

· 实验研究 ·

超声介导缓释型载药纳米粒促进抗结核药物 增效杀菌的实验研究

张志飞 胡 璨 杜永洪 杨 敏

摘 要 **目的** 探讨超声介导缓释型载药聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)共聚物纳米粒对减毒牛结核分枝杆菌的体内外增效杀菌作用。**方法** 采用双乳化法制备 PLGA 载左氧氟沙星(LEV)缓释纳米粒(LEV-NPs),并检测其物理特性和药物释放情况。将卡介苗(BCG)菌液随机分为 LEV 组(仅加入 LEV)、超声联合 LEV 组(加入 LEV 后立即经超声辐照)、超声联合 LEV-NPs 组(加入 LEV-NPs 后立即经超声辐照)及对照组(加入等量 PBS 缓冲液),实验处理 24 h 后检测各组活菌落数,观察各组 BCG 活死菌变化及其表面结构。建立 SD 大鼠皮下 BCG 结核肉芽肿模型,将 20 只大鼠分为 LEV 组(仅皮下注射 LEV)、超声联合 LEV 组(皮下注射 LEV 后立即经超声辐照)、超声联合 LEV-NPs 组(皮下注射 LEV-NPs 后立即经超声辐照)及对照组(皮下注射等量生理盐水),于治疗后第 3、7、14 天分别测量各组大鼠皮下 BCG 结核肉芽肿体积,计算并比较各组治疗效果。**结果** 制备的 LEV-NPs 呈大小均一的球形,分散性良好,粒径为 (282.42 ± 3.55) nm, Zeta 电位为 $-(20.40 \pm 0.63)$ mV,载药率、封装率分别为 6.21%、65.30%;LEV-NPs 在 24、48、72 h 自然条件下 LEV 累计释放率分别为 31.2%、45.7%、46.9%。体外实验显示,超声联合 LEV-NPs 组细菌活性下降最明显,菌落存活率约 26%,与其余各组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);激光共聚焦显微镜下示超声联合 LEV-NPs 组可见视野下呈明亮的红色荧光,以死菌为主,仅见少量活菌落;场发射扫描电镜下示超声联合 LEV-NPs 组细菌数量明显减少,菌体伸展、断裂,细菌损伤情况最严重。体内实验显示,超声联合 LEV-NPs 组大鼠皮下 BCG 结核肉芽肿体积较其余各组明显减小(均 $P < 0.05$)。**结论** 超声介导 LEV-NPs 可显著提高 LEV 对减毒牛结核分枝杆菌的体内外杀菌效果,具有协同增效作用。

关键词 超声辐照;聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒;左氧氟沙星;增效抗菌;减毒牛结核分枝杆菌
[中图分类号]R445.1 [文献标识码]A

Experimental study on ultrasound-mediated sustained-release drug-loaded nanoparticles to promote synergistic bactericidal effect of anti-tuberculosis drugs

ZHANG Zhifei, HU Can, DU Yonghong, YANG Min

College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the synergistic bactericidal effect of ultrasound-mediated sustained-release drug-loaded poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) copolymer nanoparticles on attenuated bovine mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo. **Methods** PLGA-loaded levofloxacin (LEV) sustained-release nanoparticles (LEV-NPs) were prepared by double emulsification method, and their physical characteristics and drug release were detected. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) bacterial solution was randomly divided into LEV group (only added LEV), ultrasound combined with LEV group (added LEV and irradiated by ultrasound immediately), ultrasound combined with LEV-NPs group (added LEV-NPs and irradiated by ultrasound immediately), and control group (added the same dose of PBS buffer). After 24 h of experimental treatment, the number of viable colonies in each group was detected. The changes of live and dead bacteria and the surface structure of BCG in each group were observed. A model of subcutaneous BCG tuberculosis granuloma was established in SD rats, 20 rats were divided into LEV group (only subcutaneous injection of LEV), ultrasound combined with LEV group (subcutaneous injection of LEV and

基金项目:重庆市研究生科研创新项目(CYS21240);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwjkj2020-1-042)

