



纳米铁氧化物磁热疗相关机制研究进展*

许黄涛^{1,2)} 任 伟^{1,2)} 潘永信^{1,2)**}⁽¹⁾ 中国科学院地质与地球物理研究所, 北京 100029; ⁽²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049

摘要 热疗作为继手术、放疗和化疗后的肿瘤治疗的重要方法之一, 自其诞生之初便受到研究人员和产业部门的关注. 磁热疗目前已经应用到前列腺癌、脑部肿瘤等临床实验或治疗中, 并取得较好的疗效. 本文主要介绍基于磁性纳米颗粒的磁热疗产热物理机制与影响因素, 以及磁热的亚细胞水平生物学效应.

关键词 纳米铁氧化物, 磁热机制, 细胞膜系统损伤, DNA断裂

中图分类号 R730.5, R318

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0218

据国家癌症中心2018年新发布数据, 2014年我国新发恶性肿瘤病例约有380.4万例, 死亡病例为229.6万例^[1]. 目前, 手术摘除仍然是临床肿瘤治疗的首选, 而对不适于摘除的肿瘤, 一般采用放疗或/和化疗方法. 与放化疗相比, 热疗的毒副作用更小、可控性更强. 磁热疗作为热疗的一种, 其优势在于加热区域和温度更为可控, 这得益于磁热疗所使用的磁性材料性能(如磁学性能、分散性等)的高度可控. 此外, 磁热疗以交变磁场作为加热源, 其穿透能力强, 几乎不受生物体组织的影响, 而其他加热方式如红外、微波等对于组织的穿透能力则相对较弱.

关于磁热疗最早文献记录可追溯至1957年, Gilchrist等^[2-3]首次报道的磁性材料感应产热破坏狗的转移性淋巴瘤组织, 这项工作被认为是肿瘤磁热疗的先河. 随后, Crile等^[3-4]总结了肿瘤热疗的相关特征: 肿瘤区域血管较为丰富、管壁较薄、流速较缓, 容易引起热滞留(heat trap); 超过42℃时肿瘤组织出现损伤, 且温度每升高1℃, 致死时间减半; 亚致死温度的处理会诱发肿瘤的耐热性; 小肿瘤对放疗敏感度高、热疗敏感度低, 而大肿瘤正好相反; 热疗与放疗、化疗联用, 明显增强放化疗效果. 这些描述基本涵盖了现代肿瘤热疗领域的基本论点, 奠定了肿瘤热疗学的基础, 推动了肿瘤热疗的发展.

目前国内外磁热疗临床试验已针对部分肿瘤开

展工作, 从最初的热籽(微米级软磁材料)手术植入介导, 发展到磁流体(纳米级铁磁性或超顺磁性)瘤区注射, 使磁热治疗过程中肿瘤区域温度分布更加均匀, 疗效更佳^[5]. 鉴于已有不少磁热疗应用方面的综述文献, 本文主要介绍纳米级磁性铁氧化物产热的物理机制、产热影响因素及细胞水平这些生物学影响等方面的研究进展. 关于用于磁热疗磁性颗粒的制备方面可参阅[6-7], 这里不再赘述.

1 磁性铁氧化物颗粒产热的物理学机制

磁性铁氧化物颗粒在交变磁场中吸收外界磁能转化为自身的热能. 磁热疗就是将产生的热能传递至周围的病灶组织产生热损伤, 从而达到治疗效果. 目前认为, 磁性材料在交变场中的产热机制主要有涡流(eddy current)、磁滞(hysteresis)和弛豫(relaxation). 由于纳米尺寸磁性材料在交变磁场下的涡流效应很小, 产热通常可以忽略, 因此这里主要讨论磁性纳米颗粒的磁滞与弛豫产热机制. 磁滞产热是指磁性物质磁矩的变化总是滞后于外界磁场方向的变化, 磁场对其做功, 因而一部分磁能

* 国家自然科学基金(41621004)和中国科学院重点项目(QYZDJ-SSW-DQC024)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-82998406, E-mail: yxpan@mail.iggcas.ac.cn

收稿日期: 2018-08-06, 接受日期: 2019-01-30

以热能的形式储存在颗粒中(图1a).弛豫产热主要是由于磁性物质的内耗,具体又可分为尼尔弛豫(Néel relaxation)和布朗弛豫(Brownian relaxation)两种.如图1b所示,尼尔弛豫是指当外界磁场方向改变时,磁颗粒内部的磁矩方向发生改变,偏转至外界磁场方向;而布朗弛豫(图1c)是指磁颗粒在布朗运动下整个颗粒发生旋转,带动磁矩偏转至外界磁场方向.

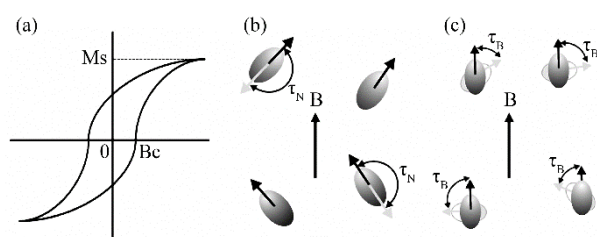


Fig. 1 The schematic diagram of magnetocaloric mechanism

图1 磁性材料产热机制模式图

(a) 磁滞产热; (b) 尼尔弛豫产热; (c) 布朗弛豫(修改自[8]).

磁性颗粒产热的理论模型建立,一直是磁热研究的重点.超顺磁磁性材料目前使用较多的模型是由Rosensweig^[9]于2002年总结提出,本文主要基于该计算模型介绍.

超顺磁颗粒在交变磁场中的功耗 P (volumetric power dissipation): $P = \pi \mu_0 \chi'' H^2 f$. 其中, μ_0 为真空磁导率, χ'' 为颗粒的虚部磁化率, H 为外磁场强度, f 为磁场频率. 由此可见,磁性颗粒的产热性能,除了与外磁场的频率和场强相关,还与其虚部磁化率有关. 而虚部磁化率 $\chi'' = \frac{\chi_0 \omega \tau}{1 + (\omega \tau)^2}$. 其中, χ_0 为平衡磁化率, ω 为磁场角动量 ($\omega = 2\pi f$), τ 为弛豫时间. 因此,磁性材料的功耗实际与材料的平衡磁化率和弛豫时间有关.

