

· α 核素诊疗一体化 ·

^{225}Ac 标记 ANGPT2 靶向多肽 HSV 对非小细胞肺癌增殖、侵袭和迁移的研究

柳佳娣¹ 甘蓉¹ 王洁茹² 殷小杰² 秦芝² 李鸿岩¹¹中国科学院近代物理研究所医学物理研究室,兰州 730000;²中国科学院近代物理研究所核化学室,兰州 730000

通信作者:李鸿岩, Email: lihy@impcas.ac.cn;秦芝, Email: qinzhi@impcas.ac.cn

【摘要】 目的 探讨 ^{225}Ac 标记血管生成素 2 (ANGPT2) 靶向多肽 HSVPRHEV (简称 HSV) 对非小细胞肺癌 (NSCLC) 增殖、侵袭、迁移的影响。**方法** 成组设计研究。制备 ^{225}Ac -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)-HSV, 并设对照组 (PBS)、DOTA-HSV 组、游离 ^{225}Ac 组及 ^{225}Ac -DOTA-HSV 组。采用 Western blot 检测不同 NSCLC 细胞株中 ANGPT2 表达水平;通过 HSV-异硫氰酸荧光素 (FITC) 共聚焦实验及荷瘤小鼠体内荧光成像评价 HSV 的靶向摄取能力;采用细胞计数盒 (CCK-8) 法检测 A549 细胞活力,流式细胞术检测细胞周期及凋亡,平板克隆形成评估细胞增殖能力,Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力, γH2AX 免疫荧光观察 DNA 损伤。采用单因素方差分析、两因素方差分析进行组间比较。**结果** Western blot 结果显示, A549 细胞 ANGPT2 表达量较高。HSV-FITC 在 A549 细胞中表现出明显的荧光摄取信号,荷瘤小鼠体内荧光成像也显示肿瘤部位存在荧光富集。 ^{225}Ac -DOTA-HSV 的标记率大于 85%,其可显著抑制 A549 细胞活力,且随着放射性浓度的增加和处理时间的延长,细胞活力逐渐下降 ($F=17.64, P<0.001$), 48 和 72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 23.06 和 4.13 kBq/ml。 ^{225}Ac -DOTA-HSV 可诱导 A549 细胞 G2/M 期阻滞 ($F=431.60, P<0.001$), 促进细胞凋亡 ($F=17.60, P<0.001$), 抑制细胞克隆形成 ($F=1\,660.00, P<0.001$), 并抑制细胞的迁移 ($F=565.00, P<0.001$) 和侵袭 ($F=1\,743.00, P<0.001$) 及诱导 DNA 双链断裂 ($F=111.70, P<0.001$)。**结论** ^{225}Ac -DOTA-HSV 可抑制 NSCLC 细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭,诱导细胞 G2/M 期阻滞、促进细胞凋亡,并诱导 DNA 损伤。该研究为 ^{225}Ac -DOTA-HSV 用于体内治疗研究提供了实验基础。

【关键词】 癌,非小细胞肺;放射疗法;铜;血管生成素 2;肿瘤细胞,培养的;小鼠,裸**基金项目:**国家自然科学基金 (11875061);甘肃省重大科技项目 (23ZDFA014)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20260331-00095

Study on proliferation, invasion and migration of non-small cell lung cancer using ^{225}Ac -labeled ANGPT2-targeting peptide HSV

Liu Jiadi¹, Gan Rong¹, Wang Jieru², Yin Xiaojie², Qin Zhi², Li Hongyan¹¹Department of Medical Physics, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; ²Laboratory of Nuclear Chemistry, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Corresponding authors: Li Hongyan, Email: lihy@impcas.ac.cn; Qin Zhi, Email: qinzhi@impcas.ac.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ^{225}Ac -labeled angiopoietin-2 (ANGPT2)-targeting peptide HSVPRHEV (HSV) on proliferation, invasion, and migration of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A grouped experimental design was adopted. ^{225}Ac -1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)-HSV was synthesized, and 4 groups including the control group (PBS), DOTA-HSV group, free ^{225}Ac group, and ^{225}Ac -DOTA-HSV group were established. The expression levels of ANGPT2 in different NSCLC cell lines were determined by Western blot. The targeting uptake capability of HSV was evaluated by HSV-fluorescein isothiocyanate (FITC) confocal microscopy and *in vivo* fluorescence imaging in tumor-bearing mice. Cell viability of A549 cells was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Cell cycle distribution and apoptosis were analyzed by flow cytometry. Colony formation assays were performed to evaluate cell proliferative capacity. Cell migration and invasion abilities were assessed using Transwell assays. DNA damage was examined by γH2AX immunofluorescence. Data were analyzed using one-way analysis of variance or two-way analysis of variance. **Results** Western blot analysis demonstrated that ANGPT2 was highly expressed in A549 cells. Confocal microscopy showed a pronounced uptake of HSV-FITC in A549 cells, and *in vivo* fluorescence imaging of tumor-bearing mice further revealed significant fluorescence accumulation at the tumor site. The radiolabeling yield of ^{225}Ac -DOTA-HSV exceeded

