

靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体的新型 RGDyC-PEG-PAMAM 纳米探针的设计制备、 ^{131}I 标记及其质量控制

钟建秋¹, 王欣璐¹, 陈永明², 尹吉林¹, 杨玉婷¹, 吴 凡¹,
李华安², 梁大成², 褚日环², 张金赫^{1,*}

1. 广州军区广州总医院 核医学科, 广东 广州 510010; 2. 中山大学 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275

摘要:本研究以具有优良生物学性能的聚酰胺-胺树状大分子(PAMAM)为纳米载体,将具有肿瘤靶向性的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)与纳米载体相连,并通过放射性核素 ^{131}I 进行标记,对标记物的体内外药效学性质进行评价,探讨将其应用于肿瘤特异显像和靶向治疗的可能性。从多肽化学修饰法角度设计精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-酪氨酸-半胱氨酸(RGDyC),利用点击化学法引入双功能基团 PEG(NHS-PEG-MAL),采用“一锅两步”法制备 RGDyC-PEG-PAMAM 纳米复合物,通过核磁共振和紫外光谱进行表征确定产物,并检测纳米粒径分布和电位,用透射电镜(TEM)观察其形态大小及分布;进一步采用氯胺 T 法进行 ^{131}I 标记,并测定标记率、标记物的稳定性及脂水分分配系数。所设计的 RGDyC-PEG-PAMAM 纳米复合物制备产率为 62.09%, ^{131}I 对其标记率为 94.68%~98.87%,标记物在体外 72 h 后放化纯大于 80%,脂水分分配系数 $\lg P$ (正辛醇/水)为 -1.59 ± 0.09 。所设计的 RGDyC-PEG-PAMAM 可采用氯胺 T 法成功完成 ^{131}I 标记,制备与标记过程高效、简捷,标记物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 具有良好稳定性和较高亲水性,成药性良好,为后期进一步考察体外肿瘤细胞摄取与生长抑制、评估人癌裸鼠异种移植瘤模型治疗及肿瘤显像等体内药效学研究奠定了基础, ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 有可能作为一个新型 SPECT 探针应用于肿瘤特异显像与靶向治疗。

关键词:聚酰胺-胺树状大分子; ^{131}I 标记;放射性同位素;整合素 $\alpha_v\beta_3$

中图分类号:R817 文献标志码:A 文章编号:0253-9950(2018)01-0074-07

doi:10.7538/hhx.2017.YX.2016091

Design and Preparation of Novel RGDyC-PEG-PAMAM Nanoprobe Targeting Integrin $\alpha_v\beta_3$ Receptor, ^{131}I Labeling and Its Quality Control

ZHONG Jian-qiu¹, WANG Xin-lu¹, CHEN Yong-ming², YIN Ji-lin¹, YANG Yu-ting¹,
WU Fan¹, LI Hua-an², LIANG Da-cheng², CHU Yue-huan², ZHANG Jin-he^{1,*}

1. Department of Nuclear Medicine, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military District, Guangzhou 510010, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: In this study, arginine-glycine-aspartic acid(RGD) with tumor targeting was att-

收稿日期:2016-11-17;修订日期:2017-04-18

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2016A030313612)

作者简介:钟建秋(1990—),男,广东东莞人,硕士研究生,放射医学专业,E-mail: zhongjianqiu@foxmail.com

* 通信联系人:张金赫(1971—),男,广东广州人,硕士,高级医师,从事肿瘤核素显像及治疗研究,E-mail: 64331671@qq.com

网络出版时间:2017-09-04;网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2045.TL.20170904.1618.004.html

