

Fe₂O₃ 纳米磁流体热疗治疗小鼠结肠癌实验研究

尹燕鹰 高嫦娥 陈明清 顾 宁 董 坚

摘 要 **目的** 研究 Fe₂O₃ 纳米磁流体热疗对小鼠结肠癌的治疗效果。**方法** 磁流体直接局部注射到小鼠皮下肿瘤组织, 交变磁场下加热至 43℃, 计算瘤体积抑制率, 肿瘤组织及各个脏器做病理检测。**结果** Fe₂O₃ 纳米磁流体在交变磁场 (alternating magnetic field, AMF) 中升温迅速。热疗组相比磁流体对照组、磁场对照组、空白对照组, 热疗 6 天后瘤体体积抑制率分别为 50.87%、50.50%、76.57%, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。病理检测证实肿瘤组织部分凋亡, 而正常脏器无变化。**结论** Fe₂O₃ 纳米磁流体热疗可抑制小鼠结肠癌的增长, 对结肠癌的治疗有一定作用, 但并不能完全抑制肿瘤的生长。实验证明热疗安全可靠。

关键词 磁流体 交变磁场 热疗 结肠癌

Anticancer Effect of Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles Fe₂O₃ Colon Cancer. Yin Yanying, Gao Change, Chen Mingqing, Gu Ning, Dong Jian. Department of Biotherapy, The First Affiliated Hospital of Kunming University of Medical Science, Yunnan 650032, China

Abstract Objective To research hyperthermia effect of the magnetic nanoparticles (Fe₂O₃) for mice colon cancer. **Methods** Magnetic nanoparticles was targeted to be injected into the subcutaneous tumor. Magnetic nanoparticles were heated to 43℃ in the alternating magnetic field. Tumor size inhibition rate was calculated, and tumor tissue and organs underwent pathology testing. **Results** Fe₂O₃ nano magnetic in alternating magnetic field was rapidly heated. Compared with the MF group, the AMF group, the blank control group, in the sixth day later heated, the inhibition rate to the volume were 50.87%, 50.50% and 76.57% respectively ($P < 0.05$). Pathology testing proved that tumor tissue appeared part of apoptosis and normal organs did not change. **Conclusion** By magnetic nano Fe₂O₃ hyperthermia could restrain the growth of the colon cancer in mice. Treatment had certain effect for colon cancer, but hyperthermia could not completely inhibited the growth of tumors. Experiments show that hyperthermia was safe and reliable.

Key words Magnetic fluid; Alternating magnetic field; Hyperthermia; Cancer of colon

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 其发病率呈上升趋势严重威胁人类的生存。目前结肠癌的治疗手段有限, 且结肠癌患者多为老年患者并发症多预后差^[1]。磁热疗 (magnetic hyperthermia, MH) 是近年来发展的一种肿瘤热疗新方法, 即适形定位于肿瘤组织中的磁性介质在外部交变磁场下升温, 使局部快速形成靶向高热区, 使肿瘤细胞受到打击^[2]。MH 的治疗理念一经提出就引起了不同学科的广泛关注, 随着生物技术、纳米技术、材料学等学科的发展, 肿瘤 MH 取得了突破性进展, 在肿瘤治疗中具有良好的应用前景^[3]。磁热疗应用在了由小鼠结肠癌细胞株 (CT-26) 建立的小鼠结肠癌皮下模型上, 观察治疗效果及安全性。旨为新的治疗结肠癌的方法提供实验依据

和理论基础。

材料与方法

1. 材料: DMSA@ γ -Fe₂O₃ 纳米磁流体, 直径为 17.8 ± 2.1 nm, 由东南大学生物材料与器件重点实验室提供。小鼠结肠癌 CT-26 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院。Balb/c 小鼠 (SPF 级) 44 只, 4~6 周龄, 体重 22~25g 购自中国人民解放军军事科学院动物中心, 在东南大学公共卫生学院 SPF 动物实验室饲养。

