

文章编号:0253-9950(2010)01-0035-06

人端粒酶催化亚单位(hTERT)反义分子探针的 制备与理化性质初步研究

王荣福,刘 萌,张春丽,闫 平

北京大学第一医院 核医学科,北京 100034

摘要:制备放射性核素 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的针对人端粒酶催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)mRNA的反义分子探针,探讨其在体外的稳定性和相关理化性质。针对 hTERT mRNA (GEN-BANK 号为 AF015950)的第 2331~2348 位核苷酸(含 18 个碱基),即 5'-TCAAGAGCCACGTCTCTA-3' (hTERT SON),设计反义寡核苷酸序列(hTERT ASON)为 5'-TAGAGACGTGGCTCTTGA-3';对 hTERT ASON 进行适当修饰。通过双功能螯合剂 S-Acetyl NHS-MAG₃进行放射性核素 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记。针对影响标记的主要因素(SnCl₂用量、反应体积、反应时间等)进行条件摸索,建立最优化标记方案。纸层析法测定反义分子探针($^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON)的标记率和放射化学纯度,计算比活度。检测 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的放射稳定性与序列稳定性,以及血清蛋白结合率。所有结果通过统计学软件 SPSS12.0 进行分析。室温下反应 15~30 min 后, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的标记率为 76%±5% (n=5);在相同条件下,无双功能螯合剂作用,ASON 的标记率仅为 5.0%±1.6% (n=5);二者比较有显著差异(P<0.05)。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 放射化学纯度达到 96%以上,比活度为 1 850 GBq/g。在不同条件下, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的放射化学纯度在 24 h 内均达到 93%以上。PAGE 凝胶电泳显示 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 在与新鲜血清 37℃ 孵育 6 h 内未发生任何降解。与新鲜血清 37℃ 孵育 1、3 和 6 h 后, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的血清蛋白结合率分别为 15.0%±1.6%、18.0%±1.9% 和 20.0%±2.4%。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 具有较高标记率、放射化学纯度和比活度;其放射稳定性和序列稳定性均良好,与血清蛋白结合率较低,适合作为反义显像剂用于进一步研究。

关键词:人端粒酶催化亚单位(hTERT);S-Acetyl NHS-MAG₃; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$;分子探针;反义显像

中图分类号:R817 **文献标志码:**A

Preparation and Characterization of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Labeled Antisense Oligonucleotide Targeting hTERT mRNA

WANG Rong-fu, LIU Meng, ZHANG Chun-li, YAN Ping

Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Abstract: To radiolabel antisense oligonucleotide (ASON) targeting hTERT mRNA with technetium-99m, and evaluate the characteristics of this novel radiopharmaceutical. One 18mer antisense uniformly phosphorothioate-modified oligonucleotide targeting hTERT mR-

收稿日期:2008-07-20;**修订日期:**2008-11-18

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20050001108);教育部教育振兴行动计划特殊专项(“九八五”工程:Ⅱ期)资助项目(985-2-056);国家自然科学基金资助项目(30670583,30470498,30900374);国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2006CB705705);高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金课题(200800011061)

