

$^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 肿瘤靶向肽的标记和性质鉴定

杜毓菁¹, 闫平¹, 陈钊¹, 姜巧¹, 段小江¹, 王荣福^{1,2,*}

1. 北京大学第一医院 核医学科, 北京 100034; 2. 北京大学国际医院 核医学科, 北京 102206

摘要: 将具有肿瘤靶向性的精氨酸-精氨酸-亮氨酸(RRL)多肽与双功能螯合剂 MAG₃ 相连, 摸索其螯合 $^{99}\text{Tc}^m$ 的适宜标记条件并评价探针的体外稳定性。标记利用 SnCl₂ 还原法进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记, 对影响标记的主要变量因素分别进行探究以获得适宜标记条件, 采用纸层析法测定标记率和放射化学纯度。实验所得 MAG₃-RRL 纯度为 98.94%, 适宜标记条件下, 标记率为 93.67% ± 1.10%, 纯化后放射化学纯度为 94.32% ± 0.19% (n=3)。 $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 在生理盐水和 50% 牛血清白蛋白(BSA)中放置, 6 h 内放射化学纯度均大于 90% (n=3), 在半胱氨酸溶液中的最高置换率为 0.57% ± 0.21%, 生理盐水对照为 0.41% ± 0.04% (n=3, P>0.05)。 $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 的脂水分配系数为 lg P = -0.15 ± 0.01 (n=3)。结果表明: MAG₃ 可成功连接 RRL 多肽, 并能进一步提高标记率; 探针制备方法简单快速, 体外稳定性好, 为进一步的生物学实验提供了良好的基础。

关键词: 精氨酸-精氨酸-亮氨酸; $^{99}\text{Tc}^m$; MAG₃

中图分类号: R817.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2020)03-0155-06

doi: 10.7538/hhx.2020.YX.2019086

Labeling and Characterization of $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL Tumor Targeting Peptide

DU Yu-jing¹, YAN Ping¹, CHEN Zhao¹, JIANG Qiao¹, DUAN Xiao-jiang¹, WANG Rong-fu^{1,2,*}

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

2. Department of Nuclear Medicine, Peking University International Hospital, Beijing 102206, China

Abstract: Arginine-arginine-leucine(RRL) a tumor targeting peptide is designed to link the bifunctional chelator mercaptoacetyltriglycine(MAG₃), aiming to explore the labeling conditions of $^{99}\text{Tc}^m$ and to evaluate the stability of this probe *in vitro*. Then $^{99}\text{Tc}^m$ was labeled through the SnCl₂ reduction method, and the main factors affecting the labeling were investigated respectively to obtain the suitable labeling conditions. The paper chromatography was used to determine the labeling rate and radiochemical purity. As a result, the purity of MAG₃-RRL is 98.94%. Under the suitable labeling conditions, the labeling rate is 93.67% ± 1.10%, and the radiochemical purity is 94.32% ± 0.19% (n=3). When $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL is placed in normal saline at room temperature and 50% BSA at 37 °C, the radiochemical

收稿日期: 2019-12-09; 修订日期: 2020-01-15

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ03011409); 十二五国家支撑项目(2014BAA03B03); 北京市科技计划项目(首都健康保障培育研究专项课题, Z181100001618017); 北京大学医学青年科技创新平台发展基金(BMU2018MI010)

作者简介: 杜毓菁(1993—), 女, 四川南充人, 博士研究生, 医学影像与核医学专业, E-mail: dyjnuclearmedical@163.com

* 通信联系人: 王荣福(1955—), 男, 福建南平人, 博士, 教授, 博士生导师, 从事临床核医学、分子核医学和放射性药物应用研究, E-mail: rongfu_wang@163.com

purity of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MAG₃-RRL is more than 90% ($n=3$) within 6 hours. The highest replacement rate of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MAG₃-RRL is $0.57\% \pm 0.21\%$ in cysteine solution, and $0.41\% \pm 0.04\%$ in normal saline control ($n=3$, $P>0.05$). The distribution coefficient $\lg P$ of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MAG₃-RRL is -0.15 ± 0.01 ($n=3$). In conclusion, the results show that MAG₃ can successfully be connected to RRL polypeptide and further improve the labeling rate, and the preparation method of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MAG₃-RRL is simple and fast. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MAG₃-RRL probe has good stability *in vitro*, which provides a good basis for further biological experiments.

