

氧化钬增强兔原位肝癌放疗疗效并减轻肺部转移负荷

燕霞^{1,2#}, 赵嘉仪^{1,2#}, 文浩^{1,2}, 齐延歌^{1,2}, 刘博洋^{1,2}, 杜江锋³, 宋建波⁴

(1. 山西白求恩医院(山西医学科学院), 山西医科大学第三医院, 同济山西医院, 太原 030032;

2. 山西医科大学第三临床医学院, 太原 030032;

3. 山西医科大学第一医院医学影像科, 山西省智能影像与纳米医学重点实验室, 太原 030001;

4. 山西省人民医院(山西医科大学第五医院), 太原 030012)

摘要 高原子序数纳米材料因能够在放射线照射下增强局部能量沉积、放大辐射诱导的物理和化学损伤, 在肿瘤放疗增敏领域受到广泛关注. 为构建适用于肝癌放疗的高效增敏体系, 本研究通过水热法制备了粒径主要分布于 50~100 nm 且分散性良好的单斜晶相 HfO_2 纳米颗粒, 并在兔原位肝癌模型中系统评估了其经肝动脉介入灌注后的体内行为、放疗增敏效果及初步安全性. TEM, XRD 与 EDS 表征结果表明, 所得 HfO_2 纳米颗粒形貌规则、纯度高且晶相稳定. ICP-MS, CT 及 TEM 结果显示, 经肝动脉给药后, HfO_2 纳米颗粒在肿瘤组织中实现了较高的富集与一定时间的滞留, 而在心、肺及肾等主要脏器中的蓄积较低, 仅脾脏因富含吞噬细胞而表现出一定的聚集. 与单纯放疗相比, HfO_2 与放疗联合处理显著降低了肿瘤体积和重量, 并在组织学和分子水平上表现为更广泛的坏死区域、更明显的 Ki67 阳性率下降以及更高水平的 $\gamma\text{-H2AX}$ 表达和细胞内活性氧积累, 表明 HfO_2 纳米颗粒可放大辐射诱导的 DNA 损伤和氧化应激, 从而增强放疗抑瘤作用. 血清细胞因子检测结果显示, 联合治疗组炎症相关因子水平升高, 同时肺部转移负荷相对减轻, 提示联合治疗除直接放大部分局辐射损伤外, 还可能伴随一定程度的系统性免疫应答. 血常规、血生化及主要脏器病理结果未见明显急性毒性, 说明在实验剂量和给药条件下 HfO_2 纳米颗粒具有较好的耐受性. 本研究从材料制备、体内分布、放疗增敏效应及初步安全性等方面, 为 HfO_2 基纳米放疗增敏剂在肝癌治疗中的进一步研究和转化应用提供了依据.

关键词 氧化钬纳米颗粒; 放疗增敏; 原位肝细胞肝癌; 肝动脉介入灌注; 肿瘤转移负荷

中图分类号 O614

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20250391

Hafnium Oxide Nanoparticles Enhancing Radiotherapy Efficacy and Reducing Pulmonary Metastatic Burden in Rabbit Orthotopic Hepatocellular Carcinoma

YAN Xia^{1,2#}, ZHAO Jiayi^{1,2#}, WEN Hao^{1,2}, QI Yange^{1,2}, LIU Boyang^{1,2},
DU Jiangfeng^{3*}, SONG Jianbo^{4*}

(1. Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences,

Third Hospital of Shanxi Medical University, Tongji Shanxi Hospital, Taiyuan 030032, China;

2. Third Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030032, China;

3. Department of Medical Imaging, Shanxi Key Laboratory of Intelligent Imaging and Nanomedicine,

收稿日期: 2025-12-22. 网络首发日期: 2026-05-31.

联系人简介: 宋建波, 男, 博士, 教授, 主要从事核药研发转化与精准防护方面的研究. E-mail: jianbo2611@sxmu.edu.cn

杜江锋, 男, 博士, 教授, 主要从事纳米生物效应分析及其应用方面的研究. E-mail: dujf@sxmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 82171988)和山西白求恩医院科研项目(批准号: 2023RC24)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.82171988) and the Scientific Research Project of Shanxi Bethune Hospital, China(No.2023RC24).

共同第一作者.

First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

4. Shanxi Provincial People's Hospital, Fifth Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030012, China)

Abstract High-atomic-number nanomaterials have garnered significant attention in the field of tumor radiosensitization due to their ability to enhance localized energy deposition and amplify radiation-induced physicochemical damage upon irradiation. To establish an efficient radiosensitization system for hepatocellular carcinoma (HCC) radiotherapy, a hydrothermal method was employed to synthesize HfO_2 nanoparticles with a primary size distribution of 50–100 nm, a monoclinic crystal phase, and excellent dispersion. The *in vivo* behavior, radiosensitization efficacy, and preliminary safety of the test substance were systematically evaluated in a rabbit orthotopic liver cancer model following transarterial infusion. TEM, XRD and EDS characterization indicated that the obtained HfO_2 nanoparticles exhibited regular morphology, high purity, and stable crystalline phases. The results of ICP-MS, CT, and TEM analyses demonstrated that following hepatic arterial administration, HfO_2 nanoparticles achieved high enrichment and sustained retention within tumor tissues over time. Accumulation in major organs such as the heart, lungs, and kidneys was minimal, with only the spleen, which is rich in phagocytes, demonstrating notable aggregation. The combination of HfO_2 and radiotherapy led to a substantial reduction in tumor volume and weight when compared to radiotherapy alone. Histological and molecular analyses revealed that the treatment resulted in extensive necrosis, a significant decrease in Ki-67 positivity, and elevated levels of $\gamma\text{-H2AX}$ expression and intracellular reactive oxygen species accumulation. This finding suggests that HfO_2 nanoparticles augment radiation-induced DNA damage and oxidative stress, thereby potentiating the antitumor effects of radiotherapy. Serum cytokine analysis revealed elevated levels of inflammation-related factors in the combination therapy group, accompanied by a relative reduction in lung metastasis burden. This finding indicates that, in addition to directly amplifying local radiation-induced damage, the combination therapy may elicit a systemic immune response. No significant acute toxicity was observed in hematological assessments, biochemical parameters, or major organ pathology, indicating good tolerability of HfO_2 nanoparticles under the study dosage and administration conditions. This work provides experimental evidence covering material preparation, *in vivo* distribution, radiosensitization effects, and preliminary safety for the further development and translational application of HfO_2 -based nanoradiosensitizers in hepatocellular carcinoma treatment.

Keywords Hafnium dioxide nanoparticle; Radiosensitization; Orthotopic hepatocellular carcinoma; Transarterial hepatic infusion; Tumor metastasis burden

肝癌是全球范围内重要的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均位居前列^[1-3]。尽管手术、局部治疗及系统药物治疗等综合手段不断发展,肝癌因其固有的高侵袭性与高转移性,在临床治疗后仍常出现局部复发与远端转移,导致患者预后不佳^[4,5]。因此,开发能够协同强化局部治疗效果并有效阻断转移途径的创新策略,对于改善肝癌治疗现状具有重要意义。

在肝癌的综合治疗体系中,放射治疗(Radiotherapy, RT)是重要的局部治疗方式之一^[6-8]。高能射线可通过直接或间接作用损伤肿瘤细胞DNA,并产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)抑制细胞增殖,从而实现肿瘤杀伤^[9,10]。然而,肝癌细胞普遍存在一定程度的固有放射抵抗性,同时正常肝组织对辐射较敏感,严重限制了放疗剂量的提升与疗效的发挥,导致肿瘤控制率不高和转移风险居高不下^[11,12]。如何在保证正常肝组织安全性的前提下选择性增强肿瘤细胞对射线的敏感性,已成为推动肝癌放疗进一步发展的关键科学问题之一。

随着纳米医学的快速发展,利用纳米放疗增敏剂提高肿瘤对放射损伤的敏感性被认为是提升RT疗效的有效途径^[13-16]。其中,非高原子序数(Z)体系通常通过调控肿瘤微环境、抑制DNA损伤修复或释放活性物质等化学途径实现增敏,如功能性有机自组装纳米药物可通过释放NO抑制DNA损伤修复从而增强放疗敏感性^[17];而高原子序数纳米材料则可通过光电效应和康普顿散射等物理过程增强局部能量沉积,进而放大辐射诱导的DNA损伤和自由基生成,在多种肿瘤模型中展现出良好的放疗增敏潜力^[18-20]。在此类材料中,金纳米颗粒(AuNPs, $Z=79$)是研究最为广泛的高原子序数放疗增敏剂之一,其