2. 实验方法: (1) 磁流体体外升温实验: 将浓度为 7.8 mg/ml 的 DMSA@ γ -Fe₂O₃ 用蒸馏水稀释成浓度为 3.9 mg/ml、1.95 mg/ml 和 0.952 mg/ml 的 DMSA@ γ -Fe₂O₃, 4 种浓度磁流体置于中频 AMF 中进行加热, AMF 频率为 40 kHz, 电流强度为 320 A, 辐照时间 20 min, 光纤测温仪测温。(2) 细胞吸收磁颗粒情况及细胞对温度的敏感研究: 1) CT-26 对 DMSA@ γ -Fe₂O₃ 颗粒的吞噬: CT-26 细胞用含有 DMSA@ γ -Fe₂O₃ 颗粒 (浓度为 30 μ g/ml) 的培养基培养 24 h。普鲁士蓝染色, 光镜下观察 CT-26 细胞对 DMSA@ γ -Fe₂O₃ 的吞噬情况 (同时设空白对照组)。2) 细胞对温度敏感性: 培养瓶中培养 CT-26 细胞, 待细胞铺满瓶底 80% 后, 放入 37℃、41℃、43℃、45℃、47℃ 水浴, 1 h 后, 光镜下观察细胞状态, 换培养基后继续

作者单位: 650032 昆明医学院第一附属医院生物治疗中心 (尹燕鹰、高嫦娥、陈明清、董坚); 东南大学生物材料与器件重点实验室 (顾宁)

通讯作者: 董坚、顾宁, 电子信箱: Dongjian18@yahoo.com

培养 12h, 光镜观察细胞状态; 流式细胞仪检测细胞周期。3) 建立小鼠皮下结肠癌模型及热疗: 小鼠皮下结肠癌模型建立, CT-26 细胞制成细胞悬液, 调细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 取 0.2ml 的细胞悬液接种于 44 只 4~6 周龄雌性 Balb/c 小鼠右侧颈近前腋下。成瘤后, 小鼠用 0.3% 戊巴比妥钠, 按 60mg/kg 腹腔麻醉后, 放入频率为 40kHz 的 AMF 加热器进行热疗, 记录瘤区中心、瘤旁和体温的温度变化。每 24h 热疗 1 次, 热疗 3 次后观察各组荷瘤小鼠的肿瘤生长情况并记录。

皮下种植肿瘤细胞 8 天后, 将 44 只小鼠随机分 4 组, 每组 11 只。①空白对照组, 无任何处理; ②磁流体对照组, 向瘤内多点注射 0.3ml DMSA@ γ - Fe_2O_3 的磁流体 (浓度 7.8mg/ml); ③磁场对照组, 单纯交变磁场作用 60min; ④热疗组, 瘤内多点注射 0.3ml DMSA@ γ - Fe_2O_3 的磁流体 (浓度 7.8mg/ml) 24h 后, 在交变磁场下加热 60min, 磁场频率 40kHz, 电流强度为 320A。将温度稳定在 43℃。(4) 计算瘤体积及瘤体积抑制率: 测量肿瘤的长径 (A) 及肿瘤的短径 (B), 计算瘤体积 $V = (A \times B^2 \times \pi) / 6$ 。依肿瘤体积抑制率 (%) = $(1 - \text{实验组肿瘤体积} / \text{对照组肿瘤体积}) \times 100\%$, 计算肿瘤体积抑制率。(5) 组织学检测: 空白对照组、磁流体对照组、交变磁场对照组、热疗组处理 24h 后各组选择 1 只荷瘤小鼠用脱臼法处死, 迅速取出心、肝、脾、肺、肾和瘤体经中性甲醛固定, 石蜡包埋行 HE 病理检查。