Key words: arginine-arginine-leucine; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$; MAG₃

多肽类显像剂的显像应用和化学开发一直都是核医学和核放射化学的研究重点^[1-3]。一般来说,小分子多肽具有易于人工合成、可控性高、分子量小、活性高、毒性低的优点,故具有较好的临床转化前景,可被应用于各种核素的标记^[4-5]。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 可发射 141 keV 的纯 γ 射线,同时化学价态多样,从钼钨发生器获取较为便捷,所以是多肽核素标记的常用核素。精氨酸-精氨酸-亮氨酸(Arg-Arg-Leu, RRL)是一种经噬菌体文库筛选并验证对肿瘤新生血管内皮细胞^[5]和各种肿瘤细胞同时具有特异靶向性的寡肽序列^[6-7],其可被¹³¹I^[8]、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ^[9]、⁶⁸Ga^[10]等核素标记。原有 RRL 多肽的序列极难被 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记,本课题组根据文献^[11]在其氨基末端添加甘氨酸-甘氨酸-(D)丙氨酸-甘氨酸(Gly-Gly-(D)Ala-Gly)四肽以进行修饰,所形成天然穴状结构可螯合 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 。该法标记率为 70%~80%,放射化学纯度在 90%以上^[12]。但是该直接标记的方法难以满足实际临床转化的标准,故本工作拟用双功能螯合剂巯基乙酰基三甘氨酸(MAG₃)连接多肽,探究其提高核素标记率的可能并对其体外稳定性进行评估。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

SMA3000 型紫外分光光度计,北京华大基因研究中心;RM905 型放射性活度仪,中国计量科学研究院;FT-163 γ 井型计数器,北京核仪器厂;BS110S 电子天平,精度 0.000 1 g,德国 Startorius 公司;pH 测量计,意大利 Hanna 公司;电热恒温水浴锅,上海医疗器械三厂;Tetras 多肽合成仪,美国 CreoSalus 公司;Sep-pak C18 固相萃取小柱,美国 Waters 公司。

MAG₃-多肽,自行设计,委托北京中科亚光科技有限公司合成并纯化,相对分子质量为 1 535.63,纯度为 98.94%;无水 SnCl₂,北京伊诺

凯公司;Na⁹⁹Tc^mO₄溶液,北京原子高科股份有限公司;NaHCO₃、丙酮、正辛醇、氨水(分析纯)等,购自北京化工厂;L-半胱氨酸(纯度 $\geq 99.0\%$),牛血清白蛋白粉末(纯度 97%),北京索莱宝科技有限公司。

