

· 靶向 FAP 分子影像技术 ·

FAP 放射性配体治疗协同免疫检查点抑制剂对微卫星稳定型结直肠癌的增敏效应与机制探索

陈健豪¹ 周扬帆¹ 逢一臻¹ 余珊¹ 吴华¹ 苏国强² 赵亮¹ 陈皓鋆¹

¹厦门大学附属第一医院核医学科及闽南 PET 中心, 厦门 361003; ²厦门大学附属第一医院结直肠肿瘤外科, 厦门 361003

通信作者: 陈皓鋆, Email: leochen0821@foxmail.com

【摘要】目的 探讨新型成纤维细胞激活蛋白(FAP)靶向放射性药物⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-2P[FAP 抑制剂(FAPI)]₂在微卫星稳定(MSS)型结直肠癌诊疗中的潜力,评估¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂联合免疫检查点抑制剂(ICIs)的疗效及作用机制。**方法** 本研究采用随机分组的成组设计。⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu 分别标记 DOTA-2P(FAPI)₂,通过体外细胞实验验证 DOTA-2P(FAPI)₂与 FAP 的结合性能。在 FAP 阳性 CT26-FAP 荷瘤小鼠模型中进行 microPET 显像与生物分布实验,并分别评估¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂单药、α 程序性死亡受体配体 1(PD-L1)单抗治疗组(简称单抗)及两者联合治疗组的体内抗肿瘤效果。采用单细胞 RNA 测序分析肿瘤微环境变化及联合治疗的机制。采用两独立样本 *t* 检验分析数据,生存分析比较采用 log-rank 检验。**结果** ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂的标记产率均>90%,放化纯均>95%。体外细胞摄取与阻断实验显示,FAPI-46 明显抑制了⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂与 FAP 的结合,两者 60 min 的细胞摄取值分别为(51.5±0.8)%与(1.0±0.3)%(*t*=102.40,*P*<0.001)。MicroPET 显像结果显示,⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂的肿瘤摄取在注射后 4 h 仍保持稳定,摄取值明显高于⁶⁸Ga-FAPI-46 [(7.3±1.6)与(3.7±0.2)每克组织百分注射剂量率(%ID/g);*t*=3.87,*P*=0.018]。生物分布结果显示,¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂注射后 24 h 在肿瘤中仍保持较高水平[(4.30±0.52)%ID/g]。¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂与 αPD-L1 单抗联合治疗组 30 d 存活率达 100%,明显优于对照组(注射生理盐水)($\chi^2=9.53$,*P*=0.002)。联合疗法可重塑肿瘤免疫微环境,增强抗肿瘤细胞间通讯,激活 T 淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞与肿瘤细胞间 Fas-FasL 等信号通路,从而协同抑制肿瘤进展。**结论** ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂在 MSS 型结直肠癌中有诊疗潜力,¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂与 ICIs 联合有望提高 MSS 型结直肠癌存活率,具备良好的临床转化前景。

【关键词】 结直肠肿瘤;膜蛋白类;镓放射性同位素;镱;程序性细胞死亡受体 1;小鼠;正电子发射断层显像术;FAP

基金项目:国家自然科学基金(82422039)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20251013-00359

Sensitization effect and mechanism of FAP-targeted radioligand therapy combined with immune checkpoint inhibitors on microsatellite stable colorectal cancer

Chen Jianhao¹, Zhou Yangfan¹, Pang Yizhen¹, Yu Shan¹, Wu Hua¹, Su Guoqiang², Zhao Liang¹, Chen Haojun¹

¹Department of Nuclear Medicine & Minnan PET Center, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; ²Department of Colorectal Tumor Surgery, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

Corresponding author: Chen Haojun, Email: leochen0821@foxmail.com

【Abstract】Objective To explore the potential of the novel fibroblast activation protein (FAP)-targeted theranostic agent ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)-2P (FAP inhibitor (FAPI))₂ in microsatellite stable (MSS) colorectal cancer, and to evaluate the efficacy and underlying mechanism of ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ in combination with immune checkpoint inhibitors (ICIs). **Methods** This study was a randomized, parallel-group design. DOTA-2P (FAPI)₂ was labeled with ⁶⁸Ga or ¹⁷⁷Lu respectively. The binding performance of DOTA-2P (FAPI)₂ to FAP was validated through *in vitro* cell experiments. FAP-positive CT26-FAP tumor-bearing mouse model was constructed, and microPET imaging and biodistribution were performed. The *in vivo* antitumor efficacy was assessed for the ¹⁷⁷Lu-

