

CaCO₃ 纳米颗粒递送²²³Ra 联合 Ca²⁺ 释放增强肝细胞癌细胞杀伤效应

李文杰¹ 王思雨² 王涛² 程超² 左长京¹

¹上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093; ²海军军医大学第一附属医院核医学科, 上海 200433

通信作者: 程超, Email: chao_cheng_1999@163.com; 左长京, Email: cjzuo@smmu.edu.cn

【摘要】 目的 构建负载²²³Ra 的 CaCO₃ 纳米颗粒 (NPs), 以肝细胞癌 (HCC) 细胞为模型, 评估其治疗效能, 并探讨 CaCO₃ NPs 在细胞内水解释放 Ca²⁺ 增敏 α 核素治疗的分子机制。**方法** 采用 CaCl₂ 与 Na₂CO₃ 共沉淀法制备 CaCO₃ NPs, 并以少量 BaCl₂ 替代 CaCl₂ 进行掺杂, 模拟并验证²²³Ra 标记 CaCO₃ NPs 的可行性。运用透射电子显微镜 (TEM)、X 射线衍射仪 (XRD)、热重分析仪 (TGA) 对 NPs 进行表征。制备²²³Ra-CaCO₃ NPs 并检测标记率。采用大鼠 N1S1 HCC 细胞, 通过完全随机设计开展实验。用细胞计数盒 (CCK-8) 评估 CaCO₃ NPs 的生物安全性, 比较²²³RaCl₂ 与²²³Ra-CaCO₃ NPs 对 N1S1 细胞的杀伤效能, 检测 N1S1 胞内 Ca²⁺ 水平 (Fluo-4 AM 探针结合流式细胞术)、细胞周期分布 (流式细胞术), 通过免疫荧光染色及 Western blot 检测 DNA 双链断裂标志物 γ -H2AX 和同源重组 (HR) 修复蛋白 RAD51 的表达变化。采用两独立样本 *t* 检验和单因素方差分析 (事后检验采用 Tukey 法、Dunnett 法) 处理数据。**结果** 成功制备粒径约 20 nm 的 CaCO₃ NPs, ²²³Ra-CaCO₃ NPs 标记率为 (98.10±1.23)% (*n*=3)。600 μ g/ml 及以下质量浓度 CaCO₃ NPs 对正常肝细胞 BRL-3A 及 N1S1 细胞均无明显毒性。CaCO₃ NPs 可显著提升 N1S1 细胞内 Ca²⁺ 浓度 (*t*=6.97, *P*=0.002)。²²³Ra-CaCO₃ NPs 处理后 N1S1 细胞活力降至 (49.95±3.21)%, 低于²²³RaCl₂ 组 (*F*=25.33, *q*=8.65, 均 *P*<0.001)。相较于²²³RaCl₂ 和 CaCO₃ NPs 处理组, ²²³Ra-CaCO₃ NPs 处理后处于 S 期的 N1S1 细胞比例增加 (*F*=4.38, *P*=0.042), 且细胞内 γ -H2AX 荧光强度最高 (*F*=433.20, *P*<0.001), RAD51 蛋白表达较对照组降低 (*F*=119.70, *q*=25.14, 均 *P*<0.001)。**结论** CaCO₃ NPs 是²²³Ra 的良好递送载体, 且其进入细胞后水解释放的 Ca²⁺ 可通过下调 RAD51 蛋白表达和削弱 HR 修复能力增强²²³Ra 对 HCC 细胞的杀伤作用。

【关键词】 癌, 肝细胞; 放射疗法; 镭; 碳酸钙; 纳米粒子; 肿瘤细胞, 培养的; 大鼠

基金项目: 国家自然科学基金 (82272040)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20260414-00121

²²³Ra-loaded calcium carbonate nanoparticles enhance hepatocellular carcinoma cell killing via synergistic Ca²⁺ release