1.2 MAG₃-多肽的合成

RRL 为核心功能区的十六肽氨基酸序列为 Gly-(D-Ala)-Gly-Gly-Lys-(D-Ser)-(D-Ser)-Cys-Gly-Gly-Arg-Arg-Leu-Gly-Gly-Cys,其中 Cys-Cys 成环。实验设计将羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)-MAG₃ 偶联在多肽 Gly 末端的氨基上,从而形成 MAG₃-多肽复合物。在北京中科亚光科技有限公司的协助下,采用下列技术路线:首先合成 S-乙酰基巯基乙酰-N-羟基丁二酰亚胺(SATA),即巯基乙酸和乙酸酐(摩尔比为 1:1.1)在室温下反应 4 d,反应产物以减压蒸馏(115~125 °C、267~400 Pa)纯化,得到高纯度的乙酰化巯基乙酸,然后将 75 mmol 乙酰化巯基乙酸与 75 mmol NHS 溶解于 150 mL 二氧杂环乙烷中,在 4 °C 下与 75 mmol 二环己基碳二亚胺(DCC)反应 16 h,过滤去除二环己胺,溶剂经真空冻干后用异丙醇 2 次重结晶而得到 SATA。然后采用自动多肽合成仪常规固相法合成目标多肽,并在合成过程中直接在其 N 端连接 3 个甘氨酸,且在最后一个氨基酸接完后去保护,加入 SATA、二异丙基乙胺(3 mol/L DIEA)及 1-羟基,苯并,三氯唑四甲基六氟磷酸盐(HB-TU)、1-羟基苯并三唑(HOBT)反应 60 min,比例为 1:3:7:3:3,茚三酮反应检测为黄色即可。然后用 N-甲基吡咯烷酮、二氯甲烷交替洗 6 次抽干。把切割液(1 mL 乙二硫醇、1 mL 苯甲硫醚、68 mL 三氟乙酸、0.5 g 苯酚、0.4 mL H₂O、0.1 mL 三异丙基硅烷)倒入树脂中,反应 3~4 h 后抽滤,用乙醚沉淀、离心 4 次,最后晾干,纯化得 RRL-MAG₃ 复合物,粗品到纯品大概回收率是 10%~20%。产物经 HPLC 和

质谱鉴定,其中 HPLC 条件为:流动相 A 液为 0.05%(体积分数,下同)三氟乙酸的 2%乙腈,B 液为 0.05%三氟乙酸的 90%乙腈,流速为 1.0 mL/min,梯度为第 1—20 min,B 液从 5%—25%。

1.3 ⁹⁹Tc^m 标记

参考文献[13-14]一步法进行⁹⁹Tc^m的多肽标记。标记缓冲液是由 0.25 mol/L NaHCO₃、0.18 mol/L 氨水、0.125 mol/L 醋酸铵配制而成的混合溶液。在标记条件摸索中,设定多肽含量为 30 μg,⁹⁹Tc^mO₄⁻淋洗液的放射性活度为 7.4×10⁷ Bq,反应时间为 30 min,再对主要影响标记结果的变量因素先后分别进行标记,以摸索适宜标记条件。变量因素有:反应体系最终 pH 值分别为 6.0~6.5、7.0~7.5、8.0~8.5;SnCl₂ 用量(临用前用 1 mmol/L HCl 新鲜配制)分别为 2.5、5、10、15、20 μg;反应温度分别为常温、65 °C、沸水浴;反应总体积分别为 125、175、225 μL。标记过程具体如下:将 30 μL 多肽溶液(1 g/L,溶于超纯水中)与 50 μL 标记缓冲液混合,再先后加入一定体积的 SnCl₂(1 g/L)和 50 μL ⁹⁹Tc^mO₄⁻淋洗液,最后反应体系采用 NaOH/HCl 调节 pH 值,标记缓冲液调节反应总体积。标记率的测定采用纸层析法,固相为新华 I 号滤纸,展开剂 I 为乙醇:氨水:水(体积比 2:1:5),展开剂 II 为丙酮。参考文献[15]报道方法进行纯化,即先用 10 mL 无水乙醇冲洗、活化 Sep-Pak C18 柱,再用 10 mL 的纯水清洗残液,然后用 1 mL 注射器抽取标记反应液并上样,最后用 0.5 mL 80%乙醇溶液缓慢连续洗脱得到纯化产物,风干溶解备用。用纸层析法测定纯化产物的放射化学纯度。

1.4 体外稳定性的测定

取经纯化的⁹⁹Tc^m-MAG₃-RRL 各 100 μL 分别加入 2 倍体积的生理盐水和 50%牛血清蛋白(BSA)中,分别于室温和 37 °C 下放置 1、2、4、6 h,然后取少量样品用纸层析法测定其放射化学纯度。

