

肿瘤血管生成的 SPECT 分子显像研究进展

刘晓梅 张芳 黄建敏

【摘要】 肿瘤血管生成与肿瘤生长、转移有着密切的关系。肿瘤血管生成被各种蛋白分子调控,其中包括血管内皮生长因子、 $\alpha v\beta 3$ 整合素、细胞外基质蛋白、前列腺特异性膜抗原等。它们已成为肿瘤血管生成分子影像及靶向治疗研究领域的重要分子靶点。研究并利用这些蛋白分子准确无创地评估肿瘤新生血管及肿瘤抗血管生成治疗效果的成像方法,已成为现代医学影像学的一个重要课题。

【关键词】 血管生成;血管内皮生长因子; $\alpha v\beta 3$ 整合素;细胞外基质蛋白;前列腺特异性膜抗原;体层摄影术,发射型计算机,单光子

Research advance on molecular imaging of tumor angiogenesis with SPECT Liu Xiaomei, Zhang Fang, Huang Jianmin. Department of Nuclear Medicine, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

Corresponding author: Liu Xiaomei, Email: ky121@163.com

【Abstract】 Tumor Angiogenesis is one of the key requirements of tumor growth and metastasis. Tumour-induced angiogenesis is a multistep process that controlled by growth factors, cellular receptors and adhesion molecules, such as vascular endothelial growth factor, $\alpha v\beta 3$ integrin, extracellular matrix proteins, prostate-specific membrane antigen. They have become a common molecular target which has a potential value in angiogenesis molecular imaging and therapy at present. It is an important subject of modern medical imaging in developing a new imaging method which can accurate noninvasive assessment of tumor angiogenesis and tumor anti-angiogenesis therapy effect.

【Key words】 Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor; $\alpha v\beta 3$ integrin; Extracellular matrix proteins; Prostate-specific membrane antigen; Tomography, emission-computed, single photon

肿瘤血管生成在实体肿瘤的生长和转移等生物行为过程中起关键作用,而针对肿瘤新生血管的成像,对病变检测、肿瘤分级、预后判断、肿瘤药物的研发及有效性评价、用药剂量的个性化指导、疗效的监测等都有着重要的指导意义^[1]。

当实体肿瘤直径>2~3 mm 时,仅靠单纯的养分扩散已不再能满足组织养分的供给,缺氧即可诱发肿瘤血管生成,其过程是复杂多步骤的,且被生长因子、细胞受体、黏附分子等调节和控制^[2-4],如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白、前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)等^[5-6]。这些因子在实体肿瘤中高表达,将它们作

为核医学分子显像的显像剂有着很好的应用前景。因此,本文将对肿瘤血管生成的 SPECT 分子显像的显像剂研究进行回顾性总结。

1 VEGF 受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)SPECT 显像

VEGF 是一组由 VEGF-A、VEGF-F 及胎盘生长因子组成的家族,其中 VEGF-A 具有激活受体 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的功能,在血管生成中起主要作用。VEGF-A 基因可产生 4 个亚型:VEGF-121、VEGF-165、VEGF-189 和 VEGF-206^[7]。

VEGFR 主要有 5 种亚型,其中 VEGFR-1 与 VEGFR-2 是最重要的 2 个亚型,VEGFR-1 与 VEGFR-2 相比,VEGFR-1 与 VEGF 有很高的亲和力,但 VEGFR-1 被认为是一个诱骗受体,其络氨酸激酶活性相对较低,VEGF-A 唯一的信号是经过 VEGFR-2 传递的,表明 VEGFR-2 是促进血管生成

