

本文引用: 漆辉雄, 刘灿, 李泉, 等. 靶向肿瘤血管磁共振对比剂的制备及体外显像研究[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (3): 187-190, 194.

【基础研究】

靶向肿瘤血管磁共振对比剂的制备及体外显像研究

漆辉雄¹, 刘 灿², 李 泉¹, 胡国清³

(1. 襄阳市中心医院肿瘤科, 湖北 襄阳 441021; 2. 武汉市普爱医院肿瘤科, 湖北 武汉 430032; 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科, 湖北 武汉 430032)

摘要: **目的** 制备针对肿瘤新生血管的靶向纳米磁共振(MR)对比剂, 并用高场强MR检测其体外显像能力。**方法** 通过碳二亚胺法将超小型超顺磁性氧化铁(USPIO)与环精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽连接。普鲁士蓝染色检测环RGD肽-超小型超顺磁性氧化铁复合物(RGD-USPIO)针对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性及靶向性。原子吸收分光光度计检测人脐静脉内皮细胞(HUVEC)对RGD-USPIO的摄取量变化。透射电镜检测RGD-USPIO的亚细胞定位。4.7 T MR检测不同时间梯度HUVEC摄取RGD-USPIO及单纯USPIO引起MR T_2 值的变化。**结果** RGD-USPIO可特异性结合 $\alpha_v\beta_3$, 具有良好的靶向性, HUVEC摄取的RGD-USPIO主要位于细胞内, 并可引起MR T_2 信号强度明显下降, 与USPIO组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RGD-USPIO可特异性地与高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的HUVEC结合, 明显降低高场强MR T_2 值, 是一种具有前景的靶向MR对比剂。

关键词: 分子显像; 肿瘤; 对比剂; 内皮细胞; 氧化铁

中图分类号: R981 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239 (2014) 03-0187-05

Design and *in vitro* experiment of magnetic resonance contrast agent targeted tumor vessel

QI Hui-xiong¹, LIU Can², LI Quan¹, HU Guo-qing³

(1. Department of Oncology, the Central Hospital of Xiangyang City, Xiangyang 441021, Hubei Province, China; 2. Department of Oncology, Pu'ai Hospital of Wuhan City, Wuhan 430032, Hubei Province, China; 3. Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430032, Hubei Province, China)

Abstract: **Objective** To design a targeted nanoconjugate magnetic resonance (MR) contrast agent for neovessels of tumor and detect its imaging capability with high field intensity MR. **Methods** The ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) was conjugated with cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) peptide by carbodiimide method. The specificity and targeting ability for $\alpha_v\beta_3$ -integrin were detected by prussian blue staining. The uptake capability of RGD-USPIO by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was detected with atomic absorption spectrophotometer. The subcellular localization of RGD-USPIO was detected by transmission electron microscopy. The change of T_2 relaxation time caused by the uptake of RGD-USPIO and pure USPIO by HUVEC in different time gradient was detected by 4.7 T MR. **Results** RGD-USPIO could specific binding to $\alpha_v\beta_3$, with good targeting ability. The uptake of RGD-USPIO by HUVEC was most located intra-cellular, which could significantly reduce the T_2 relaxation time of MR imaging, the difference was significant compared with USPIO ($P < 0.05$). **Conclusion** RGD-USPIO is a perspective MR contrast enhancement agent, which can specific binding to HUVEC and overexpress $\alpha_v\beta_3$ -integrin and significantly reduce the T_2 relaxation time of high field intensity MR imaging.

