:$P<0.05$,与同浓度 TBs 无超声辐照组比较;B:MDA-MB-468 细胞

图 5 CCK-8 法检测 TBs 对不同乳腺癌细胞的生长抑制作用

2.5 TBs 联合 UTMD 对乳腺癌细胞的生长抑制作用

CCK-8 检测分析 TBs 联合 UTMD 对乳腺癌细胞生存率的影响,对于 MCF-7 细胞,TBs 浓度在 0~2.5×10^6 个/mL 时,细胞的生存率与对照组差异无统计学意义,当 TBs 浓度处于 5×10^6~2×10^7 个/mL,细胞生存率逐渐降低,与对照组差异有统计学意义($P<0.05$),且 TBs 联合 UTMD 组细胞生存率较同浓度的 TBs 处理组更低($P<0.05$),在 TBs 浓度达到 2×10^7 个/mL,在超声辐照的配合下,MCF-细胞的生存率是所有处理组里最低的(图 5A)。而在 MDA-MB-468 细胞,TBs 联合 UTMD 在各个浓度梯度对细胞生存率的影响差异均无统计学意义(图 5B)。

3 讨论

药物治疗是乳腺癌治疗方案中的重要组成部分,但是目前抗肿瘤药物普遍缺乏特异性,且为全身用药,全身毒副作用大[9]。因此,构建一种靶向的、高效的、安全的药物递送系统成为目前研究的热点。超声微泡不仅可作为临床上良好的超声造影剂,还可作为一种良好的药物载体,携载药物或基因随着全身血液循环到达肿瘤部位,在超声靶向微泡破坏(UTMD)的配合下实现定向爆破,将携载的药物或基因释放于肿瘤部位,提高肿瘤局部药物浓度或转染效率,从而提高肿瘤治疗效果[10-12]。我们的前期研究显示,比常规微泡粒径更小、穿透力更强的纳米泡同样具备增强显像和在超声辐照下定向爆破促进药物释放和抑制肿瘤生长的作用[6,13]。由于 CXCR4 在多种肿瘤中都存在过表达,已成为多种肿瘤靶向治疗中的高特异性靶点[14-15]。而目前针对乳腺癌 CXCR4 位点进行靶向治疗的研究较少,AMD070 是针对 CXCR4 的小分子拮抗剂,已进入临床前试验阶段,具有与 CXCR4 特异性结合的能力[16]。由此本研究构建携载 AMD070 的纳米级超声微泡,即诊疗一体化的靶向纳米泡(targeted nanobubbles,TBs),探讨靶向纳米泡与 CXCR4 阳性的乳腺癌结合能力,并优化 UTMD 参数,初步探索靶向纳米泡对 CXCR4 阳性表达的乳腺癌细胞是否具有生长抑制作用。

本研究成功构建了携载 AMD070 的纳米泡,质谱检测结果显示,通过碳二亚胺法将 AMD070 连接于纳米脂质外壳 DSPE-PEG2000-COOH 上,所制备的靶向纳米泡具有粒径小、分布均匀的优点,在电镜下呈圆形,大小匀称。在体外乳腺癌细胞靶向结合实验中,靶向纳米泡能与 CXCR4 阳性表达的乳腺癌特异性结合,相较于普通空白纳米泡,靶向纳米泡大量分布于细胞膜表面,表明靶向纳米泡对 CXCR4 阳性表达的乳腺癌细胞具有良好的靶向结合能力。

研究证实,超声辐照能使超声纳米泡定向爆破,但是超声辐照的参数(包括声强、辐照时间、超声纳米泡浓度)需要进一步优化。这是由于超声辐照本身对细胞具有一定的损伤作用,在适宜范围内表现能改变细胞的通透性,使药物更好的进入细胞,而超声辐照参数过大将会使细胞直接破碎,无法探究靶向纳米泡对肿瘤细胞是否有生长抑制作用,所以对超声辐照的参数进行筛选优化是十分必要的[17]。为了确保携载 AMD070 的靶向纳米泡在超声辐照下发挥最佳的治疗效果,本研究进行了超声辐照参数的筛选实验,结果显示,超声声强为 1.0 W/cm^2、辐照时间 10 s、纳米泡浓度为 5×10^6~2×10^7 个/mL 为最佳辐照参数。在这个