ched to the polyamidoamine dendrimers(PAMAM) with excellent biological properties as the nanocarrier labeled with radionuclide ^{131}I . The pharmacodynamic properties of the labeled compounds *in vivo* and *in vitro* were evaluated, and the possibility of applying them to tumor-specific imaging and targeted therapy was discussed. The structure of the peptide Arg-Gly-Asp-Tyrosine-Cysteine(RGDyC) was determined by the chemical modification method, and then the double functional group(NHS-PEG-MAL, PEG) was introduced by the chemical method of click chemistry using “one pot two step” preparation. Nanocomposites were characterized by ^1H NMR and UV spectroscopy. And then particle size distribution and potential were detected. The morphology and size distribution were characterized by transmission electron microscopy(TEM). Chloramine T method was used to label ^{131}I , and the labeling rate, marker stability and water partition coefficient were determined. The yield of RGDyC-PEG-PAMAM nanocomposite is 62.09%. The labeling rate of RGDyC-PEG-PAMAM is 94.68%-98.87%. The radiochemical purity of the marker *in vitro* is above 80%. Water partition coefficient, $\lg P(\text{n-octanol/water})$ is -1.59 ± 0.09 . The designed RGDyC-PEG-PAMAM can successfully complete the ^{131}I labeling with the chloramine T method. The preparation and labeling process is efficient and simple. The labeling product ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM has good stability, high hydrophilicity and good druggability. The results laid the foundation of pharmacodynamics study *in vivo* and *in vitro*, including further assess of the tumor cell uptake and growth inhibition *in vitro*, human tumor xenograft model therapy and tumor imaging. The results show that ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM can be used as a novel SPECT probe for tumor-specific imaging and targeted therapy.

Key words: polyamidoamine dendrimers; ^{131}I labeling; radioisotopes; integrins $\alpha_v\beta_3$

在众多已被研究的以纳米为载体的药物传送系统中,树状纳米粒 PAMAM 以其独特的纳米结构以及多功能性,已被广泛应用于药物/基因的传递当中^[1-4]。一方面,它们能够共价结合多种靶向配体、显像药物、抗癌药物,从而能够同步达到肿瘤靶向、显像及肿瘤治疗的目的;另一方面, PAMAM 纳米的内部空腔结构使之能够包裹各种客体分子,如抗癌药物、金属^[5]。然而,早期的研究发现,较高代数的 PAMAM 纳米由于其表面具有较多的 NH_2 基团,导致其具有一定的细胞毒性、溶血反应以及肝脏毒性,这些性质限制了它们的生物学应用^[6]。为了改善 PAMAM- $(\text{NH}_2)_n$ 的生物相容性以及减少它的毒性,各种不同的方法已被用于削弱其 NH_2 基团的影响,如乙酰化和聚乙二醇化^[6-8]。聚乙二醇化不仅能够降低化合物的毒性,而且能够增加在血液中的循环时间以及通过 EPR 效应提高化合物在体内肿瘤的累积^[6,9-12]。然而仅仅通过 EPR 效应被动靶向传递,对于肿瘤靶向的作用来说是有限的^[13]。因此肿瘤靶向多肽在各种肿瘤药物探针中提供了非常重要的功能。 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白在许多实质瘤的血管

生成中具有非常关键作用,包括胶质瘤、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌等^[4,14]。 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白也会在肿瘤进行放疗过程中表达增强^[15]。而人造环状 RGD 肽(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)与 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白具有非常高亲和力,利用这些环状 RGD 肽能够提高肿瘤靶向治疗^[16-18]。已经有研究^[19]表明,PAMAM-cRGD 结合物能够提高肿瘤显像剂靶向传递的能力。再者, $^{131}\text{I}(\beta^-, 8.02\text{ d})$ 是一种常用的放射性药物的标记核素,它不仅能够用于显像,还具有治疗作用^[20]。本研究根据实验需求对 RGD 进行改造,获得 RGD 衍生物 RGDyC(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-酪氨酸-半胱氨酸),利用天冬氨酸上的巯基与 PEG 进行点击化学反应;再利用酪氨酸进行 ^{131}I 标记。首先把 RGDyC 通过 PEG 与 PAMAM 相连,合成标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM,再通过氯胺 T 法进行 ^{131}I 标记,并对其体外稳定性进行评价,以期获得一种能够对具有 RGD 受体 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白的肿瘤特异显像和靶向治疗的新型 SPECT 探针。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

