专家述评

文章编号:1000-5404(2014)01-0006-05

超声分子影像学:现状与将来



郭燕丽教授

郭燕丽,范校周 (400038 重庆,第三军医大学西南医院超声科)

[关键词] 超声医学;分子影像学;造影剂;靶向治疗;多模态成像
[中图法分类号] R445.1 [文献标志码] A

Ultrasound molecular imaging: current status and future

Guo Yanli, Fan Xiaozhou (Department of Ultrasonography, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Molecular imaging is to study functional molecular events in living organisms at the cellular and molecular levels through many imaging technologies, and thus to reflect the living condition at the aspect of qualitative and quantitative research. However, traditional imaging diagnostic technologies, such as X-ray radiology, CT scanning, MR imaging, and ultrasonography, etc., mainly show anatomic structural damages. Ultrasound molecular imaging as an emerging discipline is to rely largely on the ultrasound contrast agent consisting of acoustic materials and substances binding with interesting targets, and to offer the potential and new direction for early diagnosis and targeted treatment of various diseases. Ultrasound molecular imaging has a wide prospect of clinical application due to its high soft tissue resolution, no radiation damage, no invasion, and portable instrument. The purpose of this article is to summarize the development of ultrasound contrast agent, the application in the field of ultrasound targeted diagnosis and targeted treatment, and to illustrate challenges in this field.

[**Key words**] ultrasound medicine; molecular imaging; contrast agent; targeted therapy; multi-modality imaging

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30970830) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2012jjB0072). Corresponding author: Guo Yanli, Tel: 86-23-68765439, E-mail: guoyanli71@aliyun.com

Weissleder 于 1999 年首先阐述了分子影像学的定义,即分子影像学是通过发展新的工具、试剂及方法,应用影像学方法(X 线、CT、MR、超声等)来探查疾病过程中细胞和分子水平的变化。它能使疾病在尚无解剖结构改变前被检测出来,从而有利于探索疾病的发生、发展、转归以及药物疗效的评价,起到连接分子生物学与临床医学之间的桥梁作用[1]。近年来,随着各种组学及芯片等高通量筛选技术的发展,揭示出了越来越多适用于分子成像的靶点。同时小动物成像设备的成功研发、转基因动物模型及具有高度特异性的成像药物和探针的应用等因素也促使分子影像学的研究领域不断拓宽[2]。目前分子影像学技术主要有分子磁共振成像技术、核医学分子成像技术和超声分子成像技术等。它们共同的特点是应用磁性物质、放射性核素和超声造影剂等影像学成像物质,反应疾病发生、发展过程中分子的变化情况,为疾病的早期诊断、治疗方案的选择及疗效的评价提供全新的研究方向[3]。超声分子影像学作为分子影像学的重要组成部分,是指在靶向超声造影剂的介导下,应用超声成像技术对活体生物进行细胞和分子水平上的定性和定量研究。主要过程为:将靶向配体(抗体、肽类等)连接在超声

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970830);重庆市自然科学基金(CSTC 2012jjB0072)
[通信作者] 郭燕丽,女,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师。担任中华医学会数字医学分会常务委员、中华医学会重庆市超声医学专业委员会副主任委员、全军超声医学专业委员会超声心动图分会委员、重庆超声医学工程学会常务理事、《临床超声医学杂志》常务编委。主持国家自然科学基金面上项目、重庆市科委重点项目、第三军医大学成果转化基金、第三军医大学第一附院科研基金各 1 项。以主要完成人获得国家科技进步二等奖 1 项、重庆市科技进步一等奖 2 项、军队医疗成果二等奖 2 项;以第一完成人获得军队医疗成果二等奖 1 项。以第一申请人获得国家发明专利和实用新型授权专利各 1 项;以第一完成人获得第三军医大学临床新技术奖一级乙等项目 1 项;以第一完成人获得第三军医大学教学成果三等奖 1 项。以第一作者或通信作者发表国内外学术论著 30 篇,其中 SCI 论著 5 篇。主要从事超声分子影像学的临床及其基础方面的研究。电话:(023)68765439,E-mail:guoyanli71@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1408.003.html(2013-10-22)