在体外及体内实验中表现出显著的剂量增强效应^[21,22],但其长期毒性、生物分布和免疫学效应仍需系统性评估,临床转化仍面临挑战^[23]. 铋基纳米材料(如 Bi_2O_3 和 Bi_2S_3 , $Z=83$)同样因高X射线衰减系数而受到关注,在动物模型中展现出良好的放射增敏和CT显影双重效果,但其生物降解行为和潜在毒性尚需进一步明确^[24-26]. 相比之下,氧化铪(HfO_2)纳米颗粒凭借高原子序数($Z=72$)所赋予的强X射线吸收截面、固有的化学惰性与优异的生物相容性,以及相对低廉的制备成本,在纳米放疗增敏领域展现出独特优势^[27-29]. 研究表明, HfO_2 纳米颗粒在实体瘤中可有效富集,且在辐射下可高效产生次级电子,显著放大放疗的物理与化学杀伤效应^[30-32].

既往关于 HfO_2 放射增敏治疗肝癌的研究多基于小鼠皮下移植瘤模型,并多采用静脉或瘤内给药路径,该类模型在模拟肿瘤微环境方面仍存在一定局限^[33,34]. 为更加贴近临床实际并更准确评估 HfO_2 纳米颗粒的转化应用前景,本研究选用兔原位肝细胞癌模型,结合与临床经肝动脉化疗路径高度一致的肿瘤供血动脉灌注方式,将制备的 HfO_2 纳米颗粒定向递送至肝癌病灶区域. 在此基础上系统考察其体内分布特征、放疗增敏效应、炎症与免疫相关指标及初步生物安全性,为 HfO_2 基高原子序数纳米放疗增敏剂在肝癌治疗中的进一步研究和临床转化提供了实验依据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

四氯化铪(HfCl_4 , 80目,纯度99%),美国赛默飞世尔科技公司;氢氧化钠(NaOH , A. R.级,纯度95%),上海罗恩试剂有限公司;乙醇,分析纯,北京化工厂. 所用试剂均未进一步纯化.

Tecnai G2 Spirit型透射电子显微镜(TEM)及Tecnai G2 F30 S-TWIN型高分辨透射电子显微镜[HRTEM, 配备能量色散X射线光谱仪(EDS)],美国FEI公司; Zetasizer Nano ZS90型激光粒度仪(DLS),英国Malvern公司; D8 Advance型X射线衍射仪(XRD),德国Bruker公司; NexION 300D型电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS),美国PerkinElmer公司; Synergy型医用直线加速器,瑞典Elekta公司.

1.2 实验过程

1.2.1 HfO_2 纳米颗粒的合成 参照文献[35]方法合成 HfO_2 纳米颗粒. 具体方法如下:称取0.16 g HfCl_4 溶于10 mL去离子水中,制得浓度为0.05 mol/L的 HfCl_4 溶液. 称取0.08 g氢氧化钠溶于10 mL去离子水中,制得浓度为0.20 mol/L的 NaOH 溶液. 在室温下,将 NaOH 溶液缓慢滴加到 HfCl_4 溶液中并不断搅拌. 滴加完毕后,将混合液离心,所得沉淀用去离子水洗涤并再次离心(10000 r/min) 2次. 随后,称取0.20 g NaOH 溶于10 mL去离子水中,制得浓度为0.50 mol/L的 NaOH 溶液. 将离心后所得沉淀分散于0.50 mol/L的 NaOH 溶液中,并转移至带有聚四氟乙烯内胆的高压水热反应釜中,拧紧反应釜后置于鼓风干燥箱内,于120 °C下反应12 h. 反应结束后,待反应釜自然冷却至室温,将釜内悬浊液进行离心. 所得固体用乙醇和去离子水交替洗涤后离心(重复3次),以彻底去除杂质. 最后,将 HfO_2 纳米颗粒保存在去离子水中进行后续实验.

1.2.2 HfO_2 纳米颗粒的表征 采用TEM和HRTEM分析纳米颗粒的微观形貌与晶体结构. 利用DLS测定其水合动力学直径. 通过XRD($\text{Cu K}\alpha$ 辐射,扫描 2θ 范围 $20^\circ\sim 80^\circ$)确定纳米颗粒的物相,并借助EDS进行元素组成分析.

1.2.3 兔原位肝癌模型的构建 选用36只5月龄的日本大白兔,通过手术将VX2肿瘤组织块原位植入肝左叶,以构建原位肝癌模型. 术后动物于标准环境中饲养,并通过计算机断层扫描(CT)定期监测肿瘤生长情况. 造模成功标准为CT影像学显示肝内出现明确的占位性病变. 同时,利用CT初步评估各荷瘤兔肿瘤的可见性及大体形态. 在此基础上,采用随机数字表法将荷瘤兔分为以下4组:Control组(对照组)、 HfO_2 组(单纯纳米材料组)、RT组(单纯放疗组)以及(HfO_2 +RT)组(联合治疗组),随机分组以保证各组间初始状态的均衡性.

1.2.4 体内抗肿瘤疗效与生物安全性评估 经肝动脉介入给药时,将 HfO_2 纳米颗粒原液与生理盐水混合配制,给药剂量为10 $\mu\text{g/g}$,每只兔注射总体积约为1 mL(该给药剂量参考本课题组既往工作). 给药

后 24 h, 对 RT 组及 (HfO₂+RT) 组实验兔实施放疗. 放疗前行 CT 模拟定位, 以红外激光线辅助体位摆位(仰卧位固定), 由放射治疗医师在 CT 影像上手动勾画肿瘤区域(Gross tumor volume, GTV)并制定照射计划; 照射采用 Elekta Synergy 医用直线加速器(6 MV X 线), 对肝脏肿瘤局部实施单次 6 Gy 剂量照射. 分别于治疗后第 2, 5, 12 d, 从 Control 组、HfO₂ 组、RT 组及 (HfO₂+RT) 组各处死 3 只荷瘤兔, 收集肿瘤组织与主要脏器(心、肝、脾、肺和肾)用于后续分析. 首先, 为评估整体抑瘤效果, 对完整剥离的肿瘤组织进行称重. 随后, 对每只兔的肿瘤组织进行系统取材, 分别用于不同目的的分析: 一部分组织经硝酸处理后, 利用 ICP-MS 测定 Hf 元素含量, 以分析纳米颗粒的生物分布; 另一部分制备成超薄切片用 TEM 观察; 其余部分经石蜡包埋后制备组织切片, 依次进行苏木精-伊红(H&E)染色、Ki67 免疫荧光染色、 γ -H2AX 免疫荧光染色及活性氧(ROS)荧光染色, 从病理与分子层面探究疗效与机制. 此外, 通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中细胞因子(IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ 和 IL-1 β)水平. 最后, 对兔外周血进行血常规与血生化分析, 并对主要脏器进行 H&E 染色组织学分析, 以系统性评估 HfO₂ 纳米颗粒的生物安全性.

1.2.5 统计分析 实验数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示. 使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析及图表绘制. 组间比较使用学生 *t* 检验和单因素方差分析(ANOVA). * *P*<0.05, ** *P*<0.01, *** *P*<0.001 被认为差异具有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 HfO₂ 纳米颗粒的表征

为确认所合成材料的理化性质, 首先对 HfO₂ 纳米颗粒进行了系统表征. 典型 TEM 照片[图 1(A) 和 (B)]显示, 所制备的 HfO₂ 纳米颗粒形貌均一, 分散性良好. HR TEM 照片[图 1(C)]显示出清晰的晶格条纹, 测得晶面间距为 0.24 nm, 这与单斜相 HfO₂ 纳米颗粒的 {200} 晶面一致. 粒径分布统计结果[图 1(D)]表明, 纳米颗粒的尺寸主要集中在 50~100 nm 的范围内. EDS 谱图[图 1(E)]中没有发现明显的杂质峰, 表明获得了高纯度的 HfO₂. XRD 谱图[图 1(F)]与单斜相 HfO₂ 纳米颗粒的标准卡片(JCPDS No. 06-0318)高度吻合. 综上所述, 制备了纯度高且分散性良好的单斜晶相 HfO₂ 纳米颗粒.

