

羰基铁粉介导的动脉栓塞热疗的可行性研究

郑雅婧^{1,2}, 江 薇^{1,2}, 赵凌云¹, 盛 军³, 唐劲天¹

1. 清华大学工程物理系医学物理与工程研究所; 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084
2. 北京中医药大学中药学院生物制药系, 北京 100102
3. 长春生物制品研究所, 长春 130062

摘要 为评价羰基铁粉作为动脉栓塞热疗的一种新型介质的可行性, 通过进行羰基铁粉形态学观察和粒径分布检测, 对其理化性质进行初步表征; 利用 L929 成纤维细胞进行体外细胞实验, 并进行大鼠体内毒性实验, 检查羰基铁粉的细胞毒性和生物相容性; 体外升温实验中, 将羰基铁粉和碘油的混悬液暴露于外界交变磁场, 通过设置不同的羰基铁粉含量和磁场强度, 评价羰基铁粉在外界交变磁场下的升温情况; 体内实验中, 以正常新西兰大耳白兔作为动物模型, 对其肝动脉进行经动脉栓塞热疗, 对比热疗过程中肝组织温度和体温变化情况, 并对热疗后兔肝进行病理学检查。细胞毒性研究表明, 羰基铁粉具有良好的生物相容性; 体内和体外的升温情况表明, 在外界交变磁场作用下, 羰基铁粉具有理想的升温特性。由此说明, 对于动脉栓塞热疗来说, 羰基铁粉是一种极具潜力的临床应用候选介质。

关键词 磁感应热疗; 动脉栓塞热疗; 羰基铁粉; 交变磁场

中图分类号 R318.08

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)11-0054-05

Feasibility Study of Carbonyl Iron Powder as a Novel Mediator of Arterial Embolization Hyperthermia for Liver Cancer Treatment

ZHENG Yajing^{1,2}, JIANG Wei^{1,2}, ZHAO Lingyun¹, SHANG Jun³, TANG Jingtian¹

1. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education; Institute of Medical Physics and Engineering, Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. Department of Biopharmaceuticals, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
3. Changchun Institute of Biological Products, Changchun 130062, China

Abstract This paper explores the feasibility of carbonyl iron powder to be used as a novel mediator of arterial embolization hyperthermia. Based on *in vitro* morphology study, the particle diameter distribution of the carbonyl iron powder is measured by laser light scattering with particle size analyzer, and the morphology of these particles is observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). Mouse fibroblast L-929 cells are cultured in the medium of extraction of carbonyl iron powder. The cytotoxicity is graded by the generally accepted standard. In *in vitro* heating experiment, different doses of carbonyl iron powder/Lipiodol suspension are heated in an alternating magnetic field. The influences of the doses of suspension and the magnetic field are observed. As animal models, the normal New Zealand half lop rabbits are treated with arterial embolization hyperthermia by using the suspension. Cytotoxicity study demonstrates that Carbonyl Iron Powder (CIP) shows good biocompatibility. The heating profiles of *in vitro* and *in vivo* experiments reveal that CIP possesses the ideal property with inductive heating characteristics under the alternative magnetic field and it does not affect the normal temperature of animal models. These findings suggest that CIP is a very promising mediator candidate of arterial embolization hyperthermia for clinical applications.

Keywords magnetic mediated hyperthermia; arterial embolization hyperthermia; carbonyl iron powder; alternative magnetic field

收稿日期: 2010-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30973439)

作者简介: 郑雅婧, 硕士研究生, 研究方向为生物医学工程, 电子信箱: zhengyajing008@163.com; 唐劲天 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S0900800253M), 教授, 研究方向为肿瘤学, 电子信箱: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn

0 引言

目前正在临床试验阶段的磁感应热疗 (Magnetic Inductive Hyperthermia, MIH) 是癌症治疗的一种新方法^[1-3]。在外界交变磁场 (Alternative Magnetic Field, AMF) 作用下, 分布在肿瘤组织中具有生物相容性的超顺磁性介质被加热, 使得肿瘤组织温度升高, 从而实现肿瘤的局部热疗。而应用于肝肿瘤治疗的 MIH, 根据不同的介质给予途径, 可以分为直接注射热疗 (Direct Injection Hyperthermia, DIH) 和动脉栓塞热疗 (Arterial Embolization Hyperthermia, AEH)^[4]。肝肿瘤所有的血供都来源于肝动脉系统, 所以将治疗介质灌注进入肝动脉, 能够对肝肿瘤起到有效的靶向治疗作用。Moroz 等^[5]在小型动物肝肿瘤模型中进行体内实验, 评价 AEH 和 DIH 对肿瘤的疗效研究发现, AEH 相较于 DIH 能更有效地提高温度。可能是因经动脉栓塞 (Transcatheter Arterial Embolization, TAE) 能使瘤组织中的粒子分布更广泛, 从而达到更完全的肿瘤治疗^[6]。