作者单位:400016 重庆市,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

通讯作者:杨敏, Email: 943640119@qq.com

irradiated by ultrasound immediately), ultrasound combined with LEV-NPs group (subcutaneous injection of LEV-NPs and irradiated by ultrasound immediately) and control group (subcutaneous injection of the same dose of normal saline). The volume of subcutaneous BCG tuberculosis granuloma was measured on the 3rd, 7th, and 14th day after treatment, and the therapeutic effect of each group was calculated and compared. **Results** LEV-NPs were spherical with uniform size and good dispersion, with a particle size of (282.42 ± 3.55) nm and a Zeta potential of $-(20.4 \pm 0.63)$ mV. The drug loading rate and encapsulation rate were 6.21% and 65.3%, respectively. The cumulative drug release rate of LEV-NPs at 24, 48 and 72 h were 31.2%, 45.7% and 46.90%, respectively. In vitro experiments showed that the bacterial activity in the ultrasound combined with LEV-NPs group decreased most significantly, and the colony survival rate was about 26%, which was statistically significant compared with other groups (all $P < 0.01$). The ultrasound combined with LEV-NPs group showed bright red fluorescence in the field of view under laser confocal microscopy, with mainly dead bacteria and only a few live colonies. Field emission scanning electron microscopy showed that the number of bacteria in the ultrasound combined with LEV-NPs group was significantly reduced, and the bacteria were stretched and broken, with the most serious bacterial damage. In vivo experiments results showed that the volume of subcutaneous BCG tuberculosis granuloma was significantly reduced in the ultrasound combined with LEV-NPs group compared with the other groups, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Ultrasound-mediated LEV-NPs can significantly improve the bactericidal effect of LEV against attenuated bovine mycobacterium tuberculosis with synergistic effect in vitro and in vivo.

KEY WORDS Ultrasonic irradiation; Poly lactic-co-glycolic acid copolymer nanoparticles; Levofloxacin; Synergistic antimicrobial; Attenuated bovine mycobacterium tuberculosis

结核病是由结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 引起的世界上第二大传染病, 2020 年全球新发结核病患者约 990 万, 与结核病感染直接相关死亡患者约 161.4 万^[1-2]。结核病治疗的特殊性和难治性主要在于 MTB 细胞壁含有大量脂质, 结构致密, 且感染后易形成纤维病灶并包裹形成结核球, 导致药物难以进入 MTB 菌体内发挥有效的杀菌作用^[3-4]。研究^[5-6]表明, 超声辐照能提高细胞膜通透性, 其所致的声孔效应可使细胞膜表面产生临时通道, 为药物进入细胞内创造了有利条件, 可增强多种细菌对抗菌药物的敏感性, 从而提高杀菌效果。另一方面, 纳米载药递送系统通过药物在靶组织的缓释作用, 具有提高药物疗效、减少药物用量、降低毒副作用等优点, 在抗肿瘤、高耐药率 (如多药耐药细菌) 和生物膜相关感染的治疗中备受关注^[7-8]。卡介苗 (Bacillus Calmette-Guerin, BCG) 是一种减毒牛结核分枝杆菌活株, 与 MTB 具有相似的细胞壁结构和成分, 常被用于替代 MTB 的基础研究^[9]。本实验选择药物作用靶点在 MTB 细胞内的抗结核药左氧氟沙星 (levofloxacin, LEV), 应用聚乳酸-羟基乙酸 (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 共聚物高分子材料制备载 LEV 缓释纳米粒 (levofloxacin nanoparticles, LEV-NPs), 旨在探讨超声介导 LEV-NPs 对减毒牛结核分枝杆菌的体内外增效杀菌作用。

材料与方法

一、主要实验动物、材料及仪器

1. 实验动物: 健康雌性 SD 大鼠 20 只, 6~8 周龄, 体质量约 200 g, 来自重庆医科大学动物实验中心。

2. 主要材料: BCG 菌株冻干粉购自成都生物产品研究所 (批号: S20013057)。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA-COOH) 购自济南岱罡生物科技有限公司; 4% 聚乙烯醇、2% 异丙醇、7H9 肉汤培养基、甘油、OADC 增菌液、活细菌/死细菌双染 (SYTO 9/PI) 试剂盒均购自美国 Sigma 公司。

3. 主要仪器: 低频低强度超声治疗仪 (苏州工业园区海纳科技有限公司), 换能器直径 45 mm, 固定频率 42 kHz, 输出声强 $0.15 \sim 0.60$ W/cm²; 马尔文激光粒度仪 (3000 HS, 英国 Malvern 公司); 激光共聚焦显微镜 (A1+/A1R+, 日本 Nikon 公司); 场发射扫描电镜 (SU 8010) 和透射电镜 (H-7500) 均购自日本 Hitachi 公司; 紫外可见分光光度计 (Nano Drop 2000, 美国 Therm Scientific 公司)。