Li Wenjie¹, Wang Siyu², Wang Tao², Cheng Chao², Zuo Changjing¹

¹School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; ²Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding authors: Cheng Chao, Email: chao_cheng_1999@163.com; Zuo Changjing, Email: cjzuo@smmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct ²²³Ra-loaded CaCO₃ nanoparticles (NPs), evaluate their α -particle therapeutic efficacy using a hepatocellular carcinoma (HCC) cell model, and explore the molecular mechanism by which Ca²⁺ released from the intracellular hydrolysis of CaCO₃ NPs sensitize α -therapy. **Methods** CaCO₃ NPs were prepared via a coprecipitation method using CaCl₂ and Na₂CO₃, with a minor substitution of BaCl₂ for CaCl₂ as a dopant to simulate and verify the feasibility of ²²³Ra labeling. The NPs were characterized using transmission electron microscope (TEM), X-ray diffractometer (XRD), and thermogravimetric analyzer (TGA). ²²³Ra-CaCO₃ NPs were synthesized, and the radiolabeling efficiency was measured. Rat N1S1 HCC cells were used as the experimental model, and a completely randomized design was employed. The biosafety of CaCO₃ NPs was evaluated in rat N1S1 HCC cells using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Intracellular Ca²⁺ levels were measured by flow cytometry with a Fluo-4 AM probe. Furthermore, the killing efficacy of ²²³RaCl₂ and ²²³Ra-CaCO₃ NPs against N1S1 cells was compared. Cell cycle distribution was analyzed via flow cytometry. Immunofluorescence staining and Western blot were performed

to assess the expression changes of the DNA double-strand break marker γ -H2AX and the homologous recombination (HR) repair protein RAD51. Data were analyzed using independent-sample *t* test and one-way analysis of variance with Tukey or Dunnett post-hoc test. **Results** CaCO_3 NPs with a diameter of approximately 20 nm were successfully synthesized, and the radiolabeling efficiency of ^{223}Ra - CaCO_3 NPs was $(98.10 \pm 1.23)\%$ ($n=3$). CaCO_3 NPs exhibited no significant cytotoxicity toward both normal liver cells (BRL-3A) and N1S1 cells at concentration $\leq 600 \mu\text{g/ml}$. CaCO_3 NPs significantly increased the intracellular Ca^{2+} concentration in N1S1 cells ($t=6.97$, $P=0.002$). Following treatment with ^{223}Ra - CaCO_3 NPs, the viability of N1S1 cells decreased to $(49.95 \pm 3.21)\%$, significantly lower than that of the $^{223}\text{RaCl}_2$ group ($F=25.33$, $q=8.65$, both $P<0.001$). Compared to the $^{223}\text{RaCl}_2$ and CaCO_3 treatment groups, ^{223}Ra - CaCO_3 NPs treatment resulted in an increased proportion of N1S1 cells in the S phase ($F=4.38$, $P=0.042$). The ^{223}Ra - CaCO_3 NPs group displayed the highest intracellular γ -H2AX fluorescence intensity ($F=433.20$, $P<0.001$), and RAD51 protein expression of this group was significantly decreased compared with that of the control group ($F=119.70$, $q=25.14$, both $P<0.001$). **Conclusion** CaCO_3 NPs not only serve as an excellent delivery carrier for ^{223}Ra but also release Ca^{2+} upon intracellular hydrolysis, which downregulates RAD51 protein expression, impairs HR repair capacity, and ultimately enhances the cytotoxic effect of ^{223}Ra on HCC cells.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Radiotherapy; Radium; Calcium carbonate; Nanoparticles; Tumor cells, cultured; Rats

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82272040)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20260414-00121

α 粒子凭借其较 X、 γ 及 β^- 射线更高的传能线密度 (linear energy transfer, LET) 及不依赖氧环境的细胞杀伤特性^[1-2], 能够高效杀伤乏氧肿瘤细胞, 已成为肿瘤放射性核素内照射治疗的研究热点^[3-4]。 $^{223}\text{RaCl}_2$ 是目前唯一获美国食品与药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的 α 粒子药物^[5], 主要用于骨转移性前列腺癌的治疗^[6]。因缺乏理想的递送载体, α 核素在非骨靶向实体肿瘤中的应用受限^[7]。

CaCO_3 纳米颗粒 (nanoparticles, NPs) 具有良好的生物相容性, 是极具潜力的药物载体^[8-9]。 Ra 与 Ca 属同一族, 具有相似的化学性质^[10], 这为利用元素掺杂法实现 CaCO_3 NPs 对 ^{223}Ra 的负载奠定了基础^[11]。此外, CaCO_3 NPs 在细胞内水解产生的 Ca^{2+} 可以与 Mg^{2+} 竞争, 干扰 Mg^{2+} 依赖的 DNA 修复酶活性^[12]。 α 粒子可以高效导致 DNA 双链断裂 (DNA double-strand break, DSB), 而同源重组 (homologous recombination, HR) 修复是 DSB 的主要修复途径之一; RAD51 是 HR 修复过程中的关键重组酶, 其活性依赖于 Mg^{2+} 的辅因子作用^[13]。因此, 利用 CaCO_3 NPs 递送 ^{223}Ra , 还可以通过提高胞内 Ca^{2+} 水平抑制 RAD51 介导的 HR 修复, 从而增进 α 粒子对肿瘤细胞的杀伤。基于此, 本研究采用共沉淀法制备 CaCO_3 NPs 并进行 ^{223}Ra 标记, 以大鼠 N1S1 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞为模型, 评估 ^{223}Ra - CaCO_3 NPs 的肿瘤杀伤效能, 并初步验证其通过释放 Ca^{2+} 下调 RAD51、抑制 HR 修复从而增进 α 治疗的分子机制。