作者简介:王荣福(1955—),男,福建南平浦城人,医学和药学博士,教授,博士生导师,从事分子与临床核医学

NA was radiolabeled with technetium-99m through bifunctional chelator N-hydroxysuccinimide derivative of S-acetylmercaptoacetyltriglycine (S-Acetyl NHS-MAG₃). The novel molecular imaging agent was characterized *in vitro*. All data were analyzed by the statistic software SPSS12.0. The labeling efficiencies of ⁹⁹Tc^m-hTERT ASON reach 76% ± 5% (*n* = 5) within 15 min to 30 min at room temperature, the specific activity is up to 1 850 GBq/g, and the radiochemical purity is above 96% after purification. Control labeling of ASON without bifunctional chelator under the same conditions shows only about 5.0% ± 1.6% (*n* = 5) binding, which is significantly different compared with the results of labeling of ASON through bifunctional chelator (*P* < 0.05). The radiochemical purity of ⁹⁹Tc^m-hTERT ASON at room temperature, as well as that of in normal saline at room temperature and in 37 °C fresh human serum, always remains above 93% periodically over 24 h. The result of PAGE analysis indicates the non-degradation of ⁹⁹Tc^m-hTERT ASON by the nuclease in serum after its incubation in 37 °C fresh human serum for 1, 2, 4 and 6 h respectively. After incubated in 37 °C fresh human serum for 1, 3 and 6 h respectively, the protein-binding ratio of ⁹⁹Tc^m-hTERT ASON are 15.0% ± 1.6%, 18.0% ± 1.9%, and 20.0% ± 2.4%. hTERT ASON can be radiolabeled with technetium-99m through bifunctional chelator successfully. The antisense molecular imaging probe maintains good stability and low protein-binding, which may be a suitable antisense probe for the further antisense imaging study.

Key words: human telomerase reverse transcriptase (hTERT); S-Acetyl NHS-MAG₃; ⁹⁹Tc^m; molecular probe; antisense imaging

反义显像是将放射性核素标记的一段人工合成的反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON) 引入体内后, 根据“碱基互补配对原则”, 追踪其与病变组织中过度表达的目标 DNA 或 mRNA 发生特异性结合的过程, 从而达到在基因水平上早期、特异、定量诊断疾病的目的^[1-2]。大量研究证实, 人端粒酶催化亚单位 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 是迄今所知的人体肿瘤特异性最强的生物标志之一^[3-4], 具有肿瘤特异诊断和治疗的潜在应用价值。基于以上认识, 本研究提出以 hTERT 为生物靶点, 制备一种新型的反义分子探针, 并对其理化性质进行初步研究。

选择合适的放射性核素和适宜的标记方法是成功进行反义显像的关键问题。在所应用的临床显像药物中, 放射性核素 ⁹⁹Tc^m 及其标记的化合物约占总量的 80%。⁹⁹Tc^m 物理性能优良, 为纯 γ 光子发射体; 能量适宜, 为 140 keV; 半衰期 (*T*_{1/2}) 合适, 为 6.02 h; 获取方便, 可通过 ⁹⁹Mo-⁹⁹Tc^m 发生器产生; 价格较为便宜; 广泛应用于临床核医学多种脏器的显像诊断。因此, 本研究拟选取放射性核素 ⁹⁹Tc^m 标记针对 hTERT mRNA 的 ASON, 通过标记条件优化, 制备反义分子探针。

1 实验部分

1.1 主要试剂、材料及仪器

根据 ASON 的设计原则以及文献报道^[5], 针对 hTERT mRNA 的反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON) 序列为 5'-TAGAGACGTG-GCTCTTGA-3', 正义寡核苷酸 (sense oligonucleotide, SON) 序列为 5'-TCAAGAGCCACGTCTCTA-3', 每条链均为全硫代修饰, 3' 端连接一个伯氨结构, 修饰结构式为 5'-ASON-(CH₂)₆-NH₂-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。双功能螯合剂 S-Acetyl NHS-MAG₃ 由美国 Hnatowich D J 博士赠送。SephadexG25 (Fine), 瑞典 Amersham 公司。SnCl₂ · 2H₂O, 美国 Sigma 公司。⁹⁹Tc^m 洗脱液, 中国原子能科学研究院同位素研究所。

SMA3000-UV-VIS 型微量分光光度计, 北京华大基因研究中心。真空离心干燥仪, 美国 LABCONCO 公司。RM905 型放射性活度仪, 中国计量科学研究院。FT-163 型放射免疫测量仪, 国营二六一厂。AlphaImagerTM 2200 凝胶成像仪, 美国 Alpha Innotech 公司。