Key words: molecular imaging; cancer; contrast agent; endothelial cells; iron oxide

整合素是一组广泛分布于细胞表面的跨膜糖蛋白受体, 由 α 亚基和 β 亚基组成, 其中 $\alpha_v\beta_3$ 是由 α_v 亚基 β_3 亚基形成的跨膜异二聚体糖蛋白。 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤新生血管内皮细胞及多种肿瘤细胞均呈高表达, 而在成熟血管内皮细胞和绝大多数正常器官细胞, 几

乎不表达或表达非常低^[1]。 $\alpha_v\beta_3$ 能识别配体分子中的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列, 有研究显示环RGD肽与 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力更高, 是线性RGD肽的30倍^[2]。目前多数研究采用放射性核素标记RGD肽。von Wallbrunn等^[3]用荧光染料Cy 5.5标记的环RGD肽检测黑色素瘤细胞(M21)、人纤维肉瘤细胞(HT-1080细胞)($\alpha_v\beta_3$ 阳性)裸鼠移植瘤 $\alpha_v\beta_3$ 的表达水平, 用 $\alpha_v\beta_3$ 表达阴性的人乳腺癌细胞(MCF-7)作为对照, 结果显示RGD-Cy 5.5能有效检测肿瘤周边 $\alpha_v\beta_3$ 水平。但由于其在体内分布不

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.03.007

收稿日期: 2013-08-21

作者简介: 漆辉雄(1981-), 男, 湖北襄阳人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤放射治疗和化学治疗研究。

通信作者: 李 泉(1974-), 女, 湖北武汉人, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤放射治疗和化学治疗工作。

均并具有放射性,限制了进一步临床应用。因此,开发无创无毒的磁共振(magnetic resonance, MR)对比剂来进行肿瘤或肿瘤血管显像是目前研究的主要方向。相比超顺磁性氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO),超小型超顺磁性氧化铁纳米颗粒(ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles, USPIO)其粒径更小,在体内半衰期更长,并且在体内更容易通过血管内皮进入组织间隙^[4]。本实验拟制备RGD-USPIO复合物,采用4.7 T MR对 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)进行体外显像实验,探讨该复合物与 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力,并进行体外靶向MR显像,为制备出针对肿瘤新生血管的有效靶向对比剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 HUVEC和MCF-7细胞由华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心提供,USPIO (TANBead USPIO-101,表面包被氨基,直径6~10 nm,铁浓度 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH值 3.8 ± 0.5 , Taiwan Advanced Nanotech公司,中国),环RGD肽[cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Glu)](美国Peptides International公司),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC·HCl]、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)(中国,阿拉丁试剂公司),无水吗啉乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES](中国Biosharp公司),明胶、核固红(中国武汉博士德公司),1640培养基、新生小牛血清(美国Gibco公司),胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(美国Amresco公司),亚铁氰化钾(中国天津化学试剂厂),标准铁溶液(GBW08616, $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)(中国国家标准物质研究中心),超微透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)(荷兰FEI电子光学有限公司),原子吸收光谱仪(SPECTR AA-240FS)(美国Varian公司),4.7 T/30 cm小动物MR成像仪(德国Bruker公司)。

1.2 USPIO与环RGD连接 取EDC·HCl 0.6 mg, NHS 1.2 mg, 加入1 mL MES (pH 6.0), 充分混匀后取混合物0.3 mL, 将环RGD 500 μg 加入上述混合物中室温15 min, 取USPIO 2 mL, 加2 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)充分混匀后进行磁性分离, 弃上清后将RGD溶液加入USPIO中, 室温反应4 h, 将反应物置于磁性分离器上

5 min, 弃上清, 加入PBS 5 mL, 得到铁离子浓度为 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的RGD-USPIO复合物。在复合物中加入 $4.16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸和 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇作为稳定剂, 配好后置于4℃冰箱保存备用。

1.3 TEM检测RGD-USPIO 取RGD-USPIO复合物50 μL 加入150 μL 去离子水中, 充分混匀后滴片、干燥处理后, TEM检测其粒径及分布情况。

1.4 细胞培养 HUVEC和MCF-7细胞均在含体积分数5% CO_2 培养箱中培养, 在75 cm^2 的培养瓶中加入10 mL含体积分数10%小牛血清的1640培养基, 隔天换液, 当细胞铺满培养瓶底时, 用PBS洗2次, 加入胰蛋白酶37℃消化10 min, 使细胞从培养板分离, 轻轻吹打细胞, 得到细胞悬液进行传代, 当细胞处于对数生长期时进行试验, 用0.9 mm^3 细胞计数器计数。