在实际应用过程中,为方便计算比较不同磁性纳米材料产热效率的高低,引入了SAR (specific absorption rate) 的概念(其等效概念为SLP, specific loss power), 定义为单位质量磁性材料在单位时间内的产热功率,表达式为 $SAR = \frac{CV}{m} \times \frac{\Delta T}{\Delta t}$, 单位为 W/g. 其中 C 为溶液的比热容, V 为溶液体积, m 为 Fe 质量或磁性材料质量.

2 磁性纳米颗粒磁热效率的影响因素

除施加磁场的条件外,对于磁滞产热的磁性材料,其产热效率与磁滞回线的面积即磁能面积成正比;而弛豫产热磁性材料则主要取决于其虚部磁化率的大小和弛豫时间.

2.1 磁性来源

磁铁矿(Fe_3O_4)具有反尖晶石结构,属等轴晶系.在晶体中, Fe^{2+} 占据了一半的八面体B位,而 Fe^{3+} 一半占据八面体B位,另一半占据四面体A位(图2).因此,磁铁矿的化学形式又可表示为 $\text{Fe}^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})\text{O}_4$.而 Fe^{2+} 之所以会优先进入八面体位,则是由晶体场能量最低原理决定的. Fe^{2+} 在四面体位的晶体场稳定化能(crystal field stabilization energy, CFSE)约为7.5 kcal/mol,而在八面体位CFSE约为11.4 kcal/mol,是四面体位的1.5倍.因此, Fe^{2+} 会优先进入到八面体位,使得整体的静电能更低从而更加稳定^[10].

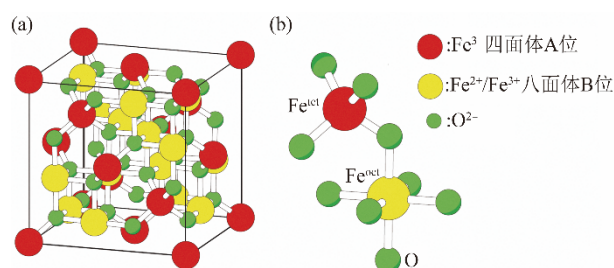


Fig. 2 The crystal structure of magnetite

图2 磁铁矿尖晶石结构模式图

(a) 磁铁矿结构模式图; (b) 四面体位及八面体位(修改自[11]).

磁性的本质在于原子或离子内部的电子运动,轨道运动产生轨道磁矩,自旋运动产生自旋磁矩.过渡族元素离子的磁矩主要来自于未配对电子的自旋所产生的自旋磁矩.过渡元素失去电子以后,d轨道的未配对电子直接暴露在离子最外围,受周围电子影响,其轨道运动受到抑制,不能快速顺应磁场的变化,因此轨道磁矩表现微弱,而未配对电子的自旋运动则不受或很少受到周围电子的影响,能很好地顺应磁场的变化,因此自旋磁矩相对较强.磁铁矿的磁性主要来自于八面体位 Fe^{2+} 未配对电子自旋所产生的自旋磁矩.这是由于八面体位中的 Fe^{3+} 与四面体中的 Fe^{3+} 未配对电子数相同,而自旋方向相反,因而产生的自旋磁矩相互抵消,净磁矩

为零。

磁赤铁矿 ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) 的晶格与磁铁矿相似, 属尖晶石结构. 可由磁铁矿八面体位的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 生成, 这导致其晶格中有 $1/3$ ($3\text{Fe}^{2+} \rightarrow 2\text{Fe}^{3+}$) 的原 Fe^{2+} 八面体位形成空位. 因此, 磁赤铁矿的磁性来源比较复杂, 但是可以相应地简化管理为八面体位取代 Fe^{2+} 的 Fe^{3+} 电子自旋所产生的自旋磁矩。

铁氧化物掺杂衍生物的磁性来源, 主要取决于元素的掺杂位置. 在元素掺杂形成 $\text{M}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ (M 表示掺杂元素, x 表示该元素的掺杂比例) 的过程中, 二价过渡元素主要进入到八面体位取代 Fe^{2+} 位置, 但有的也可以进入到四面体位^[10, 12-13]. 当过渡元素进入八面体位后, 其磁性机制与磁铁矿相似, 主要来自于过渡元素的未配对电子自旋磁矩和未被取代的 Fe^{2+} 的自旋磁矩. 而当元素掺杂到四面体位时, 由于未配对电子数的不同, 与八面体位 Fe^{3+} 自旋磁矩不能相互抵消, 主要取决于净磁矩。

2.2 磁性纳米铁氧化物种类对产热效率的影响

Yoon 等^[14] 采用高温热分解 $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$ 获得单质纳米 Fe 核, 继而添加铁的油酸复合物合成外部 Fe_3O_4 壳结构, 合成的 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 核壳纳米颗粒粒径约为 16 nm, 其中 Fe_3O_4 壳约为 3 nm, Fe 核约为 13 nm. 与同粒径 Fe_3O_4 相比, 其饱和磁化强度由 95 emu/g 提高至 142 emu/g.