参数条件下,既能使靶向纳米泡充分爆破,又确保肿瘤细胞的结构改变是可逆的,从而确保纳米泡上的AMD070顺利释放进入肿瘤细胞内。在靶向纳米泡联合UTMD抑制乳腺癌细胞生长的实验中,随着靶向纳米泡浓度的升高,MCF-7细胞的生存率逐渐降低,且TBs联合UTMD组细胞生存率比同浓度下的TBs组更低,显示靶向纳米泡在UTMD的作用下集中爆破,能提高肿瘤细胞局部药物浓度,AMD070更容易进入细胞内部发挥作用,使CXCR4阳性表达的乳腺癌细胞生长受到抑制。而靶向纳米泡联合UTMD在各个浓度下对CXCR4阴性表达的MDA-MB-468细胞的生长抑制无明显差异,与MISRA等[18]和ZHOU等[19]的研究结果一致,表明对于携载AMD070的靶向纳米泡,结合超声辐照能对细胞产生声孔效应,即肿瘤细胞在两者作用之下胞膜出现可逆性的断裂和穿孔,细胞膜的通透性明显提高,AMD070能顺利进入细胞内部从而抑制细胞生长;而对于空白纳米泡,联合我们所筛选的超声辐照参数,对肿瘤细胞通透性改变是可逆性的[20]。由于空白纳米泡并未携载药物,最终空白纳米泡联合UTMD对乳腺癌细胞生长无明显影响。由此可见靶向纳米泡联合UTMD能明显抑制CXCR4阳性表达的乳腺癌细胞生长,具有较好的治疗作用。

综上所述,本研究将CXCR4的新型小分子拮抗剂AMD070连接于纳米泡的脂质外壳上,构建了一种同时具备靶向显像和治疗的纳米泡,观察靶向纳米泡具有与CXCR4阳性表达乳腺癌细胞的结合能力,并且在优化UTMD参数的基础上,联合UTMD对乳腺癌细胞具有较好的生长抑制效果,表明携载AMD070的靶向纳米泡对乳腺癌细胞有显著的治疗作用。本研究不仅为构建肿瘤诊疗一体化的靶向纳米泡提供了新的思路,还为乳腺癌的靶向诊断和治疗提供了翔实的体外实验基础。本研究尚存在不足之处,比如未探究靶向纳米泡与乳腺癌细胞结合后进入肿瘤,抑制肿瘤细胞生长的机制,下一步将在体内实验中研究靶向纳米泡穿过肿瘤血管与肿瘤细胞结合,在UTMD协同下释放AMD070抑制肿瘤生长,促进凋亡的过程及其机制。

参考文献:

[1] ANASTASIADI Z, LIANOS G D, IGNATIADOU E, *et al*. Breast cancer in young women: an overview[J]. Updates Surg, 2017, 69(3): 313-317. DOI:10.1007/s13304-017-0424-1.

[2] IFTIKHAR A, HASSAN H, IFTIKHAR N, *et al*. Investigational monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: A systematic review of agents under clinical development[J]. Antibodies (Basel), 2019, 8(2): E34. DOI:10.3390/antib8020034.

[3] MAO T L, FAN K F, LIU C L. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in treating epithelial ovarian cancer[J]. Gene Ther, 2017, 24(10): 621-629. DOI:10.1038/gt.2017.69.

[4] XU C, ZHENG L F, LI D C, *et al*. CXCR4 overexpression is correlated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. Life Sci, 2018, 208: 333-340. DOI:10.1016/j.lfs.2018.04.050.

[5] UCHIDA D, KURIBAYASHI N, KINOUCHI M, *et al*. Effect of a novel orally bioavailable CXCR4 inhibitor, AMD070, on the metastasis of oral cancer cells[J]. Oncol Rep, 2018, 40(1): 303-308. DOI:10.3892/or.2018.6400.

[6] 熊星宇, 郭燕丽, 范校周, 等. 携载PSMA单克隆抗体载药纳米泡的制备及体内显影的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2016, 32(5): 467-470.
XIONG X Y, GUO Y L, FAN X Z, *et al*. Preparation of drug-loadingnanobubble connected with PSMA monoclonal antibody and *in vivo* imaging: experimental study[J]. Chin J Ultrasound Med, 2016, 32(5): 467-470.

