

文章编号:0253-9950(2008)01-0034-05

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF 的直接法合成 及其在荷 C6 动物体内生物学分布

董孟杰,李少林*,任庆兰,黄家君,吴国清

重庆医科大学 核医学教研室,重庆 400016

摘要:探索用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 直接标记表皮生长因子(EGF)的方法并研究其在荷 C6 动物体内的生物学分布特点。巯基乙醇(20 mL/L)10 μL 还原 EGF(2.5 μg);含 0.5 μg SnCl_2 的亚甲基二膦酸盐(MDP)溶液将还原高价锝使之与还原 EGF 的巯基结合,放化纯度大于 95%,标记物稳定性较好,在 6 h 内放化纯度大于 95%。通过内皮细胞培养进行 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF 的生物活性鉴定,显示 EGF 在锝标记前后生物学活性未见明显改变($P>0.05$)。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF 在荷瘤鼠体内生物学分布显示肝、脾、肾等组织放射性分布较高,瘤区放射性较高,而脑组织最低,4 h 瘤与正常组织放射性摄取比值(Tumor/Normal Tissue)为 2.25, SPECT 全身显像显示瘤组织放射性核素浓聚。因此直接合成的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF 可望成为特异性诊断高表达 EGFR 肿瘤的 SPECT 分子显像剂。

关键词:表皮生长因子;表皮生长因子受体; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$;放射性标记

中图分类号:R817.4 文献标志码:A

Direct Radiolabeled $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF and Biological Distribution in C6 Rats

DONG Meng-jie, LI Shao-lin*, REN Qing-lan, HUANG Jia-jun, WU Guo-qing

Department of Nuclear Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: The method of technetium-99m direct radiolabeling of epidermal growth factor (EGF) and the biological distribution characteristics of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF in C6-bearing rats were explored. Following reduction of EGF(2.5 μg) with 2-ME(20 mL/L, 10 μL), EGF was labeled with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ in the presence of SnCl_2 (0.5 μg). The results show that radiochemical purity of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF is more than 95% and $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF is of the characteristic of stability. The biological activity analyzed by the culture of endothelial cells shows that there is no significant difference between $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF and EGF($P>0.05$). Biological distribution is observed at different time point after injection of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF into tumor-bearing Wistar rats, and shows $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF is mainly accumulated in liver, kidney and spleen and least accumulated in the brain. Tumor take relatively high concentration of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF and the uptake ratio of tumor to normal tissue is 2.25 at 4 h. So $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EGF prepared by this direct method appears to be a feasible way to detect the tumors expressing high EGFR(such as glioma).

Key words: EGF; EGFR; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$; radiolabeling

收稿日期:2007-01-08;修订日期:2007-07-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070230)

作者简介:董孟杰(1972—),男,山西万荣人,博士,影像医学与核医学专业

* 通讯联系人

应用放射性核素标记小分子多肽进行肿瘤受体的显像是当今肿瘤核医学研究的主要领域之一。表皮生长因子受体(EGFR)是相对分子质量为 170 000 的细胞膜糖蛋白,自 1984 年 Libermann 等^[1]首次用 cDNA 克隆分析证实多种脑部肿瘤的细胞表面过度表达 EGFR 以来,国外一些学者^[2-4]对恶性胶质瘤中的 EGFR 基因的扩增及过表达情况作了大量研究,已证实胶质瘤细胞表面 EGFR 过度表达,因此 EGFR 可作为研究胶质瘤的重要生物学指标。本实验拟研究一种更为快速简便的⁹⁹Tc^m 标记表皮生长因子(EGF)的方法,以为诊断高表达 EGFR 的神经胶质瘤探索一种特异性强的 SPECT 分子显像剂。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

表皮生长因子(EGF),美国 Pepro Tech Ec LTD 公司产品;亚甲基二膦酸盐(MDP)(含 5 mg MDP, 0.5 mg SnCl₂),成都云克药业有限公司;改良 Eagle 培养基(DMEM)干粉、胰蛋白酶、小牛血清,美国 Hyclone 公司;巯基乙醇,分析纯,上海试剂四厂;内皮细胞株、C6 及神经胶质细胞株,重庆医科大学病理教研室提供;Wistar 大鼠,重庆医科大学动物实验中心提供。