85%。²²⁵Ac-DOTA-HSV 显著抑制了 A549 细胞的活力, 且抑制作用随着放射性浓度和孵育时间的增加而增强 ($F=17.64$, $P<0.001$), 其半数最大抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 23.06 和 4.13 kBq/ml 于 48 和 72 h 时。 ²²⁵Ac-DOTA-HSV 显著诱导 G2/M 期细胞周期阻滞 ($F=431.60$, $P<0.001$), 促进细胞凋亡 ($F=17.60$, $P<0.001$), 抑制克隆形成 ($F=1\,660.00$, $P<0.001$), 抑制细胞迁移 ($F=565.00$, $P<0.001$) 和侵袭 ($F=1\,743.00$, $P<0.001$), 并诱导 DNA 双链断裂 ($F=111.70$, $P<0.001$)。 **Conclusions** ²²⁵Ac-DOTA-HSV 显著抑制 NSCLC 细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭。此外, 它还诱导 G2/M 期细胞周期阻滞, 促进细胞凋亡, 并造成 DNA 损伤, 为进一步研究该放射药物作为潜在的 *in vivo* 治疗剂提供了实验依据。

【Key words】 Carcinoma, non-small-cell lung; Radiotherapy; Actinium; Angiopoietin-2; Tumor cells, cultured; Mice, nude

Fund program: National Natural Science Foundation of China (11875061); Major Science and Technology Project of Gansu Province (23ZDFA014)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20260331-00095

肺癌是当前全球范围威胁公众健康最严重的恶性肿瘤之一, 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占全部肺癌的 85%^[1]。尽管近年来靶向治疗及免疫治疗不断发展, 但晚期 NSCLC 仍存在易复发、易转移及预后较差等问题^[2-4]。

靶向 α 核素治疗是近年来放射性核素治疗领域的重要发展方向。与 β 粒子相比, α 粒子具有更高的传能线密度 (linear energy transfer, LET) 和短射程, 可在局部范围内产生高能量沉积, 从而诱导复杂 DNA 双链断裂 (DNA double-strand break, DSB), 具有较强的肿瘤杀伤作用^[5]。²²⁵Ac 因其物理半衰期 (9.92 d) 及多级 α 衰变特性, 已成为目前最具应用前景的医用 α 核素之一^[6]。研究表明, ²²⁵Ac 标记放射性药物在多种实体瘤中具有良好的抗肿瘤活性及临床转化潜力^[7]。

血管生成素 2 (angiopoietin-2, ANGPT2) 是肿瘤血管生成及肿瘤转移的重要调控因子, 在 NSCLC 组织中高表达, 并与肿瘤进展及不良预后密切相关^[8-11]。本研究组前期筛选获得的 ANGPT2 靶向多肽 HSVPRHEV (简称 HSV) 对 ANGPT2 具有较好的亲和能力^[12]。基于此, 本研究构建 ²²⁵Ac-1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸 (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid, DOTA)-HSV, 系统评价其对 NSCLC 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响, 为 ²²⁵Ac 的靶向 α 核素治疗在 NSCLC 中的进一步研究提供依据。

材料和方法

一、实验仪器与材料

1. 主要材料与仪器。²²⁵Ac 由本单位自制; 利用兰州重离子研究装置提供的束流轰击 ²³²Th 金属靶, 通过散裂反应制备, 再使用全自动化分离多色谱连用装置高效分离获得 ²²⁵Ac。DOTA-HSV 购自上海强

耀生物科技有限公司; DMEM/F12 培养基、RIPA 裂解液、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自苏州依科赛生物科技有限公司; 细胞计数盒 (cell counting kit-8, CCK8) 溶液、FITC-膜联蛋白 V (Annexin V)、碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 溶液购自深圳市尚唯生物科技有限公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液购自上海碧云天生物技术股份有限公司。酶标仪购自瑞士 TECAN 公司; GEM50P4-83 高纯锗 (high-purity germanium, HPGe) γ 探测器 (配有 DSPEC 50 数字化谱仪) 购自美国 ORTEC 公司; 激光共聚焦显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司; 倒置显微镜、流式细胞仪购自北京索莱宝科技有限公司; 小动物活体荧光成像仪购自韩国 Vieworks 公司。

2. 细胞与实验动物。NSCLC 细胞株 A549、H1299、H460 及正常肺上皮细胞株 BEAS-2B 均购自苏州海星生物科技有限公司。5 周龄、体质量 20 g 左右的 BALB/c 雌性小鼠 ($n=4$) 购自中国农科院兰州兽医研究所, 于无特定病原体环境中饲养。动物实验经中国科学院近代物理研究所实验动物福利伦理委员会批准 [批件号: 2025(023)], 实验动物使用许可证号为 SCXK(甘)2020-0002。

二、实验方法

1. ²²⁵Ac 标记探针的制备。将 0.1 mol/L 辅助试剂加入 ²²⁵Ac 溶液中, 调节 pH = 4.5, 混匀后加入 DOTA-HSV (DOTA-HSV 与 ²²⁵Ac 的质量比为 10:1), 在 90 °C 下温育 25 min, 完成放射性核素标记。采用 HPGe γ 探测器测定放射性计数, 并计算 ²²⁵Ac-DOTA-HSV 标记率。