超顺磁性介质或作用剂在 AEH 中至关重要, 特别是对于它们的安全性及加热性质的考虑。此外, Pardoe 等^[7]认为, AEH 的介质颗粒应该选择粒径在微米级的微球, 这样才能确保它们阻塞肿瘤的毛细血管床, 而不会通过毛细血管进入静脉循环。但是, MIH 临床试验所用的超顺磁性介质尺寸通常是纳米级或通过高分子材料将纳米级的磁颗粒包裹成微米级。目前关于开发一种用于 AEH 的理想微米级介质的研究还很少。美国 ISP 公司的羰基铁粉 (Carbonyl Iron Powder, CIP) 已经正式被美国药品监督管理局 (FDA) 认可, 并由于其低毒性和优良的生物利用度, 而被直接添加到食品中作为铁元素的补给。它具有很高的铁含量和非常好的抗氧化性^[8], 且 CIP 粒子的平均直径为微米级, 符合作为 AEH 的栓塞介质。因此, 本研究开展对 CIP 细胞毒性的研究以及其在 AMF 作用下的升温情况测定^[9], 以期开发一种合适的 AEH 新型介质提供可行性分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CIP 由美国 ISP 制药公司提供; 碘化油购自法国加柏公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CIP 的性质表征

用扫描电镜 (SEM) 对 CIP 粒子进行形态学观察。在 25℃ 用激光粒度分析仪 (美国 Brookhaven 仪器公司) 对 CIP 进行检测, 确定 CIP 粒子的粒径分布。

1.2.2 CIP 的细胞毒性和生物相容性评价

1) CIP 浸提液制备。将已灭菌的 CIP 样品加入 RPMI-1640 培养基中 (混合比例为 10mg/mL), 37℃ 浸提 24h。实验溶液分为 4 组: 10mg/mL-100% CIP 浸提液, 10mg/mL-50% CIP 浸提液, 单纯培养基 (阴性对照组), 0.02% 苯酚溶液 (阳性对照组)。

2) MTT 法检测细胞毒性。根据医疗器械生物学评价标准 GB/T 16886.5—1997 规定, L-929 成纤维细胞用于评价细胞毒性试验。通过 MTT [溴化 3-(4,5-二甲基噁唑-2)-2,5-二甲基四氮唑溴盐, 四唑盐] 比色法对实验组和阴性对照组细胞活性做比较, 以检测细胞生长和存活情况。同时通过实验组和阴性对照组平均 OD 值的比值计算出各组细胞相对增殖率 (Relative Growth Rate, RGR), 反映细胞的增殖情况和活性状况^[10], 并转换成 6 级细胞毒性以评定 CIP 的毒性。

细胞毒性被划分为 0~5 级共 6 个等级^[11], 当 RGR ≥ 100 时, 细胞毒级定义为 0 级; 75~99 时为 1 级; 50~74 时为 2 级; 25~49 时为 3 级; 1~24 时为 4 级; 0 时为 5 级。其中 0 或 1 级为无细胞毒性。

3) 大鼠体内毒性评价。Wistar 雄鼠 (体重 200g 左右) 15 只, 随机分 6 只作为对照组, 尾静脉注射 2.5mL/kg 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 其余 9 只作为实验组, 尾静脉注射相同量的 30mg/mL 羰基铁粉/PBS 混悬液。注射后第 3 天, 大鼠取 2mL 尾静脉血不加抗凝剂, 3000r/min, 离心 10min 后取 1mL 血清做血液生化指标测试; 另取 2 滴血抗凝测试白血球、红血球数和血红蛋白含量。取血后处死大鼠, 对肝、肾组织进行病理学检查。

1.2.3 CIP/碘油混悬液在 AMF 下体外升温研究

1) CIP/碘油混悬液制备。将 30、40、50、60、70mg 的 CIP 分别加入 1mL 碘油中, 超声混合 5min, 再用涡流搅拌器搅拌 1min, 制成均匀的 CIP/碘油混悬液。混悬液为随后的 AMF 下体外升温实验和肝动脉栓塞实验备用。

