

磁流体靶向热疗对小鼠胰腺癌的作用

王露方¹, 唐劲天², 欧阳伟炜³, 董坚⁴, 赵凌云², 王晓文², 胡冰¹

1. 安徽医科大学附属省立医院肿瘤化疗科, 合肥 230001
2. 清华大学工程物理系; 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084
3. 贵阳医学院附属医院; 贵州省肿瘤医院胸部肿瘤科, 贵阳 550004
4. 昆明医科大学第一附属医院肿瘤内科, 昆明 650032

摘要 为探讨磁流体靶向热疗对小鼠胰腺癌的体外和动物治疗作用, 利用前期建株的小鼠胰腺腺泡细胞癌株(MPC-83)分别进行体外热疗和动物实验。对MPC-83进行水浴热疗, 分别调热疗温度为37、42、46、50℃, 作用30 min, 显微镜观察细胞形态变化, 流式细胞仪检测凋亡和坏死细胞百分比。选择4周龄雌性昆明种小鼠, 建立MPC-83胰腺癌皮下肿瘤模型, 观察磁流体热疗(46℃和50℃)对荷瘤小鼠的作用及其病理学变化。流式细胞仪检测46℃和50℃热疗细胞凋亡和坏死百分比分别为46.13%、89.33%, 与对照组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。热疗后第14天, 46℃和50℃热疗组肿瘤生长率分别为 -0.64 ± 0.73 和 -0.72 ± 0.79 , 与3个对照组比较, 肿瘤生长受到明显抑制($P < 0.05$)。病理学检查示磁流体对照组, 在注射磁流体24 h可见散在的磁性纳米微粒在一定范围内分布于肿瘤细胞之间, 部分肿瘤细胞和吞噬细胞吞噬了磁性纳米微粒。热疗14 d肿瘤完全消失的小鼠皮下组织未见肿瘤细胞, 可见皮下残存磁性纳米微粒, 被吞噬细胞吞噬。各对照组小鼠瘤体生长旺盛, 细胞核浓染分裂, 可见病理性核分裂像。磁流体靶向热疗可以达到杀伤胰腺癌细胞的理想温度, 能有效抑制MPC-83胰腺癌生长, 延长小鼠生存期。

关键词 胰腺癌; 磁流体; 交变磁场; 热疗

中图分类号 R73-35'2

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.30.007

Anticancer Effect of Magnetic Targeting Hyperthermia on Mouse Pancreatic Cancer

WANG Lufang¹, TANG Jintian², OUYANG Weiwei³, DONG Jian⁴, ZHAO Lingyun², WANG Xiaowen², HU Bing¹

1. Department of Oncology, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China
2. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging of the Ministry of Education; Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
3. Department of Thoracic Oncology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guizhou Cancer Hospital, Guiyang 550004, China
4. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Kunming University of Medical Science, Kunming 650032, China

Abstract This paper aims to assess the therapeutic effect of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on mouse pancreatic cancer in vitro and in vivo. In vitro and in vivo experiments were respectively established using the unique mouse pancreatic cancer cell line (MPC-83). Apoptosis and morphological changes of the MPC-83 were measured with flow cytometry and microscopy after heating to 42, 46, and 50℃ with water bath for 30 min. Four-week-old female Kunming mice were selected to establish subcutaneous pancreatic cancer model. The therapeutic effect (46℃ and 50℃) was evaluated by detecting various influences including pathological examination. Flow cytometry revealed the apoptosis and necrosis rate of MPC-83 were 46.13% (46℃) and 89.33% (50℃). Fourteen days after hyperthermia, the tumor growth rate were -0.64 ± 0.73 and -0.72 ± 0.79 , which were significantly lower than that in each control group ($P < 0.05$).

收稿日期: 2014-08-13; 修回日期: 2014-08-28

作者简介: 王露方, 硕士研究生, 研究方向为消化系统肿瘤基础及临床, 电子信箱: wanglufang121@aliyun.com; 胡冰 (通信作者), 教授, 研究方向为消化系统肿瘤基础及临床, 电子信箱: Hubin3756@Sina.com

引用格式: 王露方, 唐劲天, 欧阳伟炜, 等. 磁流体靶向热疗对小鼠胰腺癌的作用[J]. 科技导报, 2014, 32(30): 45-49.