1.5 普鲁士蓝染色检测HUVEC对环RGD-USPIO的摄取情况及环RGD-USPIO的特异性、靶向性 取8个直径为60 mm的培养皿, 置入盖玻片, 其中7个培养皿中加入约 1×10^4 个HUVEC, 另1个培养皿加入 1×10^4 个MCF-7细胞, 每皿均加入培养基5 mL, 置于培养箱培养至细胞铺满盖玻片。HUVEC组中3个培养皿中加入USPIO溶液, 另3个培养皿中加入RGD-USPIO溶液, 取1皿作为空白对照, 不加任何物质。MCF-7细胞中加入RGD-USPIO溶液。使每皿铁离子浓度为 $0.03\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HUVEC组培养15、30、120 min, MCF-7细胞组培养30 min。随后将盖玻片从培养箱中取出, PBS充分冲洗, 冰丙酮溶液固定5 min, PBS冲洗2次, 浓盐酸10 mL、质量分数10%的亚铁氰化钾2 mL配好的工作液滴加在载玻片上, 室温孵育30 min, PBS充分冲洗, 核固红避光复染2 min, 自来水冲洗, 置于显微镜观察细胞表面蓝染颗粒分布情况。另取9个直径为60 mm的培养皿, 置入盖玻片, 每个培养皿中加入约 1×10^4 个HUVEC, 培养基5 mL, 置于培养箱培养至细胞铺满盖玻片。3个培养皿中加入USPIO溶液, 3个培养皿中加入RGD-USPIO溶液, 另3皿先加入过量环RGD肽, 随后加入同样浓度RGD-USPIO, 使每皿铁离子浓度为 $0.03\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别培养15、30、120 min。用5 mL EP管收集细胞, 调节至每管约 1×10^5 个细胞, 将EP管置于超声振荡器中15 min, 然后用火焰原子吸收光谱法检测每管内铁含量。

1.6 RGD-USPIO复合物对4.7 T MR T_2 值影响

HUVEC分别与USPIO和RGD-USPIO培养15、30、120 min后收集细胞悬液滴入液态明胶中, 待明

胶变成固态后,用 4.7 T MR 仪检测。参数如下: T_1 : $TR = 400$ ms, $TE = 13.5$ ms, $NA = 2$, $matrix = 128 \times 128$, $slice\ thickness = 1$ mm, $FOV = 3.5\text{ cm} \times 3.5\text{ cm}$; T_2 : $TR = 3\ 500$ ms, $TE = 40$ ms, $480 \sim 800$ ms (12 个回波), $NA = 2$, $matrix = 128 \times 128$, $slice\ thickness = 1$ mm, $FOV = 3.5\text{ cm} \times 3.5\text{ cm}$ 。

1.7 HUVEC 摄取 RGD-USPIO 后亚细胞定位 在 HUVEC 细胞培养基中分别加入 RGD-USPIO 溶液和 USPIO 溶液,使铁离子浓度为 $0.03\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,培养箱中培养 1 h 后收集细胞,戊二醛固定 4 h,进行超薄切片,置于超微透射电镜观察。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RGD-USPIO 纳米复合物电镜检测结果 连接后的 USPIO 分散程度较单独 USPIO 稍差,部分有聚集现象,其粒径分布为 $6 \sim 10$ nm (图 1)。

2.2 HUVEC 摄取 RGD-USPIO 及其特异性 HUVEC 培养皿中分别加入 USPIO、RGD-USPIO,随着培养时间延长,HUVEC 摄取纳米颗粒逐渐增多,

15 min 后 RGD-USPIO 组即可见细胞周围有蓝染铁颗粒存在 (图 2A),30、120 min 后 RGD-USPIO 组细胞周围可见大量蓝染铁颗粒 (图 2B、C),而单纯 USPIO 组 15 min 后细胞周围未见铁颗粒 (图 2D),30、120 min 后 USPIO 组细胞周围可见少许铁颗粒 (图 2E、F)。用不表达 $\alpha_v\beta_3$ 的 MCF-7 细胞与 RGD-USPIO 相同条件下培养 30 min 后行普鲁士蓝染色,细胞周围未见铁颗粒 (图 2H)。