2. Western blot 实验。采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后

转膜,质量分数 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入 ANGPT2 一抗(24613-1-AP,购自武汉三鹰生物技术有限公司),稀释比为 1:1 000,在 4℃温育过夜;次日加入辣根过氧化物酶标记二抗(RS0002;美国 Immunoway 公司),稀释比为 1:10 000,在室温下温育 1 h,采用化学发光法显影。

3.细胞摄取实验。将 A549 细胞按每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后加入 FITC 标记的 HSV 多肽(HSV-FITC)温育 2、4、6 h;PBS 洗涤后,用 0.04 g/ml 多聚甲醛固定 15 min,DAPI 染色 5 min,采用激光共聚焦显微镜观察细胞内荧光分布情况。

4.体内荧光摄取实验。取对数期生长的 A549 细胞 5×10^6 个(重悬于 100 μ l PBS 中),接种于裸鼠右侧腋窝皮下。待肿瘤体积达到约 200 mm³ 后,予每只小鼠经尾静脉注射游离 FITC(100 μ g/只)及 HSV-FITC(100 μ g/只)。给药后 1、4 和 6 h 进行小动物活体荧光成像,观察 HSV-FITC 在体内的分布情况。成像结束后,取主要脏器及肿瘤组织进行离体荧光观察。

5.细胞活力检测。将 A549 细胞接种于 96 孔板中(每孔 3 000 个),用 0、2.5、5.0、10.0 和 20.0 kBq/ml ²²⁵Ac-DOTA-HSV 处理细胞,继续培养 24、48 和 72 h 后,每孔加入 10 μ l CCK8 溶液,培养 1~2 h 后,在酶标仪上测定 450 nm 处的吸光度,计算细胞活力。

6.细胞周期与凋亡实验。将 A549 细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板,培养 24 h 后分别加入 PBS(对照组)、DOTA-HSV(5 μ g)、游离 ²²⁵Ac(18.5 kBq)和 ²²⁵Ac-DOTA-HSV(18.5 kBq)。将不同处理组的 A549 细胞培养 48 h 后,用不含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶(大连美仑生物技术有限公司)消化收集细胞,室温离心(800 r/min)4 min(离心半径 10 cm),弃上清液,用 PBS 重复洗涤 2 次。细胞周期检测:加入体积分数 70%冷乙醇固定过夜,洗涤细胞后加入 PI 染色液,避光温育 15 min,使用流式细胞仪进行检测。细胞凋亡检测:加入 200 μ l Binding Buffer(深圳市尚唯生物科技有限公司)重悬细胞,分别加入 10 μ l FITC-Annexin V 和 5 μ l PI 染色液,室温避光染色 15 min 后使用流式细胞仪检测。

7.细胞克隆、迁移和侵袭实验。(1)细胞克隆。A549 细胞经处理(分组处理同细胞周期与凋亡实验)后接种于 ϕ 60 培养皿中,对照组与 DOTA-HSV 组接种 1 000 个细胞,游离 ²²⁵Ac 与 ²²⁵Ac-DOTA-HSV 组分别接种 8 000 个细胞。培养 14 d 后弃去培养基,用 PBS 清洗细胞 2 次。采用 0.04 g/ml 多聚甲

醛固定 30 min,用质量分数 1% 结晶紫染色 1 h,在显微镜下计数含 ≥ 50 个细胞的细胞集落。

(2)细胞迁移。A549 细胞以每孔 3×10^4 个接种于 Transwell 装置上室,上室加入无 FBS 培养基,下室加入含 FBS 的培养基。细胞培养 48 h 后,用 PBS 轻轻冲洗 3 次后,使用 0.04 g/ml 多聚甲醛固定细胞 15 min,结晶紫染色 30 min,用 PBS 轻轻冲洗 3 次以去除多余染液,在倒置显微镜下观察并计数。

(3)细胞侵袭。取 60 μ l 质量浓度为 300 μ g/ml 基质胶(美国 Corning 公司)加至 Transwell 上室底部,4℃温育 3 h;随后向 Transwell 下室加入含 FBS 的培养基。将 A549 细胞以每孔 3×10^4 个接种到预先形成凝胶的上室中,培养 48 h 后进行细胞的收集、固定、染色、计数(同迁移实验)。

8.免疫荧光检测。将 3×10^5 个 A549 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁 24 h 后按照不同分组处理(同细胞活力检测)。弃培养基后 PBS 清洗 2 次,0.04 g/ml 多聚甲醛固定 15 min。加入体积分数 0.2% Triton X100 温育 10 min,PBS 清洗 3 次,用质量分数 5%牛血清白蛋白室温封闭 1 h。加入一抗 γ H2AX(ab81299;英国 Abcam 公司)4℃过夜,次日 PBS 清洗 3 次,二抗采用 Alexa Fluor 488 标记的兔抗(RS3218;美国 Immunoway 公司),室温避光温育 1 h。DAPI 染色 5 min,PBS 清洗 3 次。在爬片上滴加抗淬灭封片剂封片,并使用激光共聚焦显微镜进行图像采集和定量分析。

9.统计学分析。本研究采用成组设计,且至少进行 3 次独立的重复实验。采用 GraphPad Prism 10.4.2 软件进行统计学分析,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析或两因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义(双侧检验)。