二、实验方法

1. BCG 培养及最小抑菌浓度检测: 将 BCG 菌株冻干粉复苏后, 接种于 7H9 肉汤培养基中, 3 周后离心重悬收集菌液, 调整菌液浓度为 10^7 CFU/ml 备用。按照美国国家实验室标准委员会抗菌药物敏感性试验操作标准检测 LEV 对 BCG 的最小抑菌浓度。

2. LEV-NPs 的制备及物理特性检测: 采用双乳化法制备 LEV-NPs。将 40 mg PLGA-COOH 完全溶于 2.0 ml 三氯甲烷形成有机相, 加入 0.2 ml LEV 水相, 采用声震仪声震 60 s 形成初乳, 然后加入 4% 聚乙烯醇,

声震 150 s 形成复乳,再加入 6.0 ml 2% 异丙醇,室温下磁力搅拌 3~6 h 后,离心、洗涤收集得到 LEV-NPs。采用马尔文激光粒度仪检测 LEV-NPs 的粒径和 Zeta 电位;场发射扫描电镜和透射电镜观察 LEV-NPs 的形态和结构;紫外可见分光光度计检测 LEV-NPs 的载药率、包封率。

3. LEV-NPs 药物释放情况:采用透析袋法检测 LEV-NPs 在自然条件下及超声辐照后下的药物累积释放量。称取 20 mg LEV-NPs 干粉溶于 2 ml PBS 缓冲液中,采用声强 0.15 W/cm^2 的超声辐照 10 min,然后将样品转移到透析袋中。将透析袋放入含有 25 ml PBS 缓冲液的烧杯中,在 37°C 下以 120 r/min 的速度摇动烧杯,使烧杯中的溶液均匀化。在预定的时间点(0、2、4、8、10、12、24、48、60、72 h)取 2 ml 透析液,在烧杯中加入等量体积的 PBS 缓冲液。使用紫外可见分光光度计测量 303 nm 处 LEV 的吸收值,计算 LEV 累积释放率,公式为:LEV 累积释放率=(PBS 缓冲液中的 LEV 量/LEV-NPs 中的 LEV 总量) $\times 100\%$ 。

4. 体外实验分组及方法:将制备好的 BCG 菌液加入 30 mm 培养皿中,随机分为 4 组:①LEV 组,加入 1 ml LEV,调整培养皿内最终浓度为 $4.0 \mu\text{g/ml}$ (此浓度为 LEV 对 BCG 的最小抑菌浓度);②超声联合 LEV 组,加入 1 ml LEV,调整培养皿内最终浓度为 $4.0 \mu\text{g/ml}$,然后立即经超声辐照;③超声联合 LEV-NPs 组,加入 1 ml LEV-NPs,调整培养皿内药物最终浓度为 $4.0 \mu\text{g/ml}$,然后立即经超声辐照;④对照组,加入 1 ml PBS 缓冲液。超声联合 LEV 组和超声联合 LEV-NPs 组的超声辐照方法一致,均于培养皿底部均匀涂抹耦合剂,平面换能器紧贴培养皿底部,辐照参数均为声强 0.15 W/cm^2 ,连续辐照 10 min。实验处理 24 h 后,采用平板菌落培养计数法检测各组活菌落数,计数结果经 Log_{10} 对数处理后进行统计学处理。应用 SYTO 9/PI 试剂盒对每组细菌进行染色标记,其中 SYTO 9 可将活菌标记为绿色荧光,而 PI 可与死菌 DNA 结合显示为红色荧光,于激光

