

磁性四氧化三铁纳米粒在磁共振/光热双模式成像中的应用

黄丹华, 戚雪勇, 戈延茹*, 沈松

(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 本文利用水热法制备了水分散性的磁性四氧化三铁 (magnetic iron oxide, Fe_3O_4) 纳米粒, 采用透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM)、振动样品磁强计 (vibrating sample magnetometer, VSM) 等手段对其进行表征, 进而对其体外磁共振响应及光热转换特性进行了考察。此外, 研究了 Fe_3O_4 纳米粒的细胞摄取、细胞毒性及体内分布情况, 并分析了其在肿瘤部位磁共振/光热双模式成像中的应用效果。结果表明, 所制备的磁性纳米粒为大小均一的球型, 粒径约为 125 nm。该纳米粒表现出超顺磁性及良好的磁共振响应和光热转换性能。细胞实验结果显示, 该磁性纳米粒能够被肿瘤细胞摄取, 同时具有较好的生物相容性。小鼠尾静脉注射后, 该纳米粒能够靶向聚集于肿瘤部位, 并实现该部位磁共振/光热双模式成像。以上结果表明, Fe_3O_4 纳米粒具有潜在的多模式生物成像应用前景, 可能在肿瘤的诊断中发挥重要作用。

关键词: 磁性四氧化三铁纳米粒; 磁共振成像; 光热成像; 双模式成像

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0481-07

Application of magnetic iron oxide nanoparticles in magnetic resonance / photothermal dual-modal imaging

HUANG Dan-hua, QI Xue-yong, GE Yan-ru*, SHEN Song

(College of Pharmaceutical Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In this study, water-dispersible magnetic iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles were synthesized with solvothermal method. The nanoparticles were characterized with a transmission electron microscopy (TEM) and vibrating sample magnetometer (VSM). The *in vitro* magnetic resonance response and photothermal conversion characteristics of the nanoparticles were evaluated. In addition, the cellular uptake, cytotoxicity and biodistribution were studied. Finally, magnetic resonance/photothermal dual-modal imaging effect of the as-synthesized Fe_3O_4 nanoparticles was investigated in the tumor-bearing mice. The results showed that the obtained magnetic nanoparticles were uniform with a mean diameter of about 125 nm. Moreover, the superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles showed remarkable magnetic resonance response and photothermal conversion properties. The results of cellular experiments showed that the cell viability was nearly 85% even the concentration of the nanoparticles was up to $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, an indicator of good biocompatibility. In addition, the nanoparticles could be taken up by the tumor cells and then located in the cytoplasm. After intravenous injection, the nanoparticles were tended to enrich in the tumor over time, which is helpful in achieving dual-modal magnetic resonance/photothermal imaging. In sum, the obtained Fe_3O_4 nanoparticles showed great potential to be applied for multi-modal bio-imaging which may play an important role in the diagnosis of tumors.

Key words: magnetic iron oxide nanoparticle; magnetic resonance imaging; photothermal imaging; dual-modal imaging

收稿日期: 2016-11-21; 修回日期: 2016-12-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503017); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20150534).

*通讯作者 Tel: 86-511-85038170, Fax: 86-511-85038451-806, E-mail: geyanru@ujs.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1118

肿瘤的早期诊断便于人们及早地发现肿瘤,对肿瘤的治疗具有极其重要的意义。在众多的肿瘤诊断方法中,磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 不仅具有较高的空间分辨率,还能够提供高质量的软组织任意断面 3D 成像信息^[1,2],现已成为一种临床常见的肿瘤诊断成像技术。根据作用机制的不同,常见的磁共振成像造影剂可以分为两大类:顺磁性造影剂和超顺磁性造影剂。目前,基于钆 (Gd) 的螯合物是临床上常用的顺磁性造影剂^[3],但该类造影剂在使用时具有明显不足之处,主要体现为体内滞留时间短、分布无特异性、毒性较大且难以进入病变细胞等^[4,5]。作为一种新型的造影剂,超顺磁性氧化铁很大程度上弥补了上述不足,其进入体内后,主要集中在网状内皮细胞丰富的肝、脾和骨髓等组织和器官^[6],从而提高该部位与周围组织的 MRI 成像对比度。