造影剂表面,造影剂进入体内与靶点部位受体选择性结合并积聚,靶区与正常组织间的超声信号对比度升高,实现对靶区的选择性成像。由于超声分子影像学技术与其他影像学技术相比,具有特异性高、敏感性高、无创、安全、方便等优点,因此已经成为目前分子影像学领域的研究热点。相关实验研究已经逐步显示,超声分子成像技术在了解疾病发生的分子机制、指导肿瘤治疗和药物研发等方面发挥着重要作用[4]。本研究从超声造影剂的发展、靶向超声造影剂的构建方法、超声分子影像学的应用领域和发展前景以及面临的挑战等方面进行综述。

1 超声分子影像学成像的物质基础——超声造影剂的发展

超声造影剂从1968年被报道以来发展到现在,主要经历了3个阶段的历程[5]。第1代造影剂选用自由气体,如空气、氮气等,由于这类造影剂大小不均匀,仅能存在数十秒,不能通过肺循环等缺陷,未能在临床广泛应用。第2代造影剂采用韧性弹性外壳和低弥散度大分子量的气体成分作为内核,包括外壳为脂类的SonoVue(内含六氟化硫)、Sonazoid(内含全氟丁烷)及外壳为白蛋白的Optison(内含全氟丙烷)等,主要用于心脏、腹部脏器的超声检查,在临床展示了良好的应用前景。第3代造影剂目前尚处于研究阶段,主要研究方向包括高分子聚合物外壳微泡和靶向超声微泡两部分,前者是使用耐压、高稳定性和可生物降解的聚合物作为外壳、内部为低弥散度大分子量的氟碳气体,目前研究较为成熟的是以聚乳酸-羟基乙酸共聚物作为外壳,其代表为AI700(Imagify),正在进行Ⅲ期临床试验。同时,研究者在临床的不断实践中发现,由于常规超声造影剂因缺乏对病变组织的特殊亲和力,不能有效滞留于靶组织,只能在短暂的动脉相中使靶器官血管显影,影响了诊断的准确性和特异性。因此,针对上述不足,近年来研究者致力于研究和开发能使组织和器官、某种特定的疾病特异性显影的靶向超声造影剂,主要是在超声造影剂的表面装载能与相关组织或疾病特异性结合的物质(如配体、抗体等),通过特定方法进行靶向结合,适当进行信号放大后,再通过高分辨力的超声成像系统间接反映疾病的分子变化信息,有效提高超声诊断的敏感性和特异性。

由于常规超声造影剂粒径相对较大,组织穿透力弱,属于血池造影[6],严重限制了超声分子影像学的发展。随着超声分子成像技术和生物纳米技术的飞速发展,新型的纳米级造影剂正显示其独特的优势,如分子量小、穿透力强、体内稳定性好,进一步推动了超声分子影像学的发展。目前研究较多的纳米级超声造影剂主要包括回波脂质体、氟碳乳剂纳米滴、纳米泡和纳米颗粒等[7]。研究表明,能在临床应用的靶向超声造影剂应满足以下条件:①安全性能好,对组织无刺激无毒副作用;②造影剂穿透力强,能经外周静脉注射后分别通过肺及全身毛细血管床,进入组织间隙中;③造影剂不能相互融合形成大气泡(气栓),不影响人体正常的血流动力学;④造影剂与靶位的结合牢固,且结合到靶位上的造影剂应在超声检查过程中保持稳定,靶向选择性和敏感性高;⑤造影剂用量少且具有携带治疗药物或基因的潜力;⑥造影剂成像清晰,具有明显的信噪增强效果,可很快实现靶位与背景的高对比度。然而,目前还没有一种造影剂能够完全满足这些条件,仍需进行不断探索。有学者指出,靶向超声造影剂已经成为第3代超声造影剂的主要研究方向,如能使靶向超声分子成像应用于临床,将会成为超声医学发展史上的重要里程碑。尽管其目前仍处于实验研究阶段,面临诸多挑战和技术难题,相信随着靶向超声造影剂构建技术的不断改进和优化,以及对比超声成像相关技术的迅猛发展,超声分子成像技术进入临床应用的步伐将日益加快,将成为一种安全有效的无创评价各种疾病的重要辅助检查手段。