结 果

1.不同 NSCLC 细胞 ANGPT2 表达水平。Western blot 结果显示,ANGPT2 在 A549 与 H1299 细胞中呈较高表达,而在 H460 及 BEAS-2B 细胞中表达相对较低(图 1)。

2. HSV-FITC 细胞摄取。随着温育时间延长,A549 细胞内 HSV-FITC 荧光信号逐渐增强($F = 13.42$, $P = 0.006$);在 2 h 时 HSV-FITC 荧光主要分布于细胞膜周围,随着时间延长,细胞质内荧光信号进一步增加,部分区域呈点状聚集(图 2)。

3. HSV-FITC 体内摄取。活体荧光成像结果显

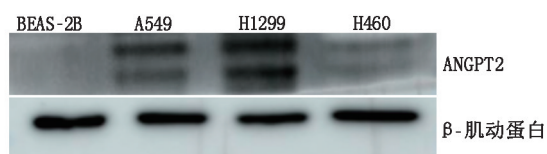


图1 不同非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞株 A549、H1299、H460 及正常肺上皮细胞株 BEAS-2B 中血管生成素 2 (ANGPT2) 表达的 Western blot 结果

示,荷瘤小鼠肿瘤部位可见明显 HSV-FITC 荧光信号;离体荧光成像结果显示,肿瘤组织中可见较明显 HSV-FITC 荧光聚集,且荧光强度在 1~6 h 内逐渐增强,并在 4 h 左右达到相对稳定水平(图 3)。

4. ^{225}Ac -DOTA-HSV 抑制 A549 细胞增殖。制备的 ^{225}Ac -DOTA-HSV 终产物为无色澄清的溶液,标记率大于 85%。实验结果(图 4)显示, ^{225}Ac -DOTA-HSV 对 A549 细胞的增殖具有显著的抑制作用,随着药物放射性浓度的增加和处理时间的延长,细胞

活力逐渐下降,组间差异有统计学意义($F=17.64, P<0.001$)。与对照组(0 kBq/ml)相比,2.5 kBq/ml ^{225}Ac -DOTA-HSV 处理 24 h 对细胞活力无明显影响;当放射性浓度升高至 20.0 kBq/ml 时,细胞活力开始降低。处理 48 h 后,抑制作用更加明显,在 2.5 kBq/ml 时细胞活力开始下降;在 20.0 kBq/ml 时,细胞活力降至最低。处理 72 h 后,各放射性浓度的细胞活力进一步降低,显示更强的抑制作用。 ^{225}Ac -DOTA-HSV 作用 48 和 72 h 的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})分别为 23.06 和 4.13 kBq/ml。

6. ^{225}Ac -DOTA-HSV 诱导 A549 细胞 G2/M 期阻滞。对照组、DOTA-HSV 组、游离 ^{225}Ac 组和 ^{225}Ac -DOTA-HSV 组 A549 细胞 G2/M 期百分比分别为 $(4.71\pm0.51)\%$ 、 $(4.69\pm0.55)\%$ 、 $(41.31\pm2.44)\%$ 和 $(47.94\pm1.48)\%$, 差异有统计学意义($F=431.60, P<0.001$);其中 ^{225}Ac -DOTA-HSV 组 G2/M 期阻滞作用较游离 ^{225}Ac 组更

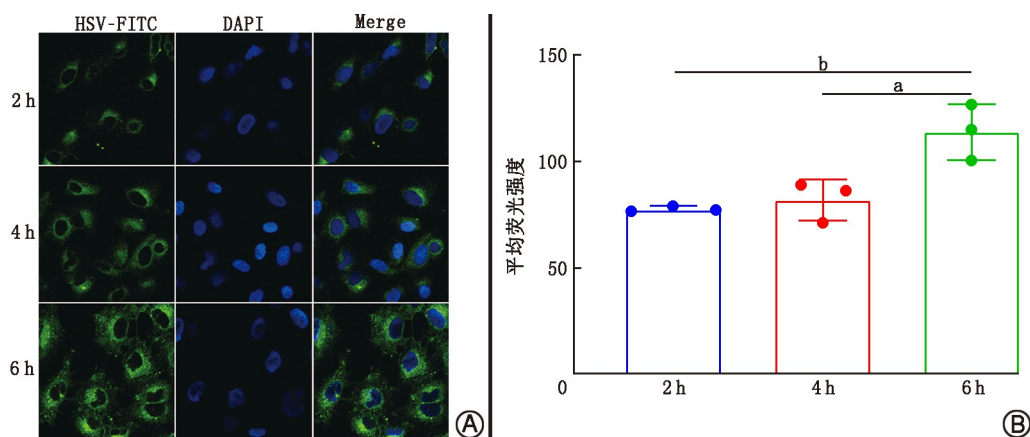


图2 不同时间点 A549 细胞激光共聚焦显微镜检测图(A; $\times 40$)及 HSVPRHEV (简称 HSV)-异硫氰酸荧光素 (FITC) 荧光信号定量分析(B) 可见随着时间延长,HSV-FITC 荧光信号由细胞膜周围向细胞质内增加,且不同时间点差异有统计学意义($^aP<0.05, ^bP<0.01$)。DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶, Merge 为融合