DOTA-2P (FAPI)₂ monotherapy, α programmed death-ligand 1 (PD-L1) monotherapy, and the combination of ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ with α PD-L1 therapy groups. Changes in the tumor microenvironment were analyzed using single-cell RNA sequencing to elucidate the mechanism of the combined treatment. Independent-sample *t* test was used to analyze data. Survival analysis was performed using the log-rank test. **Results** The labeling yields of ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ were both >90%, with the radiochemical purities both >95%. *In vitro* cellular uptake and blocking assays showed that FAPI-46 significantly inhibited the binding of ⁶⁸Ga-DOTA-2P (FAPI)₂ to FAP in CT26-FAP cells, with the cellular uptake values at 60 min of (51.5±0.8)% and (1.0±0.3)%, respectively (*t*=102.40, *P*<0.001). MicroPET imaging showed that the tumor uptake of ⁶⁸Ga-DOTA-2P (FAPI)₂ remained stable even at 4 h post-injection, with a significantly higher uptake value compared to ⁶⁸Ga-FAPI-46 ((7.3±1.6) vs (3.7±0.2) percentage activity of injection dose per gram of tissue (%ID/g); *t*=3.87, *P*=0.018). The biodistribution results indicated significant tumor uptake of ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ even at 24 h post-injection ((4.30±0.52) %ID/g). The combination of ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ and α PD-L1 achieved the 30-day survival rate of 100%, which was significantly superior to that of the control group (saline injection; $\chi^2=9.53$, *P*=0.002). Further mechanistic studies revealed that the combination therapy reprogrammed the tumor microenvironment, enhanced anti-tumor intercellular communication, and activated signaling pathways such as Fas-FasL between T cells/natural killer (NK) cells and tumor cells, thereby synergistically inhibiting tumor progression. **Conclusions** ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ exhibits theranostic potential for MSS colorectal cancer. The combination of ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ with ICIs may significantly prolong survival, demonstrating significant potential for clinical translation.

【Key words】 Colorectal neoplasms; Membrane proteins; Gallium radioisotopes; Lutetium; Programmed cell death 1 receptor; Mice; Positron-emission tomography; FAP

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82422039)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20251013-00359

免疫治疗,特别是免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs),如程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1)/程序性死亡受体配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 单克隆抗体 (简称单抗),已显著改善多种晚期癌症患者的预后。在结直肠癌中,微卫星高度不稳定型患者因肿瘤突变负荷高,对免疫治疗反应良好^[1];而微卫星稳定 (microsatellite stable, MSS) 型患者则获益有限^[2],亟需开发能够逆转肿瘤免疫抑制微环境的联合策略,以增强其对免疫治疗的敏感性。

放射性核素靶向治疗 (targeted radionuclide therapy, TRT) 为晚期转移性肿瘤提供了一种重要的治疗策略,其能够实现对肿瘤的精准内照射,持续的低剂量辐射在调控肿瘤微环境方面展现出独特优势。然而,目前已应用于临床的放射性药物,如¹⁷⁷Lu-前列腺特异膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA)-617 与¹⁷⁷Lu-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)-D-苯丙氨酸 1-酪氨酸 3-苏氨酸 8-奥曲肽 (*D*-Phe1-Tyr3-Thr8-octreotide, TATE),多针对特定类型肿瘤,适用范围相对有限。因此,开发更为广谱的抗肿瘤放射性药物已成为当前研究的重要方向。

成纤维细胞激活蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 在结直肠癌等多种肿瘤的肿瘤相关成纤维细胞中高表达,而在正常组织细胞中不表达或低

表达,与生长、增殖及血管生成密切相关^[3-4]。笔者团队近期开发的 FAP 抑制剂 (FAP inhibitor, FAPI) 二聚体药物¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂,在临床前及初步临床研究中展现出较传统 FAPI 药物更优的肿瘤摄取与滞留特性,并表现出更强的抑瘤效果,有望成为增强免疫治疗的有效手段^[5-6]。本研究旨在评估¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ 联合免疫疗法在 MSS 型结直肠癌中的抗肿瘤疗效,并探讨其通过重塑肿瘤免疫微环境、激活抗肿瘤免疫应答的潜在机制,以期“放射-免疫”联合治疗策略的临床应用提供相关依据。

材料与方法

一、实验材料与仪器

1. 主要仪器。MicroPET/CT 仪购自德国 Siemens 公司,薄层色谱仪购自美国 Bioscan 公司, γ 计数仪购自美国 PerkinElmer 公司,放射性核素活度仪购自北京派特生物技术有限公司,C18 柱 (WAT020515; 5 μ m, 4.6 mm×250 mm) 购自美国 Waters 公司。