2 靶向超声造影剂的构建及其靶向作用

靶向超声造影剂是实现组织、器官或某种疾病特异性显影最为关键的物质基础。超声分子成像的关键环节是进入人体后的靶向超声造影剂能稳定地与靶器官和组织特异性地结合。这种靶向作用分为被动性和主动性两种。

被动性靶向作用主要是指吞噬作用,利用体内吞噬细胞具有吞噬颗粒的这种固有的防御机制可以对富含网状内皮系统的器官和炎性组织进行被动性靶向增强显影,如激活的中性粒细胞能够包裹和吞噬具有白蛋白和脂质外壳的造影剂,可用于炎性组织的增强显影。用脂质作为外壳的超声造影剂,可被肝脏的Kupffer细胞所吞噬,可使正常肝脏增强显影,由于肝脏肿瘤或者肝细胞坏死性疾病时肝脏局部吞噬细胞少,可进行负性显像,从而实现诊断肝脏疾病的目的。此外,被动性靶向作用亦包括利用静电吸附及淋巴回流的原理进行靶组织的显影。但是,被动性靶向作用由于结合能力低、缺乏特异性和靶向性低等缺点,限制了其在超声分子成像技术中的应用。

主动性靶向作用较被动性靶向的特异性和结合能力更为显著,根据靶向物质与造影剂结合方法的不同,目前主要分为两种:①共价结合,又称直接结合,配体为碳水化合物、肽段、激素等小分子有机配体,可以通过离子键、偶联剂或桥连剂介导结合,如在微泡外壳中的蛋白质成分插入氨基酸配体,在微泡制备过程中引入功能性配体,使其暴露在造影剂的外壳上直接与目

标组织或者细胞发生作用,如马来酰亚胺、吡啶硫代丙酸酯等充当偶联剂或者桥连剂,也可将上述物质先与配体相连再连接到微泡表面[8]。研究表明,为保证配体的完整性和最大程度地提高靶向微泡的活性,在微泡外壳与配体之间采用多聚物隔离臂,如聚乙二醇,可以使配体充分暴露在微泡表面,靶向性显著优于将配体直接连接到外壳的方式。但是与隐蔽的配体构建策略相比,此种构建可能引起配体介导的补体激活[9]。②非共价结合,又称间接结合,多采用生物素-亲和素复合体,特别适用于不能耐受微泡制备过程的单克隆抗体等大分子配体,是目前实验研究阶段最有效的靶向结合系统。该复合体可极大地提高信号的强度和检测的敏感性;同时,也能够很大程度延缓单核巨噬细胞系统对靶向声学造影剂的清除。然而这种方法存在一些明显的缺点,如人体存在内源性生物素位点;来源于鸡蛋清或细菌等的抗生物素蛋白具有免疫原性,临床应用时可能产生排斥反应;作为一种大分子阳离子,易在高阴离子浓度的肾基底膜形成免疫复合物,但是,该方法在细胞实验及临床前动物实验研究中仍不失为一种好的方法[10]。