第五代 PAMAM 纳米粒(MW28824.81),美国 Sigma-Aldrich 公司;RGDyC,自行设计,委托杭州中肽生化有限公司合成并纯化,相对分子质量为 594.7,纯度为 98.3%;PEG(MW2000),西安瑞禧生物科技有限公司; ^{131}I 溶液,广州原子高科同位素医药有限公司;氯胺-T、焦亚硫酸钠、 β -巯基乙醇,美国 Sigma 公司。

Zetasizer NANO ZS 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,英国 Malvern 公司;Evolution 201 型紫外光谱仪,美国 Thermo 公司;AVANCE III 400 MHz 核磁共振波谱仪,瑞士 Bruker 公司;ALPHA 1-4 LD plus 冻干机,德国 Christ 公司;Centrifuge 5804R 型高速低温离心机,德国 Eppendorf 公司;Amicon Ultra-4 离心过滤器(MWCO 10000),美国 Millipore 公司;RM-905a 放射性活度计,北京恒昌高科科学技术有限公司;TLC 薄层放射性扫描仪,美国 BIOSCAN 公司;50/PK-SGI0001 型 ITLC-SG 层析纸,美国 Agilent 公司;MN-6110 甲状腺功能测定仪,安徽中科中佳科学仪器有限公司;Color squid white 小型磁力搅拌器,德国 IKA 公司;DK-S22 型水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;电子天平(0.000 1~1.000 0 g),瑞士 Mettler Toledo 公司;JEM-1400Plus 透射电子显微镜,日本电子株式会社。

1.2 标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 的合成

标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 的合成路线示于图 1。在弱酸条件下双功能 PEG(NHS-PEG-MAL)上的马来酰亚胺基团先与 RGDyC 上的巯基基团反应。称取双功能 PEG(NHS-PEG-MAL)40 mg(17.22 μmol),加入到含有环状 RGDyC(2 mg, 6.72 μmol)的乙酸钠缓冲液(NaAc-HAc 1 mL 0.1 mol/L pH=6.0)中,在磁力搅拌器的搅拌下反应 30 s。把上一步反应中混合产物迅速转移至溶解有 PAMAM 纳米分子(4.2 mg)的硼酸(硼砂-NaOH)缓冲液(1 mL 0.05 mol/L pH=9.0)中,磁力搅拌下反应 24 h。24 h 后把反应混合物的 pH 值调至 7.0,再加入 β -巯基乙醇(2 μL , 28 μmol)结合未反应的马来酰亚胺基团,1 h 后通过超滤(4 500 r/min, 10 min, 10 次)去除游离 PEG 和 RGDyC,把水溶液冻干得浅黄色固体即为产物 RGDyC-PEG-PAMAM。

1.3 基本性质检测

称取 5 mg RGDyC-PEG-PAMAM 溶于 0.6 mL 重水(D_2O)中,采用核磁共振波谱仪检测其物质表征。用双蒸水溶解稀释 1 mg RGDyC-PEG-PAMAM 后,再采用紫外光谱仪表征、用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪检测粒径分布和电位、用透射电镜(TEM)观察其形态大小及分布。

1.4 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 的制备

产物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 的合成路线示于图 1。采用氯胺-T 的方法进行放射性核素 ^{131}I 的标记。称取 1.5 mg RGDyC-PEG-PAMAM,溶于 100 μL 磷酸缓冲液(PBS, pH=7.4),再加入 Na^{131}I 溶液 2 mCi(74 MBq, 200 μL),然后加入氯胺-T 30 μL (15 g/L),震荡反应 3 min 后,加入 50 μL (20 g/L)偏重亚硫酸钠溶液终止反应,完成标记。

1.5 标记率的测定

标记率采用快速薄层层析法(ITLC)测定。固定相为:ITLC-SG 层析纸,展开剂为甲醇。取 2 μL 反应液点样于 ITLC-SG 纸(10 mm $\times$ 150 mm)上,于甲醇中上行展开,空气中自然晾干。在展开体系中,游离 ^{131}I 随溶剂移到层析纸前沿,其 $R_f=0.9\sim 1.0$;而标记物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 停留在原点, $R_f=0.0\sim 0.1$ 。用 Bioscan 薄层放射性扫描仪对层析纸条进行扫描,并计算放射性标记率(%)。