1.2 ASON 与 NHS-MAG₃ 的偶联反应

参考文献[6-7]报道, 取 5 OD ASON (OD 即

为吸光度值),以 HEPES 缓冲液(0.1 mol/L, pH=8.0)溶解,质量浓度 5 g/L。在振荡条件下,将新鲜配制的 NHS-MAG₃溶液加入 ASON 溶液中,使二者的最终摩尔比(MAG₃/ASON)达到 20:1。室温下,静置反应 60~120 min。反应产物通过 Sephadex G25 层析柱(0.7 cm×28 cm)纯化。洗脱液为 PB 缓冲液(50 mmol/L, pH=7.2);洗脱产物按照每管 0.4 mL 收集。紫外分光光度计测定每管洗脱产物在 260 nm 处的波长吸收情况(OD_{260 nm}),计算产物含量(1 OD≈30 μg)。合并高峰管(OD_{260 nm}值以及放射性活度值均最高的管),以每管 10 μg 分装。真空离心干燥后,-20℃条件下保存、备用。质谱分析 MAG₃-ASON,由北京大学医学部医药卫生分析中心协助完成。

1.3 MAG₃-ASON 的放射性核素⁹⁹Tc^m标记

取 10 μg 的 MAG₃-ASON,溶于 NH₄OAc 缓冲液(0.25 mol/L, pH=5.2),配成 300~500 mg/L 的 MAG₃-ASON 溶液。在 MAG₃-ASON 溶液中加入酒石酸钠溶液(50 g/L),使后者的最终浓度达到 7 g/L(标记时 pH=7.6)。再依次加入新鲜⁹⁹Tc^mO₄⁻洗脱液和新鲜配制的 SnCl₂溶液。改变标记条件进行反应:① SnCl₂用量:1、2、5 μg;②⁹⁹Tc^mO₄⁻液体积:10、50、100 μL;③反应时间:15、30、45、60 min;④未加螯合剂。得到的反应产物通过 Sephadex G25 层析柱(0.7 cm×28 cm)纯化。PB 缓冲液(50 mmol/L, pH=7.2)洗脱,洗脱产物按照每管 0.4 mL 收集。分别测定各收集管的放射性活度以及在 260 nm 处的吸光度(OD_{260 nm}值)。收集高峰管,即为标记产物(⁹⁹Tc^m-hTERT ASON)。纸层析法测定⁹⁹Tc^m-hTERT ASON 的标记率和放射化学纯度。采用新华一号滤纸为固定相,分别以生理盐水和丙酮为展开剂。在生理盐水展开体系中,⁹⁹Tc^m-MAG₃-ASON 的比移值 R_f=0.8~1.0。在丙酮展开体系中,⁹⁹Tc^m-MAG₃-ASON 的比移值 R_f=0~0.1。

1.4 ⁹⁹Tc^m-hTERT ASON 的标记稳定性分析

取 100 μL 的⁹⁹Tc^m-hTERT ASON 溶液,分别放置在以下条件:①原液(室温);②加 10 倍体积的生理盐水(37℃);③加 10 倍体积的人新鲜血清(37℃),孵育不同时间(0、1、2、4、6、8、24 h)后,分别取样,纸层析法测定⁹⁹Tc^m-hTERT ASON 的放射化学纯度。

1.5 ⁹⁹Tc^m-hTERT ASON 的序列稳定性分析

取 1 μg 的⁹⁹Tc^m-hTERT ASON,溶于正常人新鲜血清中;在 37℃条件下孵育不同时间(1、2、4、6 h)后,分别采用酚/氯仿法^[8]从人新鲜血清中提取⁹⁹Tc^m-hTERT ASON;取样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)检测。以未经血清 37℃孵育的⁹⁹Tc^m-hTERT ASON 作为对照组。

1.6 ⁹⁹Tc^m-hTERT ASON 的血清蛋白结合率

取 100 μL 的⁹⁹Tc^m-hTERT ASON,与人新鲜血清(100 μL)在 37℃水育箱中孵育不同时间(1、3、6 h)。其后采用酚/氯仿法沉淀血清蛋白,即:加入酚/氯仿溶液(体积比为 1:1),充分混匀 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液;将沉淀物重复上述实验 1 遍;分别收集上清液和沉淀物,γ放射免疫计数器计数(C)。根据公式计算:血清蛋白结合率=100% C_{沉淀物}/(C_{上清液}+C_{沉淀物})。