3 超声分子影像学的应用领域

3.1 诊断领域的应用

肿瘤新生血管结构不完善,基底膜不完整,管壁薄且缺乏平滑肌层,通透性明显升高,其管壁孔径在380~780 nm之间,此种现象被称为肿瘤的渗透和滞留增强效应(enhanced permeability and retention effect,EPR),由于常规微米级超声微泡的粒径多在1~10 μm之间,往往难以穿过肿瘤的新生血管壁进入肿瘤组织内,因此目前超声分子影像学的研究方向大多集中在针对血管或者淋巴管上异常的靶分子成像,主要应用于动脉粥样硬化斑块、炎症、肿瘤血管、缺血再灌注损伤、移植排斥反应等方面[11]。由于肿瘤新生血管是肿瘤发生的重要早期事件,研究显示,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)与其受体(vascular endothelial growth factor receptor,VEGFR)结合后发挥着促进肿瘤血管生成的重要作用,而VEGFR2是VEGF发挥作用的主要受体,因此,靶向于VEGFR2的超声造影剂可实现肿瘤新生血管的显影,已成为目前肿瘤超声分子成像研究中的热点之一。超声造影剂BR55是其中的典型代表,它的表面装载了能与VEGFR2特异结合的、免疫原性极低的脂肽[12]。在大肠癌的动物移植瘤研究中,研究者发现与非靶向的造影剂相比,BR55能够将超声信号强度提高3倍。同时BR55在移植瘤与正常肌肉组织显影效果的对比研究中显示,靶向造影剂能将超声信号强度在移植瘤中比正常肌肉组织提高20倍。另外,在大鼠前列腺癌模型中发现BR55同非靶向微泡相比,具有明显的显像能力和更长的显像时间。初步的临床实验研究也显示,在12例前列腺癌患者中,发现BR55能够提高前列腺癌的检出率和病灶位置。另一有代表性的靶分子为整合素$\alpha_v\beta_3$,作为整合素家族中最重要的成员,它主要表达在肿瘤的新生血管内皮和细胞上,为一种跨膜黏附受体,能够与含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸核心序列的多肽相结合[13]。因此,利用靶向于$\alpha_v\beta_3$的超声造影剂也可较好地实现肿瘤新生血管和肿瘤组织的显影,在肿瘤的超声分子影像学研究中亦受到高度重视。Ellegala等[14]将能与$\alpha_v\beta_3$发生特异性结合的物质连接到脂质超声微泡表面,在大鼠胶质瘤模型上观察到靶向超声微泡信号更多地集中在整合素表达最多的肿瘤内或肿瘤周边组织中。为了提高超声分子成像的信号,人们进一步对双靶向乃至多靶向的超声造影微泡进行了探索。目前,双靶向超声造影微泡的制备已经在实验室阶段取得了成功,并应用于肿瘤新生血管的评价。Willmann等[15]成功制备了同时携带抗VEGFR2单抗和抗$\alpha_v\beta_3$单抗的双靶向微泡,并分别与抗VEGFR2单抗超声微泡和抗$\alpha_v\beta_3$单抗超声微泡进行对照研究,结果显示:双靶向造影微泡在动物移植瘤模型中的超声信号强度要明显强于两种不同的单靶向超声微泡。

另外,靶向于肿瘤新生血管的超声造影剂可应用于动态评估肿瘤治疗的效果。检测肿瘤对化疗药物是否有效的敏感指标并非常规影像学反映的肿瘤尺寸的变化,因为治疗引起的肿瘤体积变化往往需要数周乃至数月的时间,而超声分子影像学在体积变化之前就能通过检测分子变化来反映治疗是否有效。特别是在许多靶向性药物(包括针对EGFR、VEGFR的单抗药物)投向市场之后,早期治疗效果的有效评价对于下一步的治疗决策具有重要意义。Pysz等[16]使用BR55微泡评估在使用VEGF单抗治疗大肠癌移植瘤动物模型的效果表明,治疗后VEGFR表达、微血管密度及其移植瘤的显影信号明显变低。

3.2 治疗领域的应用

近年来研究证实,超声辐照下携载基因或药物的靶向造影微泡破坏技术有可能成为一种全新的基因靶向转染和药物靶向治疗的手段[17]。超声辐照下超声造影微泡从以下几个方面提高基因的转染效率和药物的治疗效果:①增加靶器官和细胞中空化核的数目,使空化效应的强度明显提高;②降低超声的空化阈值,使以往只有治疗性超声才能产生的空化效应,使用更低功率的诊断超声也能实现;③增加基因和药物的渗透作用,通过声孔效应、微射流等生物效应,使得有造影微泡存在的超声辐照区中相关物质能够进入细胞[18]。相关实验研究显示,此种技术与其他方法(如病毒性载体、脂质体、电穿孔等)相比,具有有效、安全、靶向