在众多的氧化铁纳米材料中,Fe₃O₄ 纳米粒由于其易于制备、价格低廉且尺寸可控等特点,已引起了研究者的极大兴趣。其独特的理化性质,使其在细胞分离^[7,8]、靶向药物传递^[9,10]、肿瘤热疗^[11]和磁共振成像^[12,13]等生物应用中发挥出巨大潜能。作为磁共振成像造影剂,Fe₃O₄ 纳米粒能够有效缩短氢质子的横向弛豫时间 (T_2),削弱 T_2 信号强度,使靶组织或器官图像变暗,从而在磁共振成像中提供高质量的成像对比图。此外,Fe₃O₄ 纳米粒不仅在生物环境中显示出长期的稳定性,还在细胞毒性和溶血实验中展现出较低的毒性和良好的生物相容性^[14-17]。这些优点使得 Fe₃O₄ 纳米粒成为磁共振成像中最具有发展前景的造影剂之一。

光热成像 (photothermal imaging) 是一种非破坏性的成像技术,因其信号响应主要由局部温度变化引起,使得光热成像具有较高的灵敏度和较低的背景噪声^[18]。光热成像中光热剂的使用,可以改变靶部位与周围环境的温度差,从而提高成像对比度。最新研究发现,Fe₃O₄ 纳米粒可以作为一种新型的、靶向性的和低毒的光热剂,它在近红外光照射下,能将吸收的光能转换为热能,从而实现肿瘤部位的光热成像^[19,20]。本文制备了亲水性 Fe₃O₄ 纳米粒,对其形貌及磁性进行了表征,考察了 Fe₃O₄ 纳米粒的细胞毒性、细胞摄取及体内分布,并通过体内外实验研究了其在磁共振及光热双模式成像中的应用。

材料与方法

试剂 六水合三氯化铁 [iron (III) chloride hexahydrate, FeCl₃·6H₂O]、乙二醇 (ethylene glycol, EG)、三

水合醋酸钠 (sodium acetate trihydrate, NaAc·3H₂O)、柠檬酸三钠、无水乙醇 (国药化学试剂有限公司);盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, DOX, 北京华联博科技术有限公司);吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG, 百灵威科技有限公司);四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazoyl tetrazolium, MTT)、Hoechst 33342 染料 (Sigma-Aldrich 公司);LysoGreen 染料 (江苏凯基生物技术股份有限公司);人乳腺癌 MCF-7 细胞、鼠肉瘤 S180 细胞 (中国科学院上海生化与细胞研究所);Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 细胞培养基 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司);胚胎牛血清 (杭州四季青生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯,所有实验用水均为去离子超纯水。

仪器 紫外可见分光光度计 (TU-1800PC, 北京普析通用仪器有限公司);透射电子显微镜 (Tecna112, 荷兰 Philips 公司);振动样品磁强计 (VSM-7410, 美国 LakeShore 公司);可调 808 nm 半导体激光器 (LDD 808-2000G3, 西安赫胥尔镭得激光科技有限公司);红外热成像仪 [testo 875-1i, 德国仪器国际贸易 (上海) 有限公司];磁共振成像仪 (Skyra 3.0 T, 德国 Siemens 公司);二氧化碳培养箱 (MCO-18AC, 松下健康医疗器械株式会社);酶标仪 (Spectra max 190, 美国 MD 公司);激光共聚焦显微镜 (TCS SP5 II, 德国 Leica 公司);小动物活体成像仪 (Maesto, 美国 Cri 公司)。

实验动物 清洁级 ICR 雄性小鼠 (4~5 周, 20±2 g) 购于江苏大学实验动物中心,合格证号: SCXK (苏) 2013-0011。其使用符合“实验动物的护理和使用指南”所规定的条例。

水分散性 Fe₃O₄ 纳米粒的制备 采用水热法制备水分散性 Fe₃O₄ 纳米粒^[21]。制备方法如下:精密称取 FeCl₃·6H₂O 0.473 g、柠檬酸三钠 0.40 g 溶于 70 mL EG, 在搅拌下加入 NaAc·3H₂O 3.854 g, 强烈搅拌 30 min, 待完全溶解后移入 100 mL 聚四氟乙烯高压反应釜中, 密封反应釜于 200 °C 反应 12 h。自然冷却至室温, 所得黑色产物用无水乙醇和去离子水洗涤若干次 (磁性分离), 最后将样品分散于去离子水中保存备用。

荧光标记的 Fe₃O₄ 纳米粒的制备 分别采用 DOX 及 ICG 标记 Fe₃O₄ 纳米粒。Fe₃O₄-DOX 制备方法如下: 将 DOX (1 mg·mL⁻¹) 1 mL 加入到 2 mL Fe₃O₄ (2 mg·mL⁻¹) 水溶液中搅拌过夜。离心除去过量的 DOX, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤至上清液无色。合并上清并定容,

