

## • 实验研究 •

## 磁共振检测纳米磁靶向性药物在荷瘤小鼠体内分布的初步研究

郑建伟, 李高, 唐涛, 肖宝来, 陈波, 李宏, 王剑明, 邹声泉

**【摘要】** 目的:利用 MRI 技术探讨活体状态磁靶向性药物在荷瘤小鼠体内的分布。方法:取荷瘤裸鼠 24 只随机分为 3 组,每组 8 只。A 组为空白对照组,经尾静脉注射生理盐水 0.2 ml;B 组未建立局部磁场,单纯静脉注射纳米磁小体靶向氟脲嘧啶药囊(剂量 250 mg/kg);C 组为建立肿瘤局部内磁场后静脉注射纳米磁小体靶向氟脲嘧啶药囊(250 mg/kg)。三组每天用药一次,连续 5 天。在最后一次用药后 24 h,每组各取 2 只动物行 MRI 扫描,扫描完毕后处死荷瘤鼠,取肝、肾、脑和肿瘤组织作病理学检查。结果:与 A 组比较,B 和 C 组中  $T_1$  WI 和  $T_2$  WI 上肝、肾组织信号都明显降低,以肝脏降低更显著;与 A 和 B 组比较,C 组中肿瘤信号在  $T_2$  WI 上明显降低;3 组中,脑组织信号均无明显变化。病理学检查也进一步证实。结论:磁性药物主要通过肝、肾代谢,在建立肿瘤局部内磁场后,磁性药物可以靶向性分布于肿瘤,磁性药物不能通过血脑屏障。MRI 技术是检测磁靶向性药物在活体荷瘤小鼠体内分布的有效方法。

**【关键词】** 磁共振成像; 药物分布; 磁性药物; 纳米颗粒

**【中图分类号】** R445.2; R914.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2007)01-0009-04

**Preliminary Study of the Distribution of Target Magnetic Nanoparticles in Mice Measured by Magnetic Resonance Image In Vivo** ZHENG Jian-wei, LI Gao, TANG Tao, et al. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, P. R. China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the distribution of target magnetic nano-particles in mice by MRI. **Methods:** 24 nude mouse bearing tumor as animal models were randomly divided into 3 groups, 8 mouse for each group. Group A received placebo (sodium chlonide) 0.2ml administered via tail vein; group B received magnetic nanoparticles with 5-Fu capsules administered intravenously at 250mg/kg on consecutive five days without application of magnetic fields; group C consist of magnetic fields built inside tumor tissue and received the same medicine as group B. 24 hours after 5 days' consecutive administration of medicine, two mouse of each group selected at random were examined on MRI  $T_1$  WI and  $T_2$  WI, and were sacrificed afterwards. Tissues of liver, kidney, brain and tumor were taken for pathology study. **Results:** On  $T_1$  WI and  $T_2$  WI, the signal intensities of liver and kidney in group B and group C were obviously decreased when compared with that in group A; which was more marked in liver. On  $T_2$  WI, the signal intensities of tumor tissue in group C was significantly lower than that of group A and B. No marked variation was revealed in brain tissue of all these three groups. Further pathology examination proved high concentration of ferric ion within tumor tissue of group C. **Conclusion:** Metabolism of magnetic nano-particles is mainly located within liver and kidney. After building up the intra-tumoral magnetic field, the magnetic particles could be distributed within the target tumor. Magnetic particle cannot pass through blood brain barrier. MRI is an effective technique in defining the distribution of magnetic nanoparticles in nude mice in vivo.

**【Key words】** Magnetic resonance imaging; Drug distribution; Magnetic medicine; Nanoparticles

采用无创性影像学诊断方法,在活体状态观察药物的脏器分布,直观地反应药物分布特点,可以即时评价药物的药代动力学及其治疗手段<sup>[1-3]</sup>。笔者利用纳米磁小体靶向氟脲嘧啶药囊中磁性载体  $Fe_3O_4$  超顺磁性特点,未偶联任何增强剂和核素示踪剂,通过磁共振扫描,观察在磁场作用下,经静脉注射的纳米磁小体氟脲嘧啶药囊在荷瘤小鼠体内的靶向性分布,旨在为整体评价药物疗效提供基础。