性强等优点,有广阔的应用前景[19]。其具体优越性主要表现在:①可确保基因或药物的稳定性:经静脉注射的同时,又可防止它们在体循环中被血流的剪切力和血液中各种酶的降解作用破坏。②安全和靶向性:由于超声微泡对超声波敏感的特点,通过控制超声波的辐照部位,使其在靶区释放,提高局部组织的基因和药物浓度,实现基因和药物靶向释放和靶向治疗、降低全身毒性的作用。③有效性:超声和超声微泡均能增强基因和药物的渗透和吸收作用,两者的协同作用更利于基因和药物的渗透作用。

4 超声分子影像学的前景展望

4.1 多模态成像及多功能分子探针

由于各种影像学技术有各自的成像特点,目前还没有发现一种单模式影像技术是完美的,而多模态成像则是利用两种或是两种以上影像学模式对同一物体进行成像以获得综合信息,通过将声磁、核素等技术的综合集成应用,将为分子成像开辟更广的研究和应用方向[5]。多模态融合技术分为软件融合和硬件融合。软件融合是先用不同模式的系统分别采集图像,然后通过图像后处理软件进行数据融合,但是对于运动的器官,在进行多模态成像数据融合时有难以克服的困难。而硬件融合则可以在同一台机器上同时或很短间隔获取功能的和解剖的图像,它能克服软件融合的缺点,可以同时提供更快捷、高解析度、高分辨率的解剖、功能、代谢或分子信息,如现已应用于临床的 PET/CT 和 PET/MR 成像仪。

各种影像仪器的融合固然是一方面,如何得到在多种成像模式下均可提供分子方面的信息是分子影像学中的研究方向,多功能分子探针成为了解决这一问题的关键。Li 等[20]的研究结果显示,携载 Fe_3O_4-PFOB 纳米乳剂,将超顺磁性氧化铁装载到全氟溴辛烷纳米乳的壳膜中,在实现磁共振显像的同时,亦可以通过液气相变实现超声显像,从而实现了应用一种造影剂可同时完成磁共振和超声分子显像。另外,光声、热声和磁声显像技术是最近出现的高度敏感显像技术。上述成像技术的基本原理是通过近红外光、射频、微波或者磁场引起纳米粒的震动,产生能够为超声所诊断的声波。其中又以光声成像研究最为广泛,光声造影剂是一种吸收光的纳米粒,如小分子染料,硅、金、钴或者碳纳米管等[21-22]。目前超声联合其他成像模式的多功能造影剂的研究多处于初级阶段,限制其发展的主要技术瓶颈是造影剂的粒径大,只能进行血管内成像,难以实现肿瘤实质细胞的靶向成像[23]。

4.2 纳米级超声造影剂特异性诊断和治疗肿瘤

目前针对各种类型肿瘤的靶向载药或基因微泡的构建和设计多集中在与肿瘤血管生成有关的靶分子上,如携肿瘤血管生成因子受体的载药或基因超声微泡,但它具有两个明显的缺点:①特异性不高,肿瘤血管生成因子不具备组织和器官特异性。②造影剂多为微米级,穿透性不强,不能穿过肿瘤血管进入到组织间隙中,载药微泡不能直接与肿瘤细胞结合,从而在超声辐照下不能实现近距离药物释放,导致药物的有效利用率不高,对人体产生较大的副作用。因此如何获得高效、特异性强、稳定性好、穿透性强的靶向多功能超声造影剂是亟待解决的主要问题。