3. 统计学方法: 实验所得数据应用 SPSS 18 统计软件进行处理, 单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. DMSA@ γ - Fe_2O_3 纳米磁流体的体外升温实验: 7.8、3.9、1.95 和 0.952mg/ml 4 个浓度的 DMSA@ γ - Fe_2O_3 , 在频率为 40kHz, 电流为 320A 的 AMF 下加热, 升温曲线如图 1, 前 10min 升温迅速, 之后温度进入平台期, 分别升高至 80.2℃、67.9℃、56.7℃、44.8℃。最终选择浓度为 7.8mg/ml 的 DMSA@ γ - Fe_2O_3 用于体内热疗。

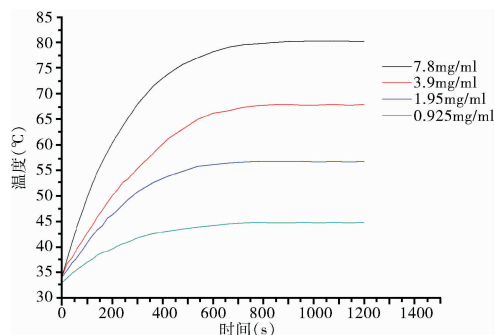


图 1 不同浓度磁流体升温曲线

2. 细胞吸收磁颗粒及温度敏感性研究: (1) CT-26 吸收 DMSA@ γ - Fe_2O_3 颗粒: CT-26 与 DMSA@ γ -

- Fe_2O_3 (浓度 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 颗粒共培养 24h。普鲁士蓝染色法染铁, 镜下观察细胞发现, 细胞内含有氧化铁颗粒, 氧化铁颗粒呈蓝色, 证明 CT-26 对 DMSA@ γ - Fe_2O_3 颗粒有吞噬能力 (图 2)。(2) CT-26 对温度的敏感性: 光镜下观察 CT-26 细胞在 37℃ 下 1h 后, 细胞无明显变化; 41℃ 下 1h 后, 部分细胞形态变圆, 换培养基后继续培养 12h 后细胞回复正常状态; 43℃ 下 1h 后, 细胞形态变圆, 部分漂起, 换培养基后继续培养 12h 后, 细胞形态仍然保持圆形, 漂浮细胞增多; 45℃ 下 1h 后, 细胞变圆, 部分细胞漂浮, 换培养基后继续培养 12h 后细胞形态变圆漂浮细胞量增加; 47℃ 下 1h, 大部分细胞成片漂起, 大量细胞漂起, 且漂浮细胞呈梭型, 仍然贴壁的细胞极少, 换培养基后继续培养 12h 后细胞成片漂浮, 贴壁细胞极少, 细胞死亡。

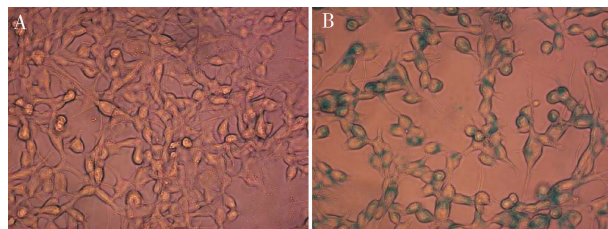


图 2 普鲁士蓝染色 ($\times 400$)

A. 空白对照无蓝色颗粒; B. 实验组细胞内含蓝色颗粒

流式细胞仪检测细胞凋亡率 43℃ 为 4.3%, 可出现 DNA 含量明显低于 G_1 期的亚 G_1 期细胞峰, 即凋亡峰, 而 37℃ 凋亡率为 0.2%, 前者凋亡率明显高于后者。随着温度的升高, 细胞凋亡率升高。

3. 小鼠模型的建立、热疗组加热升温结果: CT-26 细胞接种 8 天后, 瘤体长径为 0.8~1.5cm 的皮下瘤。热疗组的热疗过程中测温结果, 见图 3, 瘤中心温度在 10min 内升温至 43℃, 并稳定在 43℃ 附近, 而小鼠体温稳定在 24.3℃, 没有升温现象。磁场对照组无升温现象, 温度与体温相同。