材料与方法

1. 仪器与材料。实验仪器主要有: 四联磁力搅拌器 (MITR 米淇, 长沙米淇仪器设备有限公司)、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM; Hitachi HT-7800, 日本)、X 射线衍射仪 (X-ray diffractometer, XRD; Rigaku Smart Lab, 日本)、热重分析仪 (thermogravimetric analyzer, TGA; TA Q500, 美国)、高速离心机 (GTR16-2, 北京时代北利离心机有限公司)、高速台式离心机 (GT-16, 北京时代北利离心机有限公司)、SPECT/CT 仪 (Siemens Symbia T16, 德国)、井型 γ 计数器 (GC-2101, 北京派特生物技术有限公司)、流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国)、倒置荧光显微镜 (Olympus IX71, Evident, 日本)。

无水 CaCl_2 、 Na_2CO_3 、 BaCl_2 购于国药集团化学试剂有限公司; Fluo-4 AM 荧光探针购于美国 APEX BIO Technology LLC 公司; 细胞计数盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购于日本同仁化学研究所; $^{223}\text{RaCl}_2$ 注射液 (Xofigo) 购于德国 Bayer 公司; RAD51 抗体、DSB 标志物 γ -H2AX 抗体购于上海圣尔生物科技有限公司; 大鼠 N1S1 HCC 细胞株和大鼠 BRL-3A 正常肝细胞株购于上海葵赛生物科技有限公司。

2. CaCO_3 NPs 的制备与表征。将 0.1 mol/L CaCl_2 溶液与聚丙烯酸 (polyacrylic acid, PAA) 混匀 (500 r/min 搅拌 1 h), 随后在 800 r/min 搅拌条件下缓慢滴加等体积的 0.1 mol/L Na_2CO_3 溶液, 继续室温搅拌反应 1 h ; 反应结束后用高速离心机室温离心 (15000 r/min , 离心半径 10 cm) 5 min 收集沉淀, 用去离子水 and 无水乙醇交替洗涤, 最后于 60°C 真空干

干燥 12 h, 获得 CaCO_3 NPs。通过 TEM 观察 NPs 形貌与粒径, 并利用其配备的能量色散 X 射线谱 (energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS) 进行成分分析及元素映射 (elemental mapping)。XRD 分析晶体结构, TGA 分析热稳定性。

3. ^{223}Ra 标记及验证。基于 Ba 与 Ra 的同族化学相似性, 将 Ba^{2+} 作为 ^{223}Ra 的非放射性类似物, Ba^{2+} 与 Ca^{2+} 按物质的量比 1:1 000 进行掺杂共沉淀实验, 使用元素映射验证 Ba^{2+} 掺杂的可行性。类似地, 在 CaCO_3 NPs 合成过程中加入 $^{223}\text{RaCl}_2$ (37 kBq/ml), 用高速台式离心机室温离心 (15 000 r/min, 离心半径约 6.89 cm) 5 min 去除游离 ^{223}Ra , 沉淀即为 $^{223}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ NPs, 使用 SPECT/CT 显像验证是否标记成功; 采用井型 γ 计数器测定放射性计数并计算标记率。

4. 细胞培养。大鼠 HCC 细胞 N1S1 和正常肝细胞 BRL-3A 均于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养。本研究细胞实验采用完全随机设计, 根据不同实验目的设置对应处理分组。

5. 细胞内 Ca^{2+} 水平及 CaCO_3 NPs 分布检测。首先使用 CCK-8 法检测不同质量浓度 (0、5、25、100、200、400、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) CaCO_3 NPs 处理 24 h 后 BRL-3A 和 N1S1 细胞的活力。将 N1S1 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 贴壁后分别加入含 CaCO_3 NPs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基处理 4 h。Fluo-4 AM 探针 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 37 °C 避光温育 30 min 后, 采用流式细胞术检测细胞内 Ca^{2+} 荧光强度。另取部分细胞于 TEM 下观察 NPs 的分布。

