



超声、磁共振多功能微气泡造影剂的制备和应用

杨芳, 李熠鑫, 陈忠平, 顾宁*

东南大学生物科学与医学工程学院, 生物电子学国家重点实验室, 江苏省生物材料与器件重点实验室, 南京 210096

* 联系人, E-mail: guning@seu.edu.cn

2008-11-06 收稿, 2009-02-04 接受

国家重点基础研究发展计划(编号: 2006CB933206)和国家自然科学基金(批准号: 50872021)资助项目

摘要 随着包膜微气泡材料和制备技术的发展, 微气泡超声造影剂不仅用于超声成像诊断, 而且在分子成像、药物传输及靶向治疗等多个领域得到广泛的研究与应用. 实验制备了膜壳装载 Fe_3O_4 纳米颗粒、中心包裹氮气的聚合物微气泡造影剂, 体外超声成像(US)显影实验发现该微气泡具有良好的超声图像增强作用. 利用包膜微气泡在超声场作用下的振动模型研究其动力学行为发现, 膜壳中包裹的 Fe_3O_4 纳米颗粒在一定浓度范围内能增加微气泡的膜壳散射截面, 增强超声波的背向散射强度, 从而显著增强超声图像的显影效果; 当超过一定 Fe_3O_4 纳米颗粒浓度则会导致微气泡膜壳散射截面减小, 从而降低超声图像增强效果. 另一方面体外磁共振成像(MRI)显影实验证明, 随着膜壳中 Fe_3O_4 纳米颗粒含量的增加, MRI 增强效果亦增加. 因此为了制备 US 和 MRI 双重显影增强的微气泡造影剂, 控制磁性纳米颗粒在微气泡膜壳中的包裹量十分重要.

关键词

超声成像

磁共振成像

微气泡

磁性纳米颗粒

双重显影

作为一种无创、低成本、实时的成像技术, 超声成像是目前世界上应用最广的成像方式^[1]. 然而由于传统超声诊断技术的敏感性和图像分辨率都较低, 限制了超声诊断的进一步应用. 超声造影剂(ultrasound contrast agents, UCAs)和超声造影技术的引入开辟了超声成像的新时代, 使超声诊断具有更高的敏感性和更高质量的图像^[2].

1 微气泡 UCAs 的发展及应用进展

微气泡(microbubbles)超声造影剂一般是指采用声空化、冷冻干燥、喷雾、乳液、喷墨印迹等方法制备^[3]的直径在 1~10 μm 的包膜气泡. 在诊断超声频率下微气泡在血管或病灶部位聚集后发生共振, 产生比生物组织更强的回波信号, 从而明显提高超声诊断图像的分辨率、敏感度和特异性^[4]. 随着微气泡 UCAs 在临床诊断中结构成像和功能成像的发展, 微气泡除在肝脏、肾脏、乳腺、脾脏等脏器的组织灌注、

炎症检测和肿瘤检测等方面得到广泛的应用^[5~7], 还可进行微气泡表面修饰靶向特异性分子实现分子显影^[8~10]以及装载治疗药物实现药物靶向治疗功能^[11~13].

目前, 已有多种材料被用来作为微气泡的包膜材料, 包括司盘和吐温(ST)系列的表面活性剂类^[14]; 蛋白质类: 如 5%白蛋白^[15]; 脂质类^[16,17]; 聚合物类: 如聚乙二醇 4000、聚丁基-2-氰基丙烯酸酯、多聚糖、海藻酸盐、聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚乙烯醇(PVA)等^[18,19]. 近年来随着研究的深入, 新类型超声造影剂开始出现: 如微乳、纳米乳、二氧化硅纳米颗粒^[20]、金纳米颗粒^[21]以及其他纳米颗粒等^[22,23]. 生物可降解的医用高分子载体材料是目前研究最广泛的药物基因传递和控释载体, 高分子聚合物材料由于分子间作用力较强, 采用交联微球技术制备包裹气体的新型、稳定、超声显影效果良好的微气泡造

引用格式: 杨芳, 李熠鑫, 陈忠平, 等. 超声、磁共振多功能微气泡造影剂的制备和应用. 科学通报, 2009, 54(9): 1181~1186

Yang F, Li Y X, Chen Z P, et al. The preparation and application of microbubble contrast agent combining ultrasound imaging and magnetic resonance imaging. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0168-5

影剂. 该类微气泡UCAs的声学特性可根据聚合物分子量进行设计, 其粒径分布相对集中, 体内外存留时间更长, 为超声诊断技术的进一步发展提供了优良的平台^[24]. 聚合物壳膜还可因特殊的诊断和治疗需要加以修饰, 如携带药物、配体或抗体以及其他造影剂成分, 实现诊断与治疗以及多种诊断模式相结合等多种功能^[25].