[7] MA J, XU C S, GAO F, *et al*. Diagnostic and therapeutic research on ultrasoundmicrobubble/nanobubble contrast agents (Review)[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 4022-4028. DOI:10.3892/mmr.2015.3941.

[8] 洪少馥,王冬晓,杨莉,等. 超声辐照联合双配体载药纳米粒对人乳腺癌耐紫杉醇细胞株细胞毒性的效果评价[J]. 中华超声影像学杂志, 2015,24(5): 435-439. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4477.2015.05.020.
HONG S F, WANG D X, YANG L, *et al*. The cytotoxity of paclitaxel-nanoparticles with dual ligands combined with ultrasound irradiation on drug resistant breast cancer cells[J]. Chin J Ultrasonogr, 2015,24(5): 435-439. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4477.2015.05.020.

[9] THALGOTT M, HORN T, HECK M M, *et al*. Long-term results of a phase Ⅱ study with neoadjuvant docetaxel chemotherapy and complete androgen blockade in locally advanced and high-risk prostate cancer[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7: 20. DOI:10.1186/1756-8722-7-20.

[10] FAN X Z, WANG L F, GUO Y L, *et al*. Inhibition of prostate cancer growth using doxorubicin assisted by ultrasound-targetednanobubble destruction[J]. Int J Nanomed, 2016, 11: 3585-3596. DOI:10.2147/IJN.S111808.

[11] LIN L Z, FAN Y, GAO F, *et al*. UTMD-promoted co-delivery of gemcitabine and miR-21 inhibitor by dendrimer-entrapped gold nanoparticles for pancreatic cancer therapy [J]. Theranostics, 2018, 8(7): 1923-1939. DOI:10.7150/thno.22834.

[12] WANG L F, ZHANG M, TAN K B, *et al*. Preparation of nanobubbles carrying androgen receptor siRNA and their inhibitory effects on androgen-independent prostate cancer when combined with ultrasonic irradiation[J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e96586. DOI: 10.1371/journal.pone.0096586.

[13] ZHU L H, GUO Y L, WANG L F, *et al*. Construction of ultrasonic nanobubbles carrying CAIX polypeptides to target carcinoma cells derived from various organs[J]. J Nanobiotechnology, 2017, 15(1): 63. DOI:10.1186/s12951-017-0307-0.

[14] ZHONG J, LI J X, WEI J X, *et al*. Plumbagin restrains hepatocellular carcinoma angiogenesis by stromal cell-derived factor (SDF-1)/CXCR4-CXCR7 axis[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 6110-6119. DOI:10.12659/MSM.915782.

[15] ULLAH T R. The role of CXCR4 in multiple myeloma: Cells' journey from bone marrow to beyond[J]. J Bone Oncol, 2019, 17: 100253. DOI: 10.1016/j.jbo.2019.100253.

[16] NYUNT M M, BECKER S, MACFARLAND R T, *et al*. Pharmacokinetic effect of AMD070, an Oral CXCR4 antagonist, on CYP3A4 and CYP2D6 substrates midazolam and dextromethorphan in healthy volunteers[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2008, 47(5): 559-565. DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181627566.

[17] SUEN W L, JIANG J, WONG H S, *et al*. Examination of effects of low-frequency ultrasound on scleral permeability and collagen network[J]. Ultrasound Med Biol, 2016, 42(11): 2650-2661. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.07.013.

[18] MISRA A C, LUKER K E, DURMAZ H, *et al*. CXCR4-targetednanocarriers for triple negative breast cancers[J]. Biomacromolecules, 2015, 16(8): 2412-2417. DOI:10.1021/acs.biomac.5b00653.

[19] ZHOU K X, XIE L H, PENG X, *et al*. CXCR4 antagonist AMD3100 enhances the response of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation[J]. Cancer Lett, 2018, 418: 196-203. DOI:10.1016/j.canlet.2018.01.009.

[20] THOMAS E, MENON J U, OWEN J, *et al*. Ultrasound-mediated cavitation enhances the delivery of an EGFR-targeting liposomal formulation designed for chemo-radionuclide therapy[J]. Theranostics, 2019, 9(19): 5595-5609. DOI: 10.7150/thno.34669.

(收稿:2019-11-04;修回:2019-12-20)

(编辑 汪勤俭)