Compared with control groups, tumor growth in the experimental group was markedly inhibited. Pathological examination showed that magnetic nanoparticles were distributed between tumor cells, and some of them were ingested by phagocytes. Fourteen days after hyperthermia, there were no subcutaneous nodules with only the MF remaining. In each control group, tumor cells grew very well, and hyperchromatic nuclei and pathological karyokinesis were seen simultaneously. MFH can reach perfect therapeutic temperature and heat tumor tissue specifically, inhibiting the growth of mouse pancreatic cancer and prolonging the survival time of the mice apparently. MFH has satisfactory therapeutic efficacy for mouse pancreatic cancer.

Keywords pancreatic cancer; magnetic fluid; alternating magnetic field; hyperthermia

胰腺癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,具有临床表现隐匿,发病迅速,恶性程度高,手术切除率低,传统放化疗不敏感的特点,预后较差^[1]。医学工程物理学的迅速发展加速了物理治疗临床化进度,高新物理治疗技术在恶性肿瘤的综合治疗中发挥巨大作用。磁流体是磁性介质的一种,磁流体热疗(magnetic fluid hyperthermia, MFH)是将磁流体注射至肿瘤组织,纳米级磁流体沉积在细胞之间或被肿瘤细胞吞噬,在交变磁场(alternating magnetic field, AMF)下通过奈尔弛豫(néel relaxation processes)及布朗弛豫(brownian relaxation processes)机制升温,从而杀死肿瘤细胞,而肿瘤周围的正常组织升温不明显,可以有效的保护正常组织。本研究利用前期建立的唯一1株来源于小鼠胰腺腺泡细胞癌株(mouse pancreatic cancer cell line, MPC-83)^[2]建立小鼠胰腺癌动物模型,观察磁流体热疗对小鼠胰腺癌的治疗效果和安全性,探讨不同温度磁流体热疗的量效关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要设备

1.1.1 材料及试剂

细胞株:MPC-83(昆明医科大学第一附属医院)。

磁流体:Fe₃O₄水基液,粒径20 nm,密度1.2 g/mL,磁饱和强度138 GS, Fe₃O₄颗粒含量0.248 g/mL(安徽金科磁性液体有限公司)。

试剂:RPMI1640培养基(美国GIBCO公司)、15%新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、0.05%胰蛋白酶(美国Amresco公司)、0.3%戊巴比妥钠(北京化学试剂公司)。

1.1.2 主要设备

加温设备:分体式高频感应加热机,型号SP-04ABC 4 kW,频率100~250 kHz,感应线圈直径5 cm(深圳市双平电源技术有限公司)。

测温设备:铜-康铜热电偶,型号IT-18,温度响应时间0.1 s(美国Physitemp公司)。

温度显示设备:四通道毫伏计,型号XS01A-4(北京昆仑天辰仪表科技有限公司)。

细胞培养箱:37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱(美国Thermo公司)。

1.2 实验动物

选择健康昆明种小鼠38只,雌性,4周龄,体重(18±2)g,

购于北京兴隆实验动物养殖厂,清洁级饲养。

1.3 MPC-83体外热疗

将液氮冻存的MPC-83悬液取出,37℃水浴充分融化冰块,1500 r/min离心7 min,接种于含15%新生牛血清的RPMI1640培养基中,放置37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。每天换液,每3 d传代1次。将传代后处于对数生长期的细胞进行水浴热疗,分别调热疗温度为37、42、46、50℃,作用30 min,同时设空白对照,显微镜观察细胞形态变化,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4 小鼠胰腺癌皮下肿瘤模型的制作

将MPC-83置于含15%新生牛血清的RPMI1640培养基,放入37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,待培养瓶中细胞80%~90%融合时传代。选取状态和活性均较好的MPC-83细胞,0.05%胰蛋白酶消化后将贴壁细胞吹打成单细胞悬液,1500 r/min离心8 min。磷酸盐缓冲液(PBS)调细胞悬液浓度为1×10⁷/mL。将制备好的MPC-83细胞悬液0.2 mL接种于昆明种小鼠右侧腋下,7~10 d成瘤,成瘤率为100%。