目前尽管各种影像技术本身, 包括共聚焦和双光子荧光显微与成像、MRI、单光子发射计算机断层成像(SPET)、正电子发射断层成像技术(PET)、US等为研究人员和临床专家在动物和人体内获取解剖学和生理学信息提供了强大的诊断手段, 但是各种影像技术本身由于各自在时空分辨率方面各有优缺点, 因此没有任何一种成像方式可以完整而足够地获取所有的生物信息. 如荧光成像在人体尤其深部组织很难获得定量信息; MRI具有高分辨率但是敏感度低; 放射性核素成像具有高的敏感度但分辨率低, 尤其US医学诊断模式, 虽然微气泡造影剂的出现提高了疾病诊断的准确性, 但是超声诊断自身的分辨率较低, 因此将US诊断与其他诊断模式的联合使用具有互补优势^[26,27].

本实验基于微气泡造影剂的制备研究, 将具有MRI显影增强能力的 Fe_3O_4 纳米颗粒装载到微气泡膜壳材料上, 制备超声、磁共振多功能微气泡造影剂. 通过体外US显影和MRI显影实验, 优化微气泡膜壳包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的含量, 制备的微气泡造影剂可利用目前临床可用的US, MRI等影像设备实现US和MRI联合使用的双重显影模式, 通过对US和MRI显影后得到的图像联合分析和判断, 提高无创诊断疾病的准确度和特异性.

2 材料与方法

() 包裹磁性纳米颗粒的微气泡制备. 聚乳酸(PLA, $M_w = 10000$)购于山东省医疗器械研究所; 聚乙烯醇(PVA聚合度 1800, 醇解度 89%)购于Sigma-Aldrich公司; 12 nm单分散油酸 Fe_3O_4 纳米颗粒由本实验室陈忠平等人^[28]制备提供, 其他试剂均为分析纯.

将0.5 g 聚乳酸(PLA)溶解于10 mL CHCl_3 中, 移取不同浓度的12 nm油酸 Fe_3O_4 纳米颗粒溶液与上述聚合物溶液均匀混合, 然后再将1 mL双蒸水和微量司盘80注入溶液中, 用声振仪(功率 $200 \text{ W} \cdot \text{s}^{-1}$)在

匀速通入 N_2 (4 mL/min)的条件下超声空化2 min, 制备得到W/O乳液微气泡; 将W/O乳液倒入50 mL 5.0% (质量分数) PVA水溶液中, 室温下机械搅拌(转速 3000 r/min)处理2 h, 得到的双重乳液微气泡, 经离心(20 , 5 min, 1500 r/min)分离后收集样品.

() 微气泡的结构表征和分析. 微气泡的平均粒径和粒径分布采用激光粒径分析仪(MasterSizer 2000, Malvern, England)进行测定. Milli-Q 纯水作为空白对照, 然后将微气泡样品加入纯水中, 当样品达到恰当浓度时进行测定, 每个样品测定3次.

为了观察微气泡的形貌, 采用Axioskop 40进行光学显微(Carl Zeiss, Germany)观察. 同时采用透射电子显微镜(TEM)对微气泡膜壳中磁性纳米颗粒的分布情况进行观察.

将制备的包裹不同 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡样品经处理后, 采用AA240FS原子吸收光度计(Hitachi, Japan)测定微气泡膜壳中 Fe_3O_4 纳米颗粒的实际负载量.