2. 实验试剂。¹⁷⁷Lu (德国 ITM 公司), FAPI-46 (美国 CSBio 公司), DOTA-2P (FAPI)₂ (南昌探真生物技术有限公司), α PD-L1 单抗 (美国 BioXCell 公司), FAP 抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司), 荧光二抗 (美国 CST 公司)。

3. 细胞株与实验动物。小鼠结直肠癌细胞 CT26 和 CT26-FAP 均购自通用生物系统 (安徽) 有限公司。38 只雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 (20±2) g, 购自北京维通利华实验动物有限公司

(生产许可证号:SCXK2024-0001),饲养于无特定病原体环境。本研究为随机分组的成组设计研究,所有动物实验经厦门大学实验动物管理与伦理委员会批准(批准号:XMULAC20200140),并按照《厦门大学实验动物中心护理与使用指南》进行。

二、实验方法

1. DOTA-2P(FAPI)₂ 的放射性标记。(1) ⁶⁸Ga 标记。将约 25 nmol DOTA-2P(FAPI)₂ 溶于 1 ml 0.25 mol/L 乙酸钠溶液中,加入含 1.1 GBq ⁶⁸GaCl₃ 的 0.05 mol/L HCl 溶液 4 ml,95 °C 反应 15 min。(2) ¹⁷⁷Lu 标记。先将 DOTA-2P(FAPI)₂ 溶于 0.25 mol/L 乙酸钠溶液中,加入 0.2 ml 0.25 mol/L 乙酸铵及含 0.7 GBq ¹⁷⁷LuCl₃ 的 0.05 mol/L HCl 溶液 4 ml,95 °C 反应 30 min。反应产物经 C18 柱纯化后,采用薄层色谱与放射性高效液相色谱法测定标记率与放化纯。

2. 体外细胞实验。(1) 采用蛋白质印迹法检测 FAP 表达。细胞总蛋白经电泳分离后转膜,以质量分数 5% 脱脂牛奶封闭后依次温育 FAP 一抗与辣根过氧化物酶标记二抗(均 1:1 000 稀释),化学发光显影并通过成像系统采集信号。(2) 细胞摄取与阻断实验。将 CT26-FAP 细胞以每孔 2×10⁵ 个接种于 24 孔板过夜,摄取组加入 11.1 kBq ⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂,抑制组则预先加入 10 nmol FAPI-46,在 37 °C 无血清培养基中分别温育 10、30 及 60 min;温育结束后以冷 PBS 洗涤 2 次,经 0.1 mol/L NaOH 裂解后收集细胞裂解液,γ 计数器测定放射性活度。

3. 荷瘤小鼠模型的构建。CT26-FAP 细胞消化后制成 2×10⁷/ml 的肿瘤细胞悬液,取 100 μl (约 2×10⁶ 个细胞)接种于 BALB/c 小鼠的右侧大腿根部。

4. MicroPET 显像。将约 7.4 MBq 的 ⁶⁸Ga-FAPI-46 和 ⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂ 分别经尾静脉注射至 CT26-FAP 荷瘤小鼠(每组 3 只),并进行静态 micro-PET 显像,数据采集时间点为注射后 1、2 和 4 h。通过勾画肿瘤 ROI,对 PET 图像中的放射性摄取进行定量分析。

5. 生物分布。取 12 只 CT26-FAP 荷瘤小鼠,经尾静脉注射 0.74 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂,于注射后 4、24、48 及 72 h(各时间点 3 只)解剖获取主要器官及肿瘤组织并称量,测量各组织放射性计数,计算每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

6. 体内抗肿瘤疗效。当 CT26-FAP 荷瘤小鼠肿瘤体积达到约 50 mm³ 时,将荷瘤小鼠分为以下 4 组(每组 5 只)进行处理:A 组注射生理盐水(对照组);

B 组于第 0、3、6 天按体质量注射 10 mg/kg 的 αPD-L1 单抗;C 组于第 0 天注射 18.5 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂;D 组联合注射 18.5 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂ 与 10 mg/kg 的 αPD-L1 单抗。治疗后每 2 d 监测小鼠体质量及肿瘤体积(长径×短径²/2)。若体质量下降超过 20% 或肿瘤体积大于 1 500 mm³,则对小鼠实施安乐死。

7. 单细胞 RNA 测序。从小鼠肿瘤组织分离得到单细胞悬液,在 10K Genomics-Perseus 平台[万乘经纬基因科技(北京)有限公司]进行单细胞 RNA 测序。