Zhou 等^[15] 制备出偶联 RGDyK 抗体 PEG 包被的 11.5 nm $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ (RGD-PEG- $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$), 其饱和磁化强度约为 100 emu/g^[16]. 体外升温实验中, 1 ml 浓度为 1 mg $[\text{Fe}]$ /ml 样品在 598.0 kHz、24 kA/m 磁场条件下, 15 min 内约从 24.5℃ 升温至 38℃, 升温 (ΔT) 达到 13.5℃, 其产热效率 (SLP) 约为 172.5 W/g $[\text{Fe}]$ 。

Garaio 等^[17] 利用共沉淀的方法合成 Fe_3O_4 后, 在低 pH 条件下使用硝酸铁 (iron nitrate) 氧化生成 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, 粒径约为 12 nm. 体外测试 1.5 ml 浓度为 33 g/L $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 在不同磁场频率及强度下的升温效果, 其 SLP 最高可达 629 W/g (12 s), 使用的外加磁场条件为 24 kA/m、958 kHz. 值得注意的是, 他们通过测定不同磁场频率下磁性材料的磁滞回线, 并基于磁滞回线面积估算产热效率 (SLP), 发现其计算结果与实际磁场条件下测定的产热效率非常接近, 差异小于 6%。

Sabale 等^[18] 利用共沉淀的方法, 按照 $\text{M}:\text{Fe}=1:2$ 的化学剂量比在二甘醇溶液中 210℃ 回流 3 h 后洗涤干燥, 获得粒径小于 10 nm 的样品. 磁学结

果表明, 合成的颗粒为铁磁性, 存在一定的矫顽力. 其中 4 nm CoFe_2O_3 、8.35 nm ZnFe_2O_3 的矫顽力分别为 12.38 mT、6.73 mT. 而 7.0 nm MnFe_2O_3 、7.0 nm NiFe_2O_3 矫顽力则分别为 4.45 mT、2.00 mT. 在体外溶液的磁热测试中, 20 g/L 样品浓度, 在 276 kHz、33.5 kA/m 的磁场条件下, 1 200 s 时, 温度变化 CoFe_2O_3 约为 21℃、 ZnFe_2O_3 约为 26℃、 MnFe_2O_3 约为 1℃、 NiFe_2O_3 约为 6℃, 对应的产热效率 (SLP) 为 28.5 W/g (CoFe_2O_3)、12.5 W/g (ZnFe_2O_3) (Mn 、 Ni 未给出)。

2.3 铁氧化颗粒尺寸对产热效率的影响

对于超顺磁性纳米颗粒来说, 尺寸效应往往较其他效应更加可控. 另外, 对于给定的磁场条件下, 磁颗粒通常会存在一个磁热效率最高的尺寸. 磁铁矿磁热效率最高的粒径大约在 6.5 nm 左右, 磁赤铁矿 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 在 10.5 nm 附近, 而钴铁氧体则在 4 nm 左右 (图 3a)^[9]. 值得注意的是, 磁铁矿的产热速率从 5 nm 处的约 25 K/s 快速增加至 7 nm 处的约 700 K/s, 磁赤铁矿等也存在类似的现象. 理想条件下, 磁铁矿、磁赤铁矿的加热速度或加热效率足够满足热疗所需, 然而实际上却很少有文献报道如此高的产热效率, 这可能是因为理想模型中尺寸分布标准差 $\sigma=0$, 而目前磁性材料的合成, 通常都存在一定的尺寸分布, 这就可能会降低整体的产热效率. 对于磁铁矿来说, 当粒径分布从 $\sigma=0$ 增加至 $\sigma=0.05$ 时, 加热速率从最高 700 K/s 左右迅速降至 400 K/s 左右, 而当 $\sigma=0.25$ 时, 加热速率只有 100 K/s 左右 (图 3b)^[9]. 因此, 在探讨尺寸效应的同时, 应综合考虑粒径的分布。

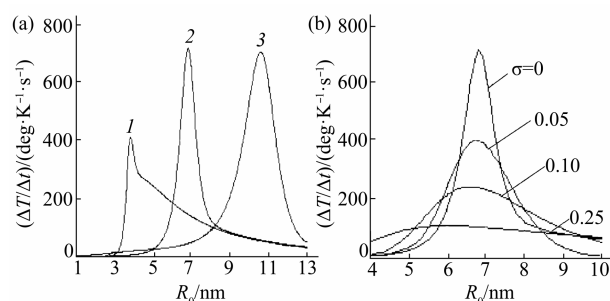


Fig. 3 The simulation of size's and size distribution's effect on heating rate

图3 磁性材料尺寸及尺寸分布对产热速度的影响。

(a) 3种磁性材料不同粒径 (R_0) 与加热速度关系: 1, CoFe_2O_3 ; 2, Fe_3O_4 ; 3, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. (b) 磁铁矿不同粒径分布下尺寸与加热速度. (修改自 [9]).

DeLa Presa 等^[19]采用共沉淀方法合成 γ - Fe_2O_3 , 粒径在 6.3~12.7 nm, σ 约为 0.2, 磁学结果显示磁性颗粒 250 K 下矫顽力均小于 1 mT, 近乎超顺磁. 随后, DeLa Presa 等测试了 50 g [Fe] /L 不同粒径的磁性材料在 7.5 kA/m、522.7 kHz 的磁场条件下水溶液升温情况, 最终升温 ΔT 及产热效率 SLP 分别为 12.7 nm (60°C、55 W/g)、10.6 nm (57.5°C、42 W/g)、8.3 nm (10°C、10 W/g)、6.3 nm (5°C、4 W/g), 结果表明, 在标准差相近的情况下, 产热效率 (SLP) 在一定范围内随着尺寸的增大而快速升高.

Fortin 等^[20]同样采用共沉淀的方法, 合成了超顺磁的 γ - Fe_2O_3 , 粒径在 5.3~10.2 nm, 粒径分布 σ 均在 0.2 附近. Fortin 等利用自制的磁场加热设备对质量份数 $\phi=0.45\%$, 0.3 ml 样品在 24.8 kA/m、700 kHz 磁场条件下的加热效果进行测试, 发现随着颗粒粒径从 5.3 nm 增加到 10.2 nm 的过程中, 产热效率 SLP 由 4 W/g 增加到 275 W/g, 呈指数型增长, 同样的, CoFe_2O_3 的产热效率也从 3.9 nm 时的 40 W/g 增加到 9.1 nm 时的 360 W/g. 在一定程度上验证了 Rosenweig 的结果.

前面我们提到, 铁磁性材料主要为磁滞产热, 其产热效率主要取决于其磁滞回线的面积 ($P_h = f \oint M dH$)^[17], 因此尽管颗粒的尺寸效应和粒径分布也存在一定的影响, 但一般没有特定的规律可循, 这可能是由于铁磁性材料在合成过程中, 其矫顽力、饱和磁化强度与颗粒的粒径没有表现出很好

的对应关系所致.