1.5 半胱氨酸置换实验

取 100 μL 浓度分别为 100、200、300、400、500 mmol/L 的半胱氨酸溶液,分别加入纯化后 50 μL(1.85 MBq)⁹⁹Tc^m-MAG₃-RRL 混匀后,37 °C 温育 1 h,再同前述纸层析法(展开剂为丙酮)计算半胱氨酸对⁹⁹Tc^m-MAG₃-RRL 中⁹⁹Tc^m的置换率。对照组使用等体积的生理盐水。计算公式如下:半胱氨酸置换率(%)=丙酮展开剂前沿放射性计数/丙酮展开剂纸层析总放射性计数×100%。

1.6 脂水分配系数的测定

在 1.5 mL 离心管中同时加入 500 μL 正辛醇和 480 μL 磷酸盐缓冲液(PBS),再取 20 μL ⁹⁹Tc^m-MAG₃-RRL 加入该管,用封口膜密封。充分振荡 1 min 后高速离心 5 min,静置 10 s。用移液枪分别从有机相和水相各取样 100 μL 液体,并连同枪头置于干净的放免管中,分别测量其放射性计数,计算脂水分配系数(lg P)。计算公式如下:lg P=lg(N(正辛醇)/N(PBS))。其中,N(正辛醇)和 N(PBS)分别为所测正辛醇和 PBS 的平均放射性计数。

1.7 统计学方法

所有数据均以平均值±标准差表示。采用统计软件 SPSS 20.0,多组间比较采用单因素方差分析,若 P<0.05 则认为有显著统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 MAG₃-多肽的合成和标记结果

单纯依靠 G-(D-Ala)-GGK-(D-Ser)-(D-Ser)-CGGRRLGGC-NH₂(C-C 成环)多肽中的天然短肽穴状结构一方面可以延缓药物代谢时间,另一方面能够增加⁹⁹Tc^m的标记率。但是如文献[16]报道,其标记远不能满足实际临床需求,故本工作引入了双功能螯合剂。目前⁹⁹Tc^m标记常用的螯合剂有二乙烯三氨五乙酸(DTPA)、胍基烟酰胺(HYNIC)、乙二氨四乙酸(EDTA)、巯基乙酰基三甘氨酸(MAG₃)等。其中,使用 DTPA 作为螯合剂的报道较少,因为⁹⁹Tc^m与 DTPA 结合位点少,所以⁹⁹Tc^m对 DTPA 的亲合率比较低,因此⁹⁹Tc^m不适合标记 DTPA-多肽结合物。HYNIC 能与⁹⁹Tc^m形成⁹⁹Tc^m-N,但是其配位的部位不能完全螯合⁹⁹Tc^m,因此需要乙二胺乙酸酯(EDDA)或甲基甘氨酸(Tricine)进行辅助配位^[17],此过程 EDDA/Tricine 的选择会成为标记过程的不确定变量。相比之下,MAG₃ 标记方法简单,变量可控,标记率高,不仅可作为⁹⁹Tc^m的双功能螯合剂,¹⁸⁸Re 标记中也同样适用^[18]。故本工作选择 MAG₃-多肽结合物进行标记研究。由于多肽合成采用固相合成法,一般从 C 端(羧基端)向 N 端(氨基端)依次添加所需氨基酸,所以在 Gly 合成开始便设计连接三甘氨酸,便于肽链形成后将事先合成好的 SATA 与三甘氨酸反应完成偶联。本实验成功合成 MAG₃-G-(D-Ala)-GGK-(D-Ser)-(D-Ser)-CGGRRLGGC-NH₂(C-C 成环)多肽,质谱检测其相对分子质量为 1 536.58,理论相