6. 细胞活性与杀伤效应检测。将 N1S1 细胞以 4×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板 (每孔液体总体积为 100 μl) 贴壁后进行干预: (1) 分别加入不同放射性浓度 (0、0.5、1、2、4、6、8、10 kBq/ml) 的 $^{223}\text{RaCl}_2$ 处理 24 h; (2) 分为对照组、 CaCO_3 NPs 组 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、 $^{223}\text{RaCl}_2$ 组 (2 kBq/ml) 和 $^{223}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ NPs (2 kBq/ml) 组处理 24 h。各组细胞均置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO_2 饱和湿度培养箱中培养。干预结束后, 每孔加入 CCK-8 溶液继续温育, 利用酶标仪测定吸光度并计算细胞活力。

7. 细胞周期检测。将 N1S1 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 按方法 6 分组处理 24 h 后, 收集细胞, 加入体积分数 70% 冷乙醇于 4 °C 固定过夜。PBS 洗涤后, 用碘化丙啶/RNase A 染色液于 37 °C 避光温育 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期分布。

8. 免疫荧光检测。将 N1S1 细胞以 3×10^4 个/孔

的密度接种于 24 孔板内的盖玻片上, 按方法 6 分组处理 24 h 后, 用 0.04 g/ml 多聚甲醛固定 15 min, 以体积分数 0.3% Triton X-100 通透 10 min, 质量分数 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h。加入 $\gamma\text{-H2AX}$ 抗体 (1:500) 后 4 °C 温育过夜。次日, 加入相应荧光二抗 (1:500), 室温避光温育 1 h, 然后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染细胞核。在荧光显微镜下观察并采集图像, 用 Image J 软件进行荧光强度定量分析。

9. Western blot 检测。按方法 6 分组处理 N1S1 细胞 24 h 后, 以 RIPA 裂解液提取总蛋白质, BCA 法测定蛋白质浓度。取 20 μg 蛋白质进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜, 用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入 RAD51 抗体 (1:1 000) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (1:5 000) 4 °C 温育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记二抗室温下温育 1 h, 进行化学发光法显影, 采用 Image J 软件进行灰度分析。

10. 统计学处理。采用 IBM SPSS Statistics 27.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析, 符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间比较采用两独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Tukey 法 (仅与对照组比较时采用 Dunnett 法)。所有实验设置至少 3 次独立生物学重复, 采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. $^{223}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ NPs 的制备与表征。TEM 观察显示合成的 CaCO_3 NPs 呈近球形, 粒径约 20 nm, 分散性良好 (图 1)。通过元素映射与 XRD 证实 Ba^{2+} 成功掺杂且产物为方解石型, 热重分析失重特征符合 CaCO_3 热分解规律。SPECT/CT 显像证实, 利用元素掺杂共沉淀法成功将 ^{223}Ra 标记到 CaCO_3 NPs 上 (图 2), $^{223}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ NPs 的标记率为 $(98.10 \pm 1.23)\%$ ($n = 3$)。体外稳定性检测显示, 在 PBS 中温育 144 h 后, $^{223}\text{Ra}-\text{CaCO}_3$ NPs 的放化纯仍保持在 $(95.07 \pm 1.39)\%$, 显示出良好的体外稳定性。

2. CaCO_3 NPs 的生物安全性及诱导 N1S1 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。CCK-8 结果显示, 在 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及以下质量浓度, CaCO_3 NPs 对 N1S1 细胞和正常肝细胞 BRL-3A 的存活无毒性 (没有一个质量浓度组出现细胞活力下降), 在 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 细胞活力与

对照组相比差异仍无统计学意义[N1S1: $F=4.70$ ($P=0.008$), $q=0.67$ ($P=0.982$); BRL-3A: $F=3.39$ ($P=0.028$), $q=2.29$ ($P=0.540$)],提示 CaCO_3 NPs 在测试质量浓度范围内本身不具有细胞毒性。TEM 观察显示, CaCO_3 NPs 与 N1S1 细胞共培养后被细胞吞噬, 主要分布于细胞质及溶酶体内(图 3)。Fluo-4 AM 探针流式检测发现, CaCO_3 NPs 处理组 N1S1 细胞的 Fluo-4 荧光强度显著增高($t=6.97$, $P=0.002$), 表明 CaCO_3 NPs 能够提高 HCC 细胞内 Ca^{2+} 浓度。