采用紫外分光光度计测其在 480 nm 波长处的吸光度, 计算其载药量。样品再分散于 4 °C PBS 溶液中备用。 Fe_3O_4 -ICG 的制备方法与 Fe_3O_4 -DOX 相似, 即将等体积的 ICG ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 Fe_3O_4 ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 水溶液混合搅拌过夜。离心洗涤除去未吸附的 ICG, 并测定其上清液在 780 nm 波长处的吸光度以计算载药量, 最后保存在 4 °C PBS 溶液中备用。

Fe_3O_4 纳米粒的表征 采用 TEM 观察 Fe_3O_4 纳米粒的形貌。取已制备适宜浓度的样品, 超声 5 min 后, 用滴管吸取少量溶液滴加到 TEM 专用的镀碳支持膜上, 干燥后置于 TEM 仪器下观察。采用 NanoMeasurer 1.2 软件随机在 TEM 图上选取 150 个粒子统计后得纳米粒的粒径分布。采用 VSM 测定样品干燥粉末在 $-10\sim 10 \text{ kOe}$ 的磁滞回线。此外, 在样品溶液的侧壁放置一块强磁铁, 观察磁铁对样品的吸附特性。

体外磁共振成像 将 Fe_3O_4 纳米粒配制成浓度为 $0\sim 0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水溶液, 整齐排列在试管架上。采用磁共振成像仪获得 T_2 加权的磁共振图像, 并记录 T_2 值。参数设置: 重复时间 (TR)=2000 ms, 视野 (FOV)=200 mm, 回波时间 (TE)=40 ms。以 Fe 离子浓度为横坐标, $1/T_2$ 值为纵坐标, 绘制线性图。

体外光热效果 将 Fe_3O_4 纳米粒配置成质量浓度为 $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的水溶液, 取 0.5 mL 于离心管中, 用 808 nm 近红外激光 ($2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 照射 8 min, 每隔 2 min 用红外热像仪获取样品溶液的光热成像图片。此外, 为了研究光热效果与 Fe_3O_4 纳米粒浓度的关系, 配制了一系列不同质量浓度 (30、60、125 及 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 Fe_3O_4 水溶液, 在同样的实验条件下, 采用电热偶每隔 1 min 测定并记录温度, 绘制升温曲线。

细胞摄取 取对数生长期的 MCF-7 细胞, 用胰蛋白酶消化后制成细胞悬浮液, 按照每孔 5×10^4 个细胞接种于内含盖玻片的 6 孔板中, 然后置于 37 °C、含 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。待 24 h 细胞贴壁后, 分别用 1 mL 含 DOX 或 Fe_3O_4 -DOX 的新鲜培养液替换原培养液, 质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (以 DOX 计, Fe_3O_4 对 DOX 的平均载药量为 5.54%)。继续培养 0.5 或 1 h 后吸出培养液, 并用 PBS 洗涤 3 遍。先后用 LysoGreen ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 30 min) 和 Hoechst 33342 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 15 min) 染色。PBS 洗涤 3 遍后, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤后取出盖玻片用树脂封片, 最后置于激光共聚焦显微镜下观察。

细胞毒性评价 采用 MTT 法考察 Fe_3O_4 纳米粒的细胞毒性。取对数生长期的 MCF-7 细胞, 按照每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 然后置于 37 °C、

含 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。24 h 后, 用 $100 \mu\text{L}$ 含不同质量浓度 (10、20、50、100、200、500 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Fe_3O_4 纳米粒的新鲜培养液替换原培养液, 继续培养 24 h。再次吸出培养液, 并用 PBS 洗涤 3 遍, 之后每孔各加入 MTT ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) $100 \mu\text{L}$ 培养 4 h 后移去。每孔加入二甲亚砜 $150 \mu\text{L}$, 震荡 10 min 后, 采用酶标仪测定每孔在 570 nm 处吸光度值。每个浓度设置 6 个复孔, 实验重复 3 次。

荷瘤小鼠体内组织分布研究 将对数生长期的 S180 细胞用胰蛋白酶消化后制成细胞悬浮液 (每毫升 2.5×10^6 个), 取 0.5 mL 腹腔注射入小鼠体内, 等待数天后腹水形成。吸出腹水, 无菌 PBS 稀释 3 倍后, 取 $100 \mu\text{L}$ 皮下注射入小鼠的腋窝, 饲养 1 周后 S180 荷瘤小鼠模型建成。将荷瘤小鼠随机分成 2 组, 分别尾静脉注射游离 ICG 或 Fe_3O_4 -ICG, 给药剂量为 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (浓度以 ICG 计, Fe_3O_4 对 ICG 的平均载药量为 6.81%)。分别在注射 6、12 和 24 h 处死小鼠, 取出心、肝、脾、肺、肾和肿瘤等组织, PBS 洗涤后用小动物活体成像系统拍照并测定其荧光强度。