DFM 型 γ 放射免疫计数器,安徽合肥众成机电技术开发有限责任公司;Sephadex G-50 medium 柱,香港 Farco Chemical Supplies 公司;752 型紫外光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂;Siemens Diacam 型单光子发射计算机断层扫描仪,美国 Siemens 公司。

1.2 钨标记 EGF 方法

实验分为 a, b, c, d 4 组进行,具体过程列入表 1。

1.2.1 EGF 的还原 生理盐水稀释 EGF,使 EGF 质量浓度为 10 mg/L。取 10 mg/L EGF 0.25 mL,加入 20 mL/L 巯基乙醇(2-ME) 10

μ L,室温振摇 30 min 后,于 ϕ 1.5 cm \times 10 cm Sephadex G50 柱洗脱,洗脱液为 0.02 mol/L 磷酸盐(PBS)中性缓冲液,流速 0.625 mL/min。用 752 型紫外光栅分光光度计在 280 nm 波长处检测。

1.2.2 EGF 的钨标记 取还原后的 EGF 2.5 μ g 加入含 0.5 μ g SnCl₂ 的 8 μ L MDP 溶液中,混合,室温下静置 5 min。通氮气下,加入新鲜的钨淋洗液 0.5 mCi (18.5 MBq) 反应 15 min。硅胶板薄层析(TLC)鉴定标记率,展开剂为正丁醇-乙醇-蒸馏水,体积比为 6 : 2 : 3。标记物经 Sephadex G50 柱分离提纯,洗脱液为 0.02 mol/L PBS 中性缓冲液,流速 0.8 mL/min。用 TLC 测定放化纯度,展开剂为正丁醇-乙醇-蒸馏水,体积比为 6 : 2 : 3。标记物稳定性分别于标记后 5 min, 3 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h 进行 TLC 分析。

1.2.3 最佳标记条件的选择 为筛选影响标记率的反应因素,以上述标记方法为基础,改变一系列反应条件,观察标记率变化。① 改变 2-ME(20 mL/L)用量,分别取 2, 5, 10, 20, 50 μ L 测定标记率;还原游离的-SH 数采用 Ellman 法,以半胱氨酸作为标准试剂,在相同条件下测定还原样本在 412 nm 处吸光度值,求得分子上的-SH 数。② 改变反应温度,分别取为 20, 40, 60, 80 $^{\circ}$ C。③ 改变 2-ME 还原时间,分别取为 5, 10, 20, 30, 60 min。④ 改变钨标记时间,分别取为 5, 10, 15, 30, 60 min。

1.3 钨标记 EGF 的生物活性鉴定

24 孔板 3 个,分成 4 组,每组编成 7 号,每号作平行管,每孔加入内皮细胞 2×10^4 个。表皮生长因子是由 53 个氨基酸残基组成的单链多肽,内含 3 个二硫键,经钨标记后,其结构中的二硫键被部分破坏(经 Ellman 法测定),这是否影响了其生物活性是一个重要问题。本课题设计了 4 个对照组与⁹⁹Tc^m-EGF 实验组作对比:① 空白对照组,加入 1 mL DMEM 培养液;② EGF 对照组,加入

表 1 ⁹⁹Tc^m-EGF 及对对照组操作步骤

Table 1 Radiolabeling procedure of ⁹⁹Tc^m-EGF and control

No.	V(生理盐水, Saline) /mL	V(EGF)/mL	V(2-ME)/ μ L	V(MDP)/ μ L	A(⁹⁹ Tc ^m)/MBq
a	0.25			8	18.5
b	0.25				18.5
c		0.25		8	18.5
d		0.25	10	8	18.5

注(Notes): a 为 MDP 加钨对照组, b 为游离钨对照组, c 为 EGF 原液的钨标记对照组, d 为实验组(还原 EGF 钨标记)(a is control group of MDP added ⁹⁹Tc^mO₄⁻; b is control group of ⁹⁹Tc^mO₄⁻; c is control group of EGF added ⁹⁹Tc^mO₄⁻; d is experiment group)