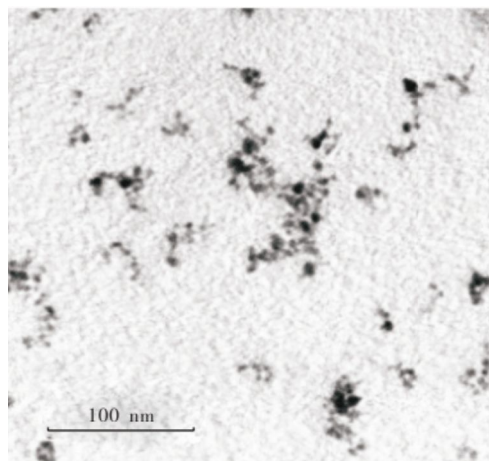
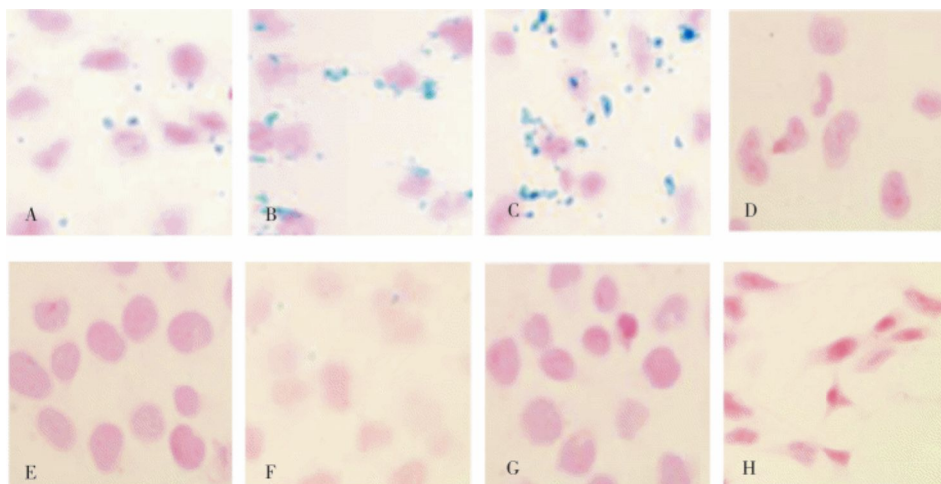


图 1 连接后的 RGD-USPIO,颗粒直径 $6 \sim 10$ nm

Fig.1 Diameter of RGD-USPIO particle was $6 \sim 10$ nm after connection



A:RGD-USPIO 组培养 15 min;B:RGD-USPIO 组培养 30 min;C:RGD-USPIO 组培养 120 min;D:USPIO 组培养 15 min;E:USPIO 组培养 30 min;F:USPIO 组培养 120 min;G:空白对照;H:MCF-7 组培养 30 min。

图 2 HUVEC 摄取 RGD-USPIO 情况及其特异性 (普鲁士蓝染色, $\times 400$)

Fig.2 Uptake of RGD-USPIO by HUVEC and its specificity (prussian staining, $\times 400$)

2.3 RGD-USPIO 靶向性 HUVE 培养皿中分别加入 USPIO、RGD-USPIO 及 RGD→RGD-USPIO 进行培养。RGD-USPIO 组各时间段细胞铁含量明显高于单纯 USPIO 组 ($P < 0.05$),RGD-USPIO 组各时间段细胞铁含量明显高于 RGD→RGD-USPIO 组 ($P < 0.05$);见表 1。