1.6 稳定性评价

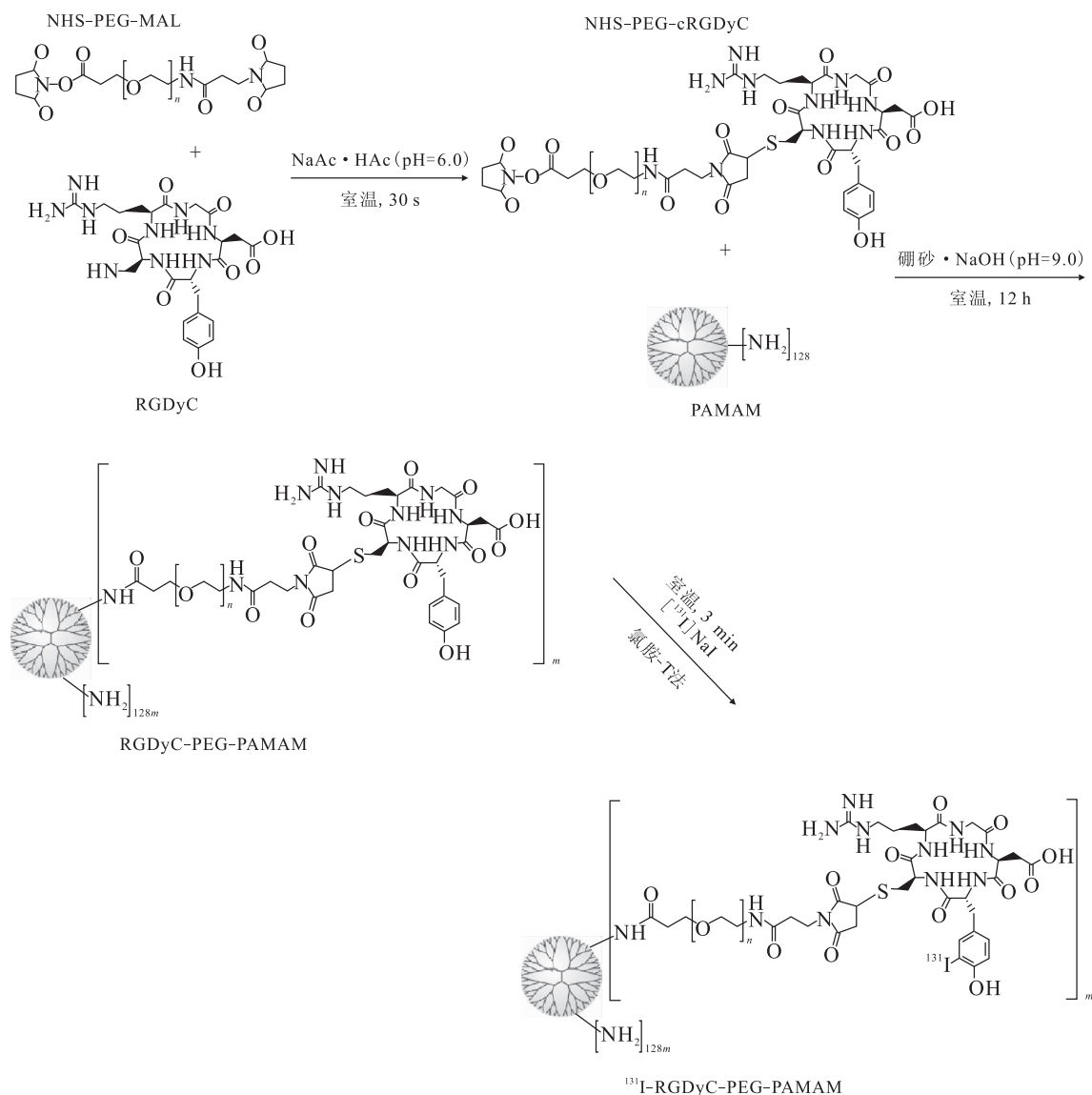
取 100 μL 标记后的产物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM,分别加入到 1 mL 的新生牛血清和 1 mL 的 PBS 中。置于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴箱中孵育 2、12、24、72 h,分别于不同时间点取少量样品用快速薄层层析法测定其放化纯度,以鉴定其体外稳定性。