的主要受体^[8-9]。

VEGF 的两个亚型 VEGF-121 和 VEGF-165 作为 VEGFR SPECT 显像的分子靶点的潜质被广泛研究。Yoshimoto 等^[10]将 ¹²⁵I-VEGF-121 和 ¹²⁵I-VEGF-165 作为显像剂在 LS180 肿瘤裸鼠中的分布进行研究, 结果显示, ¹²⁵I-VEGF-165 与 ¹²⁵I-VEGF-121 在肿瘤部位均有较高的摄取, 并随着肿瘤体积增大浓聚增多。¹²⁵I-VEGF-121 肿瘤摄取和 T/NT 值要高于 ¹²⁵I-VEGF-165。此项研究证实了 ¹²⁵I-VEGF-121 与 ¹²⁵I-VEGF-165 在肿瘤及转移病灶中有聚集, 但同时在甲状腺及胃中也有较高的摄取, 表明该类显像剂在体内不稳定, 易脱碘。

除应用放射性核素碘标记 VEGF 亚型外, ⁹⁹Tc^m 和 ¹¹¹In 标记 VEGF 亚型也已被研究。Blankenberg 等^[11]先用 ⁹⁹Tc^m 标记一种衔接蛋白, 然后再与对接目标融合形成目标蛋白的方法进行标记。如利用人核糖核酸激酶 I 的 109 氨基酸(HuS)与 15 氨基酸(Hu-tag)片段的相互作用, 充当衔接蛋白的作用, 用放射性核素 ⁹⁹Tc^m 标记, 然后再与目标蛋白 VEGF 连接, 即合成 ⁹⁹Tc^m-HuS/Hu-VEGF, 将其作为显像剂用于小鼠肿瘤血管生成显像, 结果发现, 在乳腺癌 4T1-luc 肿瘤裸鼠上可见数毫米大小肿瘤组织显影。在同样的肿瘤模型中, 利用胍基烟酰胺(hydrazine nicotinamide, HYNIC)螯合的 ⁹⁹Tc^m-HYNIC-VEGF 与 ⁹⁹Tc^m-HuS/Hu-VEGF 具有相同的生物学分布, ⁹⁹Tc^m-HYNIC-VEGF 用于 SPECT 显像, 在肿瘤区域显示出比较高的不均匀放射性浓聚。Blankenberg 等^[12]将对照组用 ⁹⁹Tc^m 标记生物灭活的 VEGF, 与 ⁹⁹Tc^m-HYNIC-VEGF 对比显示, 肿瘤部位放射性浓聚减少 75%, 表明生物灭活的 VEGF 不与受体结合, 从而证实了 ⁹⁹Tc^m-HYNIC-VEGF 在肿瘤部位浓聚是因特异性地与 VEGFR 结合所致。

除了对 VEGF 本身进行标记, 还可从基因水平改进 VEGF 及其受体的结构后进行标记。Chan 等^[13]利用 VEGF-165 融合一个多肽 GGGGS3, 多肽再连接到人转铁蛋白的氨基端小叶, 即合成重组蛋白 VEGF 后再用 ¹¹¹In 进行标记, 得到 ¹¹¹In-hnTf-VEGF。将其作为显像剂进行 SPECT 显像, 结果显示, 其可浓聚在人恶性胶质母细胞瘤荷瘤裸鼠的肿瘤种植部位(6.7% ID/g, 注射后 72 h)。对照组的荷瘤裸鼠先注射 100 倍过量 VEGF, 使其与肿瘤部位 VEGFR 竞争结合后, 再注射显像剂 ¹¹¹In-hnTf-VEGF,

其肿瘤种植部位摄取 ¹¹¹In-hnTf-VEGF 量减少 15 倍, 表明此显像剂特异性聚集在肿瘤部位的 VEGFR 上。Qin 等^[14]用 ¹⁸⁸Re 标记 VEGF-189, 通过将 VEGFR-2 基因截断后转染至肿瘤细胞再进行标记, 可使 ¹⁸⁸Re-VEGF-189 与 VEGFR 的亲合力增强, 进而提高肿瘤部位的 T/NT 值。