3. $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 增强对 HCC 细胞的杀伤效能。CCK-8 结果显示, $^{223}\text{RaCl}_2$ 对 N1S1 细胞活力的抑制呈放射性浓度依赖性(图 4A)。按照图 4B 所示不同分组处理 24 h 后, 与对照组相比, CaCO_3 NPs 组细胞活力无明显差异($F=25.33$, $P<0.001$; $q=1.13$, $P=0.853$); $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 组细胞活力为(49.95 ± 3.21)%, 低于 $^{223}\text{RaCl}_2$ 组($F=25.33$, $q=8.65$, 均 $P<0.001$), 表明 CaCO_3 NPs 作为载体可显著增强 ^{223}Ra 对 HCC 细胞的杀伤效能。

4. $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 诱导 HCC 细胞 S 期阻滞并抑制 HR 修复。细胞周期检测结果(图 5)显示, $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 组 S 期(即 DNA 复制期)细胞比例显著升

高($F=4.38$, $P=0.042$), 与对照组($q=13.13$, $P<0.001$) 和 $^{223}\text{RaCl}_2$ 组($q=12.52$, $P<0.001$) 差异均有统计学意义。免疫荧光检测(图 6A)显示, 4 组间 DSB 标志物 $\gamma\text{-H2AX}$ 荧光强度差异有统计学意义($F=433.20$, $P<0.001$), $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 组 $\gamma\text{-H2AX}$ 荧光强度高于对照组($q=40.02$, $P<0.001$)、 CaCO_3 NPs 组($q=36.69$, $P<0.001$)、 $^{223}\text{RaCl}_2$ 组($q=8.67$, $P<0.001$)。Western blot 结果(图 6B)证实各组 RAD51 蛋白的表达差异有统计学意义($F=119.70$, $P<0.001$), $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 组 RAD51 的表达低于 $^{223}\text{RaCl}_2$ 组($q=5.85$, $P=0.013$) 和对照组($q=25.14$, $P<0.001$)。上述结果表明, CaCO_3 NPs 能通过抑制 HR 修复关键蛋白 RAD51 的表达, 削弱 HCC 细胞对 α 粒子诱导 DSB 的修复能力。

讨 论

本研究针对 α 核素 ^{223}Ra 缺乏有效递送载体的临床“痛点”^[9], 成功构建 $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 递送系统, 并在 HCC 细胞模型中验证了其增敏放疗的效能。本研究结果显示, CaCO_3 NPs 具有优异的放射化学稳定性与生物相容性, 能通过内吞途径顺利进

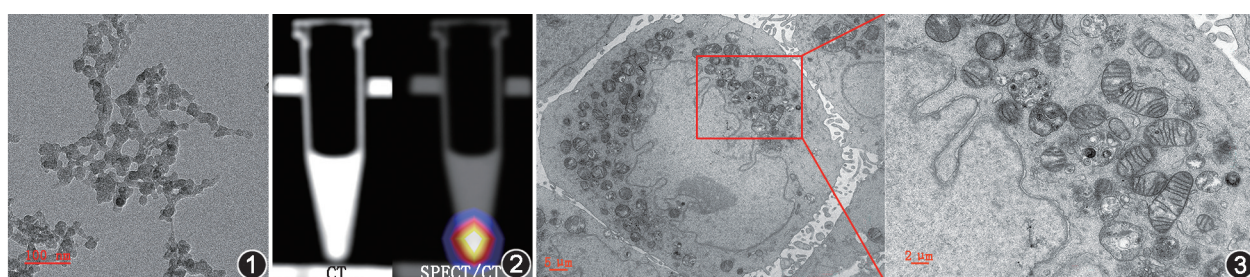


图 1 CaCO_3 纳米颗粒(NPs)的透射电子显微镜(TEM)图像 图 2 $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs SPECT/CT 显像图 可见热点信号明显集中于离心脏底部, 表明 NPs 具有良好的放射性标记稳定性 图 3 CaCO_3 NPs 与 N1S1 细胞共培养 4 h 后 TEM 检测图 左图可见 CaCO_3 NPs 成功进入肝细胞癌细胞内部; 右图选框区域放大图, 可见部分 NPs 被溶酶体包裹