共聚焦显微镜下观察各组 BCG 活死菌变化情况。取各组菌液制成爬片,沿孔壁加入固定液, 4°C 冰箱保存,于场发射扫描电镜下观察 BCG 表面结构。

5. 体内实验建模、分组及方法:选取 20 只健康雌性 SD 大鼠,右侧臀部常规脱毛消毒,皮下注射浓度为 10^7 CFU/ml 的 BCG 菌液 1 ml,注射 14 d 后观察注射部位局部凸起情况,取组织行抗酸染色,以组织中见红色杆状 BCG 细菌即证实皮下 BCG 结核肉芽肿模型成功建立。将成功建模的 SD 大鼠随机分为 4 组:①LEV 组,皮下局部注射 1 ml LEV(浓度为 5.0 mg/ml);②超声联合 LEV 组,皮下注射 1 ml LEV(浓度为 5.0 mg/ml)后立即经超声辐照;③超声联合 LEV-NPs 组,皮下注射 1 ml LEV-NPs(药物浓度为 5.0 mg/ml)后立即经超声辐照;④对照组,皮下注射 1 ml 生理盐水。超声联合 LEV 组和超声联合 LEV-NPs 组的超声辐照参数一致,均为声强 0.15 W/cm^2 ,连续辐照 10 min。在治疗后第 3、7、14 天分别测量各组大鼠皮下 BCG 结核肉芽肿体积,计算并比较各组治疗效果。

三、统计学处理

应用 Graph Pad Prism 9.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、LEV-NPs 的物理特性和药物释放情况

镜下见制备好的 LEV-NPs 呈球形,大小均一,分散性良好,LEV 成功包载入纳米粒内部。见图 1。LEV-NPs 粒径为 $(282.42 \pm 3.55) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $-(20.40 \pm 0.63) \text{ mV}$,载药率、包封率分别为 6.21%、65.30%。LEV-NPs 在 24、48、72 h 自然条件下 LEV 累积释放率分别为 31.2%、45.7%、46.9%;超声辐照后 24、48、72 h 时 LEV 累积释放率增加,分别为 42.7%、65.0%、67.7%。见图 2。

二、体外实验各组 BCG 细菌活性及其表面结构

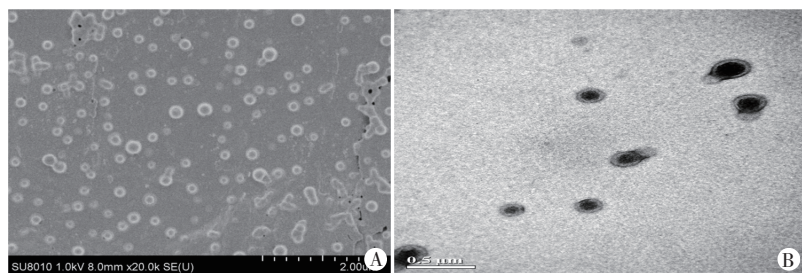


图 1 LEV-NPs 的物理特性
A:场发射扫描电镜图示 LEV-NPs 呈球形,大小均一,分散性良好($\times 20\,000$);B:透射电镜图示 LEV 成功包载入纳米粒内部($\times 30\,000$)

图 1 LEV-NPs 的物理特性

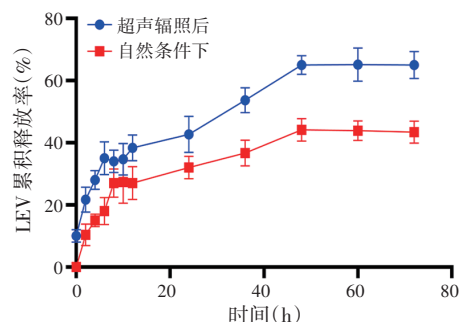
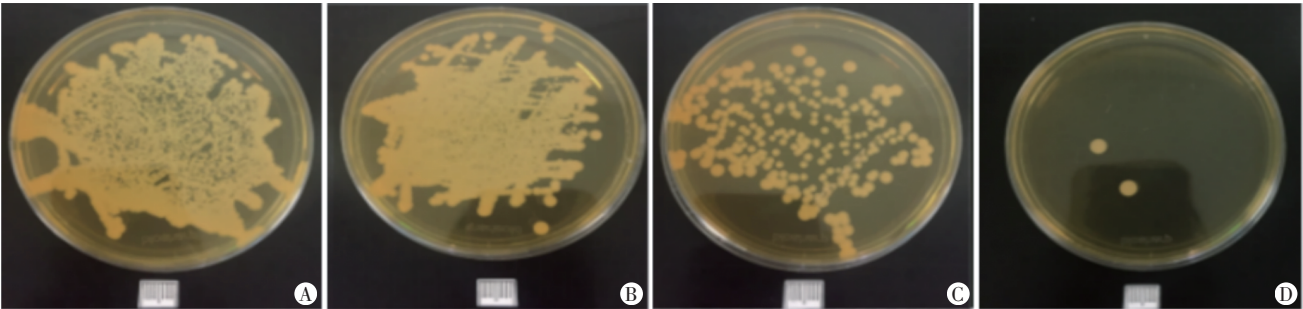