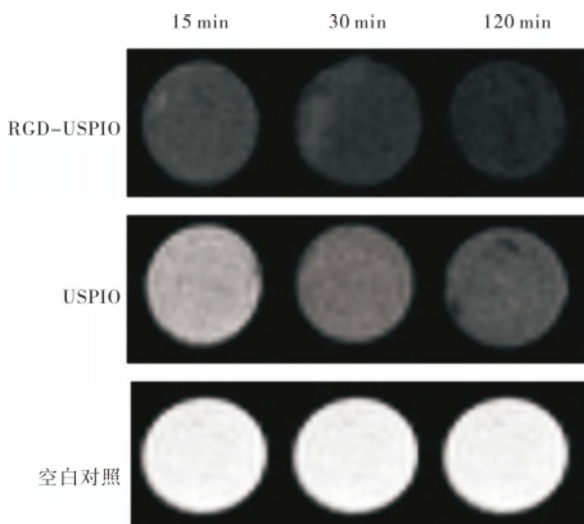
2.4 RGD-USPIO 复合物对 4.7 T MR T_2 值影响

HUVEC 分别与 USPIO 和 RGD-USPIO 培养 15、30、120 min 后收集细胞,用 4.7 T MR 检测,以去离子水作为对照,随着时间延长,RGD-USPIO 组信号逐渐降低,USPIO 组有逐渐减低趋势,考虑细胞吞噬作用所致 (图 3)。培养 15、30、120 min 时,USPIO 组 T_2 值均高于 RGD-USPIO,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);见表 2。

表 1 不同时间段 HUVEC 铁含量

Tab.1 Iron content of HUVEC in different time gradient

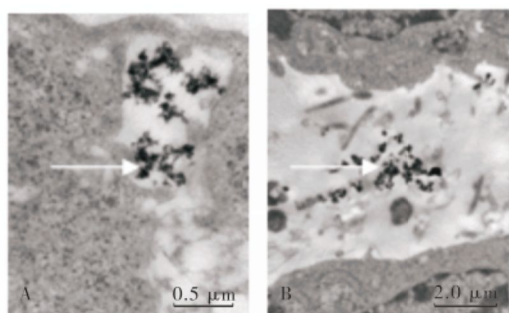
组别	HUVEC 铁含量/($\mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$)		
	15 min	30 min	120 min
USPIO 组	0.090 ± 0.003	0.160 ± 0.008	0.280 ± 0.006
RGD-USPIO 组	0.350 ± 0.007^a	0.520 ± 0.005^a	0.610 ± 0.003^a
RGD→RGD-USPIO 组	0.150 ± 0.008^b	0.310 ± 0.006^b	0.510 ± 0.007^b

注:与 USPIO 组比较^a $P < 0.05$;与 RGD-USPIO 组比较^b $P < 0.05$ 。图 3 RGD-USPIO 复合物对 4.7 T MR T_2 值影响Fig.3 Effect of RGD-USPIO on the T_2 relaxation time of 4.7 T MR表 2 HUVEC 与 USPIO、RGD-USPIO 培养后不同时间段 T_2 值的比较Tab.2 T_2 values in different time gradient after HUVEC cultured with USPIO and RGD-USPIO

组别	T_2 值/ms		
	15 min	30 min	120 min
USPIO 组	142.0 ± 8.7	125.0 ± 9.2	98.0 ± 11.5
RGD-USPIO 组	108.1 ± 11.2^a	80.0 ± 8.2^a	65.0 ± 10.3^a

注:与 USPIO 组比较^a $P < 0.05$ 。

2.4 RGD-USPIO 亚细胞定位 结果见图 4。RGD-USPIO 组大量纳米颗粒聚集于细胞内,而 USPIO 组纳米颗粒主要聚集在细胞间隙。



A: RGD-USPIO 组; B: USPIO 组。

图 4 RGD-USPIO 亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization of RGD-USPIO