纳米颗粒的粒径、晶相和表面状态是决定其体内行为和靶向特性的关键因素之一^[36]. 已有研究表

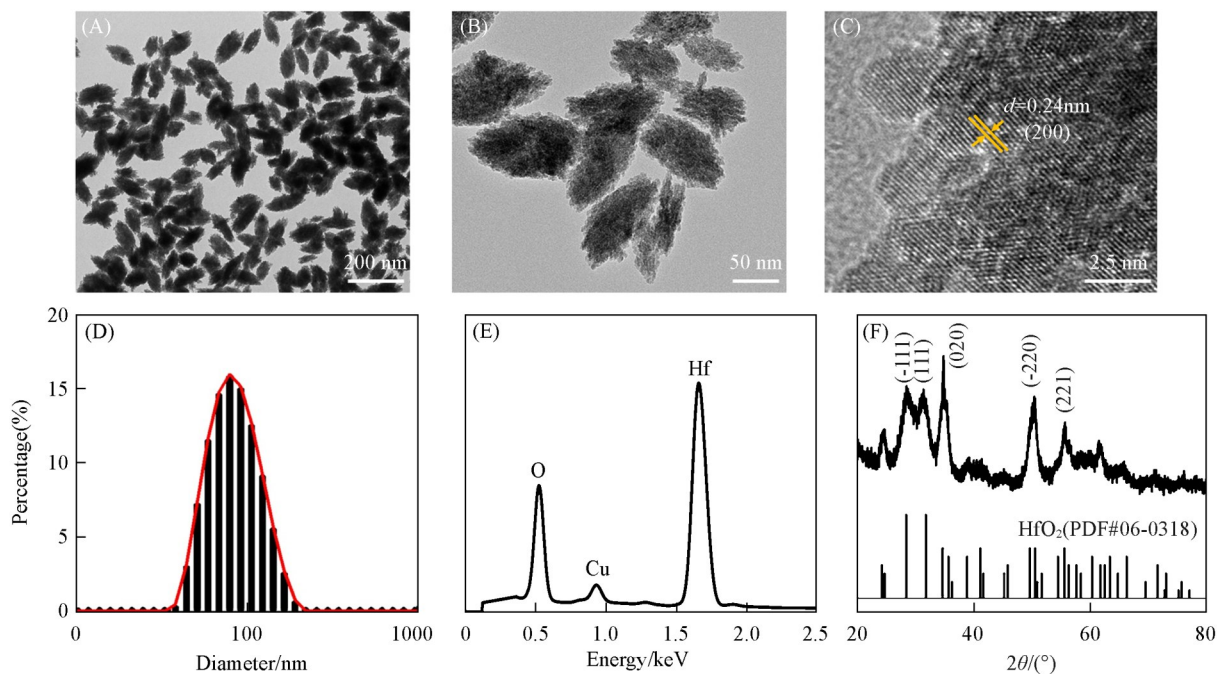


Fig. 1 TEM images(A, B), HRTEM image(C), size distribution(D), EDS spectrum(E) and XRD pattern(F) of HfO₂

明,经静脉给药后,中等粒径(约40 nm)的无机纳米颗粒易在肝脏富集,而尺寸大于150 nm时则更易在肺部滞留^[37]. 本工作所制备的HfO₂纳米颗粒粒径集中于50~100 nm,处于肝脏易富集的尺寸范围内,且TEM和XRD结果证实其为单斜晶相、分散性良好,这些理化特征有利于颗粒在血流中的稳定输运,为后续通过肝动脉介入灌注实现肝脏及肝内肿瘤的靶向递送创造了有利的物理条件.

2.2 HfO₂纳米颗粒的体内分布

为深入探讨HfO₂纳米颗粒在兔体内的动态分布,综合运用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)、计算机断层扫描(CT)及透射电子显微镜(TEM)等进行了系统分析. 考虑到原位肝癌中单纯静脉给药往往难以在肿瘤局部获得足够高的有效浓度,本研究选用与临床经肝动脉化疗/栓塞路径高度一致的介入灌注方式,将HfO₂纳米颗粒直接输注至肝动脉,以提高局部递送效率.

ICP-MS定量分析结果[图2(A)和(B)]证实了这一策略的有效性,并揭示了HfO₂纳米颗粒在肿瘤与瘤旁组织中的动态分布特征. ICP-MS分析所用组织均于各时间点处死动物后立即取材,肿瘤组织取自肿瘤中央区域,瘤旁组织取自距肿瘤边缘约0.5 cm处的正常肝实质,各时间点取样部位保持相对一

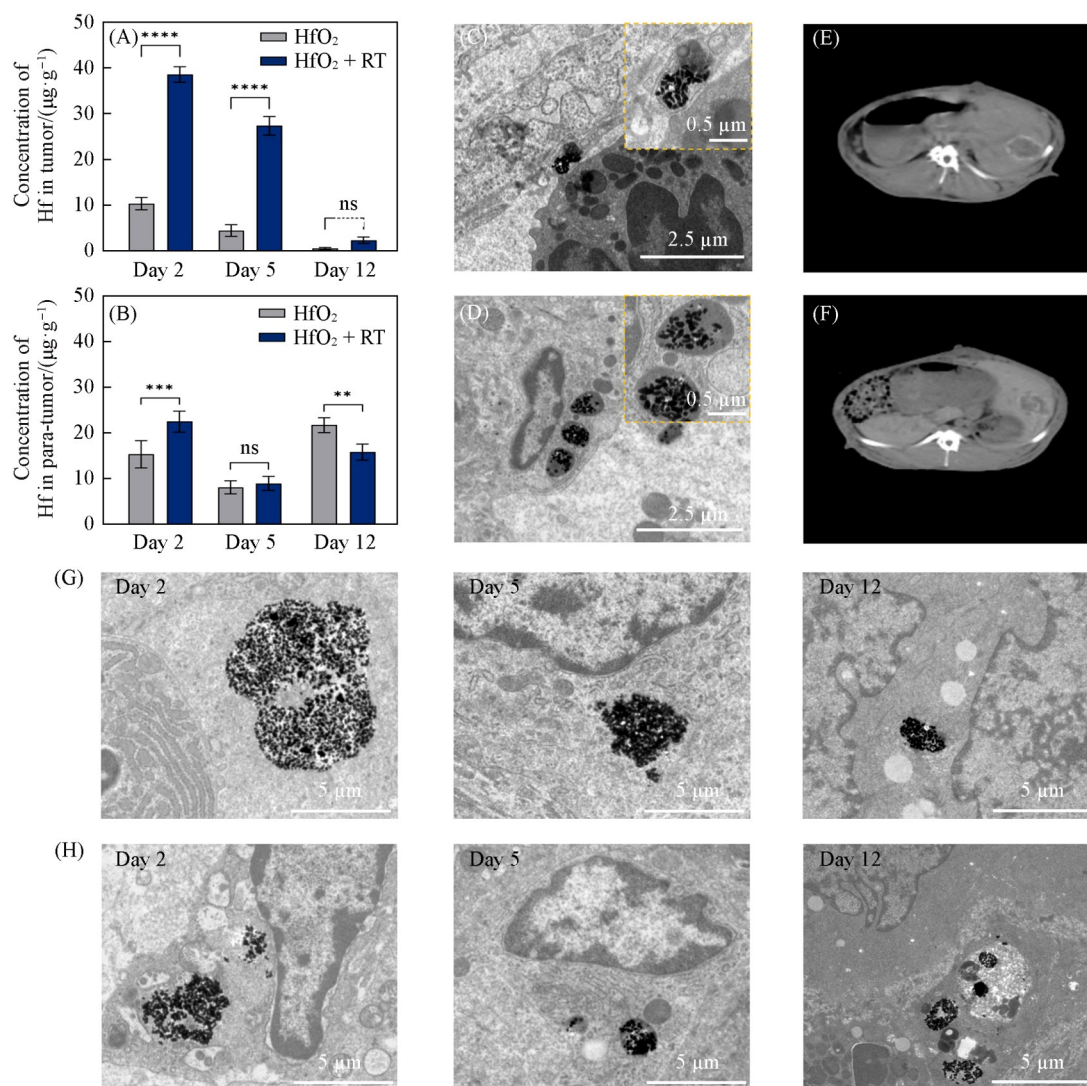


Fig. 2 *In vivo* distribution of HfO₂ nanoparticles

(A, B) ICP-MS analysis of Hf in tumor tissues(A) and para-tumor tissues(B); (C, D) TEM images of HfO₂ inside vascular endothelial cells(C) and cytoplasmic vesicles of tumor cells(D); (E, F) CT images of the rabbit abdomen showing HfO₂ nanoparticles at the tumor margin(E) and within the tumor(F); (G, H) TEM images of tumor tissues(G) and para-tumor tissues(H) at Day 2, 5, and 12. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