## 材料与方法

## 1. 动物模型的建立和分组

以 0.2 ml 细胞悬液(含  $1 \times 10^7$  个胆管癌 QBC939 细胞系),移植在 18 只裸鼠(购自上海斯莱克实验动物有限公司)背部皮下,三周后肿瘤生长至 0.8~1.0 cm 直径。将 18 只裸鼠随机分为 3 组,每组 6 只:A 组为空白对照组,经尾静脉注射生理盐水 0.2 ml;B 组为单纯静脉注射纳米磁小体靶向药囊(250 mg/kg),未建立磁场;C 组为建立肿瘤局部内磁场后,经静脉注射纳米磁小体靶向药囊(250 mg/kg)。三组裸鼠均每天治疗一次,连续 5 天。

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科(郑建伟、唐涛、肖宝来、陈波、李宏、王剑明、邹声泉),药学院(李高)

作者简介:郑建伟(1968-),男,湖北宜昌人,博士研究生,副主任医师,主要从事普通外科工作。

通讯作者:邹声泉, email: sqzou@tjh.tjmu.edu.cn

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划,2002AA214061)

## 2. 建立肿瘤局部内磁场

将直径 0.03 cm、长度 0.5 cm 的磁化支架丝插入肿瘤组织,在肿瘤内部建立磁场。该支架在 17000 Oe 恒定磁场下磁化 1 秒后表面场可以达到 300 高斯,磁化后该支架丝为永磁性,能耐 150 °C 高温,并具有在体内耐侵蚀、抗氧化的特点。

## 3. 纳米磁小体氟脲嘧啶药囊

药囊中纳米磁性材料  $Fe_3O_4$  的颗粒直径 30~40 nm,磁响应强度 300 高斯,药囊平均粒径(368±50) nm,平均载氟脲嘧啶药量为(10.1±1.2)%,平均包封率为(67.6±4.7)%,磁性颗粒含量为 9%。药囊经 0.2% 生理盐水超声配制成 250 mg/kg 浓度的乳剂。

## 4. 磁共振扫描

使用中科院武汉物理与数学研究所的 Biospec 47/30 型(德国 Bruker)小动物专用 4.7T 磁共振成像仪,室温孔径 30 cm,质子共振频率 200 MHz,体线圈接受发射。成像参数: $T_1$  WI(TR 1200 ms, TE 160 ms)和  $T_2$  WI(TR 4000 ms, TE 分别为 20, 40, 60, 80, 100 和 120 ms,分辨力为 234×234),扫描层厚 1 mm。

将治疗完毕 24 h 后的 3 组荷瘤裸鼠各选 2 只,经混合气体(笑气、异氟醚和氧气)麻醉固定后,取出肿瘤组织中的磁化支架丝,再行  $T_1$  WI 和  $T_2$  WI,使用 Pravisson 3.02 软件测量各组织器官的信号强度。

## 5. 病理学检查

检查完毕后,处死裸鼠,取肿瘤和主要脏器标本,分别用 10% 中性甲醛和 4% 戊二醛溶液固定,常规切片,行铁染色和超微病理检查。

## 结果

### 1. MRI 表现

在  $T_1$  WI 时,3 组肿瘤组织和脑组织的信号无明显变化,肝、肾组织信号在 B 和 C 组降低,以肝组织降低更明显(表 1)。

表 1 3 组荷瘤裸鼠肝肾脑及肿瘤组织  $T_1$  WI 信号强度值

组别	平均信号强度			
	肿瘤	肝脏	肾脏	脑
A 组	173	132.0	125.0	98.5
B 组	168	32.6	75.6	91.4
C 组	165	36.4	78.4	86.6

在  $T_2$  WI 时,B 和 C 组中肝肾组织的信号均明显降低,以肝脏降低更明显;C 组中肿瘤组织的信号也明显降低,与肌肉信号的对比较 A 和 B 组高;3 组中脑组织的信号强度均无变化(表 2)。

表 2 3 组荷瘤裸鼠肝肾脑及肿瘤组织  $T_2$  WI 信号强度值

组别	平均信号强度			
	肿瘤	肝脏	肾脏	脑
A 组	203(1.139)	121.5	118.4	89.5
B 组	198(1.135)	21.3	62.4	91.3
C 组	132(1.480)	28.7	68.5	88.7

注:括号内为与肌肉信号强度的比值。

空白对照组裸鼠的肿瘤、肝、脑等组织信号均一,在  $T_1$  WI 和  $T_2$  WI 上信号均无明显变化(图 1);B 和 C 组裸鼠在  $T_1$  WI 及  $T_2$  WI 上肝组织呈均一的更低信号,以  $T_2$  WI 更明显,显示铁剂主要分布在肝脏和肾脏;B 和 C 组裸鼠的肿瘤组织在  $T_1$  WI 上信号无明显变化,C 组肿瘤组织在  $T_2$  WI 上信号降低(图 2、3),