Ma 等^[21]基于 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 胶体 HNO_3 氧化后与 FeSO_4 共沉淀的方法, 合成了粒径较大的磁性颗粒, 尺寸 46~418 nm. 磁性颗粒的饱和磁化强度相近, 基本在 12.5 Am^2/kg 附近, 而矫顽力则随着粒径的增大从 46 nm 时 10.1 mT 减小到 416 nm 时的 5.4 mT, 因此其最终的产热效率 SLP 也从 75.6 W/g [Fe] (46 nm) 降到了 28.9 W/g [Fe] (416 nm).

2.4 施加磁场的频率与强度对产热效率的影响

磁性材料的产热效率, 除了受到自身的固有属性影响外, 还与外界磁场条件有关. 一般而言, 磁热效率与磁场的频率 (f) 和场强的平方 (H^2) 呈线性相关, 但具体取决于磁性材料的磁学性能.

2.4.1 磁场频率

前面我们提到, 产热功率 P 与虚部磁化率 χ'' 有关, 而 χ'' 又与 f 相关. 当粒径分布 $\sigma > 0.1$ 时, χ'' 在 $0.2 \times 10^6 < f < 3 \times 10^6$ 的范围内变化较小^[9], 因此在给定的磁场强度下, 磁性材料的产热效能大多与频率 (f) 呈线性关系.

Kallumadil 等^[22]测定了 16 种磁性纳米颗粒的产热效率, 其中给出了 Miromod 公司 Nanomag-D100 nm 磁性颗粒 (100 nm 为水合半径, 实际尺寸为 (11.8 ± 0.6) nm) 的产热效率与频率关系. 测试条件为 5 g[Fe]/L, 磁场强度 5.66 kA/m. 结果表明, 产热效率 (SAR) 与频率 (f) 在 100~900 kHz 范围内呈现很好的线性关系 (图 4a).

然而也有部分研究并没有表现出很好的线性关

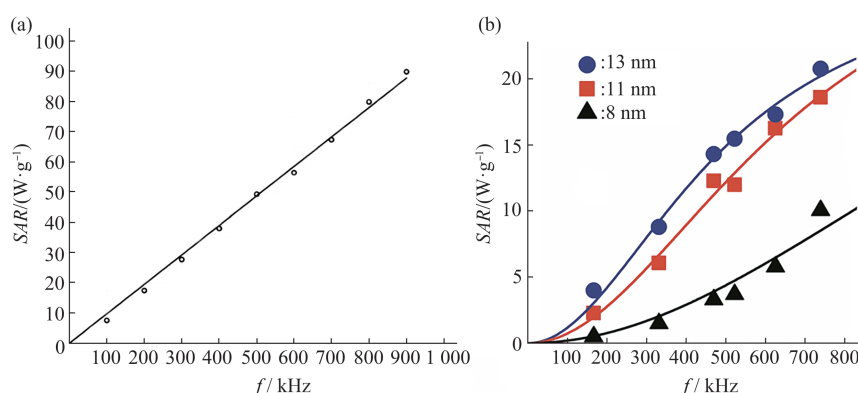


Fig. 4 SAR versus frequency

图4 磁热效率 (SAR) 与磁场频率 (f) 关系

(a) 商业化磁性材料Nanomag-D100nm SAR与 f 的线性拟合^[22]; (b) 不同尺寸磁赤铁矿SAR与 f 的非线性拟合^[19].

系, DeLa Presa 等^[19]对合成的不同粒径近乎超顺磁性磁赤铁矿, 在 50 g[Fe]/L、 $H=4$ kA/m 条件下, 测试了 f 从 166.0 kHz 到 739.2 kHz 共计 6 个频率时的产热效率 (SAR), 采用方程 $SAR = a \frac{\tau \times (2\pi f)^2}{1 + \tau^2 \times (2\pi f)^2}$ 对数据进行拟合, 结果表明 3 个粒径磁性材料的拟合情况都比较好, 指示产热效率 SAR 与频率 f 呈非线性相关 (图 4b)。此外, Deatsch 等^[23]曾基于 Rosensweig 超顺磁模型计算当 $0.01 < \omega = 2\pi f \tau < 10$ 时 SAR 与 ω 的关系, 其结果表明, SAR 与 ω 呈现非线性关系, 而弛豫时间 τ 仅为温度函数。因此, SAR 应当也与 f 呈非线性关系。值得注意的是, 使用上述方程拟合可以直接获得弛豫时间 τ , 有利于产热机制的分析。

这里需要指出的是, 对于多数磁性材料来说, 其产热效率 SLP 或 SAR 与磁场频率 f 都表现出较好的线性关系, 这可能是由于: a. 其虚部磁化率随频率变化较小, 可近似看做常数, 此时产热功率 P 正比于外磁场频率 f ; b. 外磁场频率 f 变化范围可能正好落在曲线的近直线部分, 如图 4b 中当 200 kHz $< f < 500$ kHz 时, 曲线近似一条直线, 这可能也是拟合出线性关系的原因之一; c. 对于磁滞损耗产热而言, 其磁滞产热功率 $P_h = f \oint M dH$, 显然正比于磁场频率 f 。

2.4.2 磁场强度

DeLa Presa 等^[19]测试了 100 g[Fe]/L 13 nm γ -Fe₂O₃ 在 $f=522.7$ kHz 条件下, 磁场强度从 0.8 kA/m

升至 7.5 kA/m, 增幅为 0.4 kA/m, 共计 18 个磁场强度下的产热情况, 并以方程 $SAR = c f H^2$ 对数据进行拟合, 发现数据拟合程度较好, 指示 $SAR \propto H^2$ (图 5a)。