致,以尽量减少因取样位置差异对定量结果的影响.在肿瘤组织中,Hf元素含量随时间推移逐渐降低,但在各个时间点,放疗(RT)组的Hf含量均显著高于未放疗组,提示放疗有利于纳米颗粒在肿瘤局部的高效富集与特异性滞留[图2(A)].在瘤旁组织中,Hf含量则呈先降低后升高的趋势,反映出纳米颗粒在早期可从正常组织中有效清除,随后伴随肿瘤区域的清除和再分布而在瘤周组织中出现一定程度的蓄积[图2(B)].

为进一步评估纳米颗粒的全身分布行为,检测了主要脏器(心、脾、肺和肾)及血清中的Hf元素含量(图S1,见本文支持信息).结果表明,心脏、肺及肾脏中Hf的蓄积量远低于肿瘤组织,体现了该递送策略对肝癌病灶较好的靶向性.脾脏中Hf含量相对较高,与其富含吞噬细胞及易摄取外源颗粒的生理特性相符.血清中Hf含量随时间延长显著下降,提示游离HfO₂纳米颗粒可逐步通过机体清除途径排出体外.基于血清Hf浓度-时间数据,以一级消除动力学模型 $[C(t)=C_0e^{-kt}]$ 进行拟合[式中: $C(t)$ ($\mu\text{g/mL}$)为给药后 t 时刻血清中Hf的浓度; C_0 ($\mu\text{g/mL}$)为初始($t=0$)时血清中Hf的浓度; k (d^{-1})为一级消除速率常数; t (d)为给药后时间],拟合结果显示,HfO₂组和(HfO₂+RT)组的血清Hf清除半衰期($t_{1/2}=\ln 2/k$)分别约为4.6~5.9 d和4.2~4.9 d(分别为线性回归与非线性最小二乘拟合结果),说明HfO₂纳米颗粒在兔体内的血清清除周期约为1~2周,与本研究12 d的观察窗口基本吻合.值得注意的是,(HfO₂+RT)组在第五天的血清Hf浓度显著高于HfO₂组,说明放疗可能在短期内影响纳米颗粒在肿瘤局部的滞留与再分布,使血清清除相对延迟,这与2.2节中ICP-MS检测到的(HfO₂+RT)组肿瘤内Hf含量更高的结果一致.

TEM照片从微观层面揭示了HfO₂纳米颗粒的转运途径及胞内定位.由图2(C)可见,纳米颗粒分布于血管内皮细胞内,表明其能够跨越血管屏障;在肿瘤细胞中,HfO₂纳米颗粒主要位于胞质囊泡内[图2(D)],说明其可稳定内吞并在胞内富集.这一定向递送能力超越了传统依赖EPR效应的被动靶向,为介入式纳米给药策略提供了关键依据.

CT影像学分析[图2(E)和(F)]从宏观层面佐证了上述结果.结果表明,经肝动脉灌注后,肝内部分区域出现略高密度影,其CT值高于肿瘤软组织而低于骨组织.高密度影可见于肿瘤边缘[图2(E)],亦可见于瘤体内部[图2(F)],表明经肝动脉介入灌注能够将HfO₂纳米颗粒递送至肿瘤边缘及瘤内区域.

对不同时间点的TEM照片[图2(G)和(H)]进行比对可见,肿瘤细胞内纳米颗粒数量在第二天与第五天时处于较高水平,至第十二天时明显减少;而瘤旁组织中的颗粒数量则呈先减少后略增趋势.该结果与ICP-MS的定量规律高度一致,说明HfO₂纳米颗粒在早期可以主动靶向并滞留于肿瘤组织,随后经历从肿瘤向周围组织的动态转运与清除过程.

总体来看,本研究构建的递送策略的核心优势在于紧密贴合临床实践的简化路径与明确的转化潜力.与Zhang等^[38]所采用的复杂双重靶向策略(即利用CRGDK配体进行主动靶向,并依赖放疗诱导的H₂O₂来激活PROTAC前药)不同,我们的方案立足于临床现有的经肝动脉介入灌注技术,结合纳米颗粒的物理特性与肝脏独特的血供生理,实现精准递送.这种“单靶向”设计,避免了复杂的前药合成与激活步骤,同样能实现高效的肿瘤靶向与放射增敏,为推进纳米放射增敏剂的临床应用提供了新路径.

2.3 HfO₂纳米颗粒的体内抗肿瘤疗效

在构建兔原位肝癌模型并明确HfO₂纳米颗粒体内分布特征的基础上,进一步评估了其在联合放疗方案中的抗肿瘤作用.CT影像结果[图3(A)]显示,Control组与HfO₂组肿瘤体积较大,RT组肿瘤体积较前两组有所缩小,而(HfO₂+RT)联合治疗组肿瘤体积缩小最为显著.离体肿瘤称重结果[图3(B)]进一步从定量上佐证了这一趋势:与Control组相比,(HfO₂+RT)组肿瘤重量显著降低,且明显低于单纯RT组.上述结果表明,HfO₂纳米颗粒能够在体内有效增强放疗对原位肝癌的整体抑瘤作用.为定量评估HfO₂纳米颗粒的放射增敏效率,以第十二天终点瘤重为基准,计算各组肿瘤生长抑制率(Tumor growth inhibition, TGI).结果显示,HfO₂组TGI为1.9%,与Control组相比无明显差异,表明单独给予HfO₂纳米颗粒对肿瘤生长无明显直接抑制作用.RT组TGI为38.8%,(HfO₂+RT)组TGI进一步提升至

56.6%, 且瘤重较单纯RT组降低29.1%。以TGI为效应指标计算的HfO₂的近似放射增敏比(Sensitizer enhancement ratio, SER)约为1.46, 即在相同放疗剂量下, 联合HfO₂纳米颗粒可将放疗的肿瘤抑制效率提升约46%, 说明HfO₂纳米颗粒具有显著的体内放射增敏活性。

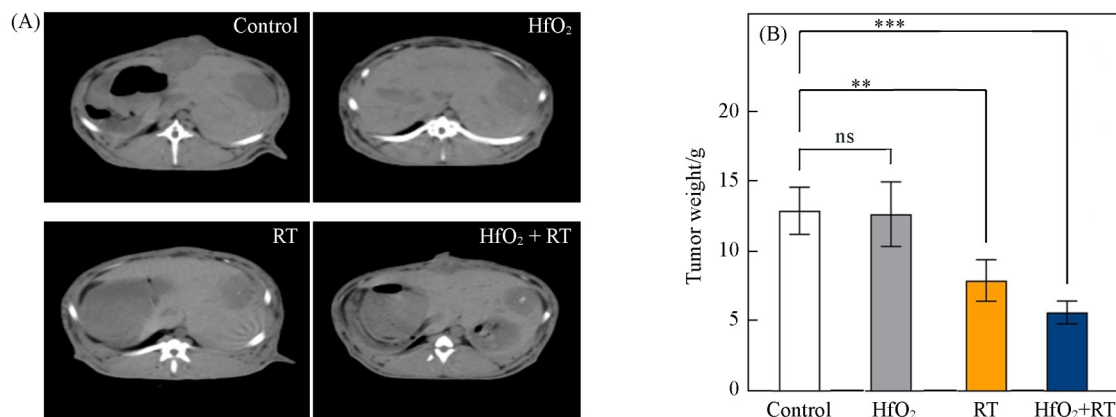


Fig. 3 Representative abdominal CT images of orthotopic liver tumors in rabbits(A) and comparison of tumor weight(B)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