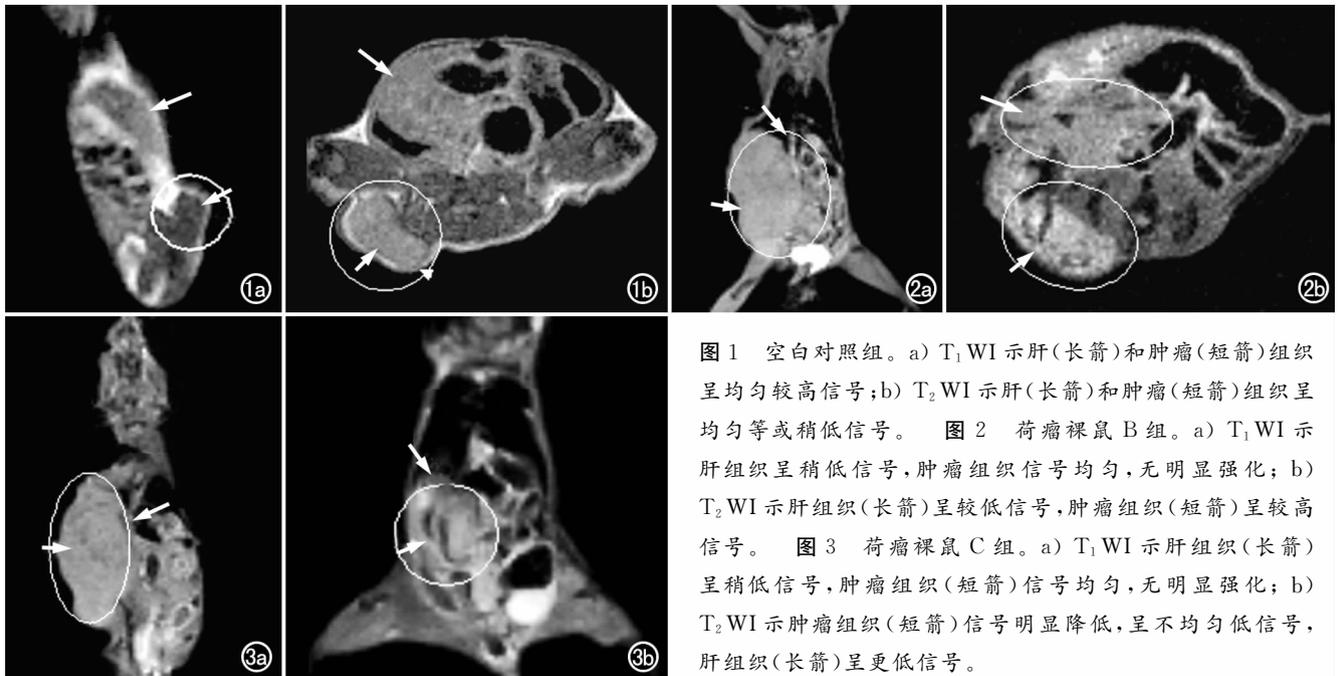


图 1 空白对照组。a)  $T_1$  WI 示肝(长箭)和肿瘤(短箭)组织呈均匀较高信号;b)  $T_2$  WI 示肝(长箭)和肿瘤(短箭)组织呈均匀等或稍低信号。图 2 荷瘤裸鼠 B 组。a)  $T_1$  WI 示肝组织呈稍低信号,肿瘤组织信号均匀,无明显强化;b)  $T_2$  WI 示肝组织(长箭)呈较低信号,肿瘤组织(短箭)呈较高信号。图 3 荷瘤裸鼠 C 组。a)  $T_1$  WI 示肝组织(长箭)呈稍低信号,肿瘤组织(短箭)信号均匀,无明显强化;b)  $T_2$  WI 示肿瘤组织(短箭)信号明显降低,呈不均匀低信号,肝组织(长箭)呈更低信号。

与空白对照组肿瘤呈均一高信号有明显区别,显示 C 组动物铁剂在肿瘤组织相对聚积;3 组中脑组织在  $T_1$  WI 和  $T_2$  WI 上信号强度均无明显改变,提示该药物不能通过血脑屏障(图 4)。