1.7 统计学分析

所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计学软件 SPSS12.0 进行数据分析。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果和讨论

2.1 ASON 与 MAG₃的偶联反应结果

Sephadex G25 凝胶层析可根据不同分子的分子量大小,有效分离偶联和未偶联的 DNA 以及未参与反应的双功能螯合剂。层析产物通过紫外分光光度计测定 OD_{260 nm}值,其中高峰管 A 为偶联产物(MAG₃-ASON),示于图 1。偶联产物(MAG₃-ASON)通过质谱分析,结果示于图 2。图 2(a)为 ASON 的质谱分析结果,显示其相对分子质量为 5 448.5;图 2(b)为 MAG₃-ASON 的质

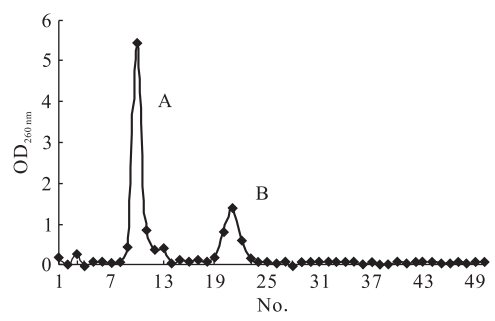


图 1 Sephadex G25 凝胶层析结果
Fig. 1 Results of Sephadex G25 gel chromatography
A——MAG₃-ASON, B——游离(Free)ASON

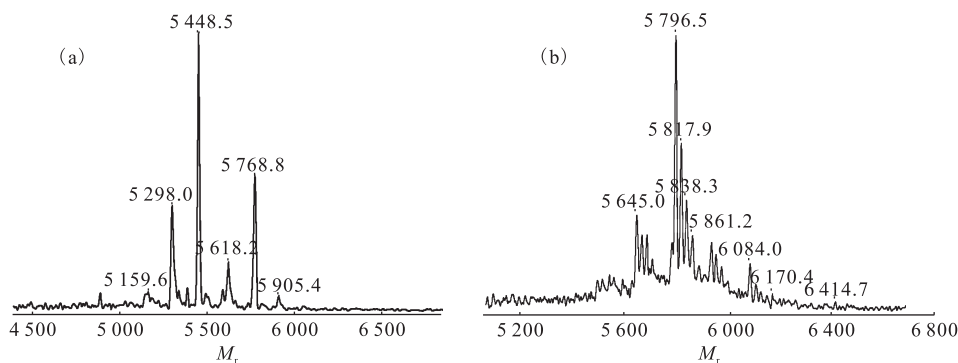


图 2 质谱分析结果

Fig. 2 Molecular mass of probe measured by MOLDI-TOF analysis

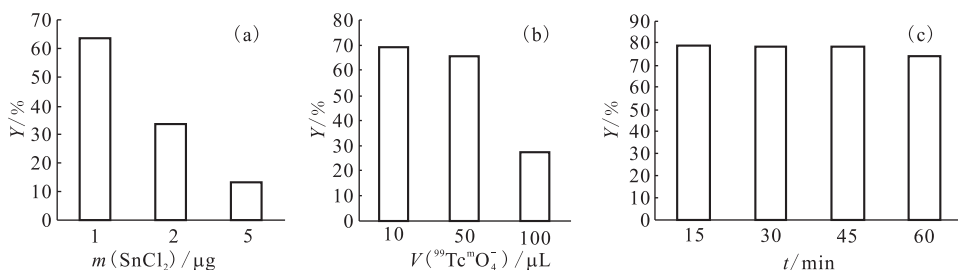
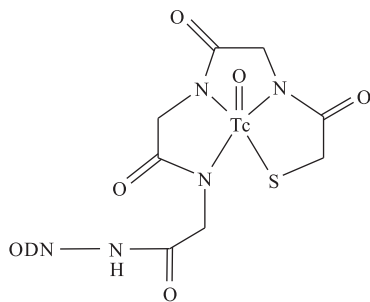
(a)——ASON, $M_r = 5448.5$; (b)——MAG₃-ASON, $M_r = 5796.5$