而对于铁磁性或超顺磁-铁磁性混合样品的产热效率与磁场的关系, 则相对复杂。

Cobianchi 等^[24]基于热分解乙酰丙酮铁 [Fe(ACAC)₃] 制备了包被聚丙烯酸 (polyacrylic acid) 粒径为 10.2 nm、14.6 nm、19.7 nm 的 γ -Fe₂O₃, 并测试了 3 种粒径 γ -Fe₂O₃ 在 110 kHz、237 kHz、340 kHz 频率下, 磁场强度从 3.25 kA/m 升至 19 kA/m 过程中样品的产热情况。作者并没有采用经典的线性应答模型 (linear response theory, LRT) 拟合, 而是采用 $SLP = c H^x$ 拟合曲线, 通过 x 值的大小, 来判定 SLP 与 H 的关系。其拟合结果表明, 对于小粒径的 10.2 nm 的 γ -Fe₂O₃, $x \approx 2$, 而对于尺寸相对较大的 γ -Fe₂O₃ 来说, 其 x 的值逐渐增大至 2.3 (图 5b)。

Carrey 等^[25]依据朗之万顺磁定律认为, 当颗粒在外场中磁矩的塞曼能 (Zeeman energy) 与热能的比值 $\xi = \mu_0 M_s V H_{\max} / k_B T < 1$ 时, 颗粒处于超顺磁或近似超顺磁状态, 磁滞产热较弱或没有, 此时颗粒的产热效率 $SLP \propto H^2$; 当 $\xi \gg 1$, 颗粒最终进入多磁畴的状态时, 满足 Rayleigh 模型, 此时有 $SLP \propto H^3$; 而当颗粒尚未进入多磁畴范围, 仍处于单畴铁磁性时, 符合 Stoner-Wohlfarth 模型, 满足 $SLP \propto H^{2-3}$ 。

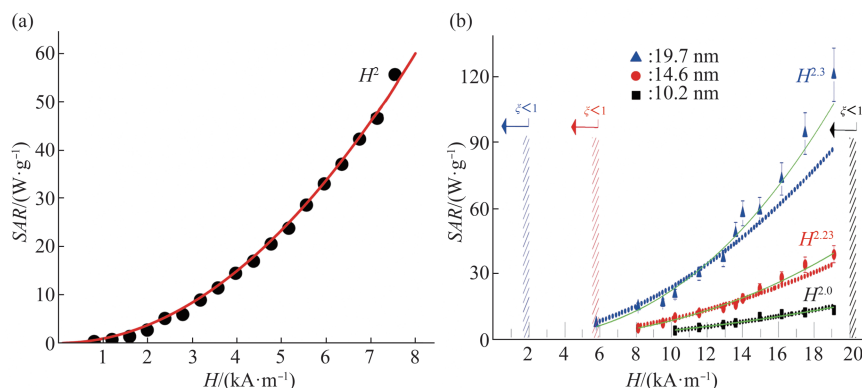


Fig. 5 SAR versus intensity.

图5 产热效率SAR与磁场场强H拟合曲线

SAR与H以方程 $SAR = c f H^2$ 拟合 (a)^[19], SAR与H以方程 $SAR = c H^x$ 拟合, 随着粒径的增大, x 逐渐增大 (b)^[24], 虚线表示以 $SAR = c H^2$ 拟合。

3 铁氧化物颗粒磁热疗的生物学效应

肿瘤细胞生长代谢旺盛,对铁的需求较大.结合受体靶向,磁性材料能够更多地聚集在肿瘤细胞内,有助于提高磁热效.另外,肿瘤区域血管生成迅速、血管较细、管壁较薄、流速相对较缓,因而不能及时地将热量散发出去,易引起热滞留,从而使得肿瘤区域的温度相对正常区域较高.

热疗的具体机制目前仍不是很明确.已有研究表明,磁热会引起细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)升高及蛋白质表达异常,如热休克蛋白家族Hsp70的表达量升高^[15, 26].另外,磁热还可能激活机体的免疫系统,提高机体免疫细胞对肿瘤细胞的识别杀伤能力^[27-28].目前认为,磁热疗细胞层面的损伤机制主要集中在细胞膜功能的变化、细胞骨架的坍塌、溶酶体内容物的逸出、线粒体凋亡途径、DNA的直接或间接损伤等几个方面.

3.1 细胞膜功能的变化

哺乳动物细胞膜通常由磷脂双分子层构成,其上镶嵌有跨膜蛋白等结构.当温度升高时,磷脂分子的运动加快,流动性增加,同时磷脂分子的有序性受到削弱,通透性增加;当温度进一步升高,可能会引起跨膜蛋白的变性或者从膜上脱落,导致跨膜蛋白功能失活,最终引起细胞膜结构的不可逆改变^[29].

Calatayud等^[30]基于聚丙烯酸和月桂酸(lauric acid, LA)包被的磁性纳米颗粒对小鼠小胶质细胞BV2孵育24 h后进行磁场处理,借助扫描电子显微镜(SEM)观察细胞的形貌变化、透射电子显微镜(TEM)观察磁性材料的细胞内定位. SEM观察发现,与对照组水浴加热BV2细胞表面凹陷或小孔分布相对均匀相比,磁热处理组细胞膜表面凹陷或小孔数目相对较少,但凹陷或小孔体积较大.结合聚焦离子束(FIB)切面观察,发现凹陷或小孔处存在大量的MNPs,存在一定的相关性;TEM观察发现,与对照组水热细胞膜结构由外至内的这种破坏相比,磁热对于细胞膜的破坏表现出较强的区域性,主要集中在MNPs附近.综合SEM与TEM的结果,强烈暗示了MNPs的热释放过程对于细胞膜结构的破坏作用.

3.2 细胞骨架的坍塌

细胞骨架包括微丝、微管和中间丝,起着机械

支撑与空间组织作用.当细胞骨架发生变化时,细胞的形态会随之发生变化,同时各种细胞器的分布也会发生异常.在磁场处理过程中,往往可以观察到细胞出现不同程度的肿胀或变形,这也暗示了细胞骨架的变化.

Calatayud等^[30]在对磁热处理后的细胞进行SEM和TEM观察时,发现细胞表面形成较大的凹陷,细胞内部出现较多的空洞,这表明在磁热过程中,除了对细胞膜的破坏作用外,可能还影响了细胞骨架的完整性,导致细胞的变形坍塌.