1.5 磁流体热疗

荷瘤小鼠随机分为4组。0.3%戊巴比妥钠30~40 mg/kg腹腔麻醉后将其固定于热疗板上,75%酒精擦拭肿瘤区,用穿刺套管分别于肿瘤中心、中心旁和直肠插入一根热电偶监测温度,然后置于交变磁场下升温。

I组:空白对照组(6只),不予任何治疗。

II组:磁流体对照组(6只),向肿瘤内注射密度为1.2 g/mL磁流体0.2 mL。

III组:磁场对照组(6只),单纯磁场作用30 min。

IV组:(a),46℃热疗组(10只),按上述方法注射磁流体24 h后,在交变磁场下加温一次,通过控制磁场强度,将温度稳定在46℃左右,时间30 min,同时监测直肠温度。(b),50℃热疗组(10只),加热时间20 min,方法同(a)组。

1.6 热疗对荷瘤小鼠的治疗作用

根据肿瘤的体积计算各组肿瘤体积变化和肿瘤生长率,肿瘤体积(V)= $(A \cdot B^2 \cdot \pi)/6$,其中 A 、 B 分别为肿瘤长径和短径;肿瘤生长率= $(V_2 - V_1)/V_1$,其中 V_2 、 V_1 分别为治疗后和治疗前的肿瘤体积,根据各组小鼠存活的天数比较治疗对生存期的影响。

1.7 组织学观察

加温治疗后当天和治疗后14 d,热疗组(a)、(b)组以及

各对照组分别随机挑选4只和2只小鼠,颈椎脱位法处死,迅速取出瘤体和心、肝、脾、肺、肾,经10%中性甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,并进行病理学检查。

1.8 统计方法

实验所得数据应用SPSS11.5统计软件进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同浓度磁流体在交变磁场下的升温情况

当磁场电流固定不变时,随着磁流体浓度的增加,升温情况呈递增趋势。实验重复测量3次。在300 A的电流强度下50 mL浓度为3、6、12、12和1200 mg/mL的磁流体作用20 min时温度升高值分别为11.5、17.5、20.5、40.6和73.4℃,而生理盐水对照组在交变磁场中温度不升,稳定在26.1℃左右(图1)。

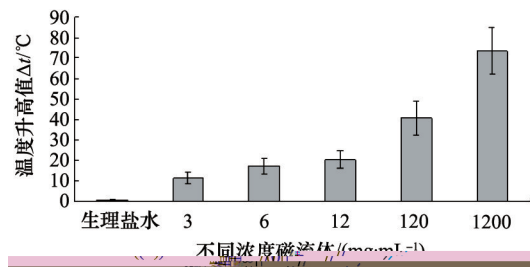


图1 不同浓度磁流体在交变磁场中的升温

Fig. 1 Heating curve of different concentrations of magnetic fluid in AMF

2.2 MPC-83体外热疗结果

MPC-83在42℃热疗时部分细胞开始从梭形向圆形转变,46℃和50℃热疗时细胞形态变化较大,基本变成圆形,50℃热疗使细胞基本全部悬浮(图2)。流式细胞仪检测46℃和50℃热疗细胞凋亡和坏死百分比分别为46.13%、89.33%,两热疗组及与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

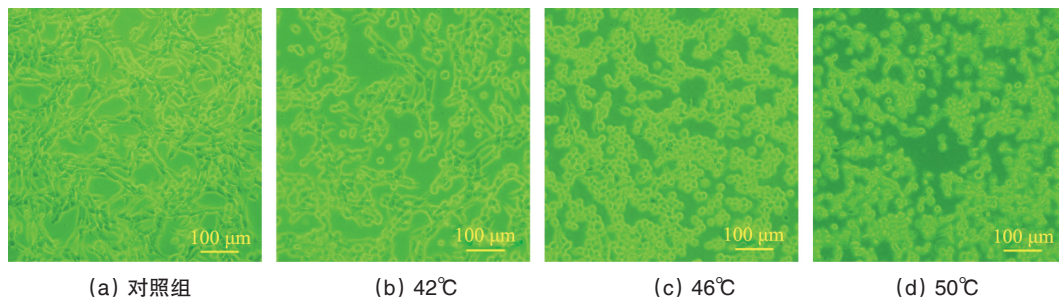


图2 不同温度热疗对MPC-83的影响

Fig. 2 Influence on MPC-83 under different heating temperature

2.3 加温治疗对小鼠瘤体的影响

加温治疗后,实验组小鼠瘤体生长受到明显抑制,46℃热疗组10只中有7只小鼠肿瘤完全消失,50℃热疗组10只中有9只小鼠肿瘤完全消失,肉眼可见皮下残存的少量磁流体,两组共有3只小鼠肿瘤生长缓慢,生长曲线趋于平坦。各对照