对分子质量为 1 535.63, 高效液相色谱测量纯度为 98.94%, 结果示于图 1、图 2。

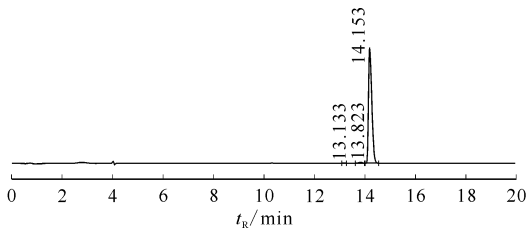


图 1 MAG₃-RRL HPLC 分析结果

Fig. 1 MAG₃-RRL HPLC analysis results

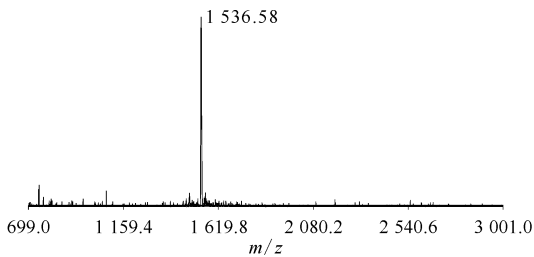


图 2 MAG₃-RRL MS 分析结果

Fig. 2 MAG₃-RRL MS analysis results

pH、SnCl₂ 用量、反应温度、反应总体积对标记率的影响示于图 3。由图 3 可得最适宜标记条件为: 缓冲液 90 μL, 多肽含量为 30 μg(1 g/L), ⁹⁹Tc^mO₄⁻ 50 μL(淋洗液的放射性活度为 7.4 × 10⁷ Bq), SnCl₂ 用量 5 μg(1 g/L), 沸水浴下反应时间 30 min, 反应体系最终 pH 值为 8.0~8.5。 ⁹⁹Tc^m-MAG₃-RRL 在纸层析展开中的比移值为

0~0.1(丙酮)、0.8~1.0(氨水混合液); ⁹⁹Tc^mO₄⁻ 比移值为 0.9~1.0(丙酮)、0.9~1.0(氨水混合物); ⁹⁹Tc^m 胶体比移值为 0~0.1(丙酮)、0~0.1(氨水混合液)。此条件下标记率为 93.67% ± 1.10%, 游离锝为 0.42% ± 0.23%, 胶体锝 5.91% ± 1.3%, 放射化学纯度为 94.32% ± 0.19% (n=3), 比活度约为 27 MBq/mmol。一般来说, NHS-MAG₃ 的羟基琥珀酰胺端的酰基可以与多肽的氨基或羧基等亲核基团进行反应, 而其巯基端上的 S 与三甘氨酸上的三个 N 能协同螯合 ⁹⁹Tc^m。实验结果提示 NHS-MAG₃ 适用于 RRL 多肽的标记, 在标记过程中受 pH 和温度的影响明显。Okarvi^[19] 用 NHS-MAG₃ 辅助多肽螯合 ⁹⁹Tc^m 时也有过类似发现, 标记率在一定范围内随 pH 的升高而升高(30% 至 95% 以上), 其中最可能原因为碱性环境有利于 MAG₃ 的氮酰胺基去质子化和脱 S-苯甲酰基保护基团。这两种效应可增加 MAG₃ 与 ⁹⁹Tc^m 的配位^[20-21]。但是过高的 pH 值可能会影响 SnCl₂ 的还原能力和引起多肽水解。除了 pH 以外, 本实验中温度也是影响标记率的关键因素, 文献^[22] 报道其标记 TAG-72 靶向多肽的最佳温度为 95 °C。本实验结果与以往文献的结果^[23] 基本符合。此外值得一提的是本工作并未对多肽含量、高锝剂量、反应时间以及酒石酸盐浓度等因素列入探究, 其也可能是影响标记率的影响因素之一。