1.7 脂水分配系数测定

在离心管内同时加入 500 μL 正辛醇和 480 μL PBS,并取 20 μL ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 加入该管,用胶封膜密封,充分震荡均匀后,高速离心 3 min(10 000 r/min),至正辛醇与 PBS 两相平衡。从有机相和水相各取样 100 μL 分别置于两只离心管中,分别测量其放射性计数。重复取样测定三次。按下式计算脂水分配系数($\lg P$)。

$$\lg P = \lg(N(\text{正辛醇})/N(\text{PBS}))$$

其中, $N(\text{正辛醇})$ 和 $N(\text{PBS})$ 分别为 100 μL 正辛醇和 100 μL PBS 中的平均放射性计数。

图1 标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 与产物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 的合成路线Fig. 1 Synthesis of RGDyC-PEG-PAMAM and ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM

2 结果与讨论

2.1 标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 的合成

该前体合成参考了文献[21], 经过设计的 RGD 衍生物 RGDyC 中含有巯基基团, 该基团与 PEG 一端的马来酰亚胺基团在弱酸条件下发生快速的点击化学反应, 反应时间仅需 30 s 即可完成。紧接着投入 PAMAM 纳米粒进行反应, 其 PEG 衍生物能够与 PAMAM 上氨基结合, 此步骤不仅降低了 PAMAM 纳米本身具有的体内毒性, 而且增加了药物的亲水性, 对于药物在体内的循环非常有帮助^[6]。反应完成后, 药物进行超滤纯化, 最后置于冻干机冻干, 得到标记前体

RGDyC-PEG-PAMAM 30 mg。其产率为 62.09%。此反应采用“一锅两步”法进行, 反应步骤简单, 而且反应快速、高效。

2.2 基本性质检测

纯化后的 RGDyC-PEG-PAMAM 复合物呈浅黄色固体, 经核磁共振氢谱 (400 MHz, D_2O) 确认为目标产物 (图 2), 其 PAMAM 的特征质子峰在 $\delta = 2.50 \times 10^{-6}$ 处, 为 $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2-$ 上的氢原子的特征峰; MAL-PEG-NHS 的特征质子峰在 $\delta = (3.65 \sim 3.86) \times 10^{-6}$ 处, 为 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 重复单元氢原子, 在 $\delta = 6.88 \times 10^{-6}$ 处代表马来酰亚胺基团的双键氢原子; RGDyC 的特征质子峰在 $\delta = 6.83 \times 10^{-6}$ 和 7.14×10^{-6} 处代表 RGDyC 的

D-Phe 上苯环氢原子的特征峰。考察各个产物的 ^1H NMR 图谱,可以发现同时具有 PAMAM、PEG 和 RGDyC 的特征质子峰,证明 RGDyC-PEG-PAMAM 复合物合成成功。

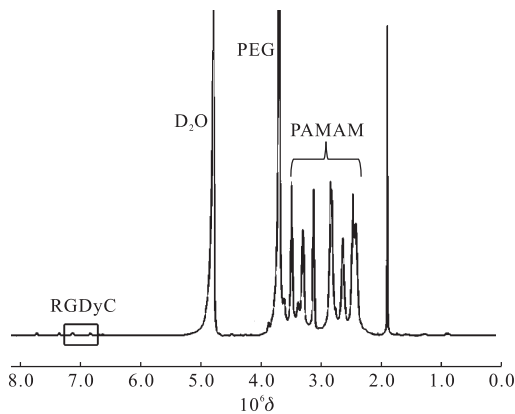


图2 标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 的 ^1H NMR 图谱

Fig. 2 ^1H NMR spectrum of RGDyC-PEG-PAMAM in D_2O

图2上 6.83×10^{-6} 和 7.14×10^{-6} 、 $(3.65 \sim 3.86) \times 10^{-6}$ 和 2.50×10^{-6} 处的峰面积分别代表 RGDyC 苯环上的 4 个氢原子、PEG 上 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 重复单元的 182 个氢原子以及 PAMAM 上的 504 个氢原子。参考文献[4, 21], 采用峰面积归一化法, 按照下面的公式计算每个 PAMAM 纳米分子表面上连接的 PEG 与 RGDyC 分子个数:

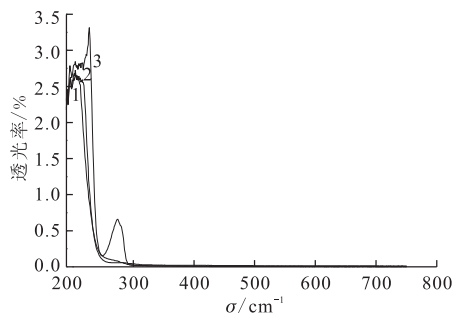
$$\alpha(\text{PEG}/\text{PAMAM}) = \frac{S_{\delta(3.65 \sim 3.86)} / 182}{S_{\delta 2.50} / 504}$$

$$\alpha(\text{RGDyC}/\text{PAMAM}) = \frac{S_{\delta(6.83 + 7.14)} / 4}{S_{\delta 2.50} / 504}$$

根据 PAMAM、PEG 以及 RGDyC 各自的特征峰的积分大小, 计算 PAMAM、PEG 以及 RGDyC 所对应的比值, 结果显示, 所得产物 RGDyC-PEG-PAMAM 中平均 1 mol PAMAM 纳米分子上大概连接上了 33.0 mol PEG 分子与 5.7 mol 的 RGDyC 分子。据文献[5]报道, 每摩尔的 PAMAM 纳米分子上只要有 2~3 mol 的 RGD 分子结合上, 就能够有效地靶向于具有相应受体的肿瘤细胞上。因此, 合成的 RGDyC-PEG-PAMAM 有可能作为一个靶向肿瘤的纳米载体。

RGDyC-PEG-PAMAM 的紫外吸收光谱示于图3。由图3可见, RGDyC-PEG-PAMAM 的紫外光谱曲线表明在 RGDyC 的特征吸收波长处也有吸收, 证明 RGDyC 已经通过 PEG 与 PAMAM 纳米

粒相连, 即复合物 RGDyC-PEG-PAMAM 合成成功。



1——RGDyC-PEG-PAMAM, 2——PAMAM, 3——RGDyC

图3 标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 的紫外吸收光谱

Fig. 3 UV spectrum of RGDyC-PEG-PAMAM

RGDyC-PEG-PAMAM 的粒径分布示于图4, 透射电子显微镜 (TEM) 图像示于图5。RGDyC-PEG-PAMAM 的流体动力学粒径大部分为 32.67 nm 左右。TEM 图像显示合成的 RGDyC-PEG-PAMAM 为球形纳米复合体, 平均直径为 22.08 nm 左右。

2.3 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 的制备

^{131}I 具有优良的化学性质以及核性质, 其半衰期为 8.02 d, 能够同时发射 β 射线 (99%) 和 γ 射线 (1%), 其特殊的性质不仅已在临床显像与治疗中发挥着重要作用, 也被广泛用于标记各种多肽合成放射性药物。因此本实验选择 ^{131}I 对具有靶向的纳米载体进行了标记合成。