## 2. 病理学观察

**肿瘤组织铁染色:** A、B 组荷瘤裸鼠肿瘤组织铁染色阴性, C 组荷瘤裸鼠肿瘤组织广泛普鲁士蓝染色强阳性,提示 C 组荷瘤裸鼠氧化铁颗粒在肿瘤组织中大量分布(图 5)。

**肿瘤组织电镜检查:** C 组胆管癌肿瘤组织超微切片观察到凋亡细胞内吞噬的铁颗粒,测量颗粒直径为 30~50 nm(图 6)。

通过 MR 扫描,未经磁性药物治疗的肿瘤组织(A 组)和未建立肿瘤局部磁场、单纯注射磁性药物的肿瘤组织(B 组),在  $T_1$  WI 和  $T_2$  WI 上呈均一较高信号, B 组裸鼠在  $T_2$  WI 上肝、肾信号明显降低;在建立肿瘤局部磁场后注射磁性药物的肿瘤组织(C 组),在  $T_2$  WI 上信号降低明显。提示氧化铁颗粒主要通过网状内皮系统包括肝、淋巴结吞噬,肾脏的信号值降低可能与血流冲击有关;在建立肿瘤内磁场后,磁性颗粒可以部分逃逸肝脏的吞噬,主动靶向分布于肿瘤组织。通过病理切片铁染色和电镜观察,在建立局部内磁场的肿瘤组织中富集铁,进一步证实了磁小体的靶向性分布的特性。

## 讨论

MRI 是现代影像医学的发展方向,具有无创性和信息容量大的特点,不仅提供组织在形态结构方面的信息,而且可以反映组织功能和药代动力学方面的信息<sup>[4-6]</sup>。近年国内外在磁靶向治疗中,通过 MRI 观察到磁性药物在活体肝的靶向性聚集<sup>[7-9]</sup>,显示了 MRI 的形态学与药代动力学相结合的诊断优势<sup>[10]</sup>。

MRI 活体状态直接药物成像是利用 MR 成像仪对成像组织磁化率的改变异常敏感的特点,在药物中偶联超顺磁性材料,造成局部磁场的不均匀,使该组织质子的相位发生变化,加速失相位,从而缩短了组织的  $T_1$  和  $T_2$  值,使组织信号强度降低<sup>[11]</sup>。铁离子作为 MRI 常用对比剂,具有长电子弛豫时间,能加速核磁弛豫速率,又不引起显著的顺磁位移。由于铁离子对外加磁场敏感,在较弱的磁场中可获得巨大的磁矩,在细胞内成簇分布的铁粒子局部扩增外加磁场,使磁场不均匀,水分子穿过不均匀的磁场时,加速了质子的失相位,使组织的横向弛豫时间( $T_2$ )明显缩短,在  $T_2$  WI 时信号降低最明显<sup>[9]</sup>。

国内外均开展了小鼠 MRI 对组织结构和功能的研究。Marzola 等<sup>[12]</sup>在血管抑制剂 SU 6688 治疗结肠癌裸鼠模型中,采用钆对比剂,通过 MRI 检测到肿瘤的信号强度值明显降低,肿瘤血管渗透性减低,肿瘤