() 微气泡的体外声学成像实验. 采用自制体外模型和超声诊断成像系统(无锡贝尔森影像技术有限公司提供)进行样品的体外超声显影成像实验, 装置示意图如图1所示. 实验所用的样品包括二次蒸馏水、未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡溶液和包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒(浓度为 $47.80 \mu\text{g/mL}$)的微气泡溶液, 实验所用的玻璃水缸尺寸为长12 cm, 宽6 cm, 高6.5 cm, 玻璃缸底部铺厚度为2 cm的海绵作为超声吸收体. 将待测样品分别充满直径为4 mm×6 mm(内径×外径)的硅胶管, 并置于离玻璃缸顶部2.5 cm处的位置, 3.5 MHz的超声扫描探头置于样品管上方1 cm处,

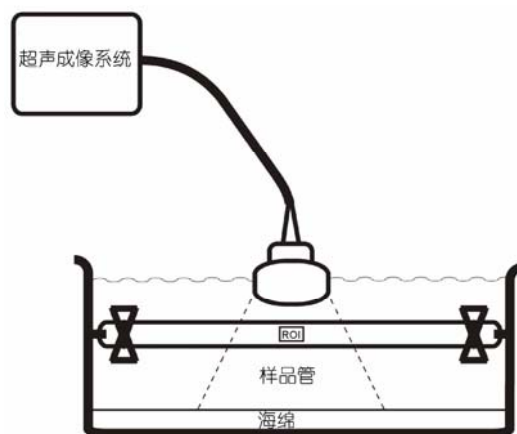


图1 微气泡体外超声显影实验装置示意图

成像参数条件为 B 型增益 50 dB; 边缘增强 4. 为了定量分析比较 3 种样品超声图像的亮度, 利用 Matlab 计算机程序分别计算每种样品对应的感兴趣区域 (ROI) 的平均灰阶。

() 微气泡超声场中动力学行为实验. 微气泡在超声场中的动力学行为是解释微气泡显影能力的基础, 研究微气泡的动力学行为能更好地理解 and 预测微气泡的超声显影能力. 根据微气泡动力学理论, 微气泡的散射由散射截面定量表示, 而散射截面的大小跟外界超声波的激励频率、微气泡的粒径、以及微气泡膜的黏弹特性相关^[29]. 结合磁性纳米颗粒的微气泡膜壳由于纳米颗粒的嵌入其黏弹特性可能发生新的变化. 为了研究磁性纳米颗粒的含量对微气泡膜壳散射截面的影响, 制备出包裹不同含量 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡样品, 利用 Hoff 等人^[30] 提出的计算微气泡散射截面方法计算不同磁性纳米颗粒含量时微气泡的散射截面。

首先, 在测量微气泡样品声衰减的基础上通过最优化方法估计获得微气泡膜黏弹特性参数, 分别用黏性参数 G_s 和弹性参数 μ_s 表示, 然后根据 G_s 和 μ_s 的值计算出在 3.5 MHz 激励频率下, 样品半径为 2 μm 的微气泡膜壳散射截面, 并以此代表整个样品的散射截面水平。

() 微气泡体外 MRI 实验. 将实验样品分别置 1 mL 的 Eppendorf 管中进行体外微气泡 MRI 实验, 样品分别为包裹不同含量 Fe_3O_4 纳米颗粒 (0, 47.80, 86.47, 124.99, 191.46 $\mu\text{g/mL}$) 的微气泡溶液和二次蒸馏水对照品. 实验采用 1.5 T 临床 MRI 扫描仪 (Eclipse, Philips Medical Systems, The Netherlands). 表面线圈内径 12.7 cm, 视野 (FOV) 12 cm $\times$ 12 cm, 激励次数 2 ~ 4, 层厚 2 mm, 矩阵 254 $\times$ 254, 感兴趣区 (ROI) 取 14.6 mm^2 . 扫描序列为 T_2 快速自旋回波序列, 其参数为重复时间 $\text{TR}=4000$ ms, 回波时间 $\text{TE}=108$ ms, 回波链长度=16. 通过测定样品的横向磁豫时间 T_2 值, 计算出相应的横向磁豫率 (R_2), 拟合出微气泡体外磁共振成像时微气泡包裹不同 Fe_3O_4 纳米颗粒的含量与 R_2 之间的函数关系。

3 结果分析

3.1 微气泡的结构表征结果

微气泡的平均直径为 3.98 μm , 单分散系数 $\text{PI} = 1.13$. 微气泡的浓度稀释至 $5 \sim 6 \times 10^6$ 个 / mL 进行实验

研究. 采用原子吸收分光光度法测得微气泡膜壳包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的实际含量分别为 0, 47.80, 86.47, 124.99, 191.46 $\mu\text{g/mL}$.