3 讨论

目前临床广泛使用的 MR 对比剂多为顺磁性对比剂,主要缩短 T_1 弛豫时间。本实验采用碳二亚胺法制备的超顺磁性 MR 对比剂 RGD-USPIO,主要缩短 T_2 弛豫时间,能针对肿瘤新生血管进行显像,其靶向性及特异性与目前文献报道相关实验结果基本一致,但相关实验大多采用 1.5 T 或 3.0 T MR 进行检测^[5-6],较少采用更高场强 MR 进行实验,更高场强的 MR 就意味着更好的图像质量这一观点已得到证实^[7],Zhang^[8]和 Jiang 等^[9]将环 RGD 肽与 USPIO 进行连接,用 1.5 T MR 针对 $\alpha_v\beta_3$ 进行显像,清楚地显示肿瘤新生血管及 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性的肿瘤细胞。后来该实验组成员尝试用 3.0 T MR 对肿瘤血管进行显像,在小动物体内得到更高的图像信噪比,使得显像更为清楚。本实验采用更高场强的 4.7 T MR 对制备的 RGD-USPIO 对比剂进行体外显像,亦取得了较好结果,虽然未能同时与 3.0 T MR 进行对比,但能证实 4.7 T MR 进行实验的可行性。

本实验选用的 USPIO 表面包被氨基,直径 6 ~ 10 nm,已被广泛用于临床及实验^[10-12]。环 RGD 肽 [c(RGDfE)] 为商业化多肽,较线性 RGD 肽有更好的稳定性,与 $\alpha_v\beta_3$ 亲和力更高^[2]。本研究利用碳二亚胺法将氨基与环 RGD 肽羧基基团连接,连接过程中有可能会基团的错误连接,导致 RGD-USPIO 复合物的特异性及靶向性受到影响,但实验证明,本研所得到的 RGD-USPIO 复合物仍有很好的特异性及靶向性。为了证实其靶向性,本研究以不表达 $\alpha_v\beta_3$ 的 MCF-7 细胞作为对照进行实验,与 RGD-USPIO 培养 30 min 后, MCF-7 细胞表面未见蓝染颗粒,而 RGD-USPIO 组 HUVEC 细胞表面在培养 15 min 后即有大量蓝染颗粒。其特异性通过利用单纯 RGD 肽竞争性抑制 HUVEC 表面 $\alpha_v\beta_3$ 位点后,再加入 RGD-USPIO,显示加入单纯 RGD 肽后, HUVEC 表面蓝染颗粒明显减少,充分体现其具有良好的特异性。这一点通过检测细胞内铁含量进行量化,得到了同样的结果。细胞超微结构更直观地说明其良好的靶向性,实验过程中发现,随着时间的延长,单纯 USPIO 组细胞表面也可见蓝染颗粒,考虑为细胞的胞吞作用所致,并不能因此说明 RGD-USPIO 特异性欠佳。

以肿瘤新生血管为靶点进行显像有非常重要的临床意义^[13]。首先,肿瘤新生血管主要位于肿瘤周边,利用这一特点,有利于在肿瘤精确放射治疗中对肿瘤边界精确定位。同时,对恶性肿瘤的诊断也有一

(下转第 194 页)

综上所述,MCM5是一种较可靠的细胞增殖标志物,能够较准确地反映细胞的增殖活性。MCM5表达的增高不但标志着恶性细胞的增殖,而且也标志着潜在恶性细胞的增生;不但可以作为一种比较可靠的胃癌细胞的标志物,也可辅助诊断癌前病变。

参考文献:

- [1] Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM proteins and DNA replication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18 (2): 130-136.
- [2] Schaarschmidt D, Ladenburger E M, Keller C, et al. Human MCM proteins at a replication origin during the G₁ to S phase transition [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (19): 4176-4185.
- [3] Stoeber K, Tilley T D, Happerfield L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (Pt 11): 2027-2041.
- [4] Giaginis G, Georgiadou M, Dimakopoulou K, et al. Clinical significance of MCM2 and MCM5 expression in colon cancer: association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54 (2): 282-291.
- [5] Steere N A, Yamaguchi S, Andrews C A, et al. Functional screen of human MCM2-7 variant alleles for disease-causing potential [J]. *Mutat Res*, 2009, 666 (1/2): 74-78.