体内磁共振成像及光热成像 荷瘤小鼠随机分成 2 组, 分别尾静脉注射 $200 \mu\text{L}$ 生理盐水或 Fe_3O_4 溶液 ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。将适宜大小的纽扣磁铁固定在肿瘤部位, 体内成像研究在给药 24 h 后进行。将小鼠麻醉后, 采用配备有小动物成像线圈的 3.0 T 医用磁共振扫描仪对小鼠进行磁共振成像, 并记录肿瘤部位 T_2 信号值。对于近红外光热成像, 则将小鼠麻醉后, 采用 808 nm 激光 ($2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 照射 3 min, 在此过程中用红外热像仪对小鼠进行成像。

结果与讨论

1 Fe_3O_4 纳米粒的表征

利用 TEM 对所制备的 Fe_3O_4 纳米粒的结构和形貌特征进行表征。由图 1A 可以看出, 水溶性 Fe_3O_4 纳米粒外观呈球形, 具有良好的均一性和分散性。NanoMeasurer1.2 软件统计得到的粒径分布结果如图 1B 所示, 其平均粒径约为 125 nm。 Fe_3O_4 纳米粒在 $-10\sim 10 \text{ kOe}$ 磁场强度内的磁化曲线如图 1C 所示, 从图中可以看出, 该 Fe_3O_4 纳米粒具有较高的饱和磁化强度, 为 $70.30 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。其剩磁和矫顽力都极低, 曲线几乎过原点, 说明该磁性纳米粒在室温下表现出超顺磁性, 这是因为本实验水热法合成的磁性纳米粒是由许多 $5\sim 10 \text{ nm}$ 的初级磁纳米晶体组成的^[21]。此外, Fe_3O_4 纳米粒在无外加磁场时, 能够稳定地分散于水中, 当在溶液瓶旁侧立一块强磁铁后, 可以观察

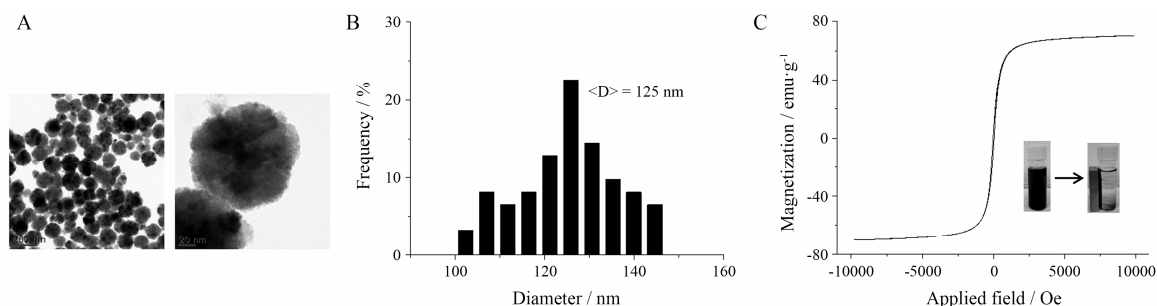


Figure 1 Characterization of the as-synthesized Fe₃O₄ nanoparticles. TEM images (A) and size distribution (B) of Fe₃O₄ nanoparticles, the average size was obtained by measuring about 150 particles randomly selected from the TEM images. (C) Normalized field-dependent magnetization curves at room temperature for the Fe₃O₄ nanoparticles. Inset: photographs of the nanoparticles suspension without or with a magnet

到粒子能够快速地被强磁铁吸附在瓶壁有磁场一侧, 如图 1C 插图所示, 说明该 Fe₃O₄ 纳米粒具有良好的磁性。

2 体外磁共振响应

通过体外磁共振成像来研究所合成的 Fe₃O₄ 纳米粒作为 T₂ 类磁共振成像造影剂的可能性, 结果如图 2 所示。从图 2A 可以看出, 随着 Fe₃O₄ 纳米粒浓度的增大, 磁共振信号强度显著降低, 反映在图像上为磁共振成像目标区域越来越黑。此外, 将 1/T₂ 值与 Fe 离子浓度进行线性拟合, 结果如图 2B 所示, 1/T₂ 与 Fe 离子浓度具有良好的线性关系。直线的斜率即为横向弛豫率 (r₂), 为 26.37 mmol·L⁻¹·s⁻¹, 说明该 Fe₃O₄ 纳米粒具有良好的体外磁共振成像性能, 可以作为体外 T₂ 加权的 MRI 造影剂。