图 2 为微气泡光学显微图片. 图 2(a) 为未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡, 图 2(b) 为包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡, 从图中可以看出微气泡的外观呈球形, 在光学显微镜下两种微气泡的形貌和结构没有显著差异。

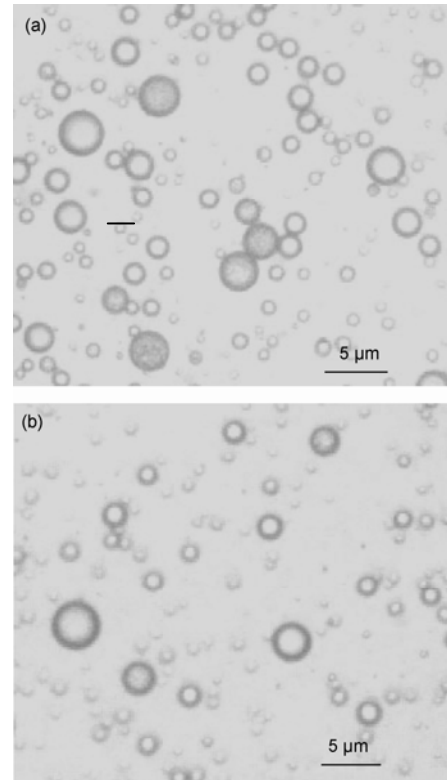


图 2 微气泡光学显微图片

(a) 未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡; (b) 包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒 (浓度为 47.80 $\mu\text{g/mL}$) 的微气泡

图 3 为微气泡样品的 TEM 结果图片. 图 3(a) 为未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡; 图 3(b) 为 Fe_3O_4 纳米颗粒的含量为 47.80 $\mu\text{g/mL}$ 微气泡. 图 3(c) 为包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡膜壳局部放大照片. 从 TEM 照片可以看出, Fe_3O_4 纳米颗粒能够均匀分布在聚合物膜壳中, 在实验浓度范围内 Fe_3O_4 纳米颗粒的加入不改变微气泡壳膜的厚度和微气泡的粒径。

将样品放置到 -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 2 周后观察其形貌、粒径及其分布均没有明显的改变。

3.2 微气泡的体外超声成像结果

图 4 是微气泡体外超声成像图, 从图中可以看出,

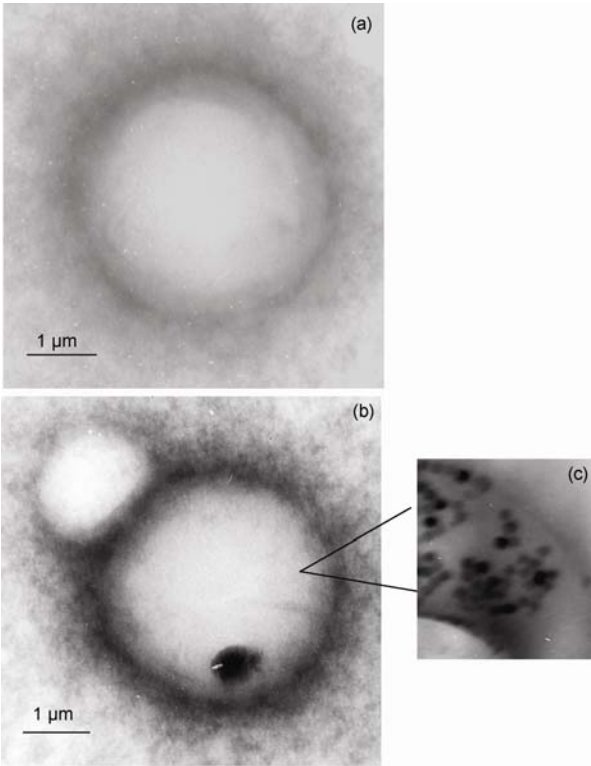


图 3 TEM 照片

(a) 未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡; (b) 包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒(浓度为 $47.80\text{ }\mu\text{g/mL}$)的微气泡; (c) 对应(b)图标示位置处微气泡膜的放大图片, 能够观察到 Fe_3O_4 纳米颗粒在膜壳中的分布情况

包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡图像亮度高于双蒸水和未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡.