以上研究都是通过放射性核素标记 VEGF 亚型, 此外应用放射性核素标记抗 VEGF 抗体及其衍生物也有报道。贝伐单抗是抗 VEGF-A 单克隆抗体的人工化变体, 针对所有的 VEGF 亚型, 阻止它们与 VEGFR-1 和 VEGFR-2 相互作用。Nagengast 等^[15]研究证实, ⁹⁰Zr-贝伐单抗和 ¹¹¹In-贝伐单抗可在人 SKOV-3 卵巢癌移植瘤裸鼠和人 LS174T 结肠癌种植瘤裸鼠中进行特异性显像。同时, Nagengast 等^[16]用 ¹¹¹In-贝伐单抗在结肠癌肝转移患者中进行显像, 其中 12 例患者有 9 例可直观显像发现病灶。在进行核医学显像后, 肝转移瘤被切除并进一步行免疫组化分析, 通过原位杂交和利用酶联免疫吸附法证实, 肿瘤提取物中有 VEGF-A 表达。在另一项临床前的研究中, 用 ¹¹¹In-贝伐单抗和 ¹¹¹In-兰尼单抗在 SKOV-3 卵巢癌裸鼠中进行 SPECT 显像并进行对比, 二者在肿瘤部位均有较高摄取, ¹¹¹In-贝伐单抗在肿瘤部位摄取要高于 ¹¹¹In-兰尼单抗, 但 ¹¹¹In-兰尼单抗在注射后较早显像, 更适合于监控治疗后 VEGF 表达的快速改变。

总之, 用放射性核素 ¹²⁵I、¹¹¹In、⁹⁹Tc^m、¹⁸⁸Re 等标记 VEGF 亚型及抗 VEGF-A 单克隆抗体, 如贝伐单抗、兰尼单抗等作为肿瘤血管生成的 SPECT 分子显像剂, 都有着很好的应用前景。

2 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体 SPECT 显像

整合素(integrins)是细胞黏附分子家族中的一类生物大分子, 是由亚基以非共价键结合而形成的跨膜异二聚体糖蛋白, 广泛分布于细胞表面。迄今已发现 18 种不同的 α 亚单位和 8 种 β 亚单位, 组成至少 24 种整合素, 对细胞的黏附、增殖、分化、转移、凋亡起着重要的调控作用, 其中 $\alpha v\beta 3$ 整合素在肿瘤血管生成过程中发挥着重要作用。 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体, 也被称为玻连蛋白受体, 在活化的内皮细胞中高表达, 在静止的内皮细胞中缺乏。同时, $\alpha v\beta 3$ 整合素受体也在卵巢癌、成神经细胞瘤、乳腺癌、黑色素瘤等各种类型肿瘤细胞膜上有表

达。存在于活化的内皮细胞上的 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体,可调节血管生成期间的细胞迁移和成活。存在于肿瘤细胞膜上的 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体,可通过增强肿瘤细胞的侵袭和迁移而促进肿瘤转移。因此,鉴于肿瘤血管生成过程中 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体的高表达和生物学作用, $\alpha v\beta 3$ 整合素被认为适合成为肿瘤血管生成显像的靶分子^[17]。

对于整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体 SPECT 显像而言,构建分子探针常用的亲和元件主要有整合素 $\alpha v\beta 3$ 单克隆抗体,如 DM101、LM609 以及整合素 $\alpha v\beta 3$ 的配体,即为含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列的多肽。Haubner 等^[18]研究证实,含有 RGD 序列的配体与整合素 α 、 β 具有特异性的高亲和力,因此利用 RGD 与 α 、 β 整合素的特异性结合而设计的含有 RGD 的 α 、 β 整合素配体,作为 SPECT 显像的分子探针得到广泛的研究和应用。