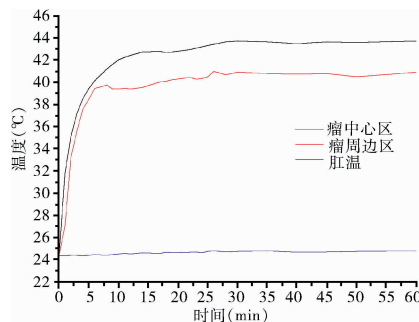


图 3 磁流体热疗体内升温曲线

4. 热疗对肿瘤体积生长和肿瘤体积抑制率的影响:记录皮下肿瘤长径短径,根据瘤体积 $V = (A \times B^2 \times \pi) / 6$ 公式计算瘤体积。热疗组小鼠瘤体在热疗后,前 10 天内生长受到抑制,生长缓慢,10 天后热疗组瘤体生长加快,肉眼可见局部坏死。各对照组瘤体生长呈明显递增趋势。生存期观察,各组小鼠在处理后续死亡,空白对照组平均生存期为 24.20 ± 5.31

天,磁场对照组平均生存期为 35.00 ± 13.59 天,磁流体对照组平均生存期为 $45.4.0 \pm 11.64$ 天,磁流体热疗组平均生存期为 $47.7.0 \pm 7.28$ 天。通过单因素方差分析,磁流体热疗组生存时间与对照组生存时间比较 $P < 0.05$,差异有统计学意义。各组第 6、9、12、14 天瘤体积平均值及抑制率,见表 1。

表 1 瘤体积平均值及抑制率

组别	第 6 天瘤体积 (cm^3)	抑制率 (%)	第 9 天瘤体积 (cm^3)	抑制率 (%)	第 12 天瘤体积 (cm^3)	抑制率 (%)	第 14 天瘤体积 (cm^3)	抑制率 (%)
热疗组	1.98 ± 0.57		3.95 ± 1.09		6.68 ± 1.24		8.93 ± 1.57	
磁流体对照组	$4.03 \pm 1.26^\Delta$	50.87	6.29 ± 1.41	37.20	8.22 ± 1.90	18.73	9.64 ± 1.82	7.37
磁场对照组	$4.00 \pm 1.18^\Delta$	50.50	5.87 ± 1.71	32.71	8.11 ± 2.41	17.63	11.97 ± 2.72	25.40
空白对照组	$8.45 \pm 3.08^\Delta$	76.57	$13.52 \pm 2.80^\Delta$	70.78	$18.62 \pm 4.31^\Delta$	64.12	$18.88 \pm 4.01^\Delta$	52.70