为进一步明确联合治疗的可能机制, 开展了组织病理及分子水平的相关分析. H&E 染色结果[图4(A)]表明, (HfO₂+RT)联合组肿瘤区域出现了最大范围的细胞坏死和组织结构破坏, 其损伤程度明显重于Control组、HfO₂组及RT组, 从组织病理学层面证实联合治疗具有最强的直接杀伤效果. Ki67免疫荧光染色结果[图4(A)和(B)]表明, Control组、HfO₂组及RT组的肿瘤细胞核内可见大量Ki67阳性信号, 提示细胞增殖活跃; 而(HfO₂+RT)联合治疗组的Ki67阳性率显著降低, 表明该联合策略能有效抑制肿瘤细胞增殖活性. γ -H2AX免疫荧光染色结果[图4(A)]表明, (HfO₂+RT)组肿瘤细胞核内形成的 γ -H2AX焦点数量远多于其它组. 定量分析进一步证实, 该组与Control组之间存在显著差异[图4(C)], 说明联合治疗能诱导最严重的DNA双链断裂. 活性氧(ROS)水平检测结果[图4(A)]表明, HfO₂组仅见微弱荧光, RT组荧光信号有所增强, 而(HfO₂+RT)组则呈现出最强的红色荧光信号. 定量分析结果[图4(D)]证实其ROS水平显著最高, 明确提示HfO₂纳米颗粒可显著放大放疗诱导的细胞内氧化应激, 从而协同增强DNA损伤并实现放射增敏.

上述多指标结果与高原子序数纳米材料的经典放射增敏机制一致. 理论上, 高原子序数纳米材料在X射线或 γ 射线照射下可通过光电效应和康普顿散射增强局部能量沉积, 增加二次电子产额, 从而放大辐射诱导的DNA损伤和自由基生成^[39]. 本研究中, (HfO₂+RT)联合治疗组肿瘤组织内 γ -H2AX焦点数量最多、ROS水平最高且Ki67阳性率最低, 说明HfO₂纳米颗粒在放疗照射下能够有效放大DNA双链断裂和氧化应激并抑制肿瘤细胞增殖. 这一结果与基于NBTR3等HfO₂制剂研究中所报道的“放大DNA损伤-增强细胞杀伤”的作用模式一致^[40].

与其它代表性高原子序数纳米放疗增敏剂相比, AuNPs和铋基纳米材料虽在体外或动物实验中展现出良好的放射增敏效果, 但在临床转化层面仍面临成本、蓄积或毒性方面的制约. 本研究制备的HfO₂纳米颗粒的近似放射增敏比(SER $\approx$ 1.46)与文献中同类高原子序数纳米材料体内实验的增敏效果处于相近水平, 表明HfO₂纳米颗粒具有与同类材料相当的体内增敏活性^[20]. 更重要的是, 在本研究所用剂量下未观察到明显急性毒性, 结合基于HfO₂的临床制剂NBTR3已获批的先行依据^[41,42], 说明该体系在安全性和临床转化可行性方面具有综合优势. 本研究进一步将HfO₂纳米颗粒应用于兔原位肝癌模型并结合经肝动脉介入灌注给药, 在更贴近临床实践的场景下验证了其放疗增敏效应, 为该类材料在肝癌治疗中的转化应用提供了直接实验依据.

需要指出的是, 本研究主要从组织学和部分分子标志物层面评价了增敏机制, 尚未对不同晶相、粒径分布或表面修饰条件下HfO₂纳米颗粒在辐射场中的能量沉积分布差异开展系统比较. 未来可结合

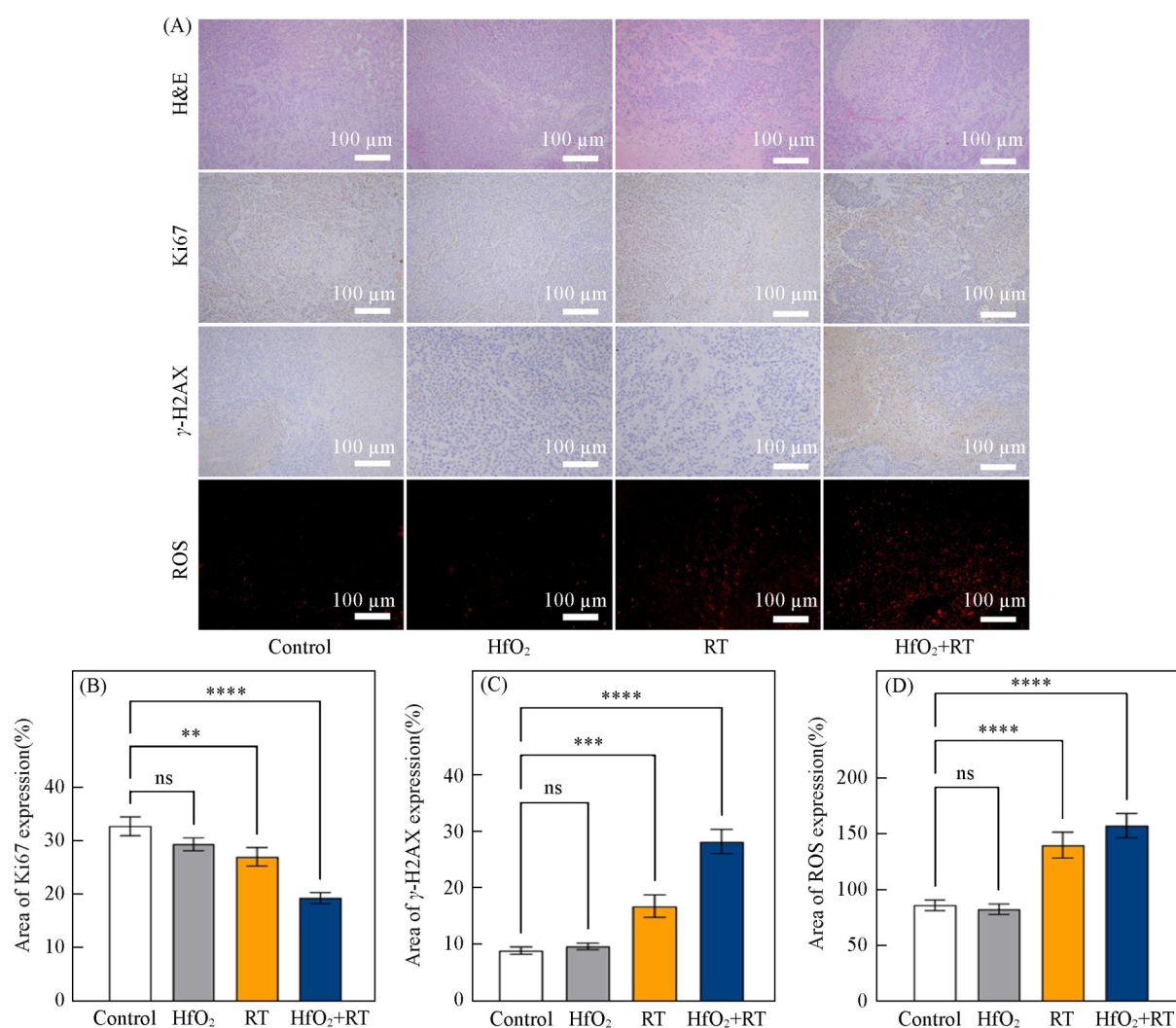


Fig. 4 Evaluation of the antitumor efficacy of HfO₂ nanoparticles *in vivo*

(A) Representative H&E and fluorescent staining images (ROS, γ-H2AX and Ki67) of tumor tissues; (B—D) Quantitative analysis of Ki67(B), γ-H2AX(C), and ROS(D) fluorescence in (A). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