用放射性核素标记 $\alpha v\beta 3$ 整合素配体,通过暴露的 RGD 的氨基酸部分与 ECM 蛋白(玻连蛋白、纤维蛋白原、层粘连蛋白、胶原蛋白)结合而进行显像。根据这些发现,Haubner 等^[19]设计了包含络氨酸残基的 5 个多肽,可被放射性碘化。其中两个多肽,将葡萄糖基糖氨基酸(SAA1)共轭到五肽中的赖氨酸的 ϵ 氨基上,将其糖化后再用放射性碘标记,然后在活体上进行研究,与无糖化的肽比较,结果显示:碘标糖肽,即 ^{125}I -gluco-RGD,在肝脏中浓聚减少,而在血液中的含量增加,同时也增加了肿瘤的摄取和滞留。

van Hagen 等^[20]研究证实,在循环五肽(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys)中的赖氨酸残基 ϵ 氨基端结合上 DTPA,导致 $\alpha v\beta 3$ 整合素配体被 ^{111}In 和放射性碘标记,放射性核素标记后的 $\alpha v\beta 3$ 整合素配体可特异地结合到 $\alpha v\beta 3$ 表达阳性的细胞表面。与 DTPA 结合后的多肽更具亲和力且可加速从肾中清除,而不与 DTPA 结合的放射性核素标记的多肽,主要经肝胆系统排泄。

Sivolapenko 等^[21]是第一个将人工合成 RGD 类似物(Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Tyr)在患者身上做肿瘤血管生成显像研究的。采用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记多肽(Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Tyr)作为显像剂,对 14 例黑色素瘤患者静脉注射,剂量为 185~1222 MBq,3 h 后进行显像,显像剂很快从血液中清除,主要经肾脏滤过和排泄(注射 1 h

后>90%ID 在肾脏和膀胱)。14 例患者中共有 22 个肿瘤转移病灶,其中 17 个被发现。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记 RGD 包含肽(NC100692)在局部缺血的模型中评估显示,在新生血管形成区域 $\alpha v\beta 3$ 高表达,表现高摄取^[14]。该研究表明,在这些模型中,NC100692 结合在血管生成区域的内皮细胞表达的 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体上。随后, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NC100692 在病理证实的乳腺癌患者中显像阳性,20 例恶性肿瘤患者测到 19 例,由此可知, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NC100692 能有效地探测恶性乳腺肿瘤^[22]。Bach-Gansom 等^[23]将 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NC100692 用于 25 例晚期癌症患者的研究中,其中包括 15 例肺癌、10 例乳腺癌患者。在 7 例肝转移者中 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NC100692 检测出 1 例,5 例肺转移检测出 4 例^[23],17 例骨转移检测出 8 例,1 例脑转移也被检测到。由此作者推论, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NC100692 检测肝转移的敏感性较低,检测骨转移的敏感性较可疑,而检测乳腺癌和肺癌患者的肺和脑转移是可行的。

在另一项研究中, ^{111}In 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 通过螯合剂 DOTA 和 HYNIC 标记二聚体 RGD,作为肿瘤靶分子在 OVCAR-3 荷瘤裸鼠中显像, ^{111}In -DOTA-E-[c(RGDfK)]₂ 作为显像剂,注射后 2 h 在肿瘤部位摄取峰值为 7.5%ID/g; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ 作为显像剂,注射后 1 h 在肿瘤部位的摄取峰值为 6.0%ID/g^[24]。四聚体 RGD 类似物 E[E[c(RGDfK)]₂]₂ 与 DOTA 共轭组成复合物使其呈现多价效应, ^{111}In 直接标记,测定肿瘤表达的 $\alpha v\beta 3$ 整合素,结果显示,通过四聚体标记较二聚体标记改进了与肿瘤靶点的亲和力^[24]。同样,二聚体较单一的 RGD 标记改进了与肿瘤靶点的亲和力。二聚体和四聚体通过谷氨酸残基将 RGDfK 偶联起来,用作 SPECT 的显像剂也已经被广泛地研究。所有的多聚体 RGD 显示,多聚化的 RGD 肽环加强了它们与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的亲和力,同时也改进了肿瘤对放射性显像剂的摄取。但是也增加了显像剂在肾和肝中的摄取。RGD_xK 的四聚体和八聚体太复杂,临床应用受到限制,有文献报道,四聚体和八聚体更适合受体治疗^[24]。