图 2 LEV-NPs 自然条件下及超声辐照后各时间点的 LEV 释放曲线图

1. 各组细菌活性检测结果见图 3。对照组、LEV 组、超声联合 LEV 组、超声联合 LEV-NPs 组活菌落数分别为： $(7.50 \pm 0.34) \text{Log}_{10} \text{CFU/ml}$ 、 $(5.98 \pm 0.08) \text{Log}_{10} \text{CFU/ml}$ 、 $(4.58 \pm 0.36) \text{Log}_{10} \text{CFU/ml}$ 、 $(1.96 \pm 0.03) \text{Log}_{10} \text{CFU/ml}$ ；其中超声联合 LEV-NPs 组细菌活性下降最明显，菌落存

活率约 26%，低于 LEV 组及超声联合 LEV 组（80%、61%），差异均有统计学意义（均 $P < 0.01$ ）。

2. 各组活死菌变化情况见图 4。对照组及 LEV 组中以绿色荧光为主，提示活菌落更多；超声联合 LEV 组中菌落分散，死菌明显增多；超声联合 LEV-NPs 组可见视



A: 对照组; B: LEV 组; C: 超声联合 LEV 组; D: 超声联合 LEV-NPs 组

图 3 平板菌落培养计数法检测各组细菌活性

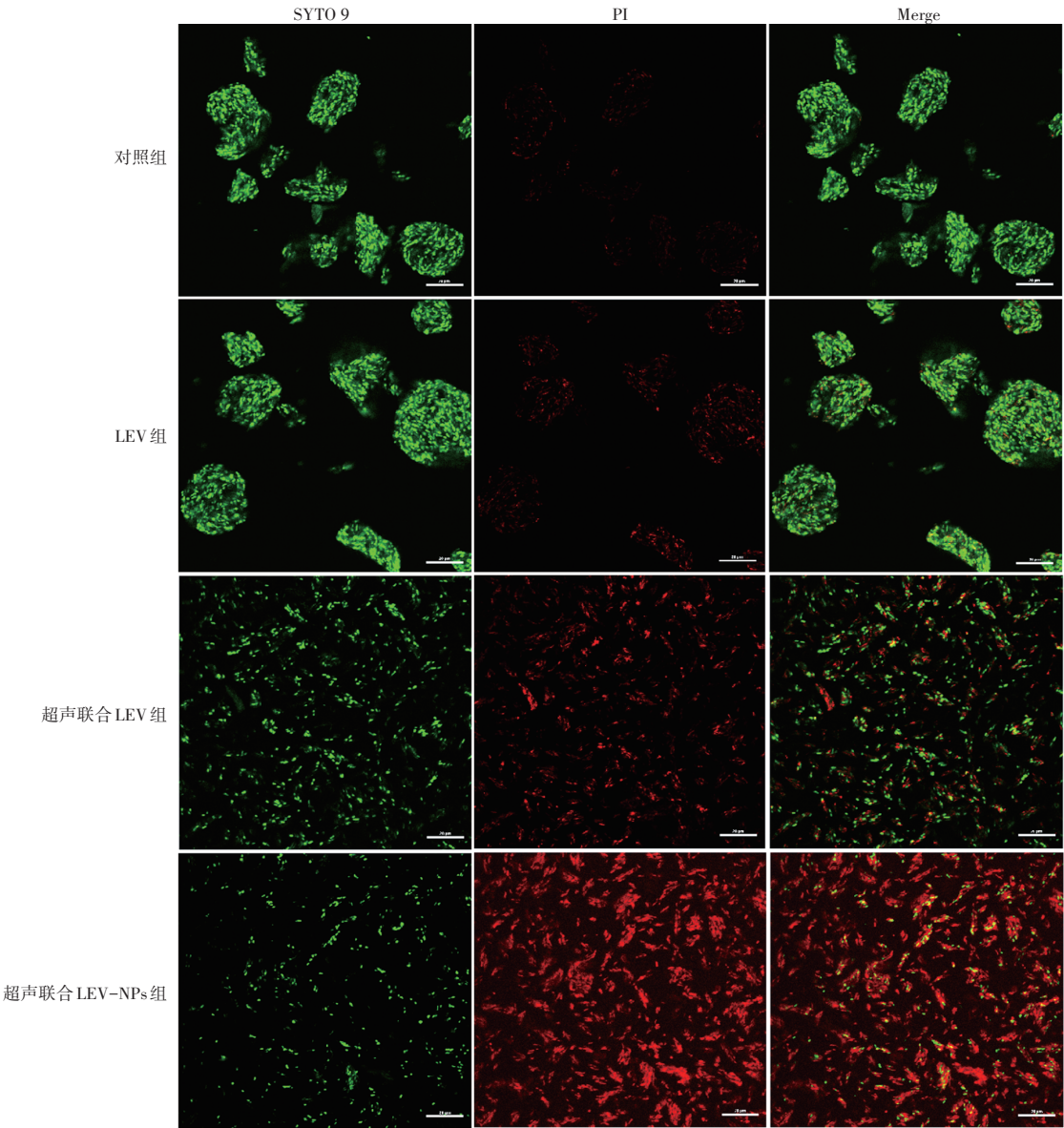