2) CIP/碘油混悬液的体外升温。将不同浓度 CIP/碘油混悬液置于 AMF 下加热 20min, 设置磁感应强度为 0.110T, 在 37℃ 时记录不同浓度混悬液的升温状况; 将浓度为 60mg/mL 的 CIP/碘化油混悬液置于 AMF 下, 37℃ 时分别检测到混悬液在磁场强度为 0.050、0.080、0.110T 下的升温状况。

1.2.4 CIP/碘油混悬液肝动脉栓塞后体内升温研究

1) 肝动脉栓塞。采用每只重 2~3kg 的 16~20 周大的新西兰大白兔进行实验。动脉灌注程序模拟人的灌注过程实施。栓塞之前, 对每只实验兔注射 2% 戊巴比妥钠进行全身麻醉, 再切开皮肤, 钝性分离肌肉, 暴露出实验兔的左或右股动脉。

将一个 18G 塑料套管针插入股动脉, 针芯拔出, 套管留下, 再插入 2.3F 的细导管。在数字剪影血管造影 (Digital Subtraction Angiography, DSA) 的引导下, 导管超选择插入肝动脉。将涡流搅拌后的 60mg/mL 的 CIP/碘油混悬液 1mL 缓慢推入导管中, 同时注意防止混悬液流出动脉。整个灌注过程要经 DSA 证实。完成灌注后, 移除导管, 股动脉结扎, 缝合伤口, 结束整个手术过程。术后要密切关注实验兔的行为、食欲以及健康状况征兆 (特别是呼吸速率)。

2) 温度测量。应用热电偶温度传感器 (IT-18 型, 铜-康铜, 美国 Physitemp 公司) 在 AEH 过程中进行温度测量。栓塞 8h 后用戊巴比妥钠把实验兔麻醉, 在剑突下腹部正中切开 2cm, 充分暴露肝脏。将两个或三个热电偶测温探头插入栓塞

的肝脏组织,一个插入直肠,用以测量温度。再缝合腹腔,只留出连接探头的光纤穿过腹腔壁,这样可以减少 AEH 过程中的热量散失。光纤另一端连接一个四通道毫伏计(型号 XS01A-4,北京昆仑天辰仪表科技有限公司)。计算机每 12s 收集 1 次数据。

3) 加热的方法。每只栓塞的实验兔,在其麻醉中,将其置于磁感应加热设备形成的 AMF 下。设置磁感应强度为 0.110T, 频率 300kHz, 加热达到温度期望值并保持 20min 左右。

4) 病理组织学检查。热疗结束后将实验组兔全部处死,立即取肝组织于 10% 甲醛中溶液浸泡,石蜡包埋,切片,普鲁士蓝染色,行病理组织学检查。

2 结果和讨论

2.1 CIP 的粒径分布和形态学检查

CIP 是灰色粉末,在扫描电镜 SEM 下观察,呈良好的球形(图 1)。CIP 的粒径分布范围较窄,平均粒径约 $5\mu\text{m}$,符合 AEH 介质的粒径要求。

2.2 CIP 细胞毒性和生物相容性评价

2.2.1 CIP 体外细胞毒性评价

表 1 为 L-929 细胞培养 2、7d 后细胞相对增值率 RGR 和 CIP 的细胞毒性级别。CIP 粉末的细胞毒性级别一直保持 0 级和 1 级,说明其没有细胞毒性。而阳性对照组表现出明显的细胞毒性。表明 CIP 具有良好的生物相容性,利于后续研究。

2.2.2 CIP 体内毒性评价

表 2 给出了实验组和对照组血液生化指标的结果比较。实验组大鼠的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肌酐

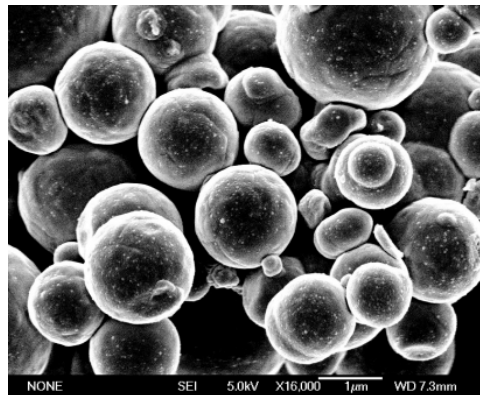


图 1 扫描电镜下的羰基铁粉粒子

Fig. 1 SEM image of CIP particles

表 1 体外培养 2、7d 的细胞增殖度和细胞毒级

Table 1 RGR and cytotoxicity grade after 2 and 7 days culture *in vitro*

组别	2d		7d	
	RGR/%	细胞毒级	RGR/%	细胞毒级
10mg/mL-100%浸提液	81.88	1	90.25	1
10mg/mL-50%浸提液	100.80	0	102.44	0
阴性对照组	100.00	0	100.00	0
阳性对照组	0	5	0	5