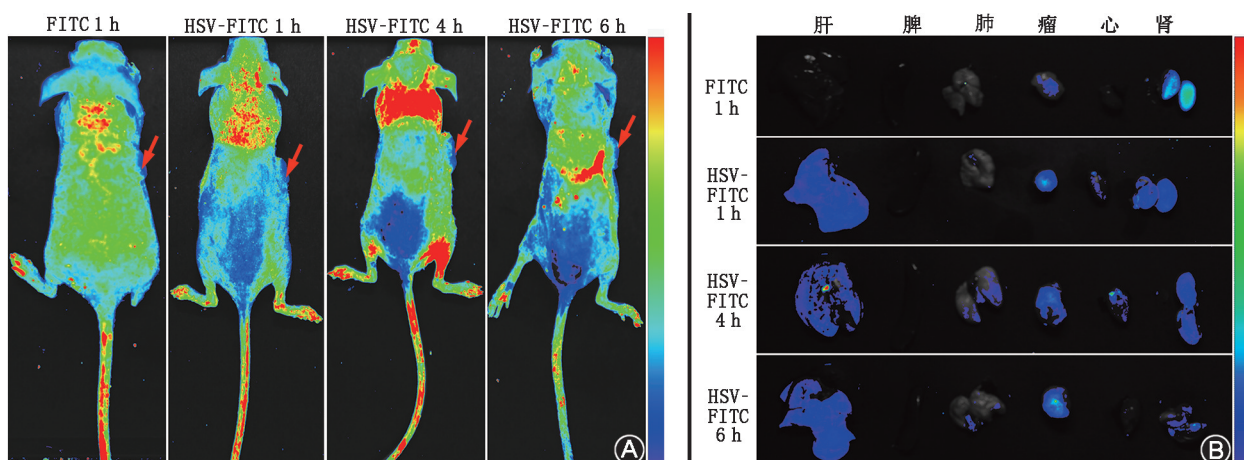


图3 不同时间点 A549 荷瘤小鼠活体荧光成像图(A)及离体荧光成像图(B) A.游离 FITC 注射后 1 h 全身荧光迅速分布,随后快速清除;HSV-FITC 注射后 1 h 肿瘤部位(箭头示)即出现明显荧光信号,随时间延长肿瘤部位荧光持续增强;B. FITC 注射 1 h 后,荧光信号主要集中在肾脏,而 HSV-FITC 注射 1 h 后,肿瘤及肝脏即出现明显荧光,随时间延长至 4 和 6 h,肿瘤内荧光强度增加。色阶表示荧光强度

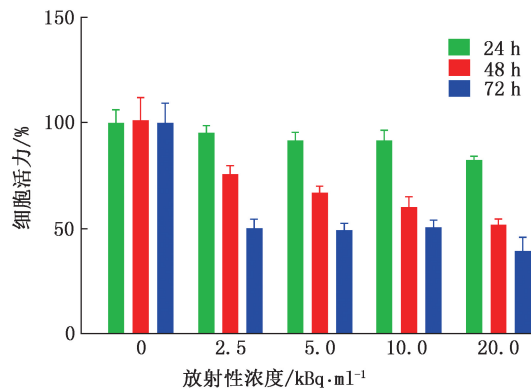


图 4 不同放射性浓度²²⁵Ac-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-HSVPRHEV(简称 HSV)分别作用 24、48 和 72 h 后 A549 细胞的细胞活力

加显著($P=0.016$)。

7. ²²⁵Ac-DOTA-HSV 促进 A549 细胞凋亡。对照组、DOTA-HSV 组、游离²²⁵Ac 组和²²⁵Ac-DOTA-HSV 组 A549 细胞凋亡率分别为 $(8.57\pm 2.61)\%$ 、 $(8.52\pm 1.19)\%$ 、 $(9.60\pm 0.46)\%$ 和 $(18.55\pm 2.75)\%$,差异有统计学意义($F=17.60, P<0.001$);游离²²⁵Ac 仅诱导了轻微的细胞凋亡,而²²⁵Ac-DOTA-HSV 则诱导了明显的细胞凋亡,且凋亡率高于游离²²⁵Ac($P=0.003$)。

8. ²²⁵Ac-DOTA-HSV 对 A549 细胞克隆、侵袭、迁移的影响(表 1)。对照组与 DOTA-HSV 组 A549 细胞的克隆形成无明显抑制作用,而游离²²⁵Ac 处理后的细胞克隆数明显减少,经过²²⁵Ac-DOTA-HSV 处理后细胞克隆形成能力进一步受到抑制。

DOTA-HSV 组与对照组相比,A549 细胞迁移及侵袭能力无明显变化;游离²²⁵Ac 处理后,细胞迁移和侵袭数均下降;而²²⁵Ac-DOTA-HSV 处理后,迁移

表 1 不同组别对 A549 细胞克隆、侵袭、迁移的影响

组别	细胞克隆形成数(个)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
对照组	323.33±6.11	237.00±5.57	235.67±5.03
DOTA-HSV 组	291.67±10.41	219.33±7.02	225.67±5.51
游离 ²²⁵ Ac 组	25.33±2.52	154.33±11.15	132.33±3.79
²²⁵ Ac-DOTA-HSV 组	13.00±3.61	15.67±3.06	12.67±2.08
<i>F</i> 值	1 660.00	565.00	1 743.00
<i>P</i> 值	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001