通过单因素方差分析,热疗组与各对照组比较, $^\Delta P < 0.05$

5. 组织学观察:热疗组的瘤体在加热后出现部分凋亡形态的肿瘤细胞。各对照组小鼠瘤体生长旺盛。各组心、肝、脾、肺和肾 HE 染色未见异常(图 5)。

产生的高温直接作用于细胞膜,细胞膜遭到破坏后导致细胞迅速死亡,这可能是抑制肿瘤生长的主要原因^[4]。

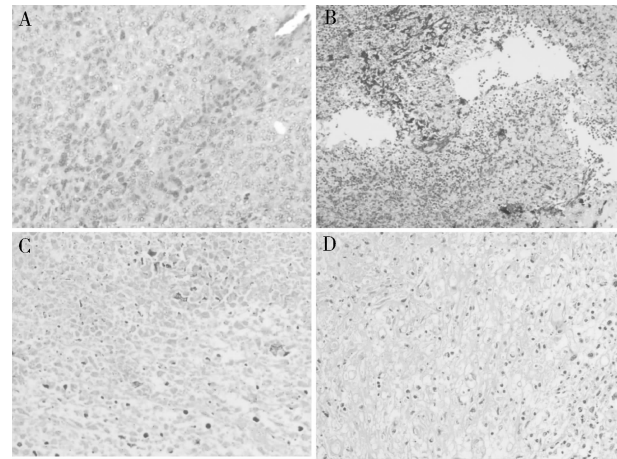


图 4 瘤体 HE 染色结果

A. 空白对照($\times 400$); B. 磁流体对照组($\times 200$); C. 磁场对照($\times 400$); D. 热疗组($\times 400$)

讨 论

当今用于热疗的加热技术主要有微波加热、超声波加热、射频加热及灌注加热等几种。这些加热技术和方法普遍存在对肿瘤的靶向能力差、易导致周围组织的温度升高和易损伤正常组织的缺点,其临床应用的范围受限。磁流体热疗是将纳米技术和热疗相结合的新型物理治疗手段,具有靶向性、低不良反应及微创等特点。综合磁热检测、流式细胞仪检测和显微镜观察结果的分析,推测结合在细胞表面的 SPIONs

目前磁流体热疗肿瘤的技术已经应用于前列腺癌恶性胶质瘤的临床实验^[5-8]。国内研究者发现 Fe_3O_4 对胰腺癌模型进行了热疗的初步研究,证明了胰腺癌的热疗是可行的^[9]。Lerenard 等^[10]和 Wang 等^[11]将不同材料包覆的氧化铁纳米颗粒小鼠进行局部磁流体热疗,取得了不错的治疗效果。体内试验中, $\text{DMSA}@\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 磁流体的生物相容性已被证明是安全的^[12]。Yonezawa 等^[13]报道在 43°C 能诱导骨肉瘤细胞凋亡。颜士岩等研究发现,应用氧化铁 MFH 在 $39 \sim 47^\circ\text{C}$ 之间加热后人肝癌细胞增殖受到明显抑制,细胞凋亡率明显增加,且与磁流体浓度呈依赖关系^[14]。研究中发现,随着温度的升高,发现 CT-26 细胞形态变圆及细胞脱离培养瓶壁呈递增趋势。CT-26 细胞在 $45、47^\circ\text{C}$ 下作用以细胞裂解死亡为主。结果与王锐等^[15]研究中得出氧化铁磁流体热疗(44°C 30min)可以明显抑制细胞增殖,但不能有效诱发大量细胞凋亡的结果类似。翟羽等人研究发现单独磁流体热处理可以显著抑制小鼠肝癌移植瘤的生长,同时发现抑制 VEGF 表达和诱导凋亡不是抑制移植瘤生长的主要原因。热疗抑制肿瘤的方法由来已久,但局部热疗引起组织损伤的确切机制或说是热疗抑制肿瘤生长的确切机制尚无定论,有待进一步研究。

热疗后,随着时间的增加瘤体积抑制率呈递减趋

势。这可能是肿瘤细胞在热疗中的热疗剂量、肿瘤的形状以及热分布不均等因素有关。单独磁流体 43℃ 热疗,在初期能够抑制肿瘤的生长。后续研究中热疗可能需要结合其他方法,如联合化疗或放疗进而在结肠癌治疗中达到更好的治疗效果。

参考文献

- 1 李洪芳,葛安波,必贵萍.老年梗阻性结肠癌合并心血管疾病 37 例围术期护理[J].齐鲁护理杂志,2010,16(29):75-76
- 2 Johannsen M, Thiesen B, Gneveckow U, *et al.* Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer[J]. *Prostate*, 2006, 66(1):97-104
- 3 Fortin JP, Gazeau F, Wilhelm C. Intracellular heating of living cells through Neel relaxation of magnetic nanoparticles[J]. *Eur Biophys J Biophys*, 2008, 37(2):223-228
- 4 赵印敏,栗波,杨晓君,等.靶向血管新生肽修饰的氧化铁纳米粒对荷瘤裸鼠磁热疗的研究[J].*肿瘤*,2010,30(5):370-375
- 5 Ito A, Shinkai M, Honda H, *et al.* Medical application of functionalized magnetic nanoparticles[J]. *Biosci Bioeng*, 2005, 100(1):1-11
- 6 Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, *et al.* The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma[J]. *Neurooncol*, 2006, 78(1):7-14
- 7 van Landeghem FKH, Maier-Hauff K, Jordan A, *et al.* Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(1):52-57