蒙特卡洛模拟和辐射物理实验,进一步从微观剂量学角度量化不同材料参数对放疗增敏效应的影响,从而为HfO₂纳米颗粒的结构优化提供更明确的设计依据。

2.4 细胞因子水平检测及分析

为评估HfO₂纳米颗粒对全身炎症反应及潜在免疫调节作用的影响,采用ELISA检测了兔血清中IL-6, IL-12, TNF-α, IFN-γ及IL-1β等关键细胞因子的水平(图5)。结果表明,HfO₂组各细胞因子水平与Control组相比均无显著差异,提示HfO₂纳米颗粒本身具有较好的生物相容性,未引发明显的全身性炎症反应。相较于单纯材料干预,RT组及(HfO₂+RT)组上述细胞因子水平均不同程度升高,表明放疗及其与纳米颗粒的联合作用可激活机体系统性炎症/免疫应答。值得注意的是,对于所检测的细胞因子,(HfO₂+RT)组的表达水平均显著高于RT组,说明联合治疗引发的炎症/免疫应答更加显著。

2.5 HfO₂的体内生物安全性

为系统评估HfO₂纳米颗粒的体内生物安全性,对实验动物进行了血常规、血生化及主要脏器的组织病理学分析。在给药后第二天、第五天和第十二天,检测了各组兔外周血的白细胞计数(WBC)、中性粒细胞计数(NEUT)、淋巴细胞计数(LYMPH)、血红蛋白(HB)、血小板计数(PLT)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(CR)和尿素(UREA)水平。结果表明,HfO₂组及(HfO₂+RT)组兔的血红蛋白水平及肝肾功能等指标均未见明显异常(图6),未出现贫血或肝肾功能损伤。尽管

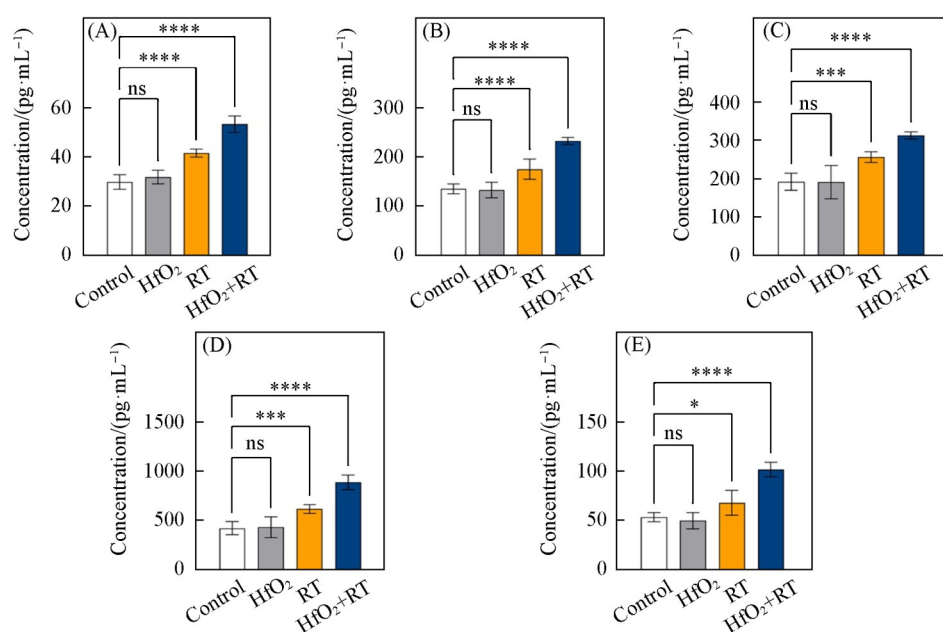


Fig. 5 Expression of IL-6(A), IL-12(B), TNF-α(C), IFN-γ(D) and IL-1β(E) in rabbit serum

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

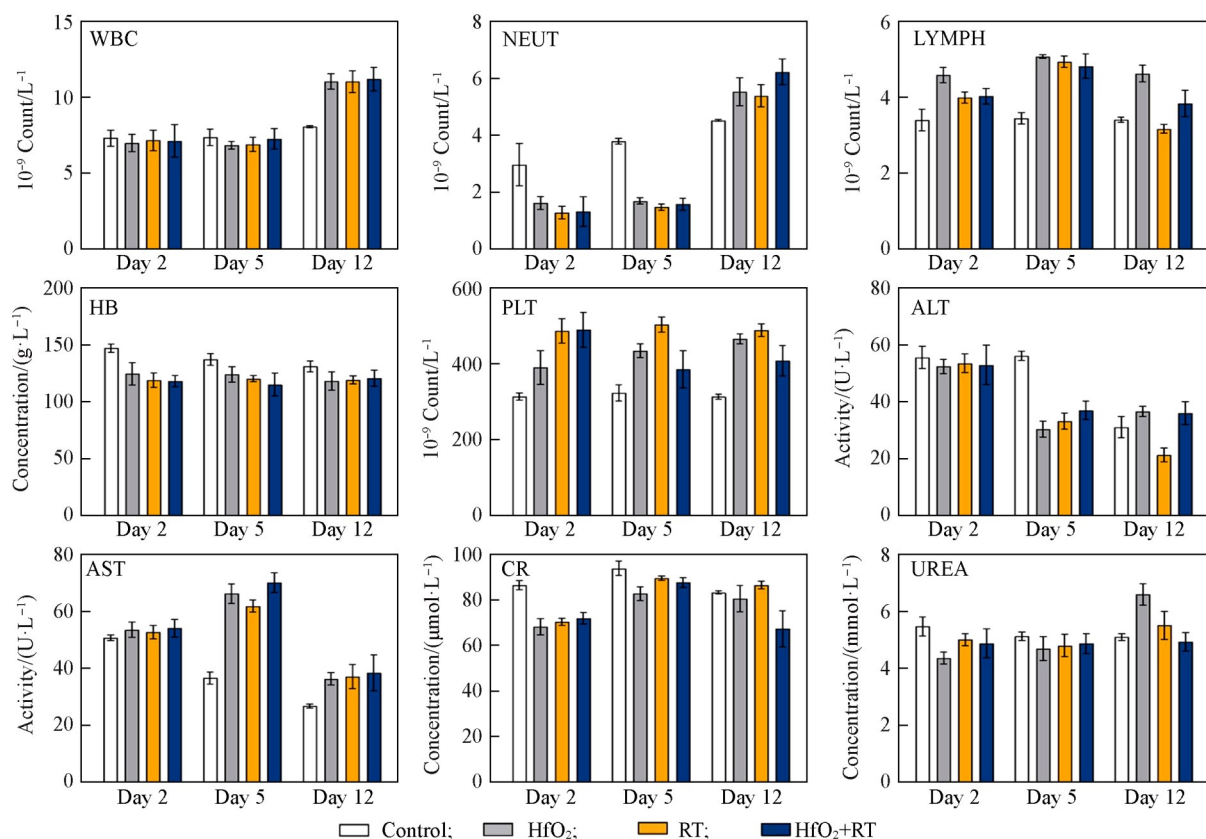


Fig. 6 Results of hematological blood chemistry parameters from rabbit after different treatments

在第十二天观察到白细胞和中性粒细胞计数有所升高,但这可能与治疗诱导的短暂炎症反应相关,整体处于可接受范围内。

收集兔的主要脏器(心脏、肝脏、脾脏、肾脏和肺脏)组织进行H&E染色结果(图7)显示,各治疗组心脏、肝脏、脾脏、肾脏及肺组织结构基本完整,未见明显坏死、炎症浸润或其它急性病理性改变。其

