

## · 实验研究 ·

## 磁导向下磁性化疗药物脑内定位分布的实验研究\*

李安民 张传秀 傅相平 张志文 薛菁晖 闫润民 易林华

(解放军总医院 304 临床部神经外科 首都脑胶质瘤治疗中心 北京 100037)

【摘要】 目的 研究磁导向下磁性药物载体在脑内定位分布的特性,探讨恶性脑肿瘤的磁导向化疗的新途径。方法 90 只 SD 大鼠随机分为 3 组:①磁导向组( $n=30$ ):将合成的磁微球-白蛋白-甲氨蝶呤载体(FM-HSA-MTX)混悬液经尾静脉注入体内,右侧大脑外置一梯度磁场;②非磁导向组( $n=30$ ):只注入混悬液,无外置磁场;③对照组( $n=30$ ):注入甲氨蝶呤 25 mg/kg,外置磁场。3 组分别在给药后 15、30、45 min 随机取 10 只处死,测量甲氨蝶呤(MTX)在大鼠左右大脑内的含量。结果 给药后 15 min 时,磁导向组导向侧(右侧)大脑 MTX 含量显著高于非磁导向组和对照组(磁导向组  $0.285 \pm 0.025$  mg/g,非磁导向组  $0.103 \pm 0.018$  mg/g,对照组  $0.137 \pm 0.024$  mg/g,  $q_{\text{磁导向组-非磁导向组}} = 25.527$ ,  $P < 0.05$ ,  $q_{\text{磁导向组-对照组}} = 20.758$ ,  $P < 0.05$ ),对照组高于非磁导向组( $q_{\text{非磁导向组-对照组}} = 4.769$ ,  $P < 0.05$ )。30、45 min 时磁导向组高于非磁导向组和对照组,非磁导向组与对照间无显著差异。给药后磁导向组大脑 MTX 含量升高,45 min 时达最高( $0.564 \pm 0.018$  mg/g,  $q_{15-45} = 32.252$ ,  $P < 0.05$ ),而非磁导向组和对照组导向侧大脑内 MTX 含量给药后 45 min 时含量较前下降(非磁导向组  $0.060 \pm 0.015$  mg/g,  $q_{15-45} = 9.245$ ,  $P < 0.05$ , 对照组  $0.074 \pm 0.045$  mg/g,  $q_{15-45} = 6.299$ ,  $P < 0.05$ )。给药后 45 min 磁导向组导向侧大脑内 MTX 含量较左侧明显高( $t_{45 \text{ min}} = 21.135$ ,  $P = 0.000$ )。非磁导向组与对照组左右两侧脑内 MTX 含量无显著性差异(非磁导向组  $t_{45 \text{ min}} = 0.434$ ,  $P = 0.670$ , 对照组  $t_{45 \text{ min}} = 0.533$ ,  $P = 0.600$ )。结论 磁性药物载体在磁导向下能在大脑靶部位定位分布。

【关键词】 磁性药物载体; 磁场; 大脑; SD 大鼠

中图分类号 R-332

文献标识 A

文章编号 1009-6604(2005)05-0409-03

**Distribution of the magnetic chemotherapeutic agent in the brain under magnetic drug targeting: An experimental study** Li Anmin, Zhang Chuanxiu, Fu Xiangping, et al. Department of Neurosurgery, No. 304 Clinical Centre of the PLA General Hospital, Beijing 100037, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the distribution features of magnetic drug carrier in brain under magnetic drug targeting, and to explore the new option of magnetic targeting chemotherapy for malignant brain tumor. **Methods** Ninety SD rats were randomly divided into three groups. ① Targeting Group ( $n=30$ ): A suspended liquid of ferrofluid microsphere human serum albumin methotrexate (FM-HSA-MTX) carriers was injected into systemic circulation via the caudal vein and a gradient magnetic field was located over the right brain. ② Non-Targeting Group ( $n=30$ ): The suspended liquid was injected, without external magnetic field. ③ Control Group ( $n=30$ ): The methotrexate (MTX) was injected, with external magnetic field. Ten rats in each group were randomly selected for sacrifice at 15 min, 30 min and 45 min after drug administrations, respectively. MTX levels in both sides of brain of each rat were measured. **Results** At 15 min after drug administration, MTX content was significantly higher in the targeting side in the Targeting Group than in the Non-Targeting Group and the Control Group (Targeting Group:  $0.285 \pm 0.025$  mg/g, Non-Targeting Group:  $0.103 \pm 0.018$  mg/g, Control Group:  $0.137 \pm 0.024$  mg/g;  $q_{\text{targeting-non-targeting}} = 25.527$ ,  $P < 0.05$ ,  $q_{\text{targeting-control}} = 20.758$ ,  $P < 0.05$ ). The MTX content was significantly higher in the Control Group than in the Non-Targeting Group ( $q_{\text{non-targeting-control}} = 4.769$ ,  $P < 0.05$ ). At 30 min and 45 min after drug administration, the MTX level was higher in the Targeting Group than in the Non-Targeting Group and the Control Group and difference between the Non-Targeting Group and the Control Group was not significant. The MTX content came to its highest level in the Targeting Group ( $0.564 \pm 0.018$  mg/g,  $q_{15-45} = 32.252$ ,  $P < 0.05$ ) at 45 minutes, while descended in other two groups as compared to levels at 15 minutes (Non-Targeting Group  $0.060 \pm 0.015$  mg/g,  $q_{15-45} = 9.245$ ,  $P < 0.05$ ; Control Group  $0.074 \pm 0.045$  mg/g,  $q_{15-45} = 6.299$ ,  $P < 0.05$ ). At 45 min after drug administration, the MTX content in the Targeting Group was significantly higher in the targeting side (right side) than in the left side ( $t_{45 \text{ min}} = 21.135$ ,  $P = 0.000$ ), whereas no difference was seen in the Non-Targeting Group and the Control Group between left and right sides (Non-Targeting Group  $t_{45 \text{ min}} = 0.434$ ,  $P = 0.670$ ; Control Group:  $t_{45 \text{ min}} = 0.533$ ,  $P = 0.600$ ). **Conclusions** Under magnetic drug targeting, magnetic drug carrier can be distributed in the target area in the brain.