3 体外光热性能研究

采用 808 nm 激光器 (2 W·cm⁻², 8 min) 照射 Fe₃O₄

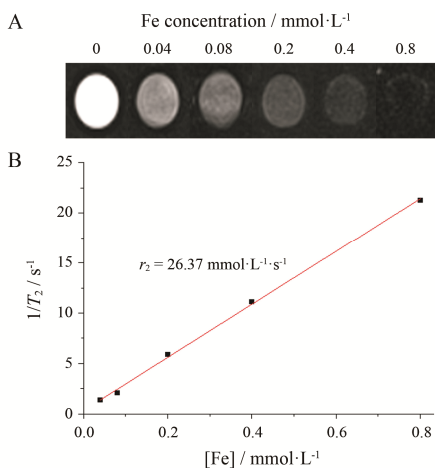


Figure 2 *In vitro* magnetic resonance response of Fe₃O₄ nanoparticles. (A) T₂-weighted MR images of Fe₃O₄ nanoparticles in aqueous solution with various concentrations. (B) T₂ relaxation rate (1/T₂, s⁻¹) of Fe₃O₄ nanoparticles as a function of Fe concentration (mmol·L⁻¹), the slope indicated the specific relaxivity (r₂)

纳米粒的水溶液, 研究 Fe₃O₄ 纳米粒的体外光热转换性能。图 3A 表示水与 Fe₃O₄ 水溶液 (60 μg·mL⁻¹) 的光热成像图, 随着照射时间的延长, Fe₃O₄ 水溶液的光热成像图越来越亮, 即温度越来越高。作为对照, 水的光热成像图则明显比 Fe₃O₄ 暗, 说明 Fe₃O₄ 纳米粒具有良好的光热性能。此外, 还研究了 Fe₃O₄ 纳米粒的光热转换性能与 Fe₃O₄ 浓度的关系, 如图 3B 所示。照射 8 min 后, 当 Fe₃O₄ 纳米粒的质量浓度从 30 μg·mL⁻¹ 增加到 250 μg·mL⁻¹, 其溶液的温度从 55 °C 增大到 75 °C, 说明 Fe₃O₄ 纳米粒的光热转换性能与其浓度成正相关。而对照组水在同样条件下, 温度仅上升了 9 °C。以上结果说明, Fe₃O₄ 具有良好的近红外吸收性质, 能将光能转换为热能, 可以作为新型光热材料进行深入研究。

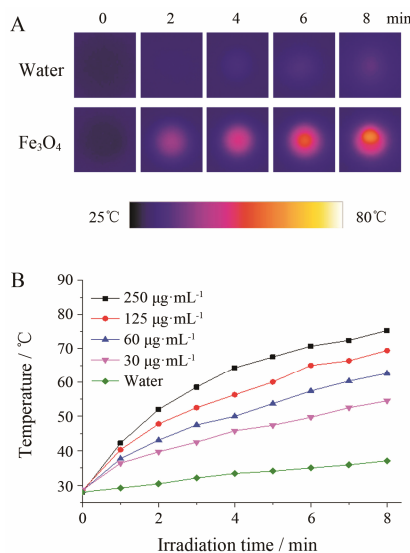


Figure 3 Photothermal effect of Fe₃O₄ nanoparticles induced by continuous NIR laser irradiation (808 nm, 2 W·cm⁻²). (A) *In vitro* photothermal images of water and Fe₃O₄ suspension (60 μg·mL⁻¹) as a function of irradiation time. (B) Photothermal heating curves of water and Fe₃O₄ suspensions at various concentrations as a function of irradiation time

4 细胞摄取

DOX 是一种常用的肿瘤治疗药物, 其本身带有荧光。本文采用 DOX 标记了 Fe_3O_4 纳米粒, 并通过观察 DOX 的荧光来研究 MCF-7 细胞在不同时间点对 Fe_3O_4 -DOX 的摄取情况。如图 4 所示, 红色荧光是 DOX 发出的特征荧光, 蓝色荧光是细胞核染料 Hoechst 33342 产生的特征荧光, 绿色荧光是溶酶体染料 LysoGreen 产生的特征荧光。从图中可以看出, 孵育 0.5 h 后, Fe_3O_4 -DOX 处理组的细胞中出现红色荧光, 表明 Fe_3O_4 -DOX 已经进入细胞。随着孵育时间延长至 1 h, 细胞中红色荧光更强, 说明更多的 Fe_3O_4 -DOX 被细胞摄取, MCF-7 细胞对 Fe_3O_4 -DOX 的摄取存在时间依赖性。关于细胞内定位, 游离 DOX 在孵育 0.5 h 后已经大量进入细胞核, 而 Fe_3O_4 -DOX 则在孵育 1 h 后也仅能存在于细胞质中。以上结果表明, 本实验合成的 Fe_3O_4 纳米粒可以被肿瘤细胞摄取。