纳米级微泡的问世对于肿瘤早期诊断与治疗有关的超声分子影像学发展是一个巨大的推动。纳米级微泡是指粒径处于纳米尺度(小于 1 000 nm)内的造影剂,它与普通造影剂相比有以下优势:①纳米级造影剂具有极强的穿透力。普通造影剂微泡不能透过血管内皮间隙,而纳米级造影剂能够穿透血管壁到达血管外,从而实现靶组织血管外显像,特别是在疾病状态中,如肿瘤的 EPR 效应为粒径小于 700 nm 的纳米级造影剂透过血管壁提供了理论基础。②纳米级造影剂的另一个重要特性为聚集成像,粒径小于 700 nm 的造影剂可以透过肿瘤新生血管,在肿瘤组织中聚集成像,从而实现了靶组织增强和背景噪声低的目的。③纳米微泡本身有许多特性,如表面积相对较大,吸附能力强,具有良好的生物亲和性;稳定性较强,自身体积微小,可以在血液循环中存留更长时间。目前已有的研究证实,粒径在 500 nm 左右的纳米脂质超声微泡能够穿过肿瘤血管进入组织间隙中[24],证实携载前列腺特异性膜抗原单抗的靶向纳米级超声微泡能使前列腺癌移植瘤显影信号的强度大于普通纳米级超声微泡[25]。Rapoport 等[26]制备了一种包裹全氟化碳和载有阿霉素的纳米泡,纳米粒子聚焦于肿瘤部位后,通过改变局部的温度使纳米泡融合成微泡,从而具有较好的造影诊断功能,之后增加超声强度使微泡破裂,引起了治疗性药物在肿瘤位置的直接释放,通过声空作用增加了血管外间隙的渗透力,达到局部治疗的目的。但是由于在不同的肿瘤组织中 EPR 效应不同,同时各种动物移植瘤模型的 EPR 效应往往高于人体肿瘤,以及纳米造影剂是否适合临床用显像仪器探测等这些问题都需要进一步研究。

5 超声分子影像学面临的挑战

在诊断领域中,目前的研究多为有关肿瘤、血栓、炎症等疾病的靶向超声分子成像研究,已经取得了较好的实验结果,但大多数研究均局限于实验研究。令人欣喜的是,2012 年针对肿瘤血管 VEGFR2 的靶向微泡 BR55 已经进入了临床前期研究[27]。目前超声分

子影像学在特异性诊断方面面临的挑战和困难主要有以下几点:①如何寻找靶向超声造影剂的最佳制备方法,从而优化显像效果和保存时间;②如何在靶向修饰的同时限制造影剂大小以及应用多种靶向配体修饰提高微泡的组织特异性,从而使造影剂微泡在高血流切变力的环境中也能大量地聚集于靶向部位;③如何优化造影剂使用的频率范围或最佳频率,以获得最佳的超声显像效果;④如何对造影剂产生的回声信号进行提取、定量分析以及与临床的相关性;⑤安全性问题,包括机体对微泡的反应和微泡协同超声辐照下可能引发的生物学效应及各种抗体或者配体引起的免疫原性。

在治疗领域中,要使超声辐照下携载基因或者药物的靶向微泡治疗应用于临床,还面临许多挑战和困难,主要有以下几点:①在构建安全、有效、组织特异性和靶向性的超声微泡的同时,如何能高效地携带基因或药物,同时可被超声能量破坏而有效释放治疗基因或药物;②解决好超声波功率与造影剂微泡浓度及组织损伤的关系;③目的基因或治疗药物在体内如何实现高效、稳定,可调控的表达;④药物和基因如何尽可能多的进入靶组织,而不被人体内的单核吞噬系统所摄取。只有克服了上述问题,超声分子成像才能从现代医学的诊断领域真正进入治疗领域,超声辐照下超声造影剂携载基因和药物治疗技术才能与脂质体、病毒介导的基因治疗技术相比占有绝对优势。

总之,利用超声造影剂进行分子成像和靶向治疗的研究目前尚处于基础阶段,虽然存在许多尚未解决的问题,但已取得的研究进展显示出了诱人的前景。相信随着分子生物学和超声医学的发展,超声分子成像技术将为人类疾病提供一种新的诊治途径。

参考文献:

[1] Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier[J]. Radiology, 1999, 212(3): 609-614.

[2] Contag P R. Whole-animal cellular and molecular imaging to accelerate drug development[J]. Drug Discov Today, 2002, 7(10): 555-562.

[3] Dayton P A, Ferrara K W. Targeted imaging using ultrasound[J]. J Magn Reson Imaging, 2002, 16(4): 362-377.

[4] Klibanov A L. Ultrasound molecular imaging with targeted microbubble contrast agents[J]. J Nucl Cardiol, 2007, 14(6): 876-884.