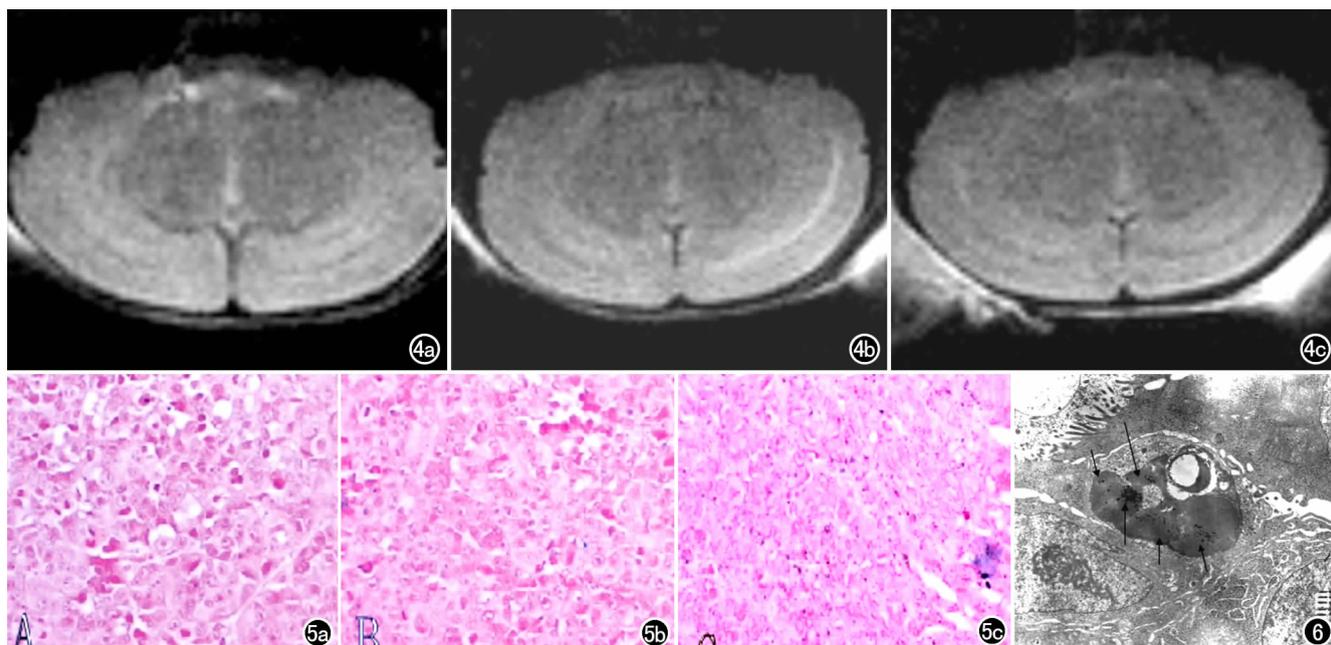


图 4  $T_2$  WI 示 A、B 和 C 组荷瘤裸鼠脑部 MRI 信号强度无明显变化。a) A 组; b) B 组; c) C 组。图 5 肿瘤组织铁染色,显示 3 组肿瘤细胞结构紊乱,细胞异型性明显,核大深染, A 组未见阳性蓝染, B 组偶见蓝染, C 组可见广泛细胞和细胞间蓝染( $\times 200$ )。a) A 组; b) B 组; c) C 组。图 6 C 组荷瘤裸鼠胆管癌细胞,电镜下显示凋亡细胞内吞噬的氧化铁颗粒(箭)。

血管被抑制,肿瘤体积减小,通过 MRI 证明血管抑制剂 SU 6688 抑制肿瘤的效应。许卫国等<sup>[13]</sup>在 MRI 扫描小鼠肝癌模型时,运用超顺磁性氧化铁(SPIO),结果能提高肝脏占位性病变更定性诊断符合率。刘岷等<sup>[14]</sup>进一步比较多种扫描序列时超顺磁性氧化铁(SPIO)增强扫描对显示大鼠肝癌的能力,显示 T<sub>2</sub>WI 最为敏感。

与 SPIO 一致,磁性药物中采用的氧化铁具有纳米级粒径、高磁性和良好的组织相容性等特点<sup>[15]</sup>。但磁性药物中的氧化铁是作为活跃功能载体,与化疗药物或单克隆抗体偶联,在磁场作用下,实现靶向性治疗<sup>[16,17]</sup>。国外在以小鼠为对象的磁靶向治疗实验研究中,采用了 MRI 检测磁性药物在活体内的靶向性分布。Huh 等<sup>[18]</sup>在肝癌、乳腺癌和纤维母细胞瘤裸鼠活体模型上,注射磁纳米颗粒与肿瘤靶向性抗体赫赛汀耦制成的磁性分子探针,通过 T<sub>2</sub>WI 观察到肿瘤组织信号降低,可以定性、定位诊断肿瘤,显示出磁性颗粒在 MRI 诊断小鼠肿瘤中的价值。国内选用较大动物为研究对象,徐华等<sup>[9]</sup>将实验组大鼠的右肾部位置于 C 型磁体中,从静脉注射磁流体后行 MR 扫描,结果显示大鼠右肾部位的信号强度明显减小,有较高浓度的磁流体在右肾部位聚集,认为选用 MRI 技术检测磁流体在体内的聚集情况是行之有效的。