8. 统计学处理。使用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行统计分析。符合正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验。绘制生存曲线,并通过 log-rank 检验比较组间差异。*P* < 0.05 为差异有统计学意义(双侧检验)。

结 果

1. DOTA-2P(FAPI)₂ 的标记及检测。⁶⁸Ga 和 ¹⁷⁷Lu 的标记产率均 > 90%,放化纯均 > 95%;两者标记产物的比活度分别为(14±2)和(23±1) GBq/μmol。

2. 体外细胞实验。蛋白质印迹分析显示,在 CT26-FAP 细胞中 FAP 呈阳性表达,而在 CT26 细胞中为阴性(图 1)。在细胞摄取和阻断实验中(图 2),CT26-FAP 细胞在 10~60 min 内逐渐增加 ⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂ 的摄取;相比之下,阻断组明显抑制了 ⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂ 与 FAP 的结合,60 min 时的摄取值分别为(51.5±0.8)%与(1.0±0.3)%(*t* = 102.40, *P* < 0.001),证实了 ⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂ 靶向 FAP 的特异性。

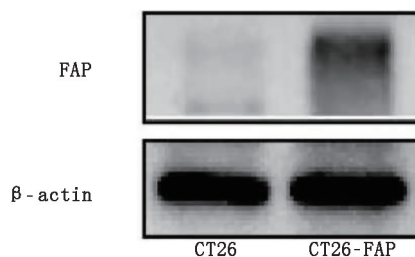


图 1 采用蛋白质印迹法检测 CT26 细胞和 CT26-成纤维细胞激活蛋白(FAP)细胞中的 FAP 表达

3. MicroPET 显像结果。注射后 4 h, ⁶⁸Ga-FAPI-46 的肿瘤摄取逐渐减少,而 ⁶⁸Ga-DOTA-2P(FAPI)₂ 的肿瘤摄取仍保持稳定(图 3),摄取值明显高于 ⁶⁸Ga-FAPI-46[(7.3±1.6)与(3.7±0.2) %ID/g;*t* = 3.87, *P* = 0.018]。

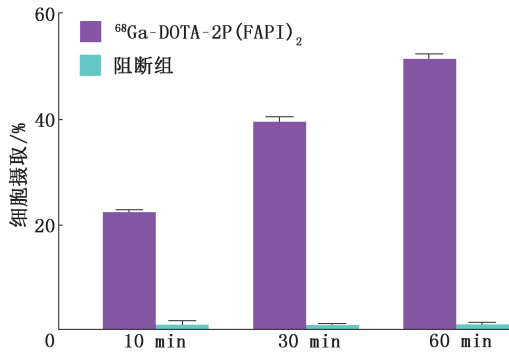


图 2 $^{68}\text{Ga-1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸 (DOTA)-2P[成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 抑制剂 (FAPI)]_2$ 在 CT26-FAP 细胞中不同时间点的细胞摄取与阻断实验结果 阻断组预先加入 10 nmol FAPI-46

4. 生物分布实验 (表 1)。在肿瘤中, $^{177}\text{Lu-DOTA-2P(FAPI)}_2$ 注射后 4 h 的摄取最高 [$(4.97 \pm 0.56) \% \text{ID/g}$], 注射后 24 h 仍保持较高水平 [$(4.30 \pm 0.52) \% \text{ID/g}$], 随后逐渐下降。在正常器官中, 注射后 24 h, $^{177}\text{Lu-DOTA-2P(FAPI)}_2$ 主要聚集于肝和脾, 余正常器官的显像剂摄取均维持在较低水平。

5. 抗肿瘤疗效 (图 4)。对照组肿瘤进展迅速, $\alpha\text{PD-L1}$ 单抗仅轻微延缓生长, 荷瘤小鼠均于 30 d 内死亡; $^{177}\text{Lu-DOTA-2P(FAPI)}_2$ 单药表现出一定抑瘤效果, 而联合治疗组在第 16 天实现全部小鼠完全缓解。治疗期间 $^{177}\text{Lu-DOTA-2P(FAPI)}_2$ 及其联合组小鼠体质量仅出现短暂轻微下降, 并于 6 d 后恢复, 提示治疗安全性良好。生存分析表明, 联合治疗组 30 d 存活率达 100%, 明显优于对照组 (0%; $\chi^2 = 9.53, P = 0.002$); ^{177}Lu 单药组存活率为 60%, 亦明显高于对照组 ($\chi^2 = 9.53, P = 0.002$)。