综上所述,有 2 个因素有助于增加多聚体 RGD 肽的 $\alpha v\beta 3$ 整合素亲和力:① $\alpha v\beta 3$ 整合素同时与 2 个 RGD 结合;② 局部较高的 RGD 浓度。为了获得瞬时整合素 $\alpha v\beta 3$ 的结合(多价),两个 RGD 序列已足够长且足够灵活,而四聚体或八聚体

RGD 蛋白多肽相对应二聚体也有不足之处,一是合成复杂,二是在非靶器官中浓聚也较高。在一个试图增加二聚体 RGD 蛋白多肽 E[c(RGDfK)]₂ 亲和力的研究中, Shi 等^[25]开发了一系列 RGD 二聚体环,包含三甘肽或聚乙二醇,用于增加 2 个 RGD 环间距离。在 U87MG 神经胶质瘤和 MDA-MB-435 乳腺癌异体移植小鼠的研究中,⁹⁹Tc^m-HYNIC-3PEG4-二聚体和⁹⁹Tc^m-HYNIC-3G3-二聚体在肿瘤部位的摄取相似于⁹⁹Tc^m-HYNIC-四聚体,提示改造后的二聚体环可增加 $\alpha v\beta 3$ 整合素的亲和力。而且,⁹⁹Tc^m-HYNIC-3PEG4-二聚体和⁹⁹Tc^m-HYNIC-3G3-二聚体在肝和肾中的摄取减少,是⁹⁹Tc^m-HYNIC-四聚体的 50%。在随后的研究中,¹¹¹In-DOTA-3PEG4-二聚体、¹¹¹In-DTPA-3PEG4-二聚体和¹¹¹In-DTPA-Bn-3PEG4-二聚体被合成,在试管和活体中被比较研究发现,他们的亲和力分别是 1.3 ± 0.2 、 1.4 ± 0.3 和 1.3 ± 0.3 nmol/L。在异体移植 U87MG 神经胶质瘤小鼠中,3 种显像剂在肿瘤部位都有较高的放射性摄取,并且肿瘤与本底比值(T/B)较高,可延续到注药 4 h 后。在这个时间点之后,由 DTPA 共轭的派生物与 DOTA 共轭的派生物相比,前者肿瘤部位的放射性清除较快且 T/B 值较低。Terry 等^[26]在对头颈部鳞癌患者的研究中证实,¹¹¹In-RGD2 可用于监测放射治疗后肿瘤生成血管的反应,并且可为临床提供一个好的工具来监测头颈部鳞状细胞癌开始放射治疗后的早期肿瘤生成血管的治疗反应,同时也可监测肿瘤抗血管生成治疗效果,如果治疗后肿瘤部位仍有¹¹¹In-RGD2 较高摄取,则表明整合素表达没有被改变。总之,可以说 3PEG4-二聚体和 3G3-二聚体更适合成为临床研究中肿瘤血管生成 SPECT 显像的靶分子。

3 ECM SPECT 显像

在新形成的血管周围有倾向性表达的纤连蛋白、层粘连蛋白、腱生蛋白、IV 型胶原。其中纤连蛋白的额外域 B 作为靶点进行肿瘤血管生成显像已经被研发。

纤连蛋白在 ECM 中是一个大的糖蛋白,纤连蛋白的额外域 B 是 91 个氨基酸序列,在小鼠、大鼠、人类中是相同的,嵌入到纤连蛋白分子中参与组织改建。纤连蛋白额外域 B 在肿瘤新生血管结构周围和有血管生成的其他组织中特异性表达,但