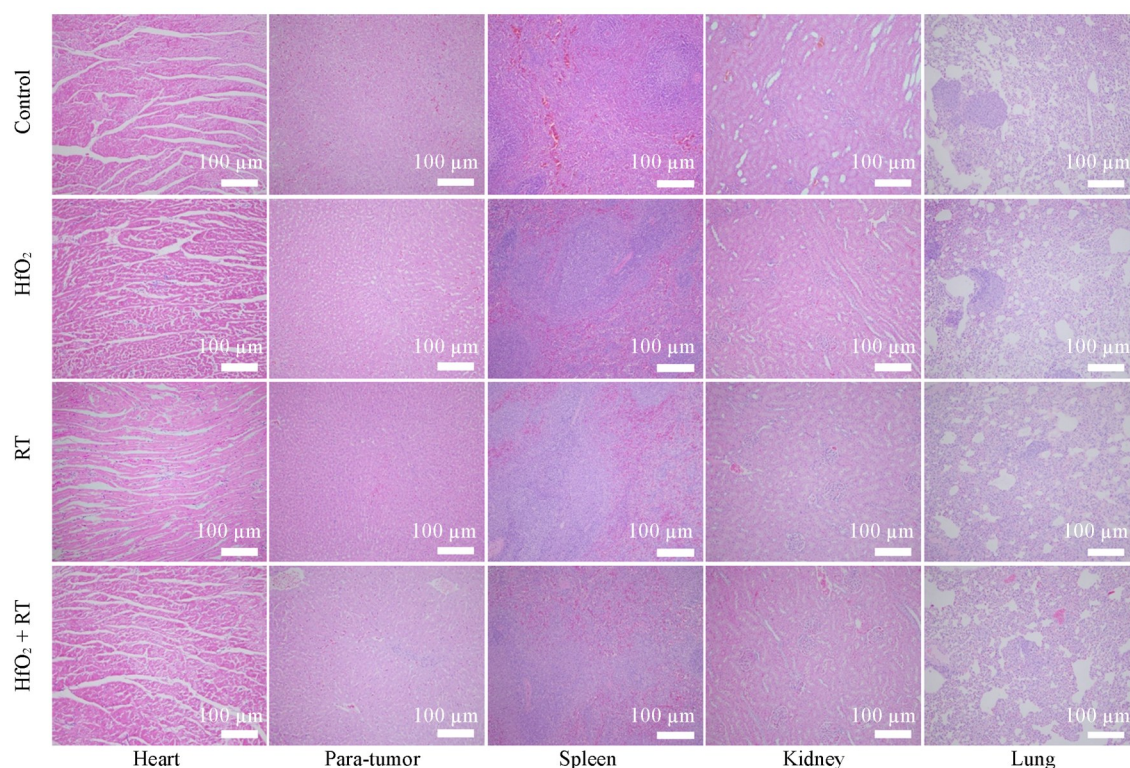


Fig. 7 Representative H&E-stained images from major organ tissue section

中肺组织中可见不同程度的肿瘤转移灶, 主要与原位肿瘤生物学行为相关。

肺组织 H&E 染色结果(图 7)表明, 以肺实质内出现异型细胞巢或腺样结构作为转移灶的判断依据, 于光学显微镜下对各组切片进行定性观察, 各组均存在不同程度的肺转移灶, 但($\text{HfO}_2 + \text{RT}$)组肺转移负荷最轻。结合 2.2 节 ICP-MS 结果中($\text{HfO}_2 + \text{RT}$)组肿瘤内 Hf 含量最高的发现, 推测在放疗诱导的炎症微环境中, HfO_2 纳米颗粒在肿瘤局部的富集可能通过调节巨噬细胞等免疫细胞功能调节局部及系统性免疫反应, 从而在一定程度上增强抗肿瘤效应并抑制远处转移。已有报道指出, HfO_2 基纳米体系在放疗条件下可促进胞质 DNA 释放并激活 cGAS-STING 通路, 进而诱导 I 型干扰素产生和免疫细胞募集^[43]。以上结果为高原子序数纳米放疗增敏剂的免疫相关作用提供了可能的机制框架。

上述结果与关于 HfO_2 纳米颗粒具有较好耐受性的报道总体一致^[44], 提示在本研究给药剂量和给药方式下, 该材料体系表现出良好的体内安全性, 为其作为放疗增敏剂的进一步研究提供了初步安全性依据。需要指出的是, 本研究仍存在一定局限。一方面, 本研究主要关注短期血液学和病理学指标, 尚未对长期蓄积、慢性毒性以及潜在免疫毒性进行系统随访; 另一方面, 本研究采用的是单一剂量和给药方案, 尚未评估不同剂量梯度及重复给药对疗效与安全性的影响。未来可在现有结果基础上, 结合多剂量设计、长期观察及更大样本动物实验, 对 HfO_2 纳米颗粒在放疗增敏中的安全窗口和耐受上限进行进一步界定, 并探索其与免疫检查点抑制剂等系统治疗联合应用的可行性, 为后续临床相关研究提供更加完善的前期依据。

需要强调的是, 本工作对免疫机制的分析仍然处于初步阶段, 尚未对肿瘤组织及远处器官中 T 细胞、巨噬细胞等免疫细胞亚群的表型和浸润情况进行系统表征, 也未直接检测 cGAS-STING 等分子的表达变化。因此, 现阶段只能认为观察到的细胞因子谱变化和转移负荷差异与既往报道的“放疗-固有免疫通路”之间^[45]具有一定一致性, 尚不足以证实 HfO_2 纳米颗粒必然通过 cGAS-STING 轴介导远隔效应。未来有必要在原位模型基础上, 结合流式细胞术、免疫荧光及相关分子生物学检测, 系统分析肿瘤及远处器官中免疫细胞的重塑情况, 并重点考察 cGAS-STING 和 I 型干扰素等关键通路, 从而进一步厘清 HfO_2 纳米放疗增敏体系的免疫学作用机制。

3 结 论

通过水热法制备了粒径主要分布于 50~100 nm 且分散性良好的单斜晶相 HfO_2 纳米颗粒,并在兔原位肝癌模型中系统评价了其经肝动脉介入灌注后的体内分布特征、放疗增敏效应及生物安全性。结果表明,经肝动脉给药后, HfO_2 纳米颗粒可在肿瘤组织中实现较高程度的富集并在一定时间内保持滞留,而在心、肺和肾等主要脏器中的蓄积相对较低。与单纯放疗相比, HfO_2 联合放疗能够进一步增强辐射诱导的 DNA 损伤和氧化应激水平,抑制肿瘤细胞增殖,从而改善原位肝癌的局部控制效果。 HfO_2 纳米颗粒的近似放射增敏比约为 1.46,表明其具有显著的体内放射增敏活性。在实验剂量范围及给药条件下, HfO_2 纳米颗粒未引起明显的急性全身毒性,表现出较好的短期耐受性。此外,联合治疗组血清炎症因子水平的升高以及肺部转移负荷的减轻提示该体系在协同局部放疗的同时,可能伴随一定程度的系统性免疫应答,对远处病灶产生了一定的抑制作用。

总体来看,本研究从材料制备、体内分布、增敏机制及安全性等方面,为 HfO_2 纳米颗粒作为放疗增敏剂在肝癌治疗中的应用提供了一定的实验依据。后续仍需在更系统的免疫机制解析和长期安全性评价基础上,结合优化的剂量与给药方案,进一步完善该类高原子序数纳米放疗增敏体系的设计,并为其潜在的临床转化提供更加充分的数据支撑。