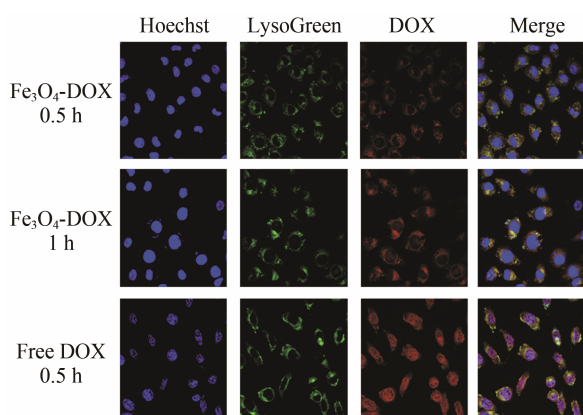


Figure 4 Cellular uptake of Fe_3O_4 -DOX and free DOX in MCF-7 cells. Red: DOX fluorescence; Blue: Hoechst 33342 staining of nuclei; Green: LysoGreen staining of lysosome. DOX: Doxorubicin hydrochloride

5 体外细胞毒性

采用 MTT 法研究了 Fe_3O_4 纳米粒对 MCF-7 细胞的毒性作用, 结果见图 5。从图中可见, 经过 24 h 孵育后, MCF-7 细胞的存活率随着 Fe_3O_4 纳米粒浓度的增加而有所下降。但是, 各浓度下 MCF-7 细胞的存活率都未见显著降低, 当 Fe_3O_4 的浓度小于 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 其存活率均在 90% 以上, 而当浓度提高至 5 倍, 依然表现出近 85% 的细胞存活率, 说明该 Fe_3O_4 纳米粒具有良好的生物相容性, 能够用于后续的体内研究。

6 组织分布研究

进行体内肿瘤成像的前提是造影剂能够在肿瘤内富集, 因此有必要对 Fe_3O_4 纳米粒在体内的组织分布情况进行研究。ICG 是美国食品药品监督管理局

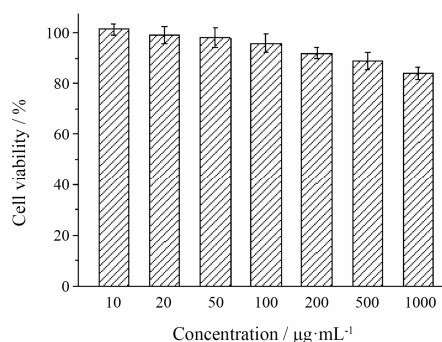


Figure 5 Cell viability of MCF-7 cells incubated with different concentrations of Fe_3O_4 nanoparticles for 24 h

局 (FDA) 批准临床使用的一种近红外荧光染料, 具有较高的体内应用安全性^[22]。本文采用 ICG 标记 Fe_3O_4 纳米粒, 并通过检测 ICG 的信号强度来研究 Fe_3O_4 纳米粒在荷瘤小鼠体内的组织分布情况。各小鼠以每个组织荧光强度占所有组织总荧光强度的比值作图。如图 6A 所示, 尾静脉注射后 6~24 h 之间, Fe_3O_4 -ICG 主要分布于肺、肾脏及肿瘤等部位, 而对照组 ICG 主要分布于肝脏、肺及肿瘤等部位。图 6B 表示不同时间点肿瘤部位的荧光强度, 游离 ICG 在注射 6 h 后即可在肿瘤部位达到其最大值, 但是随着时间的延长逐渐从瘤内被清除。而 Fe_3O_4 -ICG 则随着时间的延长逐渐在肿瘤部位富集。图 6C 为注射 24 h 后的离体组织分布图, 荧光越强, 图像越亮。从图中可以直观地看出, 注射 24 h 后, ICG 仅少量存在于肿瘤部位, 而 Fe_3O_4 -ICG 则在肿瘤部位具有相对较高的浓度。体内组织分布结果表明, Fe_3O_4 纳米粒具有肿瘤靶向性, 开展肿瘤部位成像时, 应在注射后 24 h 左右进行。