谱分析结果,显示其相对分子质量为 5 796.5,与计算值相近。

$^{99}\text{Tc}^m$ 为金属核素,其标记 ASON 最有效的方法就是在 ASON 末端加上一个合适的连接子,以使空间位阻最小化,然后通过连接子进行放射性核素标记。在 ASON 的 3' 端 NH_2 与寡核苷酸骨架之间以己基(CH_2)₆作为连接子,有助于与螯合剂偶联。此外,应用双功能螯合剂还可避免由于放射性核素直接标记而导致的标记底物生物学活性的损伤^[9]。S-Acetyl NHS-MAG₃作为一种双功能螯合剂,常用于 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记^[6]。在 ASON 的 5' 或 3' 末端连接一伯胺结构;ASON 通过伯胺与 NHS-MAG₃ 发生化学反应,形成稳定的酰胺键;在室温和中性条件下,去除保护巯基的乙酰基基团;通过转螯合作用,NHS-MAG₃ 就能与 $^{99}\text{Tc}^m$ 螯合,从而形成稳定的放射性标记物,结构示于图 3。

2.2 MAG₃-ASON 的 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记结果

利用放射性核素 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记 MAG₃-ASON,不同标记条件下标记产物的标记率示于图 4。

图 4 不同 SnCl_2 用量(a)、 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 液体积(b)和反应时间(c)下标记产物的标记率Fig. 4 Labeling efficiency of the product in different conditions; the mass of SnCl_2 (a), the volume of $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ (b), reaction time(c)图 3 $^{99}\text{Tc}^m$ -NHS-MAG₃-ASON 结构示意图Fig. 3 Structure of $^{99}\text{Tc}^m$ -NHS-MAG₃-ASON

纸层析法测定标记产物的标记率与放射化学纯度。放射性核素 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记 MAG₃-ASON 的反应产物有 3 种成分:① 游离锝;② 水解锝;③ 络合锝,即所需的标记产物 $^{99}\text{Tc}^m$ -hTERT ASON。前 2 种是放化杂质。3 种 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记产物在展开体系中的比移值(R_f)列于表 1。

通过以上标记条件的摸索,优化标记方法,总结如下:取 10 μg 的 MAG₃-ASON,溶于 NH_4OAc 缓冲液(0.25 mol/L, pH = 5.2)中,浓度达到

表 1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_2$ 的 R_f 值
Table 1 R_f of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ and $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_2$

固定相 (Solid phase)	展开剂 (Developing solvent)	R_f		
		$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$	$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON	$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_2$
新华一号滤纸(Xinhua No. 1 filter paper)	丙酮(Acetone)	0.9~1.0	0~0.1	0~0.1
	生理盐水(Normal saline)	0.9~1.0	0.8~1.0	0~0.1

500 mg/L。在 MAG_3 -ASON 溶液中加入酒石酸钠溶液(50 g/L),使后者最终浓度达到 7 g/L(标记时 $\text{pH}=7.6$)。再依次加入 37 MBq 的新鲜 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 淋洗液(10 μL)和 1 μL 新鲜配制的 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液(1 g/L)。室温下,静置反应 15~30 min。反应产物通过 Sephadex G25 层析柱(0.7 cm $\times$ 28 cm)纯化。PB 缓冲液(50 mmol/L, $\text{pH}=7.2$)洗脱,洗脱产物按照每管 0.4 mL 收集。分别测定各收集管在 260 nm 处的吸光度值

($\text{OD}_{260\text{ nm}}$ 值)和放射性活度值,收集高峰管,即为纯化产物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON。结果示于图 5。
按上述反应条件,室温下反应 15~30 min 后, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的标记率为 $76\% \pm 5\%$ ($n=5$);在相同条件下,无双功能螯合剂作用,ASON 的标记率仅为 $5.0\% \pm 1.6\%$ ($n=5$);二者比较有显著差异 ($P<0.05$)。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的放射化学纯度可达 96% 以上,比活度为 1 850 GBq/g。