注:DOTA 为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸,HSV 为多肽 HSVPRHEV 的简称

和侵袭细胞数进一步下降,且较游离²²⁵Ac 组差异具有统计学意义(均 $P<0.001$)。

9. ²²⁵Ac-DOTA-HSV 诱导 A549 细胞 DSB。免疫荧光染色结果显示,0 kBq/ml 组细胞核内无明显的 DSB 荧光焦点形成,而 2.5、5.0、10.0 及 20.0 kBq/ml 组都有不同程度的 γ H2AX 阳性焦点增加,且随着²²⁵Ac-DOTA-HSV 放射性浓度升高,细胞核内 DSB 焦点数逐渐增加,呈明显的放射性浓度依赖性($F=111.70, P<0.001$;图 5)。

讨 论

NSCLC 的增殖、浸润及远处转移是导致患者预后不良的重要原因。²²⁵Ac 释放的高 LET、短射程 α 粒子能诱导难以修复的 DNA 损伤,在靶向 α 核素治疗中具有一定优势^[13-15]。本研究基于前期筛选获得的 ANGPT2 靶向多肽 HSV 构建了²²⁵Ac-DOTA-HSV,并系统性评价其对 A549 细胞的体外抗肿瘤作用。本研究结果显示,²²⁵Ac-DOTA-HSV 能够明显抑制 A549 细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭能力,并

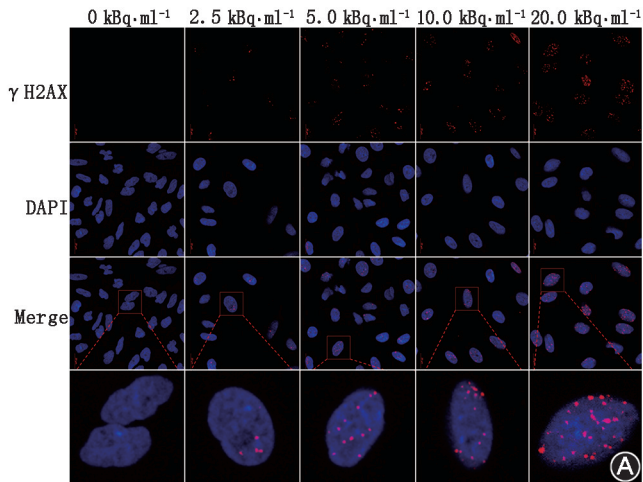


图 5 不同放射性浓度²²⁵Ac-DOTA-HSV 对 A549 细胞的 γ H2AX 免疫荧光图(A; $\times 40$)及定量分析(B) 可见随着²²⁵Ac-DOTA-HSV 放射性浓度升高,细胞核内 DNA 双链断裂(DSB)荧光焦点数逐渐增加,呈明显的放射性浓度依赖性。DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶, Merge 为融合; $^aP<0.001$

诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡,提示其可能具有一定的 ANGPT2 相关抗肿瘤作用。

ANGPT2 是 Tie2 受体的重要配体,在肿瘤血管生成、血管重塑及肿瘤微环境调控中发挥重要作用。既往研究表明,ANGPT2 在 NSCLC 组织中的表达明显高于正常肺组织,并与肿瘤进展、临床分期及不良预后密切相关^[10-11]。因此 ANGPT2 成为肺癌靶向治疗的重要潜在靶点。本研究获得的 ANGPT2 靶向多肽 HSV 具有一定的 ANGPT2 亲和能力及细胞摄取特性。Western blot 结果显示,A549 与 H1299 细胞均存在较高 ANGPT2 表达。考虑到 H1299 细胞属于 p53 缺失型细胞,而 A549 细胞为 p53 野生型细胞^[16],后者能够更完整地反映辐射诱导 DNA 损伤、细胞周期阻滞及凋亡等相关信号通路变化,本研究组选择 A549 细胞作为后续功能实验模型。此外,HSV-FITC 共聚焦结果显示,随着温育时间延长,A549 细胞内 HSV-FITC 荧光信号逐渐增强,荧光主要分布于细胞膜及细胞质区域,提示 HSV 能够被 A549 细胞有效摄取并发生一定程度细胞内富集。荷瘤小鼠体内荧光成像结果亦显示 HSV-FITC 在肿瘤部位存在一定荧光富集。上述结果结合 ANGPT2 表达情况,初步提示 HSV 可能具有与 ANGPT2 相关的结合及摄取能力,为²²⁵Ac-DOTA-HSV 发挥增强抗肿瘤效应提供了实验依据。