2.2 MAG₃-多肽的体外稳定性结果

临床多肽标记药盒一般多用可注射生理盐水稀释, 故本工作根据临床实际情况按室温下可注

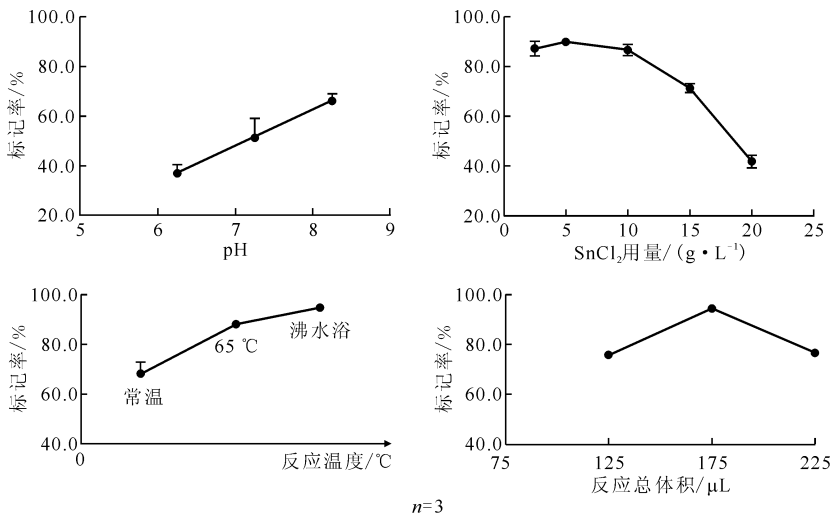


图 3 pH、SnCl₂ 用量、反应温度、反应总体积对标记率的影响

Fig. 3 Effect of pH, SnCl₂ dosage, reaction temperature and total volume of reaction on labeling rate

射生理盐水孵育和 37 °C 牛血清白蛋白(BSA)孵育 1 h 来分别模拟评价标记药物的体外稳定性。纯化后的标记多肽在室温下生理盐水中放置 1、2、4、6 h, 放射化学纯度分别为 94.00% ± 1.10%、93.43% ± 0.83%、93.27% ± 4.82%、91.06% ± 2.66% ($n=3$)。纯化后的标记多肽在 37 °C 下 50% BSA 中放置 1、2、4、6 h, 放射化学纯度分别为 97.10% ± 0.27%、96.16% ± 0.33%、96.26% ± 0.15%、94.27% ± 1.14% ($n=3$), 结果示于图 4。图 4 结果显示, $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 在生理盐水和 50% BSA 中放置 6 h 以内的稳定性较好, 放化纯均在 90% 以上, 其中在 50% BSA 中的稳定性更好。姚宁等^[24]报道, $^{99}\text{Tc}^m$ -RRL 标记物在室温生理盐水和 37 °C 人血清中, 其放射化学纯度 24 h 内均大于 93%。赵倩等^[25]也有类似报道, 在室温/37 °C 的生理盐水和正常人血清两种介质中共孵育 1、2、4、6 h 后, $^{99}\text{Tc}^m$ -RRL 的放射化学纯度也始终大于 93%, 且正常人血清中的放射化学纯度在各个时间点均大于生理盐水, 与本实验结果趋势相同。但是本实验中 $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 在生理盐水中的稳定性低于前述文献报道, 提示 MAG₃ 的加入可能对多肽标记物在生理盐水中的稳定性有一定影响。

2.3 MAG₃-多肽的半胱氨酸置换实验和 lg P

由于生物体内含有一些游离的巯基化合物, 与 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记物在体内竞争配合, 体外半胱氨酸置换实验结果可以间接反映标记物在生物体内的稳定性。纯化后标记多肽在 100 μL 100、200、300、400、500 mmol/L 的半胱氨酸溶液中的置换率分别为 0.41% ± 0.14%、0.45% ± 0.24%、0.53% ± 0.04%、0.55% ± 0.17%、0.57% ± 0.21%, 生理盐水对照为 0.41% ± 0.04%, 无统计学差异 ($n=3$,

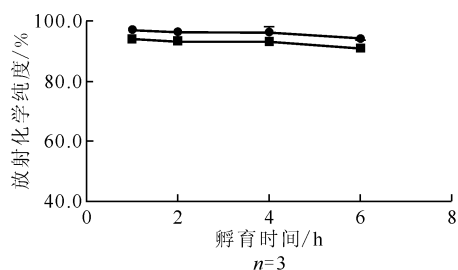


图 4 $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 在生理盐水和 50% BSA 中的放射化学纯度