在正常成熟组织中不被发现。噬菌体展示技术可将针对纤连蛋白额外域 B 的单链抗体即 L19 提取。人类单链抗体 L19 对纤连蛋白额外域 B 有亲和力。Demartis 等^[27]证实,¹²³I-L19 可选择性地浓聚在侵袭性肺癌及结肠癌肝转移患者的肿瘤部位。最近, Berndorff 等^[28]将氨基酸序列(Gly)₃-Cys-Ala 嵌入在 L19 的 C 端,使抗纤连蛋白额外域 B 单链抗体即 AP39,可以用⁹⁹Tc^m 标记。研究结果显示,⁹⁹Tc^m-L19 在异体移植畸胎瘤裸鼠中靶向显像的可行性。随后,一系列不同的 L19 抗体模式被构建,包括二聚单链抗体、人二价免疫蛋白、完整人免疫球蛋白 G 等。

比较这些用放射性核素标记的不同的 L19 抗体模式,证实 L19 单列直插式最适合肿瘤 ED-B 表达的靶向显像。

4 PSMA SPECT 显像

PSMA 是一种在前列腺癌中过度表达的跨膜蛋白,¹¹¹In 标记抗 PSMA 抗体明显地浓聚在前列腺,这个抗体的制备经过美国食品与药品监督管理局验证可探测前列腺癌患者远处转移。但这个抗体与细胞内的 PSAM 表位拮抗,被认为是次优的免疫显像靶分子。PSMA 在许多实体肿瘤的新生血管内皮中有表达,而在正常组织的内皮中不表达^[29]。J591 是一个单克隆抗体,可结合到 PSMA 胞外域的表位。从前的研究已经显示,J591 浓聚在前列腺癌的转移部位。最近的研究证实,¹¹¹In-J591 检测腺癌新生血管系统的可行性,在黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌及肝脏、肾脏中都有¹¹¹In-J591 浓聚^[30]。以上研究显示,PSMA 可与肿瘤内皮细胞选择性地结合,¹¹¹In-J591 有潜力成为适合血管生成显像的靶分子。

Vallabhajosula 等^[31]研究发现,用⁹⁹Tc^m 标记小分子 PSMA 抑制剂,可以较好地结合在异体移植的前列腺癌 PSMA 阳性表达肿瘤部位。将⁹⁹Tc^m-MIP-1404 和⁹⁹Tc^m-MIP-1405 分别在 6 名健康男性和 6 例诊断为前列腺癌转移患者中进行显像,结果显示,两种显像剂均可在血液中被快速清除,在唾液腺、泪腺、腮腺中可较持久的存留,1 h 至 2 h 后肝脏和肾脏显像剂减少到可允许显像的程度。在前列腺癌患者中,两种显像剂在注射后 1 h 均可快速浓聚在受累的骨和淋巴结病灶上,且骨转移灶与全身骨

显像相比有较好的相关性,但前者发现的骨转移灶多于骨显像,且能发现骨显像不能发现的受累的组织,包括淋巴结。

5 结论

近年, SPECT 显像剂的研发在非侵袭性肿瘤血管生成显像方面取得了很大进步,包括多肽、蛋白质、抗体等,此类显像剂除具有早期诊断肿瘤患者并进行临床分期外,同时也具有选择抗肿瘤血管生成药物治疗显像的潜能,并且此类显像剂也可用于评价抗肿瘤血管生成药物的疗效。