- [6] Lei M, Tye B K. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (Pt 8): 1447-1454.
- [7] Labib K, Tereero J A, Difley J F. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression [J]. *Science*, 2000, 288 (5471): 1643-1647.
- [8] Snyder M, He W, Zhang J J. The DNA replication factor MCM5 is essential for Stat1-mediated transcriptional activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (41): 14539-14544.
- [9] Guida T, Salvatore G, Faviana P, et al. Mitogenic effects of the up-regulation of minichromosome maintenance proteins in anaplastic thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (8): 4703-4709.
- [10] Sirieix P S, Donovan M, Brown J, et al. Surface expression of minichromosome maintenance proteins provides a novel method for detecting patients at risk for developing adenocarcinoma in Barrett's esophagus [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (7): 2560-2566.
- [11] Stoeber K, Swinn R, Prevost A T, et al. Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94 (14): 1071-1079.

(本文编辑:杨博 英文编辑:杨博)

(上接第190页)

定价值。其次,对肿瘤治疗疗效评价有重要利用价值,特别是对抗肿瘤血管生成药物的疗效评价,是其他评价手段无法比拟的。本研究设计的针对肿瘤新生血管的靶向MR造影剂在体外具有良好的稳定性、靶向性及特异性,但尚需进一步实验观察其在体内的稳定性。

参考文献:

- [1] Folkman J. Addressing tumor blood vessels [J]. *Nature Biotechnol*, 1997, 15 (6): 510.
- [2] Bogdanowich-Knipp S J, Chakrabarti S, Williams T D, et al. Solution stability of linear vs cyclic RGD peptides [J]. *J Pept Res*, 1999, 53 (5): 530-541.
- [3] von Wallbrunn A, Hölte C, Zühlsdorf M, et al. In vivo imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression using fluorescence-mediated tomography [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34 (5): 745-754.
- [4] Tsuchiya K, Nitta N, Sonoda A, et al. Histological study of the biodynamics of iron oxide nanoparticles with different diameters [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 1587-1594.
- [5] Burrell J S, Walker-Samuel S, Baker L C, et al. Investigating temporal fluctuations in tumor vasculature with combined carbogen and ultrasmall superparamagnetic iron oxide particle (CUSPIO) imaging [J]. *Magn Reson Med*, 2011, 66 (1): 227-234.
- [6] Wu G, Wang X, Deng G, et al. Novel peptide targeting integrin

$\alpha_v\beta_3$ -rich tumor cells by magnetic resonance imaging [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2011, 34 (2): 395-402.

- [7] Heidemann R M, Griswold M A, Müller M, et al. Feasibilities and limitations of high field parallel MRI [J]. *Radiology*, 2004, 44 (1): 49-55.
- [8] Zhang C, Jugold M, Woenne E C, et al. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (4): 1555-1562.
- [9] Jiang T, Zhang C, Zheng X, et al. Noninvasively characterizing the different $\alpha_v\beta_3$ expression patterns in lung cancers with RGD-USPIO using a clinical 3.0 T MR scanner [J]. *Int J Nanomedicine*, 2009, 4: 241-249.
- [10] Froehlich J M, Triantafyllou M, Fleischmann A, et al. Does quantification of USPIO uptake-related signal loss allow differentiation of benign and malignant normal-sized pelvic lymph nodes [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, 7 (3): 346-355.
- [11] Chang M, Hsiao J K, Yao M, et al. Homologous RBC-derived vesicles as ultrasmall carriers of iron oxide for magnetic resonance imaging of stem cells [J]. *Nanotechnology*, 2010, 21 (23): 235103.
- [12] Green D A, Durand M, Gumpert N, et al. Role of magnetic resonance imaging in bladder cancer: current status and emerging techniques [J]. *BJU Int*, 2012, 110 (10): 1463-1470.
- [13] Ungersma S E, Pacheco G, Ho C, et al. Vessel imaging with viable tumor analysis for quantification of tumor angiogenesis [J]. *Magn Reson Med*, 2010, 63 (6): 1637-1647.

(本文编辑:杨博 英文编辑:杨博)