7 体内双模式成像研究

体外磁共振成像及光热成像结果表明, Fe_3O_4 纳米粒可以实现体外磁共振/光热双模式成像。进一步研究其体内双模式成像, 以探讨其成为双模式造影剂的可能性, 结果如图 7 所示。从图 7A 可见, 在磁共振图像上, 尾静脉注射 Fe_3O_4 纳米粒的小鼠的肿瘤部位明显比生理盐水组的肿瘤部位更暗, 肿瘤组织与周围正常组织的对比也更明显。此外, 以信号强度计, Fe_3O_4 纳米粒组肿瘤部位的 T_2 信号强度比生理盐水组降低了 48.7%, 说明该 Fe_3O_4 纳米粒具有良好的体内磁共振成像效果。图 7B 显示了体内热成像效果, Fe_3O_4 纳米粒具有良好的体内光热性质, 随着近红外光照时间的延长, 光热成像效果越来越明显。以上结果表明 Fe_3O_4 纳米粒具有良好的成像性能, 能够作为磁共振/光热双模式成像造影剂。

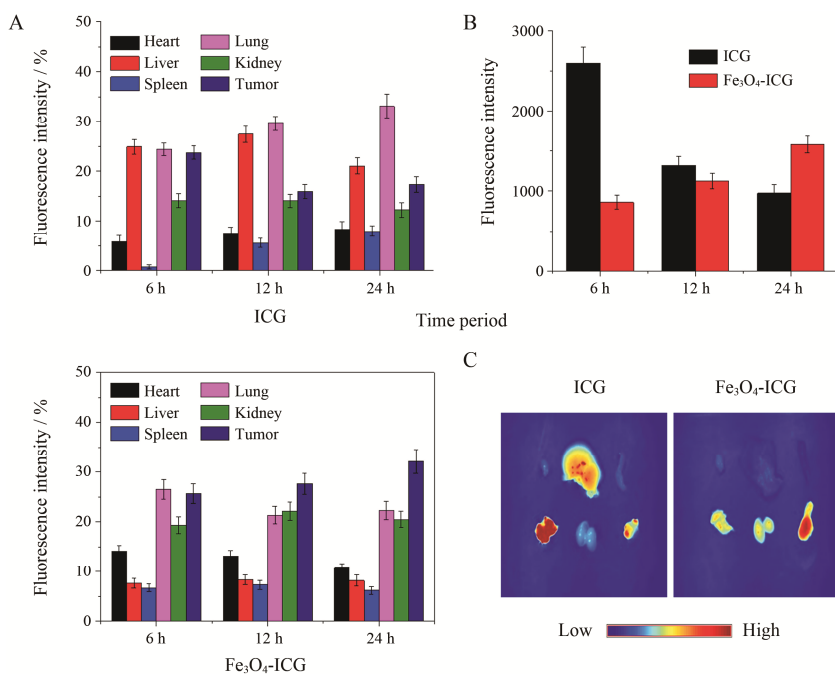


Figure 6 Biodistribution of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ICG}$ and free ICG in S180 tumor-bearing mice. (A) Tissue distribution determined by the ICG fluorescence at different time points, the ratio of the fluorescence intensity of each tissue to the total fluorescence intensity was plotted. (B) Quantitative analysis of fluorescence intensity of tumors at 6 h, 12 h and 24 h post-injection. (C) *Ex vivo* fluorescence images of major organs and tumor at 24 h post-injection. $n=3, \bar{x} \pm s$

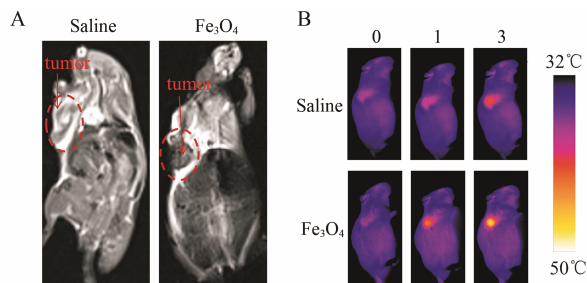


Figure 7 Dual-modal imaging of S180 tumor-bearing mice observed 24 h after intravenous injection of saline or Fe_3O_4 nanoparticles. T_2 -weighted MR images (A) and photothermal images versus irradiation time (B)

结论

本文采用水热法制备了水分散性的磁性 Fe_3O_4 纳米粒, 外观为均一稳定的球形结构, 粒径约为 125 nm, 在室温下表现出磁性及超顺磁性。此外, 该纳米粒还具有良好的体外磁共振响应及光热转换性能。细胞实验表明, 该 Fe_3O_4 纳米粒能被肿瘤细胞摄取, 摄取后分布于细胞质中并且对细胞具有较低的毒性。体内分布研究发现, 该纳米粒能够在肿瘤部位富集, 具较好的肿瘤靶向性。将其尾静脉注射到荷瘤小鼠体内后, 磁共振成像 T_2 信号下降了 48.7%, 近红外光照后, 肿瘤部位升温明显, 可以实现对肿瘤部位的磁共振/光热双模式成像。由于其在肿瘤部位成像方面的应用潜能, 该 Fe_3O_4 纳米粒对促进肿瘤临床诊断技术的发展