- 8 Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, *et al.* Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme[J]. *Neur Oncol*, 2007, 81(1):53-60
- 9 王露方,董坚.磁流体热疗对小鼠胰腺癌治疗作用的研究[J].*中国肿瘤临床*,2009,36(22):1304-1307
- 10 Lerenard PE, Buchegger F, Petri-Finka, *et al.* Local moderate magnetically induced hyperthermia using an implant formed in situ in a mouse tumor model[J]. *Int J Hyperthermia*, 2009, 25(3):229-239
- 11 Wang ZY, Song J, Zhang DS. Nanosized As₂O₃/Fe₂O₃ complexes combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(24):2995-3002
- 12 颜士岩,张东生,顾宁,等.肿瘤热疗用 F2O3 纳米磁性粒子的生物相容性研究[J].*东南大学学报:医学版*,2005,24(1):8-12
- 13 Yonezawa M, Otsuka T, Kato T, *et al.* Hyperthermic induction of apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cells; possible involvement of a p53-independent pathway in the induction of bax gene [J]. *J Orthop Sci*, 2002, 7(1):117-122
- 14 Yan SJ, Zhang D, Gu N, *et al.* Therapeutic effect of F2O3 nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on cultured liver cancer cells and xenograft liver cancers [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2005, 5(8):1185-1192
- 15 王锐,杨卫忠,徐睿智,等.氧化铁磁流体热疗对人良性脑膜瘤细胞增殖和凋亡的影响[J].*中国临床神经外科杂志*,2010,15(3):149-151
(收稿:2012-04-10)
(修回:2012-05-02)

SAPHO 综合征 12 例临床分析

李 忱 李 菁 刘晋河 董振华

摘 要 目的 SAPHO 综合征属罕见病,由于对其临床特点认识不足,往往造成漏诊和误诊,总结北京协和医院 12 例 SAPHO 综合征患者,旨在提高对本病的早期诊断,探讨本病的治疗方案。**方法** 对 12 例 SAPHO 综合征患者的临床资料、治疗转归进行总结分析。**结果** 12 例患者中男性 2 例,女性 10 例。皮损表现为掌跖脓疱病 10 例,暴发性痤疮者 1 例,无皮疹者 1 例。骨关节受累上胸壁处受累 12 例,外周关节受累 10 例,骶髂关节受累 8 例,脊柱关节受累 3 例。11 例行^{99m}Tc-MDP 全身骨扫描,均不同程度提示上胸壁处异常放射浓聚。12 例患者均给予非甾体抗炎药(NSAID),糖皮质激素和(或)改变病情抗风湿药(DMARD),其中 8 例加用抗肿瘤坏死因子- α 拮抗剂,4 例在病程中配合中药治疗。随访过程中未见严重骨骼关节并发症。**结论** 本组资料以女性多见,皮肤改变以掌跖脓疱病多见,骨关节改变以上胸壁处受累多见,^{99m}Tc-MDP 全身骨扫描对本病的敏感性、特异性均较高。单用 NSAID 类药物,症状多难控制;糖皮质激素和改变病情抗风湿药可部分改善症状;抗肿瘤坏死因子- α 可显著改善症状,但停药易复发;中医药治疗本病有一定作用,有望成为治疗本病的新方法。

关键词 SAPHO 综合征 临床表现 治疗

Clinical Features and Outcome of SAPHO Syndrome: 12 Cases Report. Li Chen, Li Jing, Liu Jinhe, Dong Zhenhua. Department of Tradition

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院中医科(李忱、刘晋河、董振华);风湿免疫科(李菁)

通讯作者:李菁,电子信箱:lijing6515@pumch.cn;董振华,电子信箱:pumcdzh@163.com