1 mL 含 800 mg/L EGF 的 DMEM 培养液; ③ $^{99}\text{Tc}^m$ 对照组, 加入 1 mL 含 29.6 MBq/L $^{99}\text{Tc}^m$ 的 DMEM 培养液; ④ $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 组, 加入 1 mL 含 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF (800 mg/L EGF, 29.6 MBq/L $^{99}\text{Tc}^m$) 的 DMEM 培养液。置二氧化碳培养箱中培养。1 d 后按顺序每天取每组一个号的培养瓶, 用胰酶消化, 培养液调整体积至 1 mL 进行细胞计数。直到计数完所有的培养瓶, 用 SAS 8.0 统计学软件进行两因素的方差分析。

1.4 体外细胞放射性摄取与滞留实验

首先培养 C6 细胞及神经胶质瘤细胞。24 孔板 2 个, 分成实验组与对照组。实验组每孔分别接种 C6 细胞 2×10^5 个, 对照组接种神经胶质瘤细胞 2×10^5 个, 加入 DMEM 培养液, 移入 CO_2 孵箱内进行培养, 当细胞数量达到 50% 左右时, 进行以下后续实验。

1.4.1 体外细胞放射性摄取实验 在培养液中加入不同浓度的 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 使 EGF 终浓度分别为 0.016 5 nmol/L (0.208 kBq), 0.165 nmol/L (2.08 kBq), 1.65 nmol/L (20.8 kBq), 16.5 nmol/L (208 kBq) 和 165 nmol/L (2 080 kBq), 均作平行管。4 $^\circ\text{C}$ 孵育 90 min 后, 每孔用 4 $^\circ\text{C}$ DMEM 培养液冲洗 3 次, 每次 2 mL, 用胰酶消化细胞, 以浓度和细胞摄取值绘制细胞放射性摄取曲线。

1.4.2 体外细胞放射性滞留实验 温度为 37 $^\circ\text{C}$, 加 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 培养液 (EGF 终浓度为 165 nmol/L, 2 080 kBq), 均作平行管, 分别孵育 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h 后终止培养, 消化细胞, 分别测量上清液与细胞的放射性, 以孵育时间、细胞摄取率绘制细胞放射性滞留曲线。

1.5 动物实验

体重 100~150 g 的 Wistar 大鼠 32 只, 随机分为 4 组, 每组 8 只。每只大鼠右股内侧皮下注射 C6 细胞数约 1.5×10^6 , 2 周后, 肿瘤长大至 0.5~1.0 cm。每只经尾静脉注入荷瘤大鼠体内 3.7 MBq $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF, 分别于注射后 30 min, 2 h, 4 h, 6 h 处死动物, 取血、脑、心脏、肝、脾、肾、胃、肠、肺及瘤等组织, 准确称重, 计算 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 在荷瘤鼠体内的放射性分布及肿瘤组织与周围正常组织的摄取比值。

荷瘤 Wistar 大鼠尾静脉注射 3.7 MBq $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 4 h, 置单光子发射型计算机断层扫描 (SPECT) 下显像, 探头为低能高分辨率探头, 矩阵 256×256 , 放大倍数为 1, 采集计数为 40×10^4 。

2 结果和讨论

2.1 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 的制备及生物活性鉴定

1) $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 的制备

还原 EGF 经 Sephadex G50 过柱, 紫外光栅分光光度计在 280 nm 波长处检测, 约 6 min 出现流出峰。表 2 为钨标记 EGF 各组实验放射峰占总放射性的百分比与 R_f 值。表 2 结果表明, $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 标记率为 76.29%, $R_f=0.50\sim0.60$ 。

表 2 钨标记 EGF 各组实验放射峰占总放射性的百分比与 R_f 值
Table 2 R_f and radioactivity percent of the maximum of $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF

组别 (Groups)	各峰放射峰占总放射峰的百分比 (Radioactivity percent of the maximum)/%		
	$R_f=0.00\sim0.10$	$R_f=0.50\sim0.60$	$R_f=0.80\sim0.90$
a	80.52		14.76
b			97.17
c	78.24		17.48
d	9.47	76.29	7.81