Prasad等^[31]对HeLa细胞的微管蛋白(tubulin)和肌动蛋白(actin)荧光标记后发现,空白对照组、单独磁场处理组和单独MNPs孵育组24 h后其微管蛋白与肌动蛋白的含量和分布没有明显的变化,而MNPs孵育后经磁场处理,微管蛋白与肌动蛋白迅速表现出不同程度的减少,并且随着时间的延长,其含量逐渐降低,24 h仅存在极少量的微管蛋白和肌动蛋白.其结果提示了在磁热处理过程中对于细胞骨架的损伤,且这一损伤随着时间的延长逐渐增加(图6).

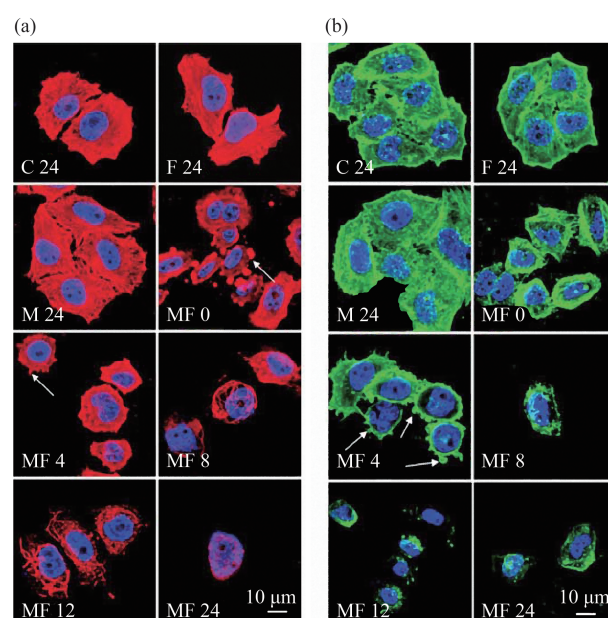


Fig. 6 Effects of MHT on HeLa cell nucleus (blue), microtubules (red) (a) and actin (green) (b)^[31]

图6 磁热对HeLa细胞核(蓝色)、微管(红色)(a)和肌动蛋白(绿色)(b)的影响

C为无处理组, F为磁场单独处理组, M为磁颗粒孵育组, MF为磁颗粒孵育后磁场处理组, 数字表示处理后时间. 箭头指示为出泡区域(修改自^[31]).

3.3 溶酶体内容物的逸出

溶酶体是细胞内的一种富含多种水解酶类的囊泡状细胞器, 参与胞外异物的消化降解和胞内物质的再循环. 研究表明, 多数磁性材料在进入细胞后转运至溶酶体中降解.

Creixell 等^[32]研究了基于共沉淀合成的 14 nm 磁铁矿并包覆羧甲基葡聚糖(carboxymethyl dextran, CMDx)后连接表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF), 靶向高表达该受体(EGFR)乳腺癌细胞MDA-MB-468的磁热疗效果. 结果发现, 尽管整个磁场处理过程(233 kHz、37.5 kA/m, 2 h)温度维持在(37±0.2)℃(起始温度37℃), 没有明显的温度变化, 但5 g/L磁性材料孵育细胞后磁热处理第5天统计细胞存活状况, 发现其活力普遍降至了对照组的0.05左右. 结合细胞水平定位发现磁性材料主要分布在溶酶体、小囊泡及细胞膜附近.

随后该研究组于2013年发表了关于这一相关机制的研究结果. 通过使用吖啶橙(acridine orange, AO)对乳腺癌细胞MDA-MB-231溶酶体进行标记, 利用流式细胞仪对这些细胞进行荧光强度筛选统计后发现, 磁场处理前后IO-CMDx-EGF实验组弱荧光细胞(指示有溶酶体破裂)的比例由11.08%增加到了42.32%, 其变化量是空白对照组的3倍, 同时也是过氧化氢阳性对照组的1.5倍左右, 暗示了磁场处理过程中溶酶体的泄露(leaking)或破裂(rupture). 另外, 在对溶酶体内半胱氨酸蛋白酶家族之一的组织蛋白酶B(cathepsins B)进行荧光底物标记后, 统计发现磁场作用前后实验组胞质中cathepsins B的含量增加了一倍. 综合其结果, Domenech 等^[33]认为, 磁性纳米材料进入细胞溶酶体后在磁场的作用下, 引起溶酶体膜完整性的改变(泄露或破裂), 其内容物如相关蛋白质水解酶进入到胞质中, 引起细胞的应激和/或级联反应, 最终导致细胞的死亡.

3.4 线粒体凋亡途径

线粒体是细胞内重要的能量产生与储存单位, 其内膜向内折叠成嵴, 其上分布有细胞色素. 当线粒体膜完整性或通透性发生变化, 其内膜上的细胞色素c转移至细胞质中, 诱发caspase依赖途径的内源性细胞凋亡通路. 另外, 线粒体内呼吸链产生能量的同时, 还会产生大量的活性氧, 当线粒体膜完整性受到破坏时, 细胞色素c转移至胞质中, 容易引起线粒体内部活性氧的累积. 过量的活性氧也可

能直接进入胞质中, 导致胞质中活性氧含量大幅度升高, 引起氧化应激, 并可能对DNA产生损伤, 最终触发凋亡.

目前磁热方面关于线粒体凋亡途径的研究较少, 可能是磁热的影响较为剧烈, 细胞响应较多, 因素相对复杂. 而水浴加热由于其温度可控性强, 较为温和, 因而也用来研究细胞热处理下的相关机制.

Wang 等^[34]对细胞进行不同温度(37℃、40℃、42℃)的水浴加热处理后发现, 细胞内ROS明显增加, 且随着水温的升高、处理时间的延长而增加. 在使用ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)和线粒体特异性的ROS清除剂Mito-TEMPO处理后发现, 细胞内ROS水平有所降低, 但Mito-TEMPO处理组的降低比例要高于NAC组, 且存在统计学差异, 这表明线粒体对于细胞内ROS的异常上升起着主要作用. 另外在对胞质以及线粒体中细胞色素c的含量进行检测后发现, 随着处理水温的升高, 细胞质中细胞色素c的含量逐渐增加, 线粒体中的含量逐渐减少, 而Mito-TEMPO处理组的胞质中细胞色素c含量明显降低至正常水平, 同时线粒体中的细胞色素c含量也恢复至正常水平. 该研究表明, 水热处理过程中, 可能破坏了线粒体膜的完整性或通透性, 使得内膜上的细胞色素c等物质进入细胞质中, 引起胞质中的活性氧升高, 进而引起细胞死亡.