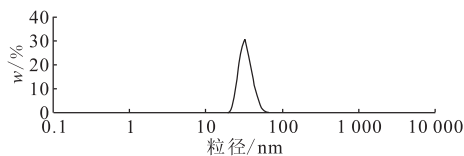


图4 标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of RGDyC-PEG-PAMAM

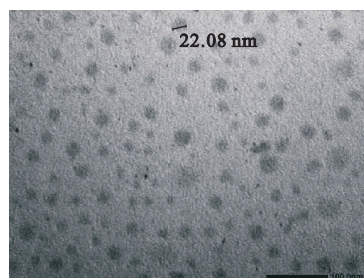


图5 标记前体 RGDyC-PEG-PAMAM 的透射电子显微镜 (TEM) 图像

Fig. 5 TEM image of RGDyC-PEG-PAMAM

$^{131}\text{I}^-$ 离子在氧化剂氯胺-T 的作用下进行氧化,随之与 RGDyC 中的酪氨酸基团进行取代反应,灭活氧化剂后得到标记产物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM。采用快速薄层层析法测定其标记率,结果示于图 6。图 6 中曲线 1 为 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM,曲线 2 为游离 $^{131}\text{I}^-$,所得产物的标记率为 94.68%~98.87%,比活度为 $2.96\times 10^{12}\text{ Bq/kg}$ 。此方法合成简单、快速,放射化学产率和比活度高,无需纯化即可获得高比活度的产物,对于以后的显像以及疗效方面的研究非常有利。

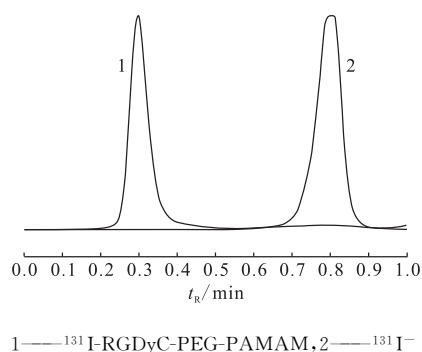


图 6 产物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 及游离 $^{131}\text{I}^-$ 的 ITLC 图谱

Fig. 6 ITLC graph of ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM and free $^{131}\text{I}^-$

2.4 稳定性评价

放射性药物必须要有足够的体外稳定性。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境下, ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM (231.25 GBq/L) 在新生牛血清(FBS)和 PBS 中分别孵育 2、12、24、72 h 后,用 Radio-TLC 测定其放射化学纯度(RCP),结果示于图 7。由图 7

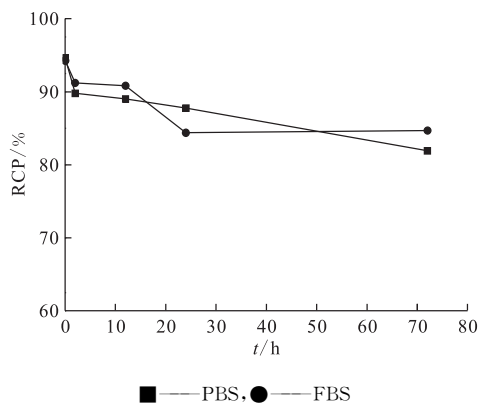


图 7 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 在 PBS 和小牛血清中的稳定性

Fig. 7 Stability of ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM in PBS and FBS

可知,标记物 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 在 PBS 与小牛血清中均具有良好的体外稳定性。这对于放射性探针的进一步体内生物学评价提供了很好的基础。

2.5 脂水分配系数

^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 的脂水分配系数 $\lg P = -1.59 \pm 0.09 (n=3)$, 药物表现出较高的水溶性,这归结于 PEG 对纳米粒子表面的修饰,从而提高药物在体内的分布运转,延长其体内的循环时间,使该探针更有效地作用于靶点。目标产物表面亲水,内核亲脂,对于包裹药物及体内的长时间循环提供了良好的条件。

3 结 论

通过合成 PEG 两端的基团,PAMAM 把纳米粒以及 RGDyC 连接在一起,而且 RGDyC 的巯基能与 PEG 的马来酰亚胺基团进行快速的点击化学反应,能够快捷、方便、高效地合成标记前体。最后通过设计好的 RGDyC 上的酪氨酸进行 ^{131}I 标记,合成具有特异显像与靶向治疗于一体的分子显像探针—— ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM。其制备方法简单快速、具有较高的标记率及纯度。 ^{131}I -RGDyC-PEG-PAMAM 探针具有亲水性,在机体内有较好的循环周期,并且具有良好的体外稳定性,没有明显脱碘或降解现象,为进一步的生物学实验提供了良好的基础。

参考文献:

[1] Chen Z, Lian F, Wang X, et al. Arginine-glycine-aspartic acid-polyethylene glycol-polyamidoamine dendrimer conjugate improves liver-cell aggregation and function in 3-D spheroid culture[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 4247-4259.