稳定性实验结果表明, $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 稳定性较好, $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 在 6 h 内放化纯度大于 95%, 8 h 放化纯度为 94.7%, 12 h 为 91.6%, 24 h 为 86.9%。

在实验中分别改变 2-ME 用量、还原时间和标记时间, 结果表明, 20 mL/L 2-ME 用量为 2, 5, 10, 20, 50 μL 时, $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 标记率分别为 35.9%, 66.2%, 74.7%, 74.0%, 72.2%; 采用 Ellman 法测定还原的游离—SH 数分别为 0.06 ± 0.01 , 0.81 ± 0.10 , 1.02 ± 0.17 , 1.15 ± 0.10 , 1.32 ± 0.13 , 对照组为 0.43 ± 0.04 , 说明每分子 EGF 可打开约 1 个二硫键。当反应温度为 20, 40, 60, 80 $^\circ\text{C}$ 时, $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 标记率分别为 70.3%, 72.1%, 68.9%, 74.2%, 说明温度对于标记率的影响并不明显。还原时间为 5, 10, 20, 30, 60 min 时, $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 标记率分别为 23.5%, 46.6%, 66.9%, 76.3%, 56.8%。钨标记时间为 5, 10, 15, 30, 60 min 时, $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 标记率分别为 38.1%, 57.3%, 75.7%, 76.0%, 75.8%。

到目前为止, 有关 EGF 放射性标记的报道多集中在间接标记法上, 但运用间接标记法标记时间长、标记率低, 且许多步骤涉及到试剂的合成, 偶联产率较低^[5-6]。本研究采用 2-ME 直接还原

法标记 EGF, 操作比较简单, 还原 30 min 即可达到较高的标记率(76.3%)。延长还原时间, 标记率有所降低, 这可能是因为空气中的氧气将还原得到的一SH 重新氧化, 或是游离的一SH 之间缩合使其再度封闭, 从而结合位点减少而导致标记率降低。标记反应 15 min 即可得到较高的标记率, 继续延长反应时间标记率无明显升高。

2) ⁹⁹Tc^m-EGF 生物活性鉴定

⁹⁹Tc^m-EGF 生物活性鉴定结果列入表 3。表 3 结果表明, EGF 在⁹⁹Tc^m 标记前后均能明显促进内皮细胞生长($P > 0.05$), 标记后生物学活性无明显改变。

表 3 得标记 EGF 实验组及各对照组细胞计数的统计学分析

Table 3 Statistical analysis of ⁹⁹Tc^m-EGF and control in cell culture

No.	显著性检验 (Significance test)			
	①	②	③	④
①	/	+	-	+
②	+	/	+	-
③	-	+	/	+
④	+	-	+	/

注 (Notes): ①为空白对照组, ②为 EGF 对照组, ③为⁹⁹Tc^m 对照组, ④为 ⁹⁹Tc^m-EGF 实验组; + 表示有统计学差异 ($P < 0.01$), - 表示无显著性差异 ($P > 0.05$), / 表示未进行统计学分析 (① is blank control group, ② is EGF control group, ③ is ⁹⁹Tc^mO₄⁻ control group, ④ is ⁹⁹Tc^m-EGF experimental group; + is statistical significance ($P < 0.01$), - is no statistical significance ($P > 0.05$), / is statistical analysis unperformed)

3) 细胞放射性摄取实验

图 1 显示, C6 细胞与对照组对不同浓度 ⁹⁹Tc^m-EGF 的摄取呈不同的曲线。随着⁹⁹Tc^m-EGF 浓度的增高, C6 细胞摄取值呈明显升高的趋势, 当⁹⁹Tc^m-EGF 浓度分别为 1.65×10^{-2} , 1.65×10^{-1} , 1.65, 1.65×10 , 1.65×10^2 nmol/L 时, C6 细胞组放射性摄取值分别为 1.32×10^3 , 4.03×10^3 , 7.21×10^3 , 22.6×10^3 , 46.9×10^3 / min。而对照组放射性摄取值分别为 0.89×10^3 , 1.11×10^3 , 2.07×10^3 , 2.41×10^3 , 2.56×10^3 / min。对照组放射性摄取值升高的趋势明显低于 C6 细胞组。