根据图 4 所得的超声成像图像, 定量计算 ROI 的平均灰度值, 结果如表 1 所示.

表 1 微气泡超声体外成像 ROI 平均灰阶结果

微气泡种类	平均灰度
二次蒸馏水	15.8
未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡	72
包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒($47.80\text{ }\mu\text{g/mL}$)的微气泡	84.3

从表 1 可以看出, 两种微气泡的超声图像平均灰度均大于二次蒸馏水, 且包裹浓度为 $47.80\text{ }\mu\text{g/mL}$ Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡图像灰阶比未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡图像高 12.3.

3.3 包裹纳米颗粒的微气泡超声图像增强原理

包裹不同含量 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡对应的膜壳粘弹性参数和散射截面结果如表 2 所示.

表 2 包裹不同含量纳米颗粒的微气泡黏弹参数结果

Fe_3O_4 纳米颗粒含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	弹性参数 G_s / MPa	黏性参数 μ_s/Pa	散射截面/ μm^2
0	1.70×10^1	1.87×10^{-1}	265.5976
47.80	1.25×10^1	1.58×10^{-1}	594.8477
86.47	1.34×10^1	1.51×10^{-1}	608.8628
124.99	1.31×10^1	1.63×10^{-1}	557.2473
191.46	1.85×10^1	2.02×10^{-1}	189.5453

从表中可以看出, 随着纳米颗粒含量的增加, 微气泡膜的黏弹性参数出现了先减小后增大的趋势, 导致在 3.5 MHz 激励频率下, 半径为 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的微气泡散射截面产生先增大后减小的趋势. 在 $47.80\sim 86.47\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 包裹磁性纳米颗粒的微气泡比未包裹磁性纳米颗粒的微气泡具有更好的超声增强效果, 在 $86.47\sim 191.46\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 微气泡的声学特性显著下降, 超声增强效果变差. 由此可以推断, 制备的微气泡散射特性变化的机理可能是微气泡膜壳的黏弹性质由于磁性纳米颗粒的加入而发生变化. 在低浓度范围内, 膜壳中纳米颗粒增加了微气泡的声学散射特性, 但是浓度过高, 纳米颗粒使膜壳变硬, 声学散射特性显著降低.

3.4 微气泡体外 MRI

图 5 所示为微气泡样品体外 MRI 显影图像结果, 从图中可以看出随着微气泡中包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒含量的增加, MRI 图像逐渐变暗, 说明膜壳中 Fe_3O_4 纳

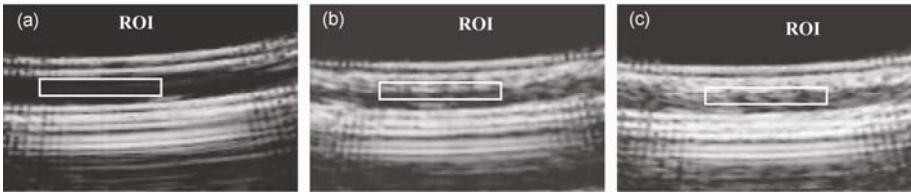


图 4 微气泡体外超声成像图

(a) 二次蒸馏水; (b) 未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡; (c) 包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒($47.80\text{ }\mu\text{g/mL}$)的微气泡

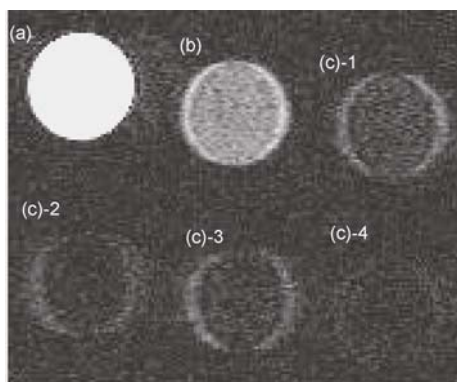


图5 微气泡体外 MRI 成像图

(a) 二次蒸馏水; (b) 未包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡; (c) 包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡(浓度依次为 c-1: 47.80, c-2: 86.47, c-3: 124.99, c-4: 191.46 $\mu\text{g/mL}$)

米颗粒含量越高, 微气泡的 MRI 效果越好.