6. 单细胞 RNA 测序结果。基于特征标记基因, 鉴定了肿瘤微环境中的 8 种主要细胞类型, 细胞比例分析显示, 与对照组相比, $^{177}\text{Lu-DOTA-2P(FAPI)}_2$

表 1 $^{177}\text{Lu-DOTA-2P(FAPI)}_2$ 注射后不同时间点在不同 CT26-FAP 荷瘤小鼠体内的生物分布结果 ($\bar{x} \pm s; \% \text{ID/g}$)

器官或肿瘤	4 h	24 h	48 h	72 h
心	3.87±0.10	1.01±0.06	0.63±0.08	0.41±0.03
肝	3.67±0.36	3.94±0.52	3.27±0.61	2.32±0.23
肺	4.27±0.83	0.50±0.12	0.26±0.02	0.19±0.01
肾	2.54±0.21	1.34±0.05	0.90±0.05	0.65±0.07
脾	2.87±0.08	2.16±0.45	1.85±0.21	1.57±0.36
胃	1.83±0.57	0.34±0.11	0.24±0.04	0.14±0.03
骨骼	2.46±0.29	1.08±0.17	0.76±0.12	0.59±0.20
肌肉	2.47±0.06	0.81±0.07	0.38±0.05	0.25±0.02
小肠	1.83±0.09	0.43±0.06	0.32±0.05	0.20±0.03
血液	7.03±0.37	0.28±0.07	0.04±0.01	0.17±0.07
脑	0.37±0.17	0.05±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01
肿瘤	4.97±0.56	4.30±0.52	2.47±0.47	1.25±0.02

注: 每个时间点小鼠数为 3 只; DOTA 为 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸, FAPI 为成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 抑制剂, $\% \text{ID/g}$ 为每克组织百分注射剂量率

单药及其联合 $\alpha\text{PD-L1}$ 治疗均显著提升了 T 淋巴细胞与自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞的浸润水平, 且联合治疗组的增幅最为显著 (图 5A), 提示联合治疗重塑免疫微环境的能力更强。信号通路分析表明, 治疗组中 FASLG (Fas 配体, FasL) 与白细胞介素 (interleukin, IL)-1 信号通路被显著激活, 而与肿瘤恶性进展相关的分泌性磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1) 通路则被抑制 (图 5B)。在细胞通讯层面, 单药与联合治疗均抑制了 NK 细胞与癌细胞之间由转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- $\beta 1$ 及其受体介导的促癌相互作用; 联合治疗还显著增强了 T 淋巴细胞/NK 细胞与癌细胞之间通过 Fas-FasL 通路发生的促凋亡相互作用 (图 5C), 该发现与联合疗法最优的抑瘤效果及上游 FASLG 通路上调相互印证, 从细胞互作层面揭示了

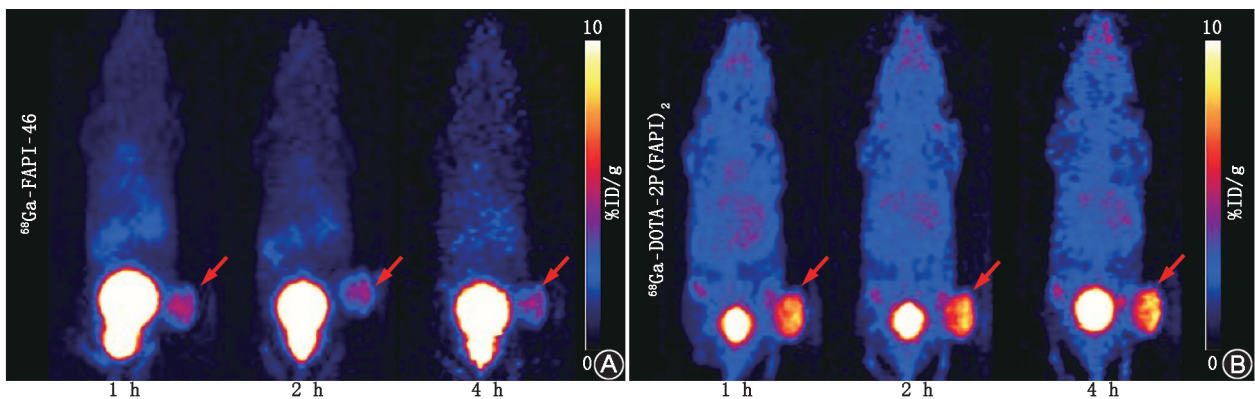


图 3 CT26-FAP 荷瘤小鼠注射 $^{68}\text{Ga-FAPI-46}$ (A) 或 $^{68}\text{Ga-DOTA-2P(FAPI)}_2$ (B) 不同时间点的 microPET 显像图 (箭头示肿瘤) 结果显示 $^{68}\text{Ga-FAPI-46}$ 的肿瘤摄取逐渐减少, 而 $^{68}\text{Ga-DOTA-2P(FAPI)}_2$ 的肿瘤摄取保持稳定。 $\% \text{ID/g}$ 为每克组织百分注射剂量率