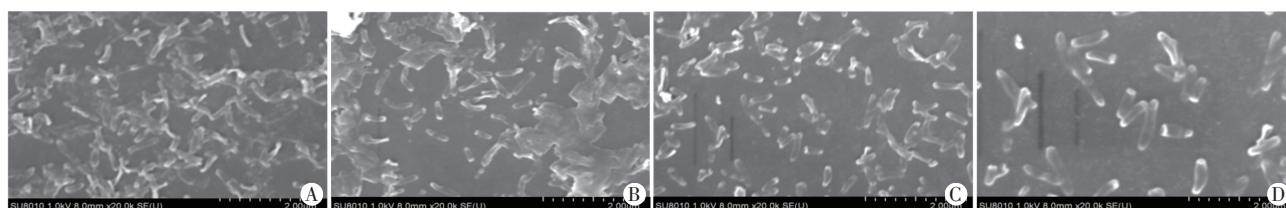
图 4 激光共聚焦显微镜观察各组活死菌变化情况(绿色荧光示活菌,红色荧光示死菌,标尺为 20 μm)

野下呈明亮的红色荧光,以死菌为主,仅见少量活菌落。

3. 各组细菌表面结构变化见图 5。对照组中细菌呈杆状,形态完整,聚集分布;LEV 组细菌聚集性降低,少量菌体结构不完整,提示细菌受到一定损伤;超声联合 LEV 组细菌分散,菌体结构破坏严重,视野下可见较多断裂菌体;超声联合 LEV-NPs 组细菌数量明显减少,菌体伸展、断裂,细菌损伤情况最严重。

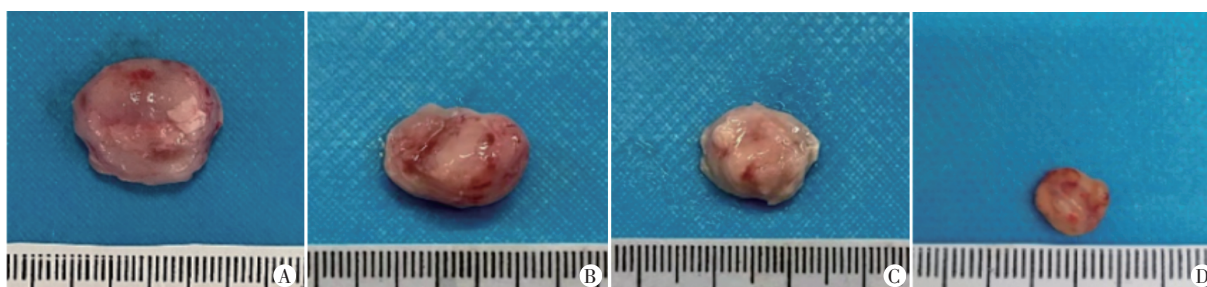
三、体内实验各组皮下 BCG 结核肉芽肿体积变化
各组大鼠治疗后皮下 BCG 结核肉芽肿体积变化

见图 6,7。肉眼观可见超声联合 LEV-NPs 组治疗后结核肉芽肿体积较其他各组明显减小。连续测量各组治疗后结核肉芽肿体积,结果显示:对照组结核肉芽肿体积在第 14 天较治疗前增加约 2 倍;LEV 组结核肉芽肿体积在第 14 天未见明显减小;超声联合 LEV 组结核肉芽肿体积呈下降趋势,在第 14 天较治疗前减小约 18%;超声联合 LEV-NPs 组结核肉芽肿体积减小最明显,在第 14 天体积约 79 mm³,较对照组减小约 80%,差异有统计学意义($P<0.01$)。