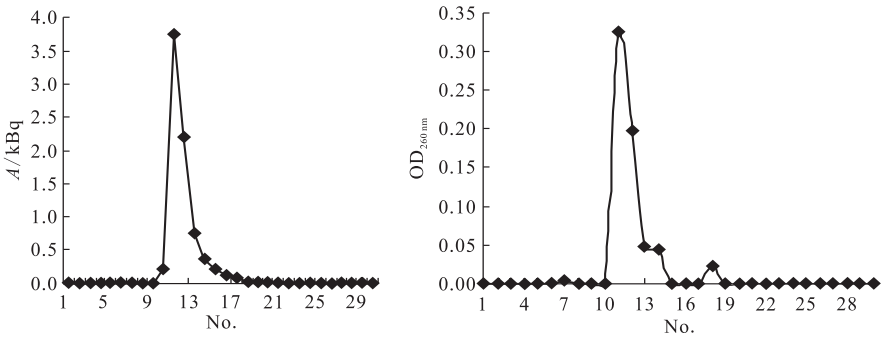


图 5 Sephadex G25 凝胶层析纯化
Fig. 5 Results of Sephadex G25 gel chromatography

2.3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的标记稳定性分析结果

将 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 放置在不同条件下(室温、生理盐水室温孵育、正常人新鲜血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育),结果示于图 6。图 6 结果表明, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 在 24 h 内的放射性化学纯度均大于 93%。

2.4 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的序列稳定性分析结果

体内应用时,不仅要保证 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 具有良好的放射稳定性,更要维持序列完整性,从而保证显像所必须的序列特异性。PAGE 凝胶电泳主要用于检测小分子核酸的大小,或在同位素标记的情况下分析单链核酸,如分离寡核苷酸探针、S1 核酸酶产物分析和 DNA 测序等。该方法适用于小分子 DNA 的分离(以 5~500 bp 最佳,其中 bp 表示碱基对)。对单链核

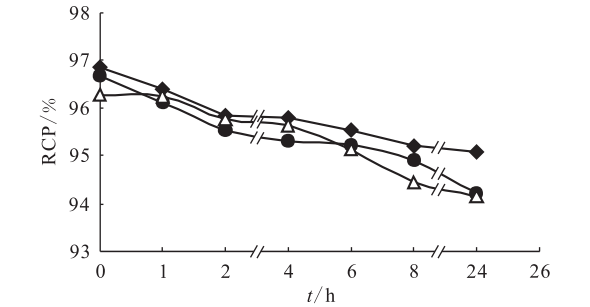


图 6 不同条件下 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 在 24 h 内的放射化学纯度
Fig. 6 Radiochemical purity of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON at different conditions during 24 h
◆——室温(Room temperature),
●——生理盐水室温孵育(Incubation with normal saline at room temperature),△——正常人新鲜血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育(Incubation with fresh 37 $^{\circ}\text{C}$ human serum)

酸来说,其分辨率可达 1 bp。如果寡核苷酸发生降解,PAGE 电泳结果上会出现异常条带。从本研究的 PAGE 电泳结果来看(图 7),仅在 18 bp 位置出现清晰的电泳条带。这说明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 在人新鲜血清中未发生任何降解,序列稳定性良好。

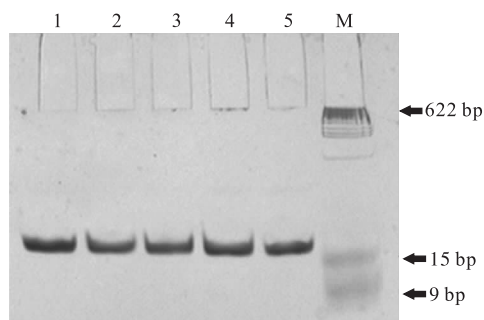


图 7 PAGE 凝胶电泳分析

Fig. 7 PAGE Gel electrophoresis

M——标准(Standard)DNA marker,

1——对照组(未与血清孵育)(Control group without incubation);