(CREA)、尿素(UREA)、尿酸(UA)含量与对照组无统计学差异($P>0.05$)。表明羰基铁粉在大鼠体内没有引起血液生化指标值的改变,对血液和大鼠的肝肾功能均无明显影响。

表 3 给出了实验组和对照组白血球 (WBC)、红血球数

表 2 血液生化指标结果比较

Table 2 Comparison of blood biochemical indicator results

分组	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	UA/(μmol·L ⁻¹)
实验组 1	93	208	37	7.31	32
实验组 2	79	199	32	6.68	62
实验组 3	71	173	31	5.39	74
实验组 4	89	177	35	6.56	77
实验组 5	90	210	29	7.02	58
实验组 6	78	224	26	6.17	51
实验组 7	82	218	25	5.99	69
实验组 8	70	227	28	6.33	73
实验组 9	77	230	32	6.26	65
实验组均值	81±8.21	207.33±20.82	30.56±3.97	6.41±0.57	62.33±14.07
对照组 1	77	254	26	7.74	74
对照组 2	86	220	33	6.25	79
对照组 3	92	226	28	6.89	62
对照组 4	106	221	29	5.98	80
对照组 5	73	192	37	6.93	59
对照组 6	74	181	30	6.17	53
对照组均值	84.67±12.80	215.67±26.02	30.5±3.94	6.66±0.66	67.83±11.34
P 值	0.5082	0.5032	0.9792	0.4503	0.4396

表 3 白血球、红血球数和血红蛋白含量结果比较
Table 3 Comparisons of WBC, RBC and HGB

分组	WBC/(10^9L^{-1})	RBC/($10^{12}L^{-1}$)	HGB/($g\cdot L^{-1}$)
实验组 1	3.8	5.42	119
实验组 2	11.2	4.95	110
实验组 3	6.7	5.65	123
实验组 4	10.2	5.27	112
实验组 5	9.8	6.25	121
实验组 6	8.9	6.45	131
实验组 7	13.9	6.33	121
实验组 8	9.7	5.96	117
实验组 9	12.3	5.13	106
实验组均值	10.72 ± 2.34	5.72 ± 0.56	117.78 ± 7.56
对照组 1	3.6	5.10	115
对照组 2	6.4	5.41	112
对照组 3	8.8	5.27	119
对照组 4	7.2	4.69	104
对照组 5	18.2	5.76	118
对照组 6	9.6	5.92	121
对照组均值	8.97 ± 4.98	5.36 ± 0.45	114.83 ± 6.18
P 值	0.3712	0.2170	0.4431

(RBC)和血红蛋白(HGB)含量的结果比较。实验组大鼠的白细胞数、红细胞数及血红蛋白含量与对照组无统计学差异($P>0.05$)。表明羰基铁粉在大鼠体内未引起白细胞数、红细胞数及血红蛋白含量改变,且未出现免疫反应。

对比实验组与对照组的肝、肾组织病理切片,未发现炎症反应或组织损伤等现象,两组之间无明显差异(图 2、图 3)。

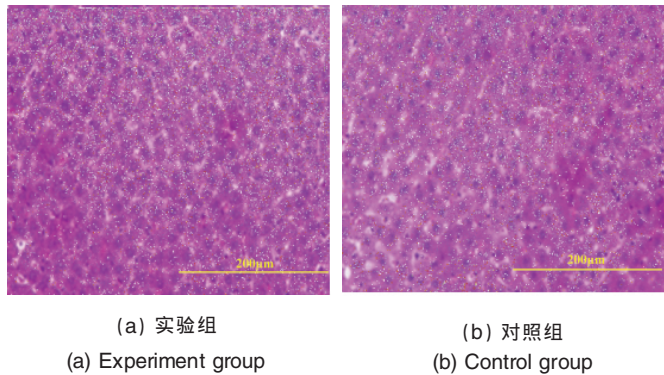


图 2 大鼠肝组织病理切片
Fig. 2 Pathological section of Wistar rats' liver tissues

2.3 CIP/碘油混悬液的体外升温研究

2.3.1 粒子含量的影响

随时间推移,各混悬液温度逐渐升高后趋于一个稳定的平衡值。图 4 为外界磁场 AMF 磁感应强度为 0.110T 下,不同 CIP 含量的 CIP/碘油混悬液的升温情况。它说明 CIP/碘油混悬液平衡温度取决于 CIP 的含量。混悬液中 CIP 的含量越高,平衡温度越高。