4) 体外细胞放射性滞留实验

图 2 显示, 放射性摄取率随着 C6 细胞与 ⁹⁹Tc^m-EGF(2 080 kBq) 孵育时间的延长呈升高趋势, 在孵育时间为 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h 时, 放射性摄取率分别为 1.71%,

3.94%, 5.26%, 8.33%, 12.51%, 15.36%, 19.84%, 而对对照组的放射性摄取率分别为 1.68%, 1.73%, 2.01%, 2.57%, 4.05%, 3.99%, 4.21%, 升高的趋势低于 C6 细胞组。

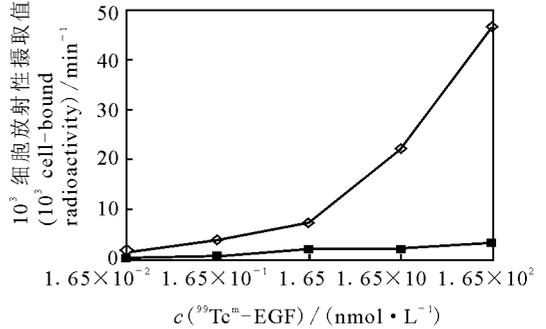


图 1 C6 细胞对不同浓度⁹⁹Tc^m-EGF 的放射性摄取

Fig. 1 Cell-associated ⁹⁹Tc^m radioactivity following incubation of C6 cell with different concentration of ⁹⁹Tc^m-EGF

◇——实验组 (Experimental group),
■——对照组 (Control group)

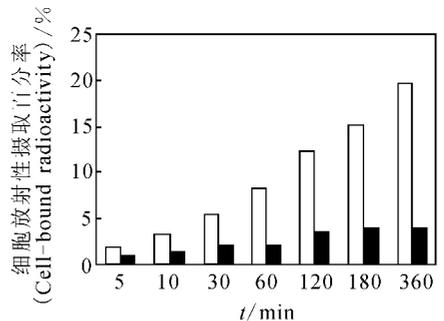


图 2 C6 细胞与 165 nmol/L ⁹⁹Tc^m-EGF(2 080 kBq) 孵育不同时间的放射性摄取

Fig. 2 Cell-bound radioactivity following incubation of 165 nmol/L ⁹⁹Tc^m-EGF(2 080 kBq) for different time

□——实验组 (Experimental group),
■——对照组 (Control group)

2.2 动物实验

3.7 MBq ⁹⁹Tc^m-EGF 经尾静脉注入荷瘤鼠体内, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h 后 Wistar 荷瘤鼠各器官及肿瘤组织内的放射性分布列于表 4。计算肿瘤组织与正常组织摄取比值, 在 30 min 时为 1.22, 2 h 为 1.61, 4 h 为 2.25, 6 h 为 2.12。

由表 4 结果看出, ⁹⁹Tc^m-EGF 具有在荷瘤鼠体内血液中清除较快, 肝、脾、肾摄取高等特点, 可能与高表达 EGFR 正常组织如肝、肾等的摄取及肾脏的高清除率有关。正常肝细胞表达中度到高度水平的 EGFR 受体 (每个细胞含 EGFR

$8 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 个), 在肾组织和肾小管细胞中也含有高浓度的 EGFR^[7-8]。脾有高浓度的 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 摄取, 可能与脾的血运丰富有关。瘤区放射性在 4 h 时达到最高, 而脑组织最低。

4 h 荷瘤 Wistar 鼠的 SPECT 显像图示于图 3。图 3 结果表明, 荷瘤 Wistar 鼠全身显影基本

清晰, 血液本底放射性可见, 右股内侧的肿瘤组织放射性浓聚, 与周围组织或与左股内侧相应部位的放射性摄取比较明显增强, 肝、脾清晰显影, 其余组织放射性分布减低, 未见明显的放射性聚集, 证实 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 具备识别高表达 EGFR 的肿瘤组织的特性, 即具有较好的导向选择性。