与血清孵育组(Groups incubated with fresh 37 °C human serum):

2——1 h, 3——2 h, 4——4 h, 5——6 h

2.5 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 的血清蛋白结合率

将 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 放置在正常人新鲜血清(37 °C)中孵育 1、3、6 h 后,其与血清蛋白的结合率分别为 $15.0\% \pm 1.6\%$ 、 $18.0\% \pm 1.9\%$ 、 $20.0\% \pm 2.4\%$ 。

在体内,一部分反义显像剂会与血清蛋白结合,这使其进入靶组织的量减少,而血液中放射性长期处于一较高水平,引起靶/非靶组织(T/NT)的放射性比值下降,从而影响显像质量。若反义显像剂与血清蛋白结合率过高,还会对机体造成额外伤害,更会对寡核苷酸的生物学特性造成严重影响。然而,反义显像剂与某些血清蛋白相互作用的消极意义从药物动力学角度来看却是有益的:其与血清蛋白的结合可使它的血清半衰期延长,且减慢肾脏排泄速度,有利于在肿瘤部位聚集。本研究结果显示, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 与血清蛋白结合率在 6 h 内约为 20%。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 与血清蛋白发生结合,可能与硫代磷酸酯寡聚脱氧核糖核酸(phosphorothioate oligonucleotides, PS)的硫原子修饰结构有关。因为 PS 的主要缺点之一就是在体内会与一些蛋白结合,特别是那些能和带有多个负电荷分子相互作用的蛋白,这种非特异性结合的原因还不甚明了。

3 结 论

本课题选择 hTERT 为靶点,设计、修饰与其特异性结合的 ASON 序列,通过双功能螯合剂 S-Acetyl NHS-MAG₃ 进行放射性核素 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记。获得的标记产物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hTERT ASON 具有较高的标记率、放射化学纯度和比活度,且放射稳定性和序列稳定性良好,与血清蛋白具有一定的结合特性,适合作为反义显像剂用于进一步的显像研究^[10-11]。

参考文献:

- [1] Hnatowich D J. Antisense and Nuclear Medicine[J]. J Nucl Med, 1999, 40(4): 693-703.
- [2] 王荣福,沈 晶,张春丽. 反义显像的应用研究及进展[J]. 北京医学, 2006, 28(9): 555-559.
- [3] Liu J P. Studies of the Molecular Mechanisms in the Regulation of Telomerase Activity[J]. FASEB J, 1999, 13(15): 2 091-2 104.
- [4] Dhaene K, van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, Telomerase and Cancer: An Up-Date[J]. Virchows Arch, 2000, 437(1): 1-16.
- [5] Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, et al. Antisense-Mediated hTERT Inhibition Specifically Reduces the Growth of Human Bladder Cancer Cells[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(10 Pt 1): 3 794-3 800.
- [6] Zhang Y M, Wang Y, Liu N, et al. *In vitro* Investigations of Tumor Targeting With (99m) Tc-Labeled Antisense DNA[J]. J Nucl Med, 2001, 42(11): 1 660-1 669.
- [7] Winnard P J, Chang F, Rusckowski M, et al. Preparation and Use of NHS-MAG₃ for Technetium-99m Labeling of DNA[J]. Nucl Med Bio, 1997, 24(5): 425-432.
- [8] 邱 峰,王荣福,张春丽,等. ^{125}I 标记反义寡核苷酸及其识别淋巴瘤细胞的实验研究[J]. 中华核医学杂志, 2003, 4(2): 69-71.
- [9] 刘 萌,王荣福. NHS-MAG₃ 在反义显像中的研究应用及进展[J]. 同位素, 2004, 17(3): 164-168.
- [10] Wang Rong Fu, Liu Meng, Zhang Chun Li, et al. Detection of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) mRNA With $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Radiolabeled Antisense Probes in Malignant Tumors *in vivo* [J]. J Nucl Med, 2008, 49(Sup 1): 104-105.
- [11] 王荣福. 肿瘤正电子药物的现状和展望[J]. 核化学与放射化学, 2006, 28(2): 65-71.