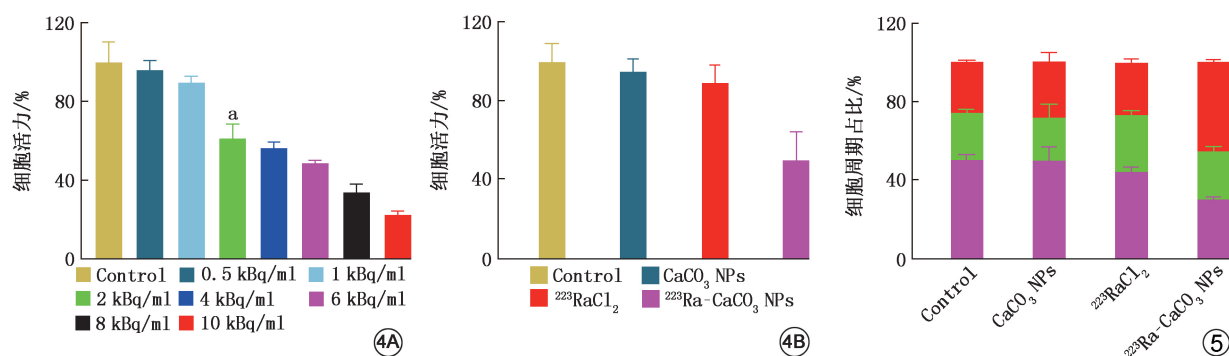


图 4 细胞杀伤实验结果 4A. 不同放射性浓度 $^{223}\text{RaCl}_2$ (0~10 kBq/ml) 处理 24 h 后 N1S1 细胞活力; 4B. 对照组 (Control)、 CaCO_3 NPs 组 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、 $^{223}\text{RaCl}_2$ 组 (2 kBq/ml) 及 $^{223}\text{Ra}\text{-CaCO}_3$ NPs 组 (2 kBq/ml) 处理 24 h 后 N1S1 细胞活力 图 5 各组 N1S1 细胞处理 24 h 后 G0/G1 期、G2/M 期及 S 期细胞比例堆积柱状图 紫色、绿色、红色分别代表 G0/G1 期 (DNA 合成前期/静止期)、G2/M 期 (DNA 合成期) 及 S 期 (DNA 复制期)