协同治疗的潜在机制。

讨 论

当前 ICIs 单药治疗对 MSS 型结直肠癌疗效有限。为突破此瓶颈,本研究提出一种靶向 FAP 的放射性核素联合免疫治疗新策略,旨在重塑肿瘤免疫微环境,增强 FAP 阳性 MSS 型结直肠癌对免疫治疗的响应。鉴于 FAP 在多种实体瘤中广泛高表达,该策略亦具备潜在的泛瘤种应用前景。本研究结果表明,¹⁷⁷Lu-DOTA-2P (FAPI)₂ 联合 αPD-L1 单抗治疗相较于单药方案,展现出更强的肿瘤免疫微环境重塑能力,可显著提高治疗响应率并延长荷瘤小鼠的生存期。在 MSS 型结直肠癌模型中,该联合方案通过促进抗肿瘤免疫细胞的浸润与活化,有效增强了对 PD-L1 抑制剂的疗效;进一步单细胞 RNA 测序分析证实,联合治疗不仅提升了 CD8⁺T 淋巴细胞与 NK 细胞的浸润水平,还伴随调节性 T 淋巴细胞的抑制,并调控关键信号通路(如激活 FASLG、抑

制 SPP1),从分子机制层面揭示了该策略逆转免疫抑制微环境的可行路径。

新近研究显示,在 MCA205-FAP 肉瘤模型中,¹⁷⁷Lu-FAP-2286 联合 αPD-L1 单抗可通过调节肿瘤微环境和增加 CD8⁺T 淋巴细胞浸润以增强 ICIs 应答^[7],与本研究的结论一致。本研究进一步采用单细胞 RNA 测序进行高分辨率解析,揭示出群体分析中易被掩盖的细胞异质性,明确了肿瘤细胞亚群分布、转录因子活性及关键信号通路。笔者课题组前期工作显示,靶向整合素 α₅β₃ 的¹⁷⁷Lu-伊文思蓝-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸联合 αPD-L1 可显著增强抗肿瘤疗效,初步提示放射性核素治疗的免疫调节潜力^[8-9]。本研究在此基础上,将靶点拓展至肿瘤微环境中 FAP,并借助单细胞技术深入阐释其免疫调控机制,实现了在靶点选择与研究深度两方面的系统性推进。

低剂量照射(0.5~2 Gy)能够重编程肿瘤微环境,具体表现为诱导巨噬细胞向 M1 表型极化。这

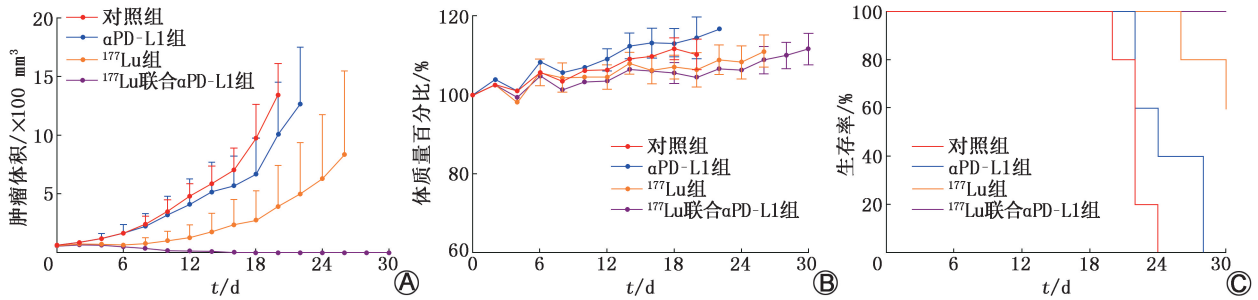


图 4 注射生理盐水(对照组)、¹⁷⁷Lu-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-2P[成纤维细胞激活蛋白(FAP)抑制剂(FAPI)]₂ 治疗(¹⁷⁷Lu组)、α程序性死亡受体配体1(PD-L1)单克隆抗体治疗(αPD-L1组)及其联合治疗(¹⁷⁷Lu联合αPD-L1组)不同时间点 CT26-FAP 荷瘤小鼠的肿瘤体积(A)、体质量(B)及生存曲线(C) 每组 5 只小鼠