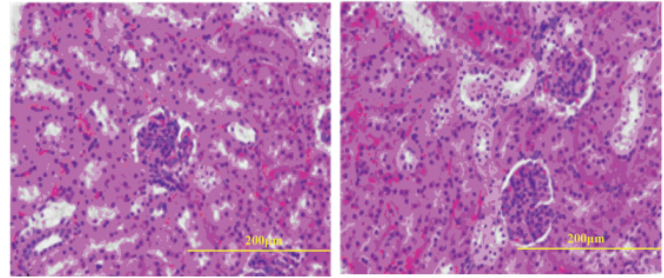


图 3 大鼠肾组织病理切片
Fig. 3 Pathological section of Wistar rats' kidney tissues

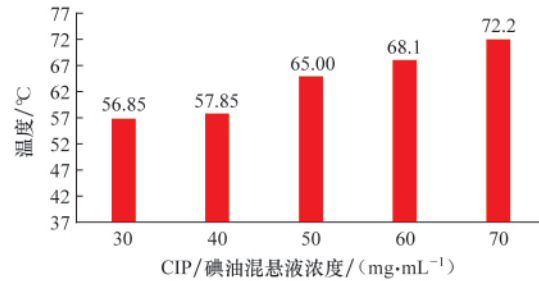


图 4 不同浓度 CIP/碘油混悬液在 AMF 下的最高温度
Fig. 4 Temperature maximum of CIP/Lipiodol suspensions with different particle contents

2.3.2 AMF 磁感应强度的影响

AMF 的磁感应强度是升温过程中的另一个决定性因素。在不同磁感应强度下,相同浓度(60mg/mL)的 CIP/碘油混悬液随时间的推移,温度逐渐升高,并最后趋于一个稳定值。如图 5 所示,AMF 的磁感应强度越大,60mg/mL 的 CIP/碘油混悬液温度上升值越大。说明随着磁感应强度的升高,CIP 粒子形成了更多的能量。

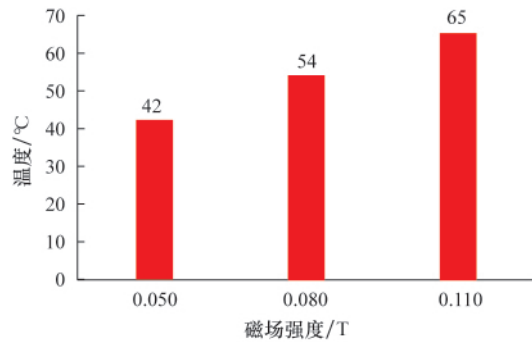


图 5 不同磁感应强度下 60mg/mL CIP/碘油混悬液的最高温度

Fig. 5 Temperature maximum of CIP/Lipiodol suspensions in different field strength

以上结果表明,AEH 介质的升温情况主要取决于栓塞混悬液中粒子的浓度以及 AMF 的磁场参数。因此,通过调节 CIP/碘油混悬液中合适的介质粒子浓度或 AMF 的磁场参数,

亦或同时调整两个因素,能够方便地控制肿瘤动脉栓塞热疗过程中的温度。

2.4 肝动脉栓塞热疗的体内研究

在动脉插管过程和 CIP/碘油混悬液灌注以及热疗过程中都没有出现实验兔的死亡。图 6 显示了在 DSA 证实下,正常肝组织 CIP/碘油混悬液的动脉栓塞情况。

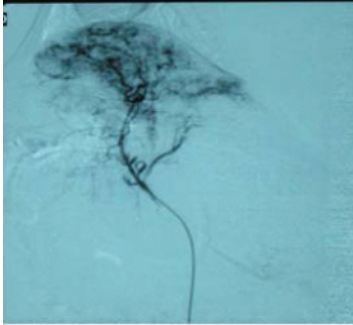


图 6 经动脉栓塞后的正常肝组织

Fig. 6 Normal liver tissue after transcatheter arterial embolization of CIP/Lipiodol

经动脉栓塞的实验兔进行热疗过程中,肝组织温度在 4min 内迅速升高并保持在 50℃,于此同时直肠温度并没有明显升高,整个加热过程均维持在 27℃左右,即整个 AEH 过程中体温均未见升高。说明 CIP 具有良好的升温诱导特性,且不影响正常体温,有望成为 AEH 临床应用的新型介质。