A: 对照组; B: LEV 组; C: 超声联合 LEV 组; D: 超声联合 LEV-NPs 组

图 5 场发射扫描电镜观察各组细菌损伤情况及表面结构变化($\times 20\,000$)



A: 对照组; B: LEV 组; C: 超声联合 LEV 组; D: 超声联合 LEV-NPs 组

图 6 各组大鼠治疗第 14 天结核肉芽肿外观图

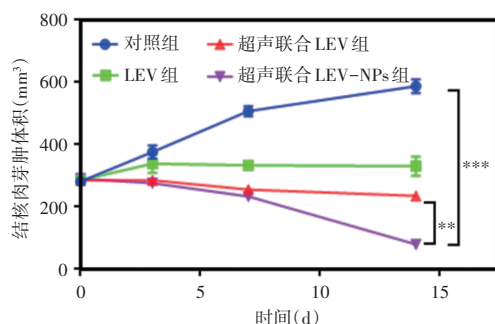


图 7 各组大鼠治疗后结核肉芽肿体积变化曲线图(** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

讨 论

结核病防治是世界性重大公共卫生问题,特别是多重耐药结核病和广泛耐药结核病使临床治疗面临严峻挑战^[10]。研究^[4]发现有两种机制被认为与天然耐药有关,即 MTB 细胞壁通透性屏障和活性多药外排泵基因表达。随着对 MTB 生物学认识的深入,改变致密细胞壁结构、增强药物渗透性是抑制日益增加的结核耐药的关键^[11]。

超声作为一种微无创技术已在多种疾病诊疗中

得到广泛应用。其中低频低强度超声已被证实对皮肤、实体肿瘤等宏观组织及细胞膜、细胞壁等微观结构具有明显的促渗作用^[12]。此外,其安全性亦不可忽视,本课题组前期通过交叉试验筛选出声强 0.15 W/cm² 的超声波连续辐照 10 min 对皮肤无明显病理结构损伤,同时具有良好的促渗作用^[13]。由于超声可以改善载药纳米粒在特定位置的释放潜力,载药纳米粒获得适当的超声波能量后其药物释放能力显著提高^[14]。本实验结果发现,制备的 LEV-NPs 物理特性稳定,载药率、包封率分别为 6.21%、65.30%。自然条件下 LEV-NPs 在 24、48、72 h 的 LEV 累计释放率分别为 31.2%、45.7%、46.9%,表明 LEV-NPs 具有明显的药物缓释特性。超声辐照后 24、48、72 h 时 LEV 累计释放率增加,分别为 42.7%、65.0%、67.7%,表明超声辐照可促进纳米粒中药物的释放,提高缓释效率,有效增加局部感染区的药物含量。另一方面,纳米粒是有效的外源性空化核,在超声促发纳米粒爆破的过程中,更多的空泡膨胀坍塌所产生的激波和微射流是产生“声

孔”促进药物渗入的根本原因^[15]。本实验中超声联合 LEV-NPs 组利用超声促进缓释型载药纳米粒加速释药,并通过声孔效应促进药物渗入,在体内外实验中表现出的抗菌效果均显著高于其余各组,表明二者具有协同增效杀菌作用。

本实验探讨了超声介导 LEV-NPs 对减毒牛结核分枝杆菌的体内外增效杀菌作用,体外实验结果显示超声联合 LEV-NPs 组细菌分散、菌体结构破坏,细菌活性下降最明显,菌落存活率仅 26%。同时使用激光共聚焦显微镜观察各组活死菌含量结果可知,超声联合 LEV-NPs 组杀菌效果也优于其余各组,证实了低频低强度超声可有效提高 LEV-NPs 抗菌疗效,具有显著的协同药物增效作用。另外,在治疗大鼠皮下 BCG 结核肉芽肿实验中,超声联合 LEV-NPs 组结核肉芽肿体积减小最明显,较对照组体积减小约 80%,表明超声联合 LEV-NPs 可明显抑制结核肉芽肿生长。