表 4 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 在荷瘤鼠体内的放射性分布

Table 4 Biological distribution of $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF in C6-carried rats

器官 (Organs)	每克组织百分注射剂量率 (Percentage of the injected dose per gram of tissue mass) / (%ID · g ⁻¹)			
	30 min	2 h	4 h	6 h
肿瘤 (Tumor)	0.236 ± 0.059	0.295 ± 0.039	0.374 ± 0.026	0.305 ± 0.026
血液 (Blood)	0.192 ± 0.022	0.183 ± 0.013	0.166 ± 0.010	0.165 ± 0.013
脑 (Brain)	0.041 ± 0.007	0.040 ± 0.005	0.033 ± 0.004	0.031 ± 0.006
胃 (Stomach)	0.133 ± 0.020	0.088 ± 0.016	0.072 ± 0.009	0.062 ± 0.007
肝 (Liver)	5.683 ± 0.719	6.387 ± 0.578	7.540 ± 1.830	6.859 ± 1.710
脾 (Spleen)	6.255 ± 1.278	6.502 ± 1.110	6.081 ± 1.512	6.284 ± 1.289
肾 (Kidney)	6.499 ± 0.060	10.500 ± 1.056	12.299 ± 2.175	20.455 ± 2.489
心脏 (Heart)	0.121 ± 0.018	0.103 ± 0.017	0.077 ± 0.007	0.066 ± 0.008
肠 (Intestines)	0.149 ± 0.026	0.156 ± 0.027	0.109 ± 0.031	0.102 ± 0.027
肺 (Lung)	0.143 ± 0.022	0.137 ± 0.022	0.120 ± 0.024	0.106 ± 0.032



图 3 尾静脉注射 3.7 MBq $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF
4 h 后的荷 C6 鼠 SPECT 图

Fig. 3 SPECT scans of $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF
distribution at 4 h following *iv* injection of 3.7 MBq
 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF in tumor-bearing rat

3 结 论

直接还原法合成的 $^{99}\text{Tc}^m$ -EGF 标记率较高, 方法简便, 稳定性较好, 可望成为诊断高表达 EGFR 肿瘤新的 SPECT 分子显像剂。

参考文献:

[1] Libermann T A, Razon N, Bartal A D, et al. Expression of Epidermal Growth Factor Receptors in Human Brain Tumor [J]. *Cancer Res*, 1984, 44 (2): 753-760.

[2] Yang W, Barth R F, Leveille R, et al. Evaluation of Systemically Administered Radiolabeled Epidermal Growth Factor as a Brain Tumor Targeting Agent [J]. *J Neuro-Nocology*, 2001, 55(1): 1-10.

[3] Mendelsohn J, Baselga J. The EGF Receptor Family as Targets for Cancer [J]. *Oncogene*, 2000, 19(33): 6 550-6 565.

[4] Torp S H, Helseth E, Ryan L, et al. Amplification of the Epidermal Growth F Actor Receptor Gene In-human Glioma [J]. *Anticancer Res*, 1991, 11(6): 2 095-2 098.

[5] Babaei M H, Almqvist Y, Orlova A. [^{99m}Tc] HYNIC-hEGF: A Potential Agent for Imaging of EGF Receptors *in Vivo*, Preparation and Pre-Clinical Evaluation [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(6): 1 169-1 175.

[6] Rusckowski M, Qu T, Chang F, et al. Technetium-99m Label Epidermal Growth Factor-Tumor Imaging in Mice [J]. *J Pep Res*, 1997, 50(5): 393-401.

[7] Mather S J, Ellison D. Reduction-Mediated Technetium-99m Labeling of Monoclonal Antibody [J]. *J Nucl Med*, 1990, 31(5): 692-693.

[8] Gladhaug P, Christoffersen T. Kinetics of Epidermal Growth Factor Binding and Processing in Isolated Intact Rat Hepatocytes: Dynamic Externalization of Receptors During Ligand Internalization [J]. *Eur J Biochem*, 1987, 164 (2): 267-275.