通过测定不同 Fe_3O_4 纳米颗粒含量的微气泡 MRI 图像 T_2 值, 计算相应的 R_2 值, 得到如图 6 所示的 R_2 与 Fe_3O_4 纳米颗粒含量之间的函数关系. 从图中可以

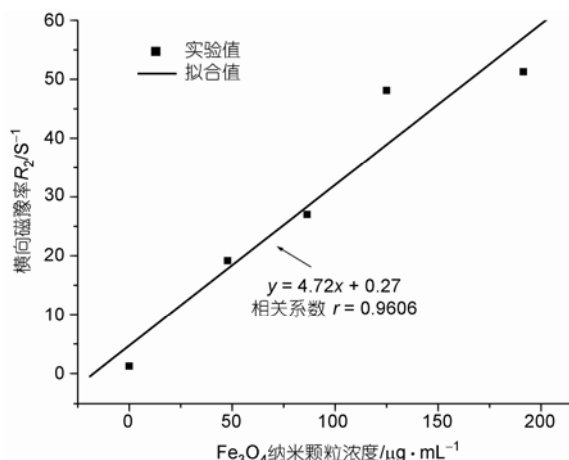


图6 微气泡横向磁豫率 R_2 与包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒含量之间的函数关系图

看出, 两者基本呈线性关系, 即随着纳米颗粒含量的增加, 微气泡的磁共振横向磁豫率 R_2 也增加.

3.5 微气泡最优包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒的浓度

从微气泡体外 MRI 实验结果可以看出, 随着包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒浓度的增加, 微气泡 MRI 增强效果越好, 但是体外微气泡超声显影增强实验结果表明, 只有包裹一定浓度范围内的 Fe_3O_4 纳米颗粒才能增强超声图像, 超过一定浓度后, 微气泡的超声增强效果反而降低, 因此, 为了设计超声、磁共振联合显影的微气泡造影剂, 需要控制和优化 Fe_3O_4 纳米颗粒在微气泡膜壳中的装载浓度. 本实验的最佳包裹 Fe_3O_4 纳米颗粒浓度为 86.47 $\mu\text{g/mL}$, 包裹该浓度纳米颗粒的微气泡具有同时增强 US 图像和 MRI 图像的功能.

4 结论

随着微气泡 UCA 从单一的诊断功能到结合基因/药物进行治疗等多功能的实现, 微气泡的研究和应用正变得越来越广泛. 本文在微气泡动力学模型的基础上研究了 Fe_3O_4 纳米颗粒的含量引起 B 超图像灰度值变化的机理, 揭示了结合 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡增强 B 超图像灰度值的能力与 Fe_3O_4 纳米颗粒含量之间的关系. 结果表明, 包裹不同含量 Fe_3O_4 纳米颗粒的微气泡由于膜的结构发生变化导致膜壳的黏弹性质产生变化, 从而直接引起微气泡的共振频率和衰减系数的变化, 进而影响微气泡散射截面的大小和 B 超图像灰度值的大小. 另一方面, 随着微气泡中磁性纳米颗粒含量的增加, MRI 显影效果越来越好, 但是为了达到超声和磁共振联合造影的目的, 微气泡膜壳中磁性纳米颗粒的装载量需要控制在一定浓度范围内, 这样的微气泡在保持声学响应特性参数进行 US 显影的同时仍具有良好的 MRI 显影效果.

参考文献

- Schutt E G, Klein D H, Mattrey R M, et al. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 3218—3235[doi]
- Lencioni R. Impact of european federation of societies for ultrasound in medicine and biology (EFSUMB) guidelines on the use of contrast agents in liver ultrasound. *Eur Radiol*, 2006, 16: 1610—1613[doi]
- Stride E, Edirisinghe M. Novel microbubble preparation technologies. *Soft Matter*, 2008, 4: 2350—2359[doi]
- Correas J M, Bridal L, Lesavre A, et al. Ultrasound contrast agents: Properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur Radiol*, 2001, 11: 1316—1328[doi]