²²⁵Ac 发挥抗肿瘤作用的核心事件之一可能是诱导复杂 DSB 的大量积累。Zolghadri 等^[17]的研究表明,²²⁵Ac 及同类 α 核素²²⁷Th 可以引起高密度、复杂的 DSB,并表现出较高的相对生物学效应,这类损伤较 DNA 单链断裂更难修复,往往会直接影响细胞存活率下降。关于靶向 α 核素治疗放射生物学基础的综述指出, α 粒子造成的损伤不仅体现在 DSB 数量增加,也体现在损伤的复杂度升高,这种复杂损伤更容易激活共济失调-毛细血管扩张突变基因 (ataxia-telangiectasia mutated gene, ATM)/细胞周期检测点激酶 2 (checkpoint kinase 2, CHK2) 信号通路的细胞周期检查点、修复失败及最终程序性死亡^[18-19]。Graf 等^[20]在²²⁵Ac-DOTA-酪氨酸 3-奥曲肽 (Tyr3-octreotide, TOC) 体内及体外实验中发现,随着²²⁵Ac 活度增加,肿瘤细胞 γ H2AX 焦点明显增加;在 2.5~10.0 kBq/ml 范围内即可观察到 G2/M 期比例升高,72 h 后出现明显的细胞凋亡,表明²²⁵Ac 可以通过 DSB 进一步引起细胞周期阻滞和细胞凋亡。该研究从放射生物学角度证实了²²⁵Ac 所导致的 DNA 损伤在抗肿瘤效应中的核心作用。与此一致,

本研究中 γ H2AX 免疫荧光结果显示,随着²²⁵Ac-DOTA-HSV 放射性浓度升高,A549 细胞核内的 DSB 焦点逐渐增多。此外,Wichmann 等^[21]报道在胶质母细胞瘤和结直肠癌异种移植模型中,²²⁵Ac-ch806 可显著抑制肿瘤生长,并伴随 γ H2AX 表达增强、细胞增殖核抗原 Ki-67 降低,p21 升高及活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 增加,提示²²⁵Ac 标记药物能够通过诱导 DNA 损伤、抑制细胞增殖并促进凋亡发挥抗肿瘤作用。本研究对象为 A549 细胞,但所得结果同样表现为增殖抑制、克隆形成下降、细胞周期阻滞和细胞凋亡增加,表明²²⁵Ac 引起的抗肿瘤效应在不同实体瘤模型中具有一定共性。

除了 DNA 的直接杀伤, α 粒子还会通过非靶向效应引起生物学效应,这些效应通常包括旁观者效应以及由免疫应答激活诱导的远隔效应^[22]。Ertveldt 等^[23]进一步证实,²²⁵Ac 标记的抗人 CD20 单域抗体不仅能够抑制肿瘤生长,还可诱导抗原特异性免疫应答、重塑肿瘤微环境,并与程序性死亡受体配体 1 阻断表现出一定协同趋势。这提示本研究观察到的 A549 细胞迁移、侵袭及克隆形成能力下降,除与 DNA 损伤和细胞周期异常直接相关外,也可能与 α 核素治疗后引起的整体细胞应激状态增强有关。由于本研究为体外细胞实验,尚未涉及免疫微环境和旁观者效应的直接验证。

本研究存在以下局限性:仅在细胞水平上进行了体外验证,虽然通过不同细胞株 ANGPT2 表达检测、HSV-FITC 细胞摄取及荷瘤小鼠体内荧光成像初步验证了 HSV 的相关结合及摄取能力,但未进一步开展阻断实验及低 ANGPT2 表达细胞株的系统功能学对照研究。后续将进一步结合多种肺癌细胞模型和动物实验,系统评价²²⁵Ac-DOTA-HSV 的靶向性、安全性及体内抗肿瘤效果,并围绕 DNA 损伤应答、凋亡调控及转移相关通路开展更深入的机制研究,以期为²²⁵Ac-DOTA-HSV 在 NSCLC 靶向 α 核素治疗中的进一步应用提供更充分的实验依据。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 柳佳娣:细胞实验、数据统计与分析、论文撰写;甘蓉:标记实验及数据整理;王洁茹:²²⁵Ac 分离、纯化与标记率检测;殷小杰:²²⁵Ac 分离、纯化;秦芝:²²⁵Ac 分离与纯化指导;李鸿岩:研究指导、论文审阅、经费支持

参 考 文 献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74 (3): 229-263. DOI:10.3322/caac.21834.