3.5 DNA的损伤

DNA作为细胞重要的遗传物质, 其功能的正常行使, 对于细胞命运起着决定性的作用. 当DNA受到少量损伤时, 细胞会启动相关修复机制. 而当损伤无法完全修复或无法进行修复时, 则会引起细胞的凋亡.

Hilger 等^[35]曾基于不同温度(45℃~90℃)探讨DNA损伤修复与细胞活力的关系. 在对人乳腺癌细胞MX-1不同温度处理4 min后, 一部分直接进行彗星实验(comet assay)测定DNA损伤, 另一部分继续培养1 h后测定. 结果发现DNA的损伤随温度的升高逐渐增加, 且加热温度在50℃以下时(包括50℃), DNA的损伤是可被完全修复的, 当温度在55℃时, DNA的损伤只能修复部分, 当温度超过60℃时, 培养1 h后DNA的损伤增加, 并且与高温处理后继续培养组没有太大的差异. 细胞活力的检测同样表现出了相似的结果. 这暗示了加热过程中温度或者热量对于DNA的影响. 当热量较

低时, DNA 损伤较小, 可以被完全修复; 当热量较高, DNA 的损伤无法完全修复, 反而会诱导细胞凋亡, 进一步降解 DNA. 在对荷瘤鼠直接注射磁铁矿进行磁场处理 4 min 后分离肿瘤细胞进行彗星实验, 同样检测到 DNA 的大量损伤, 统计结果显示约占总 DNA 的 71.9% ($N=10$).

4 展 望

热疗作为肿瘤的重要疗法之一, 将逐步应用到更多类型的肿瘤治疗当中. 而磁热疗因其较高的产热效果及加热区域的高度可控, 也将在肿瘤热疗中绽放光彩. 尽管目前磁热疗已经应用到一些肿瘤的临床治疗当中, 但其应用程度还远不及放化疗, 且自身仍然存在一些问题. 首先, 磁热疗所使用的磁性材料目前缺乏科学的评估标准, 尽管一些磁性材料已经商业化生产, 但仍存在批次差异效应^[22], 影响最终的热疗效果. 其次, 磁热疗所需的仪器设备较少, 尽管有不少机构已经在研发相关设备且部分已经进入临床应用, 但其磁场条件较为单一, 只适用于一部分的磁性材料, 限制了磁热疗临床应用的发展. 最后, 磁热疗的作用机制和生物学效应目前仍然缺乏系统性的研究, 无论是在细胞水平还是动物水平.

未来磁热疗的发展方向, 在磁性纳米材料研发上, 要进一步提高其磁产热效率, 取得更好的疗效. 目前无论化学制备还是生物/仿生制备技术方法都取得一定进展, 但磁产热效率仍有提高的空间, 如提高颗粒的结晶度、适当增加颗粒的尺寸, 均能有效提高其饱和磁化强度, 此外, 过渡元素、稀土元素等掺杂合成高饱和磁化强度或高磁能面积的复合铁氧体材料、硬磁合金纳米材料等的开发, 均能进一步拓展磁产热效能. 同时, 也需尽快建立科学的评估标准, 兼顾疗效和安全性, 促进磁热用材料的开发. 在治疗应用上, 一方面结合纳米微球、抗体靶向(如磁性铁蛋白^[36]、磁性脂质体^[37])提高磁性纳米材料在肿瘤区域的富集, 并引入温度监测提高磁热疗过程的温度控制, 使用生物安全性更高的材料, 从而使得磁热疗更加的高效安全, 另一方面也将与其他肿瘤治疗方法联用, 增加整体的疗效. 随着新技术的进一步发展, 磁性纳米颗粒磁热疗在肿瘤治疗中将会发挥重要的作用并造福人类健康.

参 考 文 献

- [1] 陈万青, 孙可欣, 郑荣寿, 等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤, 2018, **27**(1): 1-14
Chen W Q, Sun K X, Zheng R S, *et al.* China Cancer, 2018, **27**(1): 1-14
- [2] Gilchrist R K, Medal R, Shorey W D, *et al.* Selective inductive heating of lymph nodes. Ann Surg, 1957, **146**(4): 596-606
- [3] Roussakow S. The history of hyperthermia rise and decline. Conference Papers in Medicine, 2013, **2013**: 1-40
- [4] Crile G. The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. Cancer Res, 1963, **23**(3): 372-380
- [5] 王宇瀛, 赵凌云, 王晓文, 等. 磁感应热疗治疗肿瘤研究进展和临床试验. 科技导报, 2010, **28**(20): 101-107
Wang Y Y, Zhao L Y, Wang X W, *et al.* Science & Technology Review, 2010, **28**(20): 101-107
- [6] 谢俊, 陈玲, 严长志, 等. 肿瘤靶向热疗用磁性纳米材料. 中国材料进展, 2016, **35**(08): 561-568
Xie J, Chen L, Yan C Z, *et al.* Materials China, 2016, **35**(08): 561-568
- [7] Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud W M a W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. Mater Design, 2017, **123**: 174-196
- [8] Laurent S, Dutz S, Hafeli U O, *et al.* Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Adv Colloid Interfac, 2011, **166**(1-2): 8-23
- [9] Rosensweig R E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2002, **252**(1-3): 370-374
- [10] Dunitz J D, Orgel L E. Electronic properties of transition-metal oxides-II. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1957, **3**(3-4): 318-323
- [11] Friák M, Schindlmayr A, Scheffler M. Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite. New Journal of Physics, 2007, **9**(1): 5-20
- [12] Pool V L, Klem M T, Holroyd J, *et al.* Site determination of Zn doping in protein encapsulated $\text{ZnFe}_3\text{-XO}_4$ nanoparticles. Journal of Applied Physics, 2009, **105**(7): 07B515
- [13] Pool V, Klem M, Jolley C, *et al.* Site determination and magnetism of Mn doping in protein encapsulated iron oxide nanoparticles. Journal of Applied Physics, 2010, **107**(9): 09B517
- [14] Yoon T J, Lee H, Shao H, *et al.* Highly magnetic core-shell nanoparticles with a unique magnetization mechanism. Angew Chem Int Ed Engl, 2011, **50**(20): 4663-4666
- [15] Zhou P, Zhao H, Wang Q, *et al.* Photoacoustic-enabled self-guidance in magnetic-hyperthermia $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$ nanoparticles for theranostics *in vivo*. Adv Health Mater, 2018, **7**(9): e1701201
- [16] Wang J, Zhao H, Zhou Z, *et al.* MR / SPECT imaging guided photothermal therapy of tumor-targeting $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$ nanoparticles *in vivo* with low mononuclear phagocyte uptake. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, **8**(31): 19872-19882
- [17] Garaio E, Collantes J M, Garcia J A, *et al.* A wide-frequency range