前期研究^[16]结果证实,超声增强纳米粒修饰的药物传递是一个复杂的过程,受各种物理参数的影响,其动力学过程复杂且激烈。在超声辐射力和声流的作用下纳米粒产生瞬态空化,提高了细胞壁通透性,从而增加药物进入 MTB 菌体内的浓度^[17-18],由此推测超声瞬态空化产生的临时“递药通道”为药物递送提供了快速途径。实际上这种瞬态空化是指在声波的负压半周期内空化核(微小气泡)迅速膨胀,随后又在声波正半周期内气泡被压缩以至崩溃。而纳米粒的存在更降低了这种超声瞬态空化的阈值。由此可见,超声增强载药纳米粒在促进药物进入菌体方面显示出巨大的潜力,同时利用纳米粒的药物缓释特性,可以实现抗结核药物靶向运载、持续治疗,降低游离药物毒副作用,有望缩短结核病治疗疗程,提高耐药结核病的药物治疗效果,为结核病治疗带来新的突破。

综上所述,本实验成功制备了 LEV-NPs,并验证了超声介导 LEV-NPs 可显著提高对体内外 BCG 的杀菌效果,二者具有协同增效作用,为临床耐药结核病的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 卢春容,房宏霞,陆普选,等.WHO 2021 年全球结核病报告:全球与中国关键数据分析[J].新发传染病电子杂志,2021,6(4):368-372.
- [2] World Health Organization.Global tuberculosis report 2021[R]. Geneva:World Health Organization,2021:1-57.
- [3] Sarathy JP,Dartois V, Lee EJ.The role of transport mechanisms in mycobacterium tuberculosis drug resistance and tolerance[J]. Pharmaceuticals(Basel),2012,5(11):1210-1235.
- [4] De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question [J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(1):36-52.
- [5] Azagury A, Khoury L, Enden G, et al. Ultrasound mediated transdermal drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 72(6): 127-143.
- [6] Van Wamel A, Kooiman K, Hartevelde M, et al. Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation[J]. J Control Release, 2006, 112(2):149-155.
- [7] Hussein F, Antonescu C, Karshafian R. Ultrasound and microbubble induced release from intracellular compartments[J]. BMC Biotechnol, 2017, 17(1):45.
- [8] Qiu Y, Zhang C, Tu J, et al. Microbubble-induced sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection in vitro at low acoustic pressures[J]. J Biomech, 2012, 45(8):1339-1345.
- [9] de Souza GA, Wiker HG. A proteomic view of mycobacteria [J]. Proteomics, 2011, 11(15):3118-3127.
- [10] Lee JH, Ammerman NC, Nolan S, et al. Isoniazid resistance without a loss of fitness in mycobacterium tuberculosis[J]. Nat Commun, 2013, 3(1):753.
- [11] Bhat ZS, Rather MA, Maqbool M, et al. Cell wall: a versatile fountain of drug targets in mycobacterium tuberculosis[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95(11):1520-1534.
- [12] Mei L, Zhang Z. Advances in biological application of and research on low-frequency ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2021, 47(10): 2839-2852.
- [13] Yang M, Xie S, Adhikari VP, et al. The synergistic fungicidal effect of low-frequency and low-intensity ultrasound with amphotericin B-loaded nanoparticles on C.albicans in vitro[J]. Int J Pharm, 2018, 542(1-2):232-241.
- [14] Sviridov A, Tamarov K, Fesenko I, et al. Cavitation induced by janus-like mesoporous silicon nanoparticles enhances [J]. Front Chem, 2019, 7(1):393.
- [15] Yildirim A, Chattaraj R, Blum NT, et al. Understanding acoustic cavitation initiation by porous nanoparticles: toward nanoscale agents for ultrasound imaging and therapy[J]. Chem Mater, 2016, 28(16): 5962-5972.
- [16] Li F, Dong Y, Li G, et al. Multiparameter prediction control of in vitro drug delivery into mycobacterium smegmatis induced by microbubble-enhanced sonoporation [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2020, 154(1):98-107.
- [17] Xie S, Li G, Hou Y, et al. A synergistic bactericidal effect of low-frequency and low-intensity ultrasound combined with levofloxacin-loaded PLGA nanoparticles on M.smegmatis in macrophages[J]. J Nanobiotechnol, 2020, 18(1):107.
- [18] Yang M, Du K, Hou Y, et al. Synergistic antifungal effect of amphotericin b-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and ultrasound against candida albicans biofilms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(4):e02022-18.

(收稿日期:2022-06-28)