[5] Yang F, Chen Z Y, Lin Y. Advancement of targeted ultrasound contrast agents and their applications in molecular imaging and targeted therapy[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(8): 1516-1527.

[6] Lindner J R. Molecular imaging of myocardial and vascular disorders with ultrasound[J]. JACC cardiovasc imaging, 2010, 3(2): 204-211.

[7] Deshpande N, Needles A, Willmann J K. Molecular ultrasound imaging: current status and future directions[J]. Clin Radiol, 2010, 65(7): 567-581.

[8] Klibanov A L. Preparation of targeted microbubbles: ultrasound contrast agents for molecular imaging[J]. Med Biol Eng Comput, 2009, 47(8): 875-882.

[9] Diaz-Lopez R, Tsapis N, Santin M, *et al*. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent[J]. Biomaterials, 2010, 31(7): 1723-1731.

[10] Haugland R P, Bhalgat M K. Preparation of avidin conjugates [J]. Methods Mol Biol, 2008, 418: 1-12.

[11] Piedra M, Allroggen A, Lindner J R. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound[J]. Cerebrovasc Dis, 2009, 27 Suppl 2: 66-74.

[12] Pochon S, Tardy I, Bussat P, *et al*. BR55: a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis[J]. Invest Radiol, 2010, 45(2): 89-95.

[13] Jun H Y, Park S H, Kim H S, *et al*. Long residence time of ultrasound microbubbles targeted to integrin in murine tumor model[J]. Acad Radiol, 2010, 17(1): 54-60.

[14] Ellegala D B, Leong-Poi H, Carpenter J E, *et al*. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. Circulation, 2003, 108(3): 336-341.

[15] Willmann J K, Lutz A M, Paulmurugan R, *et al*. Dual-targeted contrast agent for US assessment of tumor angiogenesis *in vivo*. Radiology, 2008, 248(3): 936-944.

[16] Pysz M A, Foygel K, Rosenberg J, *et al*. Antiangiogenic cancer therapy: monitoring with molecular US and a clinically translatable contrast agent (BR55)[J]. Radiology, 2010, 256(2): 519-527.

[17] Geis NA, Katus HA, Bekeredjian R. Microbubbles as a vehicle for gene and drug delivery: current clinical implications and future perspectives[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(15): 2166-2183.

[18] Gao Z, Kennedy A M, Christensen D A, *et al*. Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy[J]. Ultrasonics, 2008, 48(4): 260-270.

[19] Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J, *et al*. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71(3): 409-419.

[20] Li A, Zheng Y, Yu J, *et al*. Superparamagnetic perfluorooctylbromide nanoparticles as a multimodal contrast agent for US, MR, and CT imaging[J]. Acta Radiol, 2013, 54(3): 278-283.

[21] Wang X, Chen H, Zheng Y, *et al*. Au-nanoparticle coated mesoporous silica nanocapsule-based multifunctional platform for ultrasound mediated imaging, cytoclasis and tumor ablation[J]. Biomaterials, 2013, 34(8): 2057-2068.

[22] Xu R X. Multifunctional microbubbles and nanobubbles for photoacoustic imaging[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2011, 6(5): 401-411.

[23] Moestue S A, Gribbestad I S, Hansen R. Intravascular targets for molecular contrast-enhanced ultrasound imaging[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6679-6697.

[24] Fan X, Wang L, Guo Y, *et al*. Experimental investigation of the penetration of ultrasound nanobubbles in a gastric cancer xenograft[J]. Nanotechnology, 2013, 24(32): 325102.

[25] Wang L, Li L, Guo Y, *et al*. Construction and In *Vitro*/*In Vivo* Targeting of PSMA-Targeted Nanoscale Microbubbles in Prostate Cancer[J]. Prostate, 2013, 73(11): 1147-1158.

[26] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy[J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(14): 1095-1106.

[27] Kaneko O F, Willmann J K. Ultrasound for molecular imaging and therapy in cancer[J]. Quant Imaging Med Surg, 2012, 2(2): 87-97.

(**收稿**:2013-09-10;**修回**:2013-09-30)

(编辑 汪勤俭)