本研究采用小动物专用磁共振仪,场强度为 4.7T, T<sub>2</sub>WI 分辨力为 234×234,扫描层厚 1 mm,适用于小鼠 MRI 检测。利用纳米磁小体药囊中铁离子具有的良好磁响应性,可以作为 MRI 体内示踪剂的特点<sup>[19]</sup>,通过 MRI 反映纳米磁小体在活体脏器的药物分布,并且在肿瘤局部建立恒定磁场,形成主动磁靶向机制,观测到纳米磁小体在小鼠肝、肾等代谢器官以外的肿瘤组织分布。研究表明, MRI 是诊断磁性药物在小鼠体内分布的一种有效、无创的方法,为研究磁性药物在体内靶向性治疗提供即时直观的信息,结合病理学、药理学和药效学的研究,为整体评价纳米磁小体氟脲嘧啶药囊靶向治疗恶性肿瘤奠定基础。

#### 参考文献:

[1] Richardson JC, Bowtell RW, Mader K, et al. Pharmaceutical applications of magnetic resonance imaging[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(8):1191-1209.

[2] Brix G, Schlicker A, Mier W, et al. Biodistribution and Pharmacokinetics of the (19)F-labeled Radiosensitizer 3-aminobenzamide: Assessment by (19)F MR Imaging[J]. *Magnetic Reson Imaging*, 2005, 23(9):967-976.

[3] Thomas AL, Morgan B, Horsfield MA. Phase I Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of

PTK787/ZK 222584 Administered Twice Daily in Patients with Advanced Cancer[J]. *J Clinical Oncology*, 2005, 23(18):4162-4171.

[4] Fink GR. Functional MR Imaging: from the BOLD Effect to Higher Motor Cognition[J]. *Suppl Clin Neurophysiol*, 2004, 57(3):458-468.

[5] Pien HH, Fischman AJ, Thrall JH, et al. Using Imaging Biomarkers to Accelerate Drug Development and Clinical Trials[J]. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(4):259-266.

[6] Fischman AJ, Alpert NM, Rubin RH. Pharmacokinetic Imaging: a Noninvasive Method for Determining Drug Distribution and Action[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2002, 41(8):581-602.

[7] Goodwin S, Peterson C, Heh C, et al. Targeting and Retention of Magnetic Targeted Carriers (MTCS) Enhancing Intra-arterial Chemotherapy[J]. *J Magn Magn Mater*, 1999, 19(4):132-137.

[8] Aexiou C, Arnold W, Klein RJ, et al. Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(23):6641-6648.

[9] 徐华, 宋涛, 鲍秀琦, 等. 磁性药物靶向治疗中 MRI 检测磁流体体内分布的实验研究[J]. *中国医学影像学*, 2004, 12(6):427-429.

[10] Ito A, Shinkai M, Honda H, et al. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles[J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100(1):1-11.

[11] 俞开潮, 王国平, 丁尚武, 等. 用于磁共振成像对比增强的造影剂研发进展[J]. *波谱学杂志*, 2004, 4(21):505-526.

[12] Marzola P, Degraffi A, Calderan L, et al. In Vivo Assessment of Antiangiogenic Activity of SU6668 in an Experimental Colon Carcinoma Model[J]. *Clinical Cancer Research*, 2004, 1(10):739-750.

[13] 许卫国, 黄力, 陈汉芳, 等. 小鼠移植瘤模型对 SPIO 增强 MRI 信号变化原因的初步研究[J]. *临床放射学杂志*, 2005, 24(6):541-544.

[14] 刘岷, 许乙凯, 黄其鏊. 不同 MR 扫描序列在 SPIO 增强大鼠肝癌模型的对比研究[J]. *放射学实践*, 2002, 17(5):425-427.

[15] Hua Xu, Tao Song, Xiuqi Bao, et al. Site-directed Research of Magnetic Nanoparticles in Magnetic Drug Targeting[J]. *J Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, 293(3):514-519.

[16] Rudge SR, Kurtz TL, Vessely CR, et al. Preparation, Characterization, and Performance of Magnetic Iron-carbon Composite Microparticles for Chemotherapy[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(14):1411-1420.

[17] Jing Chen, Hua Wu, Deyan Han, et al. Using Anti-VEGF McAb and Magnetic Nanoparticles as Double-targeting Vector for the Radioimmunotherapy of Liver Cancer[J]. *Cancer Letters*, 2006, 231(2):169-175.

[18] Huh YM, Jun YW, Song HT, et al. In Vivo Magnetic Resonance Detection of Cancer by Using Multifunctional Magnetic Nanocrystals[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(35):12387-12391.

[19] 葛凤, 朱剑虹, 刘军, 等. 纳米磁化标记神经干细胞的 MRI 大鼠活体示踪实验研究[J]. *中国临床神经科学*, 2005, 13(2):152-155.