Fig. 4 Radiochemical purity of $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL in normal saline and 50% BSA

$P>0.05$)。结果提示: 游离锝含量随半胱氨酸浓度增加而略有增加, 在 500 mmol/L 半胱氨酸溶液下增加约 0.16%。这表明 $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 的体内稳定性可能较好, 不易脱锝。原因可能是因为 MAG₃ 对 $^{99}\text{Tc}^m$ 的螯合能力比较强, 不易受半胱氨酸的影响。 $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 的脂水分配系数 $\lg P = -0.15 \pm 0.01$ ($n=3$), 结果显示药物有一定水溶性。一般亲脂性结构更容易与细胞靶点蛋白结合, 较强的水溶性虽然利于机体代谢, 但是使得标记多肽在体内循环时间过短, 不利于在肿瘤处更好富集^[25]。总体而言, 小分子多肽在体内的代谢分布易于优化^[26-28]。有学者^[29-30]报道用 PEG 修饰的多肽探针对标记率、稳定性影响较小, 且同时能改善水脂分配, 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

将 MAG₃ 作为双功能螯合剂连接 RRL 多肽可进一步螯合 $^{99}\text{Tc}^m$, 提高标记率至 90% 以上。同时 $^{99}\text{Tc}^m$ -MAG₃-RRL 的制备方法简单快速且具有较高的标记率及放射化学纯度。此外探针体外稳定性较好且具有一定亲水性, 可为进一步体内实验奠定基础。

参考文献:

- [1] Zhang Pengcheng, Cui Yonggang, Caleb F A, et al. Peptide-based nanoprobe for molecular imaging and disease diagnostics[J]. Chem Soc Rev, 2018, 47(3): 1585-1593.
- [2] 王荣福. 同位素示踪 RRL 肿瘤新生血管显像的应用研究[J]. 同位素, 2015, 28(4): 195-200.
- [3] 庞小溪, 霍焱, 王荣福. 精准医学的核医学分子时代(专论)[J]. 标记免疫与临床, 2016, 23(10): 1119-1122.
- [4] Oliveira B L, Caravan P. Peptide-based fibrin-targeting probes for thrombus imaging[J]. Dalton Translation, 2017, 46(42): 14488-14508.
- [5] Cheng S, Lang L, Wang Z, et al. Positron emission tomography imaging of prostate cancer with Ga-68-labeled gastrin-releasing peptide receptor agonist BBN7-14 and antagonist RM26[J]. Bioconjug Chem, 2018, 29(2): 410-419.
- [6] Brown C K, Modzelewski R A, Johnson C S, et al. A novel approach for the identification of unique tumor vasculature binding peptides using an E-coli peptide display library[J]. Ann Surg Oncol, 2000, 7(10): 743-749.