- 5 Cosgrove D. Ultrasound contrast agents: An overview. *Eur J Radiol*, 2006, 60: 324—330[doi]
- 6 Leen E, Moug S J, Horgan P. Potential impact and utilization of ultrasound contrast media. *Eur Radiol*, 2004, 14(suppl8): 16—24
- 7 Miller D L, Averkiou M A, Brayman A A, et al. Bioeffects considerations for diagnostic ultrasound contrast agents. *J Ultras Med*, 2008, 27(4): 611—632
- 8 Cavalieri F, Hamassi A E, Chiessi E, et al. Tethering functional ligands onto shell of ultrasound active polymeric microbubbles. *Bio-macromolecules*, 2006, 7: 604—611[doi]
- 9 Dayton P A, Pearson D, Clark J, et al. Ultrasonic analysis of peptide- and antibody-targeted microbubble contrast agents for molecular imaging of $\alpha_v\beta_3$ - expressing cells. *Mol Imaging*, 2004, 3(2): 125—134[doi]
- 10 Alexander L K. Ligand- carrying gas- filled microbubbles: Ultrasound contrast agents for targeted molecular imaging. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 9—17[doi]
- 11 Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery. *J Control Release*, 2006, 114: 89—99[doi]
- 12 Ng K, Liu Y. Therapeutic ultrasound: Its application in drug delivery. *Med Res Rev*, 2002, 22(2): 204—223[doi]
- 13 Lentacker B I, Smedt S C D, Demeester J, et al. Lipoplex- loaded microbubbles for gene delivery: A trojan horse controlled by ultrasound. *Adv Funct Mater*, 2007, 17: 1910—1916[doi]
- 14 Brian E O, Margaret A W. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics*, 2004, 42: 343—347[doi]
- 15 Maayan D E, Dan A, Marcelle M. The effects of albumin-coated microbubbles in DNA delivery mediated by therapeutic ultrasound. *J Control Release*, 2006, 112: 156—166[doi]
- 16 Arnaud B, Patrick S, Francois H, et al. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials*, 2007, 28: 4978—4990[doi]
- 17 Unger E C, Porter T, Culp W, et al. Therapeutic application of lipid- coated microbubbles. *Adv Drug Deliver Rev*, 2004, 56: 1291—1314[doi]
- 18 Pisani E, Tsapis N, Paris J, et al. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir*, 2006, 22: 4397—4402[doi]
- 19 Kim J H, Park K, Nam H Y, et al. Polymers for bioimaging. *Prog Polym Sci*, 2007, 32: 1031—1053[doi]
- 20 Liu J, Levine A L, Mattoon J S, et al. Nanoparticles as imaging enhancing agents for ultrasonography. *Phys Med Biol*, 2006, 51: 2179—2189[doi]
- 21 Bekerdejian R, Behrens S, Ruef J, et al. Potential of gold-bound microtubules as a new ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med Biol*, 2002, 28: 691—695
- 22 Ingo N, Giles H V, Mathias M, et al. Iron particles enhance visualization of experimental gliomas with high- resolution sonography. *Am J Neuroradiol*, 2005, 26: 1469—1474
- 23 Oh J, Feldman M D, Kim J, et al. Detection of magnetic nanoparticles in tissue using magneto-motive ultrasound. *Nanotechnology*, 2006, 17: 4183—4190[doi]
- 24 Cavalieri F, Finelli I, Tortora M, et al. Polymer microbubbles as diagnostic and therapeutic gas delivery device. *Chem Mater*, 2008, 20(10): 3254—3258[doi]
- 25 Cavalieri F, Hamassi A E, Chiessi E, et al. Stable polymeric microballoons as multifunctional device for biomedical uses: Synthesis and characterization. *Langmuir*, 2005, 21: 8758—8764[doi]
- 26 Townsend D W. Multimodality imaging of structure and function. *Phys Med Biol*, 2008, 53: R1—R39[doi]
- 27 Cai W, Chen X. Nanoplatfoms for targeted molecular imaging in living subjects. *Small*, 2008, 3(11): 1840—1854
- 28 Chen Z P, Zhang Y, Zhang S, et al. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double- exchange with DMSA. *Colloid Surface A*, 2008, 316: 210—216[doi]
- 29 Church C C. The effects of an elastic solid surface layer on the radial pulsations of gas bubbles. *J Acoust Soc Am*, 1995, 97(3): 1510—1521[doi]
- 30 Hoff L, Sontum P C, Hovem J M. Oscillations of polymeric microbubbles: Effect of the encapsulating shell. *J Acoust Soc Am*, 2000, 107(4): 2272—2280[doi]