参 考 文 献

- [1] Cai W, Chen X. Multimodality imaging of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor expression[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 4267-4279.
- [2] Stacy MR, Maxfield MW, Sinusas AJ. Targeted molecular imaging of angiogenesis in PET and SPECT: a review[J]. *Yale J Biol Med*, 2012, 85(1): 75-86.
- [3] Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, et al. Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy[J]. *Semin Oncol*, 2001, 28(5): 94-104.
- [4] Lijowski M, Caruthers S, Hu G, et al. High sensitivity: high-resolution SPECT-CT/MR molecular imaging of angiogenesis in the Vx2 model[J]. *Invest radiology*, 2009, 44(1): 15-22.
- [5] Eliceiri BP, Cheresh DA. Role of alpha v integrins during angiogenesis[J]. *Cancer J*, 2000, 6 Suppl3: S245-249.
- [6] Hynes RO, Bader BL, Hoidalva-Dilke K. Integrins in vascular development[J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(5): 501-510.
- [7] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(18): 11947-11954.
- [8] Quinn TP, Peters KG, De Vries C, et al. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(16): 7533-7537.
- [9] Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnürch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis[J]. *Cell*, 1993, 72(6): 835-846.
- [10] Yoshimoto M, Kinuya S, Kawashima A, et al. Radioiodinated VEGF to image tumor angiogenesis in a LS180 tumor xenograft model[J]. *Nucl Med Biol*, 2006, 33(8): 963-969.
- [11] Blankenberg FG, Mandl S, Cao YA, et al. Tumor imaging using a standardized radiolabeled adapter protein docked to vascular endothelial growth factor[J]. *J Nucl Med*, 2004, 45(8): 1373-1380.
- [12] Blankenberg FG, Backer MV, Levashova Z, et al. In vivo tumor angiogenesis imaging with site-specific labeled Tc-99m-HYNIC-VEGF[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 33(7): 841-848.
- [13] Chan C, Sandhu J, Guha A, et al. A human transferrin-vascular endothelial growth factor (hTf-VEGF) fusion protein containing an integrated binding site for (111) In for imaging tumor angiogenesis[J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(10): 1745-1752.
- [14] Qin ZX, Li QW, Liu GY, et al. Imaging targeted at tumor with (188) Re-labeled VEGF(189) exon 6-encoded peptide and effects of the transfecting truncated KDR gene in tumor-bearing nude mice[J]. *Nucl Med Biol*, 2009, 36(5): 535-543.
- [15] Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, et al. In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft[J]. *J Nucl Med*, 2007, 48(8): 1313-1319.
- [16] Nagengast WB, Hooge MN, van Straten EM, et al. VEGF-SPECT with In-111-bevacizumab in stage III/IV melanoma patients[J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(10): 1595-1602.
- [17] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 27-31.
- [18] Haubner R, Maschauer S, Einsiedel J, et al. H-CRRETAWAC-OH, a Lead structure for the development of radiotracer targeting integrin $\alpha 5 \beta 1$ [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014: 243185 [2014-10-20]. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/243185/>.
- [19] Haubner R, Wester HJ, Burkhart F, et al. Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics[J]. *J Nucl Med*, 2001, 42(2): 326-336.
- [20] van Hagen PM, Breeman WA, Bernard HF, et al. Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumour imaging and radionuclide therapy[J]. *Int J Cancer*, 2000, 90(4): 186-198.
- [21] Sivolapenko GB, Skarlos D, Pectasides D, Stathopoulou E, et al. Imaging of metastatic melanoma utilising a technetium-99m labelled RGD-containing synthetic peptide[J]. *Eur J Nucl Med*, 1998, 25(10): 1383-1389.
- [22] Fu T, Qu W, Qiu F, et al. ^{99m}Tc -3P-RGD2 micro-single-photon emission computed tomography/computed tomography provides a rational basis for integrin $\alpha v \beta 3$ -targeted therapy[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2014, 29(9): 351-358.
- [23] Bach-Gansmo T, Bogsrud TV, Skretting A. Integrin scintimammography using a dedicated breast imaging, solid-state gamma-camera and (99m) Tc-labelled NC100692[J]. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2008, 28(4): 235-239.
- [24] Axelsson R, Bach-Gansmo T, Castell-Conesa J, et al. An open-label, multicenter, phase 2a study to assess the feasibility of imaging metastases in late-stage cancer patients with the alpha v beta 3-selective angiogenesis imaging agent ^{99m}Tc -NC100692[J]. *Acta radiol*, 2010, 51(1): 40-46.
- [25] Shi JY, Kim YS, Chakraborty S, et al. Impact of bifunctional chelators on biological properties of In-111-labeled cyclic peptide RGD dimers[J]. *Amino Acids*, 2011, 41(5): 1059-1070.