- [2] Meyer ML, Fitzgerald BG, Paz-Ares L, et al. New promises and challenges in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer [J]. *Lancet*, 2024, 404(10454): 803-822. DOI:10.1016/S0140-6736(24)01029-8.
- [3] Su PL, Furuya N, Asrar A, et al. Recent advances in therapeutic strategies for non-small cell lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2025, 18(1): 35. DOI:10.1186/s13045-025-01679-1.
- [4] Zhao S, Zhao H, Yang W, et al. The next generation of immunotherapies for lung cancers [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2025, 22(8): 592-616. DOI:10.1038/s41571-025-01035-9.
- [5] 霍善棋,王瑾,张贝,等.血液肿瘤 α 粒子核素治疗进展[J].中华核医学与分子影像杂志, 2024, 44(9): 564-568. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20230721-00008.
- Huo SQ, Wang J, Zhang B, et al. Progress of nuclide targeted α -particle therapy for blood tumors [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2024, 44(9): 564-568. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20230721-00008.
- [6] Hooijman EL, de Jong JR, Ntiabose CM, et al. Ac-225 radiochemistry through the lens of [^{225}Ac] Ac-DOTA-TATE [J]. *EJNMMI Radiopharm Chem*, 2025, 10(1): 9. DOI:10.1186/s41181-025-00332-z.
- [7] 张渝,杨洪钰,林欣怡,等. ^{225}Ac -PSMA-617 治疗转移性去势抵抗性前列腺癌的安全性和有效性[J].中华核医学与分子影像杂志, 2024, 44(9): 522-527. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20240506-00150.
- Zhang Y, Yang HY, Lin XY, et al. Safety and efficacy of ^{225}Ac -PSMA-617 in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2024, 44(9): 522-527. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20240506-00150.
- [8] Huang H, Bhat A, Woodnutt G, et al. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(8): 575-585. DOI:10.1038/nrc2894.
- [9] Saharinen P, Eklund L, Alitalo K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(9): 635-661. DOI:10.1038/nrd.2016.278.
- [10] Xuan Z X, Zhang S, Yuan S J, et al. Prognostic value of angiopoietin-2 in non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis [J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1): 237. DOI:10.1186/s12957-016-0992-4.
- [11] Nikolakopoulou A, Tsakogiannis D, Zagouri F, et al. Baseline Ang-2 serum levels as a predictive factor for survival in NSCLC and SCLC [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(12): 2029. DOI:10.3390/life12122092.
- [12] Li H, Gan R, Liu J, et al. Doxorubicin-loaded PEGylated liposome modified with ANGPT2-specific peptide for integrative glioma-targeted imaging and therapy [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 30: 101455. DOI:10.1016/j.mtbio.2025.101455.
- [13] 马俊,欧蕾,饶梓娟,等. ^{225}Ac 用于核素靶向治疗的临床应用及研究进展[J].中华核医学与分子影像杂志, 2023, 43(1): 52-54. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210721-00243.
- Ma J, Ou L, Rao ZJ, et al. Clinical application and research progress of ^{225}Ac for tumor targeted therapy [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2023, 43(1): 52-54. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210721-00243.
- [14] 韩毓之,吴伟峰,柯文羨,等.放射性药物治疗的应用现状与展望[J].中华核医学与分子影像杂志, 2026, 46(1): 56-60. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20250220-00046.
- Han YZ, Wu WF, Ke WX, et al. Current status and prospects of radiopharmaceutical therapy [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2026, 46(1): 56-60. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20250220-00046.
- [15] 傅文会,徐婷婷,刘会攀,等. $^{225}\text{Ac}/^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 治疗前列腺癌继发唾液腺损伤及保护的研究进展[J].中华核医学与分子影像杂志, 2022, 42(10): 628-632. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210409-00105.
- Fu WH, Xu TT, Liu HP, et al. Research progress of salivary glands injury secondary to $^{225}\text{Ac}/^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 in the treatment of prostate cancer and its protection [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2022, 42(10): 628-632. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210409-00105.
- [16] Alhaddad L, Pustovalova M, Blokhina T, et al. IR-surviving NSCLC cells exhibit different patterns of molecular and cellular reactions relating to the multifraction irradiation regimen and p53-family proteins expression [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(11): 2669. DOI:10.3390/cancers13112669.
- [17] Zolghadri S, Rafiepour P, Yousefnia H. Quantifying DNA strand breaks from targeted alpha emitters ^{225}Ac and ^{227}Th via Geant4-DNA: implications for RBE and cell survival [J]. *EJNMMI Phys*, 2025, 12(1): 92. DOI:10.1186/s40658-025-00805-9.
- [18] Cruz-Nova P, Trujillo-Nolasco M, Aranda-Lara L, et al. Radiobiological effect of alpha particles. The scientific basis of targeted alpha-particle therapy [J]. *Nucl Med Biol*, 2025, 146-147: 109044. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2025.109044.
- [19] Song Z, Zhang J, Qin S, et al. Targeted alpha therapy: a comprehensive analysis of the biological effects from "local-regional-systemic" dimensions [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2025, 53(1): 30-47. DOI:10.1007/s00259-025-07390-0.
- [20] Graf F, Fahrer J, Maus S, et al. DNA double strand breaks as predictor of efficacy of the alpha-particle emitter Ac-225 and the electron emitter Lu-177 for somatostatin receptor targeted radiotherapy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88239. DOI:10.1371/journal.pone.0088239.
- [21] Wichmann CW, Morgan KA, Cao Z, et al. Radiolabeling and pre-clinical evaluation of therapeutic efficacy of ^{225}Ac -ch806 in glioblastoma and colorectal cancer xenograft models [J]. *J Nucl Med*, 2024, 65(9): 1456-1462. DOI:10.2967/jnumed.123.266894.
- [22] Ladjohounlou R, Lozza C, Pichard A, et al. Drugs that modify cholesterol metabolism alter the p38/JNK-mediated targeted and nontargeted response to alpha and auger radioimmunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4775-4790. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-3295.
- [23] Ertveldt T, Krasniqi A, Ceuppens H, et al. Targeted alpha-therapy using ^{225}Ac radiolabeled single-domain antibodies induces antigen-specific immune responses and instills immunomodulation both systemically and at the tumor microenvironment [J]. *J Nucl Med*, 2023, 64(5): 751-758. DOI:10.2967/jnumed.122.264752.

(收稿日期:2026-03-31)