热疗后肝脏病理切片经普鲁士蓝染色观察可见,CIP 在肝动脉血导管内聚集,并且在肝组织内呈广泛但比较特殊的分布:部分铁粉进入肝窦、肝索、Disse 腔,而在另一侧则未发现铁粉分布(图 7)。

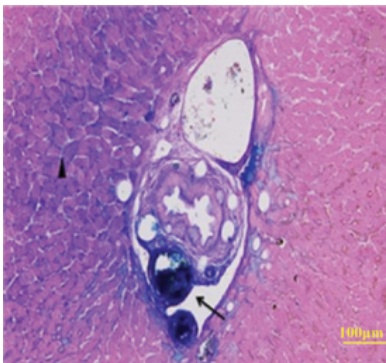


图 7 热疗后 CIP 在肝组织中的分布

Fig. 7 Distribution of CIP particles in liver tissue after AEH

3 结论

分析了 CIP 作为 AEH 一种新型、安全、有效介质的可行性。对 CIP 进行理化性质表征的结果表明,CIP 粒子是微米级的球体,并且粒径分布较窄,符合栓塞介质最好在 1~10μm 的粒径范围要求^[12]。体外的细胞毒试验及大鼠体内毒性试验结果说明 CIP 具有优良的生物相容性。体内和体外的升温实验表明,CIP 具有理想的升温诱导性质,且不会影响正常体温,

此为癌症的热疗过程提供了温度保证。因此,CIP 是 AEH 介质的理想候选,作为 AEH 介质它是安全、可行的,但还需在动物肿瘤模型中对其治疗恶性肿瘤的疗效进行进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Landeghem F, Maier-Hauff K, Jordan A, *et al.* Post-mortem studies in glioblastoma patients with thermotherapy using magnetic nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 52-57.
- [2] Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B, *et al.* Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging and three-dimensional temperature distribution [J]. *European Urology*, 2007, 52: 1653-1662.
- [3] Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K, *et al.* Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial [J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2007, 23: 315-323.
- [4] Moroz P, Pardoe H, Jones S K, *et al.* Arterial embolization hyperthermia: Hepatic iron particle distribution and its potential determination by magnetic resonance imaging[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2002, 47: 1591-1602.
- [5] Moroz P, Jones S K, Gray B N, *et al.* Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model[J]. *Journal of Surgical Oncology*, 2002, 80: 149-156.
- [6] Moroz P, Jones S K, Gray B N. The effect tumour size on ferromagnetic embolization hyperthermia in a rabbit liver tumor model [J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2002, 18(2): 129-140.
- [7] Pardoe H, Clark P R, Pierre T G, *et al.* A magnetic resonance imaging based method for measurement of tissue iron concentration in liver arterially embolized with ferromagnetic particles designed for magnetic hyperthermia treatment of tumors[J]. *Magnetic Resonance Imaging*, 2003, 21(5): 483-488.
- [8] 羰基铁粉的基本用途[J]. 中国粉体工业, 2007, 3: 40-41
Basic use of carbonyl iron powder [J]. *Chinese Powder Industry*, 2007, 3: 40-41.
- [9] 江薇, 赵凌云, 唐劲天, 等. 动脉栓塞热疗用羰基铁粉磁热效应和细胞毒性研究[J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9(6): 487-490.
Jiang Wei, Zhao Lingyun, Tang Jingtian, *et al.* *Chin J Min Inv Surg*, June, 2009, 9(6): 487-490.
- [10] 尚再艳. 贵金属牙科的铸造合金的研制和性能评价[D]. 西安: 西安建筑科技大学冶金工程学院, 2001.
Shang Zaiyan. Develop and evaluation of mechanical properties of noble alloy in dentistry [D]. Xi'an: College of Metallurgical Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, 2001.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家标准 GB/T16886.10—2005 医疗器械生物学评价第 5 部分: 体外细胞毒性试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Chinese national standard GB/T16886.10—2005 the fifth part of medical instruments biological evaluation: Cytotoxicity test *in vitro* [S]. Beijing: Standards Press of China, 2005.
- [12] Jones S K, Winter J G. Experimental examination of a targeted hyperthermia system using inductive heated ferromagnetic microspheres in rabbit kidney[J]. *Institute of Physics Publishing*, 2001, 40: 385-398.

(责任编辑 吴晓丽)