具有重大意义。

References

- [1] Shalviri A, Foltz WD, Cai P, et al. Multifunctional terpolymeric MRI contrast agent with superior signal enhancement in blood and tumor [J]. *J Control Release*, 2013, 167: 11–20.
- [2] Ge XQ, Song ZM, Sun LN, et al. Lanthanide (Gd^{3+} and Yb^{3+}) functionalized gold nanoparticles for *in vivo* imaging and therapy [J]. *Biomaterials*, 2016, 108: 35–43.
- [3] Sherry AD, Woods M. Chemical exchange saturation transfer contrast agents for magnetic resonance imaging [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, 10: 391–411.
- [4] Shen AJ, Dong HQ, Wen HY, et al. Gadolinium-based contrast agents for tumor targeting imaging [J]. *Prog Chem (化学进展)*, 2011, 23: 772–780.
- [5] Liu TH, Chang G, Cao RJ, et al. Applications of superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles in magnetic resonance imaging [J]. *Prog Chem (化学进展)*, 2015, 27: 601–613.
- [6] Kaim AH, Wischer T, O'Reilly T, et al. MR imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles in experimental soft-tissue infections in rats [J]. *Radiology*, 2002, 225: 808–814.
- [7] Xu H, Aguilar ZP, Yang L, et al. Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 9758–9765.

- [8] Lu W, Ling M, Jia M, et al. Facile synthesis and characterization of polyethylenimine-coated Fe_3O_4 superparamagnetic nanoparticles for cancer cell separation [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 1080–1084.
- [9] Tong Q, Shu XG, Lu XM, et al. Effects of magnetic gemcitabine stealth nano-liposomes on the characteristics of breast cancer cell line MCF-7 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 181–187.
- [10] Shen BB, Ma Y, Yu SY, et al. Smart multifunctional magnetic nanoparticle-based drug delivery system for cancer thermo-chemotherapy and intracellular imaging [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 24502–24508.
- [11] Shen S, Wang S, Zheng R, et al. Magnetic nanoparticle clusters for photothermal therapy with near-infrared irradiation [J]. *Biomaterials*, 2015, 39: 67–74.
- [12] Gao WH, Liu ST, Fan CX, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and magnetic resonance's response characteristics of folic acid-*O*-carboxymethyl chitosan ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mice and rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 845–851.
- [13] Deng XL, Ge XD, Wu XF, et al. Pharmacokinetics and MR imaging of SPIO-shRNA dual functional molecular probe *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1285–1289.
- [14] Cheng FY, Su CH, Yang YS, et al. Characterization of aqueous dispersions of Fe_3O_4 nanoparticles and their biomedical applications [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 729–738.
- [15] Shen LH, Bao JF, Wang D, et al. One-step synthesis of monodisperse, water-soluble ultra-small Fe_3O_4 nanoparticles for potential bio-application [J]. *Nanoscale*, 2013, 5: 2133–2141.
- [16] Shen S, Wu L, Wang CR, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of doxorubicin-loaded magnetic iron oxide nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1844–1849.
- [17] Rajan B, Sathish S, Balakumar S, et al. Synthesis and dose interval dependent hepatotoxicity evaluation of intravenously administered polyethylene glycol-8000 coated ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticle on Wistar rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 39: 727–735.
- [18] Cui JB, Xu SY, Guo C, et al. Highly efficient photothermal semiconductor nanocomposites for photothermal imaging of latent fingerprints [J]. *Anal Chem*, 2015, 87: 11592–11598.
- [19] Guo XM, Wu Z, Li W, et al. Appropriate size of magnetic nanoparticles for various bioapplications in cancer diagnostics and therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 3092–3106.
- [20] Chen L, Wu L, Liu F, et al. Azo-functionalized Fe_3O_4 nanoparticles: a near-infrared light triggered drug delivery system for combined therapy of cancer with low toxicity [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 3660–3669.
- [21] Liu J, Sun ZK, Deng YH, et al. Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 5875–5879.
- [22] Sheng ZH, Hu DH, Xue MM, et al. Indocyanine green nanoparticles for theranostic applications [J]. *Nano-Micro Lett*, 2013, 5: 145–150.