- [7] Weller G E R, Wong M K K, Modzelewski R A, et al. Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(2): 533-539.
- [8] Lu X, Yan P, Wang R F, et al. Use of radioiodinated peptide Arg-Arg-Leu targeted to neovascularization as well as tumor cells in molecular tumor imaging[J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(1): 52-59.
- [9] Zhao Q, Yan P, Yin L, et al. Validation study of ^{131}I -RRL: assessment of biodistribution, SPECT imaging and radiation dosimetry in mice[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4): 1355-1360.
- [10] Kim D W, Kim W H, Kim M H, et al. Synthesis and evaluation of Tc-99m-labeled RRL-containing peptide as a non-invasive tumor imaging agent in a mouse fibrosarcoma model[J]. *Ann Nucl Med*, 2015, 29(9): 779-785.
- [11] Huo Y, Kang L, Pang X, et al. Noninvasive PET imaging of a Ga-68-radiolabeled RRL-derived peptide in hepatocarcinoma murine models[J]. *Mol Imaging Biol*, 2019, 21(2): 286-296.
- [12] Thakur M L, Marcus C S, Saeed S, et al. $^{99}\text{Tc}^m$ -labeled vasoactive intestinal peptide analog for rapid localization of tumors in humans[J]. *J Nucl Med*, 2000, 41(1): 107-110.
- [13] Yao N, Yan P, Wang R F, et al. Detection of pulmonary metastases with the novel radiolabeled molecular probe, Tc-99m-RRL[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(2): 1726-1736.
- [14] Wang Y, Liu G, Hnatowich D J. Methods for MAG_3 conjugation and $^{99}\text{Tc}^m$ radiolabeling of biomolecules[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1477-1480.
- [15] Straub M, Leresche M, Pilloud C, et al. A new two-strip TLC method for the quality control of technetium-99m mercaptoacetyl-triglycine ((99m)Tc- MAG_3) [J]. *EJNMMI Radiopharm Chem*, 2018, 3(1): 5-21.
- [16] Zhao Q, Yan P, Wang R F, et al. A novel $^{99}\text{Tc}^m$ -labeled molecular probe for tumor angiogenesis imaging in hepatoma xenografts model: a pilot study[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61043.
- [17] Khodadust F, Ahmadpour S, Aligholikhamesh N, et al. An improved (99m) Tc-HYNIC-(Ser) 3-LTVSPWY peptide with EDDA/ tricine as co-ligands for targeting and imaging of HER₂ overexpression tumor[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 144: 767-773.
- [18] Kan W, Zhou Z, Wei H, et al. Effective way to radiolabel the peptide of MAG_3 -RM26 with ^{188}Re and the study on its coordination chemistry[J]. *J Radioanal Nucl Chem*, 2017, 314(3): 2087-2090.
- [19] Okarvi S M. Synthesis, radiolabeling and *in vitro* and *in vivo* characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M₂ peptide as a tumor imaging agent[J]. *J Pept Res*, 2004, 63(6): 460-468.
- [20] Okarvi S M, Adriaens P, Verbruggen A. Comparison of the labelling characteristics of mercaptoacetyltriglycine(MAG_3) with different S-protective groups[J]. *J Labelled Compd Rad*, 1997, 39(10): 853-874.
- [21] Bormans G, Cleyhens B, Adriaens P, et al. Investigation of the labeling characteristics of Tc-99m-mercaptoacetyltriglycine[J]. *Nucl Med Biol*, 1995, 22(3): 339-349.
- [22] Chen L, Wang Y, Cheng D, et al. Comparing two TAG-72 binding peptides previously identified by phage display as potential imaging agents[J]. *Nucl Med Commun*, 2011, 32(10): 920-924.
- [23] Hnatowich D J, Chang F, Lei K, et al. The influence of temperature and alkaline pH on the labeling of free and conjugated MAG_3 with technetium-99m[J]. *Appl Radiat Isotopes*, 1997, 48(5): 587-594.
- [24] 姚宁, 王荣福, 闫平, 等. $^{99}\text{Tc}^m$ -RRL 的药代动力学与急性毒性研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(16): 1610-1612.
- [25] 赵倩, 闫平, 王荣福, 等. 新型肿瘤新生血管靶向分子探针(99m)-Tc-RRL 的合成及初步研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2013, 19(12): 930-935.
- [26] 霍焱, 王荣福. ^{18}F 标记正电子药物研究现状与进展[J]. *核化学与放射化学*, 2015, 37(5): 376-380.
- [27] 王荣福. 核素示踪肿瘤新生血管研究进展与展望[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2015, 39(1): 50-54.
- [28] 庞小溪, 霍焱, 王荣福. 核素标记小分子多肽靶向诊治肿瘤新生血管的应用研究进展(专家论坛)[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(2): 68-72.
- [29] 钟建秋, 王欣璐, 陈永明, 等. 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[J]. *核化学与放射化学*, 2018, 40(1): 74-80.
- [30] Zhang J, Hu H, Liang S, et al. Targeted radiotherapy with tumor vascular homing trimeric GEBP11 peptide evaluated by multimodality imaging for gastric cancer[J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 172(1): 322-329.