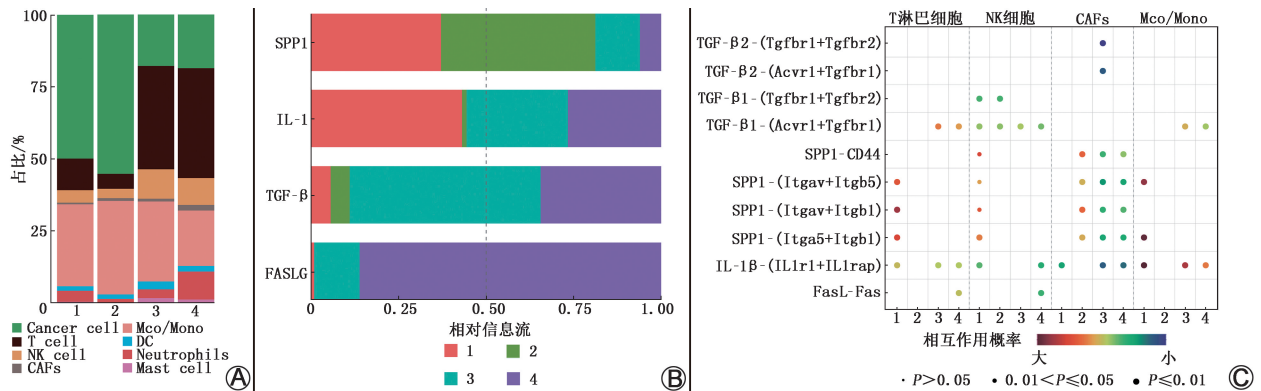


图 5 不同治疗组 CT26-FAP 荷瘤小鼠单细胞 RNA 测序结果分析 A.不同治疗组肿瘤微环境中主要细胞亚群的条形图;B.不同治疗组内不同细胞信号通路比例的条形图;C.不同治疗组各细胞与肿瘤细胞之间的配体-受体相互作用图。1~4 分别为对照组、αPD-L1 组、¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂ 组和¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂ 联合 αPD-L1 组;Cancer cell 为肿瘤细胞,T cell 为 T 淋巴细胞,NK cell 为自然杀伤细胞,CAF s 为肿瘤相关成纤维细胞,Mco/Mono 为巨噬细胞/单核细胞,DC 为树突状细胞,Neutrophils 为中性粒细胞,Mast cell 为肥大细胞,SPP1 为分泌性磷蛋白 1,IL 为白细胞介素,TGF 为转化生长因子,FASLG 为 Fas 配体(FasL),Tgfr 为 TGF-β 受体,Acvr 为激活素 A 受体,Itgav 为整合素 α₅,Itgb5 为整合素 β₃,Itgb1 为整合素 β₁,Itga5 为整合素 α₅,IL1r1 为 IL-1 受体 1 型,IL1rap 为 IL-1 受体辅助蛋白

些一氧化氮合酶阳性的 M1 巨噬细胞,通过释放相关趋化因子募集效应 T 淋巴细胞至肿瘤部位;此外,它们还能诱导肿瘤血管正常化并促进炎症反应,从而共同促进 T 淋巴细胞的深度浸润^[10]。基于此,未来可探索针对不同病灶的联合治疗策略:对原发灶或大体积病灶采用“TRT+ICIs+外照射治疗(external beam radiation therapy, EBRT)”三联疗法;而对转移灶采用“TRT+ICIs”双药方案,以降低 EBRT 对正常组织的脱靶毒性。有研究指出,中等剂量 EBRT 与低剂量 TRT 在激活“冷肿瘤”免疫中具有协同作用:EBRT 主要通过原位疫苗效应激活 T 淋巴细胞应答,而低剂量辐照则改善肿瘤微环境并减轻正常组织损伤^[11-12]。

本研究仍存在一定的局限性。首先,皮下移植瘤模型的肿瘤微环境与自发结直肠癌存在一定差异。尽管本研究选用了免疫完全小鼠以保持免疫系统的真实性,但缺乏自发 FAP 表达的免疫感受态结直肠癌模型仍是限制之一。目前相关研究多使用转染 FAP 的肿瘤模型(如 MCA205-mFAP、4T1-FAP)^[7,13],未来应探索自发 FAP 表达的原位结直肠癌模型。其次,本研究中治疗起始时肿瘤体积较小(约 50 mm³),虽符合临床前实验的一般标准,但后续应在更大肿瘤模型中进一步验证联合治疗的效果。