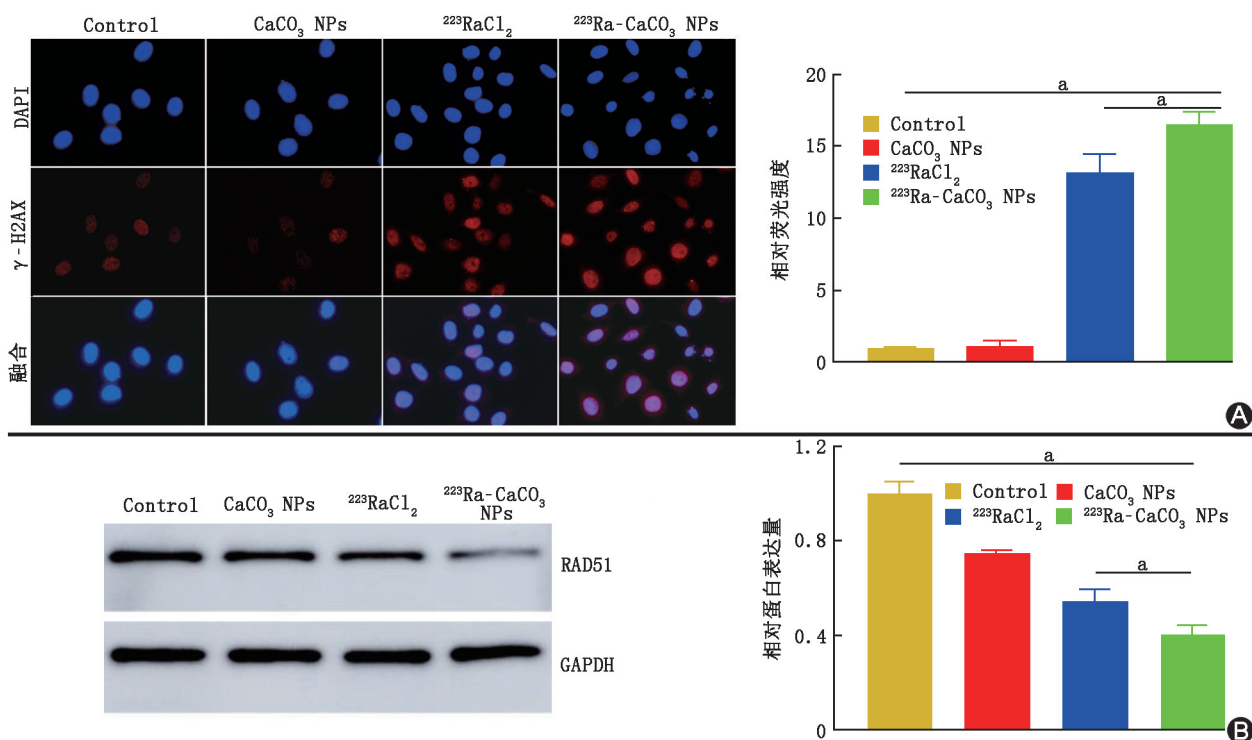


图6 对照组(Control)、 CaCO_3 纳米颗粒(NPs)组、 $^{223}\text{RaCl}_2$ 组、 $^{223}\text{Ra-CaCO}_3$ NPs组免疫荧光及Western blot检测结果 A.左图为各组NIS1细胞处理24 h后 γ -H2AX(红色)及4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI;蓝色)免疫荧光染色图($\times 400$),右图为各组 γ -H2AX相对荧光强度(RFI)定量柱状图($^*P<0.001$);B.左图为各组RAD51蛋白(相对分子质量 38×10^3)Western blot代表性条带(GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶),右图为各组RAD51相对蛋白表达量柱状图($^*P<0.001$)

入HCC细胞并定位于溶酶体;体外实验证实,相较于游离的单核素处理组, $^{223}\text{Ra-CaCO}_3$ NPs对HCC细胞的杀伤效能增强($q=8.65$, $P<0.001$)。这表明 CaCO_3 纳米载体能够克服传统 α 核素在非骨靶向实体瘤中应用受限的瓶颈。

$^{223}\text{Ra-CaCO}_3$ NPs增强杀伤的机制在于抑制DNA损伤修复。 ^{223}Ra 释放的高能 α 粒子主要通过诱导严重的DSB来杀伤肿瘤细胞^[14]。在哺乳动物细胞中,HR修复是修复DSB的关键途径,而S期是细胞进行DNA复制尤其是HR修复最为活跃的时期^[15-16],S期阻滞提示可能存在DSB修复被抑制,且该过程高度依赖于重组酶RAD51的活性^[17],而RAD51介导的DNA链侵入与交换需要 Mg^{2+} 作为辅因子^[18]。在本研究中, $^{223}\text{Ra-CaCO}_3$ NPs进入细胞溶酶体后大量释放的 Ca^{2+} 能够竞争性地占据RAD51蛋白中的 Mg^{2+} 结合位点,从而有效阻断HR修复通路。实验中观察到联合处理组细胞被显著阻滞于DNA修复极为活跃的S期^[15-16],且HR修复关键蛋白RAD51表达下调($F=119.70$, $P<0.001$),同时伴随损伤标志物 γ -H2AX的大量积累($F=433.20$, $P<0.001$),从机制层面印证了这一推论。这种“持续损

伤”与“阻断修复”的协同策略,是实现HCC细胞高效杀伤的核心机制。

尽管本研究初步证实了 $^{223}\text{Ra-CaCO}_3$ NPs的治疗潜力,但仍存在一定局限性:首先,研究数据均基于体外细胞层面,尚未能完全模拟实体瘤复杂的微环境及体内代谢过程;该系统在体内的靶向富集能力仍需进一步验证。笔者计划在后续研究中构建大鼠HCC原位模型,采用经肝动脉放射栓塞方式给药,利用HCC主要由肝动脉供血的解剖学优势实现物理定位与局部富集,从而提升靶向效率^[19]。未来将系统评估该策略下的体内抑瘤效果与安全性,为其临床转化提供更充分的依据。其次,载体在酸性环境下的降解速率与DNA修复动力学之间的精确对应关系,仍需通过实时荧光成像或代谢示踪技术进行更深入的验证。

综上,本研究成功制备了 $^{223}\text{Ra-CaCO}_3$ NPs,发现其可通过释放的 Ca^{2+} 干扰RAD51介导的HR修复过程,显著增强 α 粒子对HCC细胞的杀伤效能。本研究为 α 粒子内放射治疗HCC提供了新的策略和理论基础。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 李文杰:研究实施、论文撰写、数据采集和分析;王思雨:

研究实施;王涛:研究设计、论文修改;程超、左长京:研究指导、论文修改、基金支持

参 考 文 献

- [1] 杨晖,关志伟,徐白莹. α 核素用于放射治疗:从基础放射化学到临床研究(第一部分)[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2020, 40(11): 698-704. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20201027-00392.
- Yang H, Guan ZW, Xu BX. α -emitters for radiotherapy: from basic radiochemistry to clinical studies—part 1[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40(11): 698-704. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20201027-00392.
- [2] Lapi SE, Scott PJH, Scott AM, et al. Recent advances and impending challenges for the radiopharmaceutical sciences in oncology[J]. Lancet Oncol, 2024, 25(6): e236-e249. DOI: 10.1016/S1470-2045(24)00030-5.
- [3] Yang M, Liu H, Lou J, et al. Alpha-emitter radium-223 induces STING-dependent pyroptosis to trigger robust antitumor immunity[J]. Small, 2024, 20(9): e2307448. DOI: 10.1002/smll.202307448.
- [4] Lacerda S, de Kruijff RM, Djanashvili K. The advancement of targeted alpha therapy and the role of click chemistry therein[J]. Molecules, 2025, 30(6): 1296. DOI: 10.3390/molecules30061296.
- [5] Parker C, Nilsson S, Heinrich D, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2013, 369(3): 213-223. DOI: 10.1056/NEJMoa1213755.
- [6] Feurecker B, Kratochwil C, Ahmadzadehfar H, et al. Clinical translation of targeted α -therapy: an evolution or a revolution?[J]. J Nucl Med, 2023, 64(5): 685-692. DOI: 10.2967/jnumed.122.265353.
- [7] Di Iorio V, Samelli A, Boschi S, et al. Recommendations on the clinical application and future potential of α -particle therapy: a comprehensive review of the results from the SECURE project[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2025, 18(10): 1578. DOI: 10.3390/ph18101578.
- [8] Popova VK, Pyshnyi DV, Dmitrienko EV. Biomedical applications of calcium carbonate nanoparticles: a review of recent advances[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2025, 11(11): 6359-6385. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5c00992.
- [9] 何雨珊,刘梦雅,秦秀军.基于靶向 α 核素治疗的纳米颗粒药物递送系统的研究进展[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2024, 44(10): 637-640. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20231023-00083.
- He YS, Liu MY, Qin XJ. Progress in nanoparticle-based drug delivery system for targeted alpha-particle therapy[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2024, 44(10): 637-640. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20231023-00083.
- [10] Abou DS, Thiele NA, Gutsche NT, et al. Towards the stable chelation of radium for biomedical applications with an 18-membered macrocyclic ligand[J]. Chem Sci, 2021, 12(10): 3733-3742. DOI: 10.1039/d0sc06867e.
- [11] Biny L, Gerasimovich E, Karaulov A, et al. Functionalized calcium carbonate-based microparticles as a versatile tool for targeted drug delivery and cancer treatment[J]. Pharmaceutics, 2024, 16(5): 653. DOI: 10.3390/pharmaceutics16050653.
- [12] Bugreev DV, Mazin AV. Ca^{2+} activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(27): 9988-9993. DOI: 10.1073/pnas.0402105101.
- [13] Ito M, Fujita Y, Shinohara A. Positive and negative regulators of RAD51/DMC1 in homologous recombination and DNA replication[J]. DNA Repair (Amst), 2024, 134: 103613. DOI: 10.1016/j.dnarep.2023.103613.
- [14] Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, et al. ^{225}Ac -PSMA-617 for PSMA-targeted α -radiation therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. J Nucl Med, 2016, 57(12): 1941-1944. DOI: 10.2967/jnumed.116.178673.
- [15] Zhao J, Tian S, Guo Q, et al. A PARylation-phosphorylation cascade promotes TOPBP1 loading and RPA-RAD51 exchange in homologous recombination[J]. Mol Cell, 2022, 82(14): 2571-2587.e9. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.04.031.
- [16] Bournaka S, Badra-Fajardo N, Arbi M, et al. The cell cycle revisited: DNA replication past S phase preserves genome integrity[J]. Semin Cancer Biol, 2024, 99: 45-55. DOI: 10.1016/j.semcancer.2024.02.002.
- [17] Tsang ES, Munster PN. Targeting RAD51-mediated homologous recombination as a treatment for advanced solid and hematologic malignancies: opportunities and challenges ahead[J]. Onco Targets Ther, 2022, 15: 1509-1518. DOI: 10.2147/OTT.S322297.
- [18] Huang J, He J, Wang J, et al. Calcium carbonate-actuated ion homeostasis perturber for oxidative damage-augmented $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ interference therapy[J]. Biomaterials, 2023, 302: 122340. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2023.122340.
- [19] Badar W, Yu Q, Patel M, et al. Transarterial radioembolization for management of hepatocellular carcinoma[J]. Oncologist, 2024, 29(2): 117-122. DOI: 10.1093/oncolo/oyad327.

(收稿日期:2026-04-14)