- AC magnetometer to measure the specific absorption rate in nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2014, **368**: 432-437
- [18] Sabale S, Jadhav V, Khot V, *et al.* Superparamagnetic MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Ni}, \text{Co}, \text{Zn}, \text{Mn}$) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications. *J Mater Sci-Mater M*, 2015, **26**(3): 127
- [19] De La Presa P, Luengo Y, Multigner M, *et al.* Study of heating efficiency as a function of concentration, size, and applied field in $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012, **116**(48): 25602-25610
- [20] Fortin J P, Wilhelm C, Servais J, *et al.* Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(9): 2628-2635
- [21] Ma M, Wu Y, Zhou H, *et al.* Size dependence of specific power absorption of Fe_3O_4 particles in AC magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, **268**(1-2): 33-39
- [22] Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, *et al.* Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, **321**(10): 1509-1513
- [23] Deatsch A E, Evans B A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2014, **354**: 163-172
- [24] Cobianchi M, Guerrini A, Avolio M, *et al.* Experimental determination of the frequency and field dependence of specific loss power in magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017, **444**: 154-160
- [25] Carrey J, Mehdaoui B, Respaud M. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: application to magnetic hyperthermia optimization. *Journal of Applied Physics*, 2011, **109**(8): 083921
- [26] 石永进, 虞积仁, 岑溪南, 等. 热疗促进 HSP70 表达对免疫效应细胞杀伤肿瘤的影响. *北京大学学报(医学版)*, 2005, **37**(2): 175-178
- Shi Y J, Yu J R, Cen X N, *et al.* *Journal of Peking University. Health Sciences*, 2005, **37**(02): 175-178
- [27] 齐宝宁, 王小平, 王希楠, 等. 热疗对免疫细胞的影响及机制. *现代肿瘤医学*, 2018, **26**(16): 2635-2639
- Qi B N, Wang X P, Wang X N, *et al.* *Modern Oncology*, 2018, **26**(16): 2635-2639
- [28] Kobayashi T, Kakimi K, Nakayama E, *et al.* Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. *Nanomedicine (Lond)*, 2014, **9**(11): 1715-1726
- [29] Lepock J R. Involvement of membranes in cellular responses to hyperthermia. *Radiat Res*, 1982, **92**(3): 433-438
- [30] Calatayud M P, Soler E, Torres T E, *et al.* Cell damage produced by magnetic fluid hyperthermia on microglial BV2 cells. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 8627
- [31] Prasad N K, Rathinasamy K, Panda D, *et al.* Mechanism of cell death induced by magnetic hyperthermia with nanoparticles of gamma- $\text{MnxFe}_2\text{-xO}_3$ synthesized by a single step process. *J Mater Chem*, 2007, **17**(48): 5042-5051
- [32] Creixell M, Bohorquez A C, Torres-Lugo M, *et al.* EGFR-targeted magnetic nanoparticle heaters kill cancer cells without a perceptible temperature rise. *ACS Nano*, 2011, **5**(9): 7124-7129
- [33] Domenech M, Marrero-Berrios I, Torres-Lugo M, *et al.* Lysosomal membrane permeabilization by targeted magnetic nanoparticles in alternating magnetic fields. *ACS Nano*, 2013, **7**(6): 5091-5101
- [34] Wang Z, Cai F, Chen X, *et al.* The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in hyperthermia-induced platelet apoptosis. *Plos One*, 2013, **8**(9): e75044
- [35] Hilger I, Rapp A, Greulich K O, *et al.* Assessment of DNA damage in target tumor cells after thermoablation in mice. *Radiology*, 2005, **237**(2): 500-506
- [36] Cao C, Wang X, Cai Y, *et al.* Targeted *in vivo* imaging of microscopic tumors with ferritin - based nanoprobe across biological barriers. *Advanced Materials*, 2014, **26**(16): 2566-2571
- [37] Gogoi M, Jaiswal M K, Sarma H D, *et al.* Biocompatibility and therapeutic evaluation of magnetic liposomes designed for self-controlled cancer hyperthermia and chemotherapy. *Integr Biol (Camb)*, 2017, **9**(6): 555-565

Magnetic Hyperthermia Using Iron Oxides Nanoparticles*

XU Huang-Tao^{1,2)}, REN Wei^{1,2)}, PAN Yong-Xin^{1,2)**}

⁽¹⁾*Institute of Geology and Geophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;*

⁽²⁾*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

Abstract Hyperthermia is a major method for cancer treatment besides surgery, radiotherapy and chemotherapy. It has been increasingly applied to prostate cancer, brain tumors, *etc.* in preclinical and/or clinical. In this review, we discuss the physical mechanism, influencing factors of magnetothermal effect, and biologic effects of current magnetic hyperthermia treatment using iron oxides nanoparticles.

Key words nano iron oxides, magnetothermal mechanism, cell membrane system damage, DNA damage

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0218

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (41621004) and The Key Program of Chinese Academy of Sciences (QYZDJ-SSW-DQC024).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-82998406, E-mail: yxpan@mail.iggcas.ac.cn

Received: August 6, 2018 Accepted: January 30, 2019