本研究表明,靶向 FAP 的放射性药物¹⁷⁷Lu-DOTA-2P(FAPI)₂能够有效激活抗肿瘤免疫,并通过重编程免疫微环境增强 MSS 型结直肠癌对 PD-1/PD-L1 抑制剂的治疗敏感性,为难治性“冷肿瘤”的免疫联合治疗提供了新视角与临床前依据。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈健豪:研究实施、论文撰写;周扬帆、逢一臻、余珊:研究实施、统计学分析;吴华、苏国强、赵亮:研究指导;陈皓鋆:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] 陈桥梁,李响,来瑞鹤,等. ¹⁸F-FDG PET 相关代谢参数预测结直肠癌微卫星高度不稳定性及 HER2 表达[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2025, 45(1): 7-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20240508-00154.
- [2] André T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 383(23): 2207-2218. DOI: 10.1056/NEJMoa2017699.
- [3] 林学智,鲁海文,张国建. FAP 靶点类放射性药物用于肿瘤核素内照射治疗的研究进展[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2025, 45(7): 435-440. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20240717-00264.
- [4] Lin XZ, Lu HW, Zhang GJ. Research progress of fibroblast activation protein-targeted radiopharmaceuticals in tumor radionuclide internal radiation therapy[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2025, 45(7): 435-440. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20240717-00264.
- [5] 赵亮,陈健豪,逢一臻,等. 靶向成纤维细胞激活蛋白四聚体放射性探针的构建及其在荷瘤裸鼠中的诊疗一体化研究[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2023, 43(6): 343-348. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20230221-00042.
- [6] Zhao L, Chen JH, Pang YZ, et al. Development of radiolabeled tetramer that targeting fibroblast activation protein and theranostic research in tumor xenografts[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2023, 43(6): 343-348. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20230221-00042.
- [7] Zhao L, Niu B, Fang J, et al. Synthesis, preclinical evaluation, and a pilot clinical PET imaging study of ⁶⁸Ga-labeled FAPI dimer[J]. J Nucl Med, 2022, 63(6): 862-868. DOI: 10.2967/jnumed.121.263016.
- [8] Zhao L, Chen J, Pang Y, et al. Development of fibroblast activation protein inhibitor-based dimeric radiotracers with improved tumor retention and antitumor efficacy[J]. Mol Pharm, 2022, 19(10): 3640-3651. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00424.
- [9] Zboralski D, Osterkamp F, Christensen E, et al. Fibroblast activation protein targeted radiotherapy induces an immunogenic tumor microenvironment and enhances the efficacy of PD-1 immune checkpoint inhibition[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2023, 50(9): 2621-2635. DOI: 10.1007/s00259-023-06211-6.
- [10] Chen H, Zhao L, Fu K, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radionuclide therapy combined with immune checkpoint blockade immunotherapy synergistically enhances anti-tumor efficacy[J]. Theranostics, 2019, 9(25): 7948-7960. DOI: 10.7150/thno.39203.
- [11] 赵亮,富凯丽,姚兰琳,等. 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 放射性核素靶向治疗联合 PD-L1 免疫治疗的实验研究[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2020, 40(5): 268-274. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191128-00278.
- [12] Zhao L, Fu KL, Yao LL, et al. Enhancement of therapeutic efficacy by combination of integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotherapy and anti-PD-L1 immunotherapy: a preclinical study[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40(5): 268-274. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191128-00278.
- [13] Bergeron P, Dos Santos M, Sitterle L, et al. Non-homogenous intratumor ionizing radiation doses synergize with PD1 and CXCR2 blockade[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 8845. DOI: 10.1038/s41467-024-53015-9.
- [14] Patel RB, Hernandez R, Carlson P, et al. Low-dose targeted radionuclide therapy renders immunologically cold tumors responsive to immune checkpoint blockade[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(602): eabb3631. DOI: 10.1126/scitranslmed.abb3631.
- [15] Arunkumar N, Gokul M, Narayanam H, et al. Low-dose radiation research insights in experimental animals; a gateway to therapeutic implications[J]. Vet World, 2024, 17(10): 2253-2258. DOI: 10.14202/vetworld.2024.2253-2258.
- [16] Fu Q, Gu Z, Shen S, et al. Radiotherapy activates picolinium prodrugs in tumours[J]. Nat Chem, 2024, 16(8): 1348-1356. DOI: 10.1038/s41557-024-01501-4.

(收稿日期:2025-10-13)