组小鼠肿瘤生长呈现明显的递增趋势。治疗后第14天,46℃热疗组肿瘤生长率为 -0.64 ± 0.73 ,50℃热疗组肿瘤生长率为 -0.72 ± 0.79 ,与3个对照组比较,肿瘤生长受到明显抑制($P < 0.05$)。而3个对照组之间差异无显著性($P > 0.05$),两个热疗组之间差异亦无显著性($P > 0.05$),见表1。

表1 加温前和加温后第14天各组小鼠肿瘤的体积和生长率(均数 $\pm$ 标准差)

Table 1 Changes of tumor volume before and after hyperthermia ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	肿瘤体积/cm ³		肿瘤生长率/%
		治疗前	治疗后	
单独肿瘤组	6	1.00 $\pm$ 0.41	47.92 $\pm$ 7.13 ⁽⁴⁾⁽⁵⁾	62.68 $\pm$ 51.59 ⁽⁴⁾⁽⁵⁾
磁流体对照组	6	0.99 $\pm$ 0.66	42.89 $\pm$ 9.17 ⁽⁴⁾⁽⁵⁾	58.09 $\pm$ 32.90 ⁽⁴⁾⁽⁵⁾
磁场对照组	6	1.03 $\pm$ 0.54	43.41 $\pm$ 9.16 ⁽⁴⁾⁽⁵⁾	50.17 $\pm$ 23.48 ⁽⁴⁾⁽⁵⁾
热疗46℃组	10	1.12 $\pm$ 0.57	0.58 $\pm$ 1.20 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	-0.64 $\pm$ 0.73 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
热疗50℃组	10	1.26 $\pm$ 0.84	0.26 $\pm$ 0.6 ⁽⁹⁾⁽¹²⁾⁽³⁾	-0.72 $\pm$ 0.79 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注:1)与单独肿瘤组比较, $P < 0.05$;2)与磁流体对照组比较, $P < 0.05$;3)与磁场对照组比较, $P < 0.05$;4)与热疗46℃比较, $P < 0.05$;5)与热疗50℃比较, $P < 0.05$ 。

2.4 磁流体热疗后组织学观察

2.4.1 大体观察

加温治疗后,热疗组瘤体出现表面结痂,2~3 d出现局部坏死,坏死脱落后表面凹凸不平,两热疗组小鼠瘤体在治疗后逐渐缩小,其中17只小鼠肿瘤完全消失,而各对照组瘤体生长迅速。

2.4.2 镜下观察

热疗组瘤体在加温后即可出现大量呈凋亡形态的肿瘤细胞,表现为核固缩,染色质边聚;部分区域出现凝固性坏死的征象,表现为嗜酸性增强,正常细胞结构消失,核碎裂、溶

解。热疗后可见肿瘤血管扩张充血,管腔内见大量红细胞分布。热疗14 d肿瘤完全消失的小鼠皮下组织镜检未见肿瘤细胞,可见皮下残存磁流体,被吞噬细胞吞噬。各对照组小鼠瘤体生长旺盛,细胞核浓染分裂,可见病理性核分裂像,中心可见少量缺血坏死的组织。磁流体对照组在注射磁流体24 h可见散在的磁性纳米微粒在一定范围内分布于肿瘤细胞之间,部分肿瘤细胞和吞噬细胞吞噬了磁性纳米颗粒,将其向淋巴结输送(图3)。心、肝、脾、肺、肾等重要脏器未见磁流体残留,且无明显的异常改变(图4)。



图3 各组荷瘤小鼠病理学检查(HE染色)

Fig. 3 Pathological observation of tumor-bearing mice in different groups (HE)