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20250391>。

参 考 文 献

- [1] Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal A., *CA Cancer J. Clin.*, **2024**, 74(3), 229—263
- [2] Tan E. Y., Danpanichkul P., Yong J. N., Yu Z., Tan D. J. H., Lim W. H., Koh B., Lim R. Y. Z., Tham E. K. J., Mitra K., Morishita A., Hsu Y. C., Yang J. D., Takahashi H., Zheng M. H., Nakajima A., Ng C. H., Wijarnpreecha K., Muthiah M. D., Singal A. G., Huang D. Q., *J. Hepatol.*, **2025**, 82(5), 851—860
- [3] Chen T., Zhang Y., Liu J., Rao Z., Wang M., Shen H., Zeng S., *BMJ Open*, **2023**, 13(12), e074348
- [4] Niu Z. S., Wang W. H., Niu X. J., *World J. Gastroenterol.*, **2022**, 28(46), 6433—6477
- [5] Chen R., Hou B. N., Zhou Y. Z., Zhang T., Wang Z. Z., Chen X., Zhang Y. W., Chen M., *Front. Oncol.*, **2023**, 13, 1018715
- [6] Apisarnthanarax S., Barry A., Cao M., Czito B., DeMatteo R., Drinane M., Hallemeier C. L., Koay E. J., Lasley F., Meyer J., Owen D., Pursley J., Schaub S. K., Smith G., Venepalli N. K., Zibari G., Cardenes H., *Pract. Radiat. Oncol.*, **2022**, 12(1), 28—51
- [7] Durand-Labrunie J., Baumann A. S., Ayav A., Laurent V., Boleslawski E., Cattani S., Bogart E., Le Deley M. C., Steen V., Lacormerie T., Peiffert D., Mirabel X., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2020**, 107(1), 116—125
- [8] Choi S. H., Seong J., *Clin. Mol. Hepatol.*, **2018**, 24(2), 114—134
- [9] Ameixa J., Bald I., *Acc. Chem. Res.*, **2024**, 57(11), 1608—1619
- [10] Ebel K., Bald I., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2022**, 13(22), 4871—4876
- [11] Wang K., Tepper J. E., *CA Cancer J. Clin.*, **2021**, 71(5), 437—454
- [12] Wu J., Zhao X., Ren B., Duan X., Sun J., *Int. J. Mol. Sci.*, **2025**, 26(5), 1839
- [13] Liu J., Wu J., Chen T., Yang B., Liu X., Xi J., Zhang Z., Gao Y., Li Z., *Small*, **2024**, 20(35), e2400954
- [14] Fang J. Y., Huang H. W., Song H., Wu Q., Zhao Z., Tang B. Z., *Chem. J. Chinese Universities*, **2026**, 47(4), 20260009(方瑾钰, 黄瀚玮, 宋航, 吴谦, 赵征, 唐本忠, 高等学校化学学报, **2026**, 47(4), 20260009)
- [15] Zhang Y., Han X., Liu Y., Wang S., Han X. L., Cheng C., *Mater. Adv.*, **2022**, 3(9), 3709—3725
- [16] Song X., Sun Z., Li L., Zhou L., Yuan S., *Front. Oncol.*, **2023**, 13, 1088878
- [17] Ning J. Y., Hao P. F., Wang F., Ye J. Q., Chong Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2025**, 46(1), 20240226(宁佳雨, 郝鹏飞, 王峰, 叶家全, 崇羽, 高等学校化学学报, **2025**, 46(1), 20240226)
- [18] Jackson N., Cecchi D., Beckham W., Chithrani D. B., *Molecules*, **2024**, 29(11), 2438
- [19] Jin J., Zhao Q., *J. Nanobiotechnol.*, **2020**, 18(1), 75
- [20] Choi J., Kim G., Cho S. B., Im H. J., *J. Nanobiotechnol.*, **2020**, 18(1), 122
- [21] Chan H. W., Sheung P. W., Tsao S. T. M., Wu C. Y., Chuang H. Y., *Mater. Today Bio.*, **2025**, 33, 102029
- [22] Zhang Y. M., Huang F., Ren C. H., Liu J. J., Yang L. J., Chen S. Z., Chang J. L., Yang C. H., Wang W. W., Zhang C. N., Liu Q., Liang X. J., Liu J. F., *Adv. Sci.*, **2019**, 6(8), 1801806
- [23] Wu C. H., Qiao M. L., Ning H. Y., Gao T. T., Xu H. J., Xue D. F., Li X. Z., *Int. J. Mol. Sci.*, **2026**, 27(8), 3454
- [24] Wen S., Ovais M., Li X., Ren J., Liu T., Wang Z., Cai R., Chen C., *Nanoscale*, **2022**, 14(23), 8245—8254
- [25] Du F., Lou J., Jiang R., Fang Z., Zhao X., Niu Y., Zou S., Zhang M., Gong A., Wu C., *Int. J. Nanomed.*, **2017**, 12, 5973—5992

- [26] Huang J., Huang Q., Liu M., Chen Q. H., Ai K. L., *Front. Pharmacol.*, **2022**, *13*, 844037
- [27] Wang J., Pan J., Tang Y., Chen J., Fei X., Xue W., Liu X., *Front. Chem.*, **2023**, *11*, 1283924
- [28] McGinnity T. L., Sokolova V., Prymak O., Nallathamby P. D., Epple M., Roeder R. K., *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, **2021**, *109*(10), 1407—1417
- [29] Sebti Y., Chauveau T., Chalal M., Lalatonne Y., Lefebvre C., Motte L., *Inorg. Chem.*, **2022**, *61*(17), 6508—6518
- [30] Zhang P., Darmon A., Marill J., Mohamed Anesary N., Paris S., *Int. J. Nanomed.*, **2020**, *15*, 3843—3850
- [31] Bonvalot S., Rutkowski P. L., Thariat J., Carrère S., Ducassou A., Sunyach M. P., Agoston P., Hong A., Mervoyer A., Rastrelli M., Moreno V., Li R. K., Tiangeo B., Herraiez A. C., Gronchi A., Mangel L., Sy-Ortin T., Hohenberger P., de Baère T., Le Cesne A., Helfre S., Saada-Bouid E., Borkowska A., Anghel R., Co A., Gebhart M., Kantor G., Montero A., Loong H. H., Vergés R., Lapeire L., Dema S., Kacso G., Austen L., Moureau-Zabotto L., Servois V., Wardelmann E., Terrier P., Lazar A. J., Bovée J. V. M. G., Le Péchoux C., Papai Z., *Lancet Oncol.*, **2019**, *20*(8), 1148—1159
- [32] Sherstiuk A. A., Tsybmal S. A., Fakhardo A. F., Morozov V. N., Krivoschapkin E. F., Hey-Hawkins E., Krivoschapkin P. V., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2021**, *7*(12), 5633—5641
- [33] Zhang P., Marill J., Darmon A., Mohamed Anesary N., Lu B., Paris S., *Int. J. Nanomed.*, **2021**, *16*, 2761—2773
- [34] Li Y., Qi Y., Zhang H., Xia Z., Xie T., Li W., Zhong D., Zhu H., Zhou M., *Biomaterials*, **2020**, *226*, 119538
- [35] Wan Y., Zhou X., *RSC Adv.*, **2017**, *7*(13), 7763—7773
- [36] Wang J., Zhang T., Liao Y., Chen W., Liang S., Xu S., Fang H., Wang M., Zheng L., Gu Z., Zhang Z., Wang B., Bi Y., Feng W., *Anal. Chim. Acta*, **2023**, *1266*, 341352
- [37] Liu D., Cao F., Xu Z., Zhao C., Liu Z., Pang J., Liu Z. X., Moghiseh M., Butler A., Liang S., Fan W., Yang J., *Adv. Mater.*, **2024**, *36*(19), e2308098
- [38] Zhang S., Lai Y., Pan J., Saeed M., Li S., Zhou H., Jiang X., Gao J., Zhu Y., Yu H., Zhang W., Xu Z., *Adv. Mater.*, **2024**, *36*(23), e2314132
- [39] Liu Y., Zhang P., Li F., Jin X., Li J., Chen W., Li Q., *Theranostics*, **2018**, *8*(7), 1824—1849
- [40] Marill J., Mohamed Anesary N., Paris S., *Radiother. Oncol.: J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, **2019**, *141*, 262—266
- [41] Hoffmann C., Calugaru V., Borcoman E., Moreno V., Calvo E., Liem X., Salas S., Doger B., Jouffroy T., Mirabel X., Rodriguez J., Chilles A., Bernois K., Dimitriu M., Fakhry N., Hee Kam S. W., Le Tourneau C., *Eur. J. Cancer*, **2021**, *159*, 135—144
- [42] Huang C. W., Hu H. M., Hsu W. H., Chen C. Y., Huang M. Y., Chen C. P., Wei P. L., Shen B. N., Chang T. K., Wang J. Y., *Nanomedicine*, **2025**, *20*(9), 929—941
- [43] Cao Y., Ding S., Hu Y., Zeng L., Zhou J., Lin L., Zhang X., Ma Q., Cai R., Zhang Y., Duan G., Bian X. W., Tian G., *ACS Nano*, **2024**, *18*(5), 4189—4204
- [44] Gerken L. R. H., Keevend K., Zhang Y., Starsich F. H. L., Eberhardt C., Panzarasa G., Matter M. T., Wichser A., Boss A., Neels A., Herrmann I. K., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2019**, *11*(1), 437—448
- [45] Darmon A., Zhang P., Marill J., Mohamed Anesary N., Da Silva J., Paris S., *Cancer Cell Int.*, **2022**, *22*(1), 208

(Ed.: H, K, M)