[2] Kesharwani P, Jain K, Jain N K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery[J]. Prog Polym Sci, 2014, 39(2): 268-307.

[3] Zhu J, Shi X, Mater J. Dendrimer-based nanodevices for targeted drug delivery applications[J]. J Mater Chem B, 2013(1): 4199-4211.

[4] Saraswathy M, Knight G T, Pilla S, et al. Multifunctional drug nanocarriers formed by cRGD-conjugated β CD-PAMAM-PEG for targeted cancer therapy[J]. Colloids Surf B, 2015, 126: 590-597.

[5] He X, Alves C S, Oliveira N, et al. RGD peptide-modified multifunctional dendrimer platform for drug

- encapsulation and targeted inhibition of cancer cells[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 125: 82-89.
- [6] Liu J, Liu J, Chu L, et al. Synthesis, biodistribution, and imaging of PEGylated-acetylated poly-amidoamine dendrimers[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14(5): 3305-3312.
- [7] Zhang Y, Sun Y, Xu X, et al. Synthesis, biodistribution, and microsingle photon emission computed tomography(SPECT) imaging study of technetium-99m labeled PEGylated dendrimer poly(amidoamine) (PAMAM)-folic acid conjugates[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(8): 3262-3272.
- [8] Kolhatkar R B, Kitchens K M, Swaan P W, et al. Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability[J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(6): 2054-2060.
- [9] Eskandari N, Yavari K, Outokesh M, et al. Iodine-131 radiolabeling of poly ethylene glycol-coated gold nanorods for *in vivo* imaging[J]. *J Labelled Comp Radiopharm*, 2013, 56(1): 12-16.
- [10] Karthikeyan R, Kumar P M, Kumar P V. PEGylated dendritic nanoarchitecture improves mean survival time of BDF1 mice bearing myelogenous k-562 leukemia[J]. *Acute Dis*, 2013, 2(4): 327-329.
- [11] Zhu S, Hong M, Tang G, et al. Partly PEGylated polyamidoamine dendrimer for tumor-selective targeting of doxorubicin: the effects of PEGylation degree and drug conjugation style [J]. *Biomater*, 2010, 31(6): 1360-1371.
- [12] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 136-151.
- [13] Okamatsu A, Motoyama K, Onodera R, et al. Folate-appended β -cyclodextrin as a promising tumor targeting carrier for antitumor drugs *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(4): 724-733.
- [14] Cai W, Chen X. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonism[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6(5): 407-428.
- [15] Danhier F, le Breton A, Pr  at V. RGD-based strategies to target $\alpha_v(\beta_3)$ integrin in cancer therapy and diagnosis[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(11): 2961-2973.
- [16] Li J, Zhang X, Wang M, et al. Synthesis of a bi-functional dendrimer-based nanovehicle co-modified with RGDyC and TAT peptides for neovascular targeting and penetration[J]. *Int J Pharm*, 2016, 501(1-2): 112-123.
- [17] Morlieras J, Dufort S, Sancey L, et al. Functionalization of small rigid platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors overexpressing $\alpha_v\beta_3$ -integrins[J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(9): 1584-1597.
- [18] Chen Q, Wang H, Liu H, et al. Multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles modified with RGD peptide for targeted computed tomography/magnetic resonance dual-modal imaging of tumors[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(7): 3949-3956.
- [19] Waite C L, Roth C M. PAMAM-RGD conjugates enhance siRNA delivery through a multicellular spheroid model of malignant glioma[J]. *Bioconjug Chem*, 2009, 20(10): 1908-1916.
- [20] Zheng X B, Dong F, Yang J, et al. Synthesis and preliminary biodistribution studies of [^{131}I] SIB-PEG4-CHC in tumor-bearing mice[J]. *J Radioanal Nucl Chem*, 2011, 287(1): 113-117.
- [21] Zhu S, Qian L, Hong M, et al. RGD-modified PEG-PAMAM-DOX conjugate: *in vitro* and *in vivo* targeting to both tumor neovascular endothelial cells and tumor cells[J]. *Adv Mater*, 2011, 23(12): H84-H89.