注:(a),注射磁流体24 h,吞噬细胞将磁流体向淋巴结输送,至边缘窦;(b),注射磁流体24 h,吞噬细胞吞噬磁流体;(c),热疗30 min见肿瘤细胞呈凋亡样改变,同时见肿瘤血管扩张充血;(d),热疗30 min见肿瘤细胞呈凋亡样改变;(e),热疗14 d皮下无肿瘤细胞,见残存的磁性纳米颗粒;(f),为空白对照组,见肿瘤细胞生长旺盛,细胞核浓染分裂,可见病理性核分裂相,其恶性程度较高,侵入肌肉

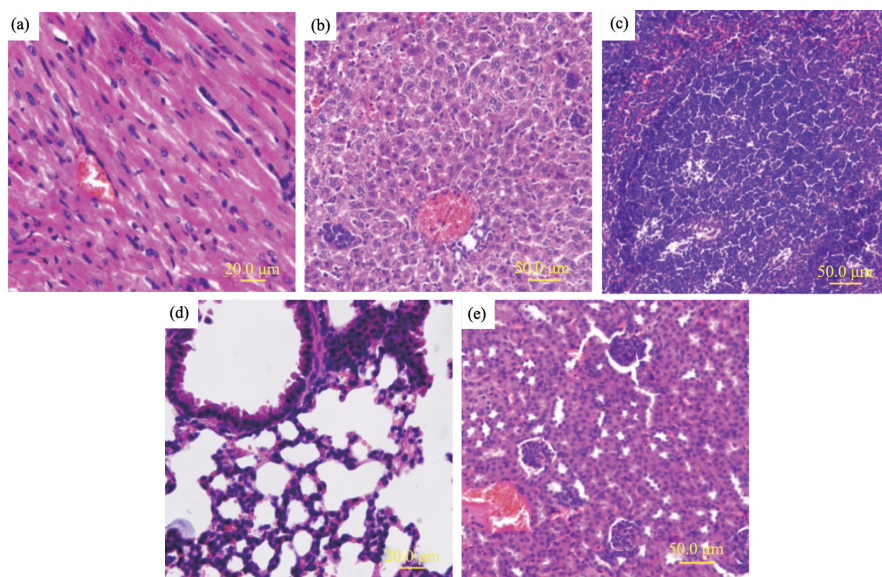


图4 重要脏器HE染色

Fig. 4 Staining of important organs (HE)

注:(a),心;(b),肝;(c),脾;(d),肺;(e),肾

2.5 磁流体热疗对小鼠生存期的影响

空白对照组、磁流体对照组和磁场对照组荷瘤小鼠分别于热疗后60余天死亡,50℃和46℃热疗组共17只小鼠生存期超过140 d。2个热疗组与3个对照组比较,生存期明显延长($P < 0.05$)。

3 讨论

胰腺癌是最常见恶性肿瘤死亡原因之一,其中位生存期仅5~7月,5年生存率仅为5.1%^[3,4]。胰腺癌目前的治疗方式主要包括手术、放射治疗、化学药物治疗、靶向治疗、热疗等,然而,各种单一的治疗方式均存在一定的缺点,胰腺癌的内科综合治疗越来越受到重视。随着医学工程物理学的迅速发展,进一步加速了临床物理治疗进度,磁感应肿瘤治疗技术属新型加温治疗范畴,具有在交变磁场下加热进入目标组织磁性介质的特性,有望克服射频加热及其他一些加温方法的各种缺点。通过直接注射热疗(direct injection hyperthermia, DIH)的方法,使磁性介质适形精确的分布于肿瘤组织中,外置交变磁场使局部快速升温,避免损伤周围正常组织,达到治疗恶性肿瘤的效果。目前,对于此项治疗肿瘤的方法世界各国的科学家都进行了不懈的努力,已应用于多种体外实验^[5,6],也应用于肝癌、乳腺癌、膀胱癌、恶性黑色素瘤、前列腺癌等动物实验^[7-9]。德国Jordan研究小组率先使磁感应热疗在神经胶质瘤和前列腺癌患者进入临床试验阶段,使这项创新治疗手段为解除人类的痛苦迈向一个新的台阶^[10-13]。

利用MPC-83建立了小鼠胰腺癌动物模型,通过调整磁流体浓度可以控制热疗温度,观察磁流体靶向热疗(50℃和46℃)治疗小鼠胰腺癌的疗效,有效抑制胰腺癌生长,延长生存期,磁性纳米微粒可长期安全的分布于皮下,重复热疗可行,选择性对肿瘤细胞具有杀伤作用而不损伤正常组织。对于胰腺癌的磁流体靶向热疗,笔者前期的研究结果显示^[2],选择磁流体靶向热疗的温度在51℃和47℃时,所有小鼠均可耐受热疗,未见明显毒副反应,热疗组小鼠生存期较对照组明显延长。本研究将前期结果进一步延伸,选择46℃温热和50℃高温两个热疗区域,分别进行细胞实验和动物实验,流式细胞仪检测46℃和50℃热疗MPC-83细胞凋亡和坏死百分比分别为46.13%和89.33%,两热疗组及与对照组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),而对于46℃和50℃的荷瘤小鼠磁流体靶向热疗,两热疗组小鼠瘤体及小鼠生存期,差异无统计学意义($P > 0.05$)。究其原因,热疗可能激发荷瘤小鼠的抗肿瘤免疫,增强免疫应答,与笔者前期研究结果类似^[14]。

组织病理学观察显示,在注射磁流体24 h,即可观察磁性纳米微粒在一定范围内分布于肿瘤细胞之间或被肿瘤细胞吞噬,热疗即刻可见肿瘤细胞呈现凋亡改变或坏死,热疗14 d可见肿瘤细胞消失,而磁性纳米微粒可长期安全的存在小鼠皮下,使重复热疗可行,热疗小鼠重要脏器未见明显异常,进一步说明磁流体靶向热疗安全有效。

4 结论

磁流体靶向热疗使得热疗温度稳定、安全性高,且治疗效果较好,是理想的胰腺癌综合治疗手段之一,为临床应用提供一定的研究基础。但本研究只观察了小鼠近期生存时间,而对于热疗后小鼠是否存在复发及远期生存观察,将在以后的实验中进一步完善。

参考文献(References)

- [1] Long J, Luo G P, Xiao Z W, et al. Cancer statistics: Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in Shanghai, China[J]. Cancer Letters, 2014, pii: S0304-3835(14)00030-5.
- [2] Wang L, Dong J, Ouyang W, et al. Anticancer effect and feasibility study of hyperthermia treatment of pancreatic cancer using magnetic nanoparticles[J]. Oncology Reports, 2012, 27(3): 719-726.
- [3] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2010, 60(5): 277-300.
- [4] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2012, 62(1): 10-29.
- [5] Parchur A K, Ansari A A, Singh B P, et al. Enhanced luminescence of CaMoO₄: Eu by core@shell formation and its hyperthermia study after hybrid formation with Fe₃O₄: Cytotoxicity assessment on human liver cancer cells and mesenchymal stem cells[J]. Integrative Biology (Cambridge), 2014, 6(1): 53-64.
- [6] Taratula O, Dani R K, Schumann C, et al. Multifunctional nanomedicine platform for concurrent delivery of chemotherapeutic drugs and mild hyperthermia to ovarian cancer cells[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 458(1): 169-180.
- [7] Oliveira T R, Stauffer P R, Lee C T, et al. Magnetic fluid hyperthermia for bladder cancer: A preclinical dosimetry study[J]. International Journal of Hyperthermia, 2013, 29(8): 835-844.
- [8] Portela A, Vasconcelos M, Fernandes M H, et al. Highly focalised thermotherapy using a ferrimagnetic cement in the treatment of a melanoma mouse model by low temperature hyperthermia[J]. International Journal of Hyperthermia, 2013, 29(2): 121-132.
- [9] Kobayashi D, Kawai N, Sato S, et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model[J]. Prostate, 2013, 73(9): 913-922.
- [10] Jordan A. First clinical experience with magnetic field hyperthermia (MFH) at the university clinic charite in Berlin[C]. 5th International Conference on the Scientific and Clinical Application for Magnetic Carriers, 2004, May 20-22, Lyon, France.
- [11] Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme[J]. Journal of Neurooncology, 2011, 103(2): 317-324.
- [12] Johannsen M, Thiesen B, Wust P, et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer[J]. International Journal of Hyperthermia, 2010, 26(8): 790-795.
- [13] van Landeghem F K, 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.
- [14] Ouyang W, Gao F, Wang L, et al. Thermoseed hyperthermia treatment of mammary orthotopic transplantation tumors in rats and impact on immune function[J]. Oncology Reports, 2010, 24(4): 973-979.

(责任编辑 吴晓丽)