【Key Words】 Magnetic drug carrier; Magnetic field; Brain; SD rat

铁磁流体负载化疗药物在外磁场的作用下靶向治疗恶性肿瘤是提高肿瘤局部药物浓度,减少其随血流全身分布的有效方法。我们研究了磁微球-白

蛋白-甲氨蝶呤载体(FM-HSA-MTX)系统在头部外置永磁场下 SD 大鼠大脑半球内甲氨蝶呤(MTX)含量的分布特征,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 磁微球-白蛋白-甲氨蝶呤载体制备

精确称取甲氨蝶呤、N-羟基琥珀酰亚胺和二乙基碳化二亚胺等摩尔混合,溶解于尽可能少的N,N-甲酰胺中,室温下搅拌2 h,然后于4℃放置18 h,在干燥条件下减压抽滤得上清液,4℃保存待用。取人血白蛋白1.0 g,加60 ml 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),搅拌溶解,室温搅拌下缓慢滴加甲氨蝶呤活化液(上清液)4.5 ml,继续搅拌3 h,4℃时透析3 h,换水5次,直至透析液无色为止。将35%磁微球悬液与上述甲氨蝶呤-白蛋白结合物溶液等体积混合,4℃下搅拌3 h,制备成磁微球-白蛋白-甲氨蝶呤(FM-HSA-MTX)载体混悬液,待用。

1.2 动物分组

取健康SD大鼠90只,体重200~220 g,雌雄不拘,按随机数字表随机分为3组,每组30只。磁导向组:腹腔内注射戊巴比妥钠(45 mg/kg),麻醉后固定在操作台上。头部右侧置梯度聚焦磁场(西北工业大学制造,磁感应强度0.72 T),经尾静脉注入磁性药物混悬液(含MTX 3 mg/kg),分别在10、30、45 min移去磁场,按随机数字表每个时点取10只,腹主动脉抽血分批处死动物,迅速取出大脑,蒸馏水洗去血迹,滤纸浸干,-20℃低温冰箱冻存待用。非磁导向组:给药、标本采集、观察时间及方法同磁导向

组,但无头部外置磁场。对照组(单纯MTX对照组):同样随机分3批,每批10只,单纯MTX溶液3 mg/kg,盐水稀释后尾静脉注射,标本采集、观察时间及方法同磁导向组。

1.3 MTX含量测定

高效液相色谱仪测定。

1.4 统计分析

采用SPSS10.0,单因素方差分析比较各组间不同时间点差异,同组左右两侧用配对资料t检验,P<0.05为差异显著,P<0.01为差异非常显著。

2 结果

各组左右两侧大脑内不同时间点MTX含量及统计分析值见表1。

2.1 3组间比较:注药后15 min,磁导向组导向侧(右侧)大脑MTX含量显著高于非磁导向组和对照组( $q_{\text{磁导向组-非磁导向组}}=25.527, P<0.05$ ;  $q_{\text{磁导向组-对照组}}=20.758, P<0.05$ ),对照组高于非磁导向组( $q_{\text{非磁导向组-对照组}}=4.769, P<0.05$ );30、45 min时磁导向组高于非磁导向组和对照组,非磁导向组与对照间无显著差异,45 min时磁导向组导向侧(右侧)大脑内MTX含量( $0.564\pm0.018$ )mg/g是非磁导向组右侧大脑MTX含量( $0.060\pm0.015$ )mg/g的9.4倍,是对照组( $0.074\pm0.045$ )mg/g的7.6倍。磁导向组非导向侧大脑内MTX含量与非磁导向组和对照组比较亦有显著差别。

表1 各组大鼠左、右大脑内不同时间点MTX含量( $\bar{x}\pm s$ ) mg/g

组别	左侧大脑			F、P值	q、P值	右侧大脑			F、P值	q、P值
	15 min (n=10)	30 min (n=10)	45 min (n=10)			15 min (n=10)	30 min (n=10)	45 min (n=10)		
磁导向组(1)	0.206 ±0.020	0.277 ±0.019	0.295 ±0.036	$F=32.29$ $P=0.000$	$q_{15-30}=8.574, P<0.05$ $q_{15-45}=10.748, P<0.05$ $q_{30-45}=2.174, P>0.05$	0.285 ±0.025	0.378 ±0.036	0.564 ±0.018	$F=6269.68$ $P=0.000$	$q_{15-30}=10.751, P<0.05$ $q_{15-45}=32.252, P<0.05$ $q_{30-45}=21.501, P<0.05$
非导向组(2)	0.102 ±0.012	0.108 ±0.011	0.064 ±0.025	$F=19.19$ $P=0.000$	$q_{15-30}=1.102, P>0.05$ $q_{15-45}=6.977, P<0.05$ $q_{30-45}=8.078, P<0.05$	0.103 ±0.018	0.111 ±0.010	0.060 ±0.015	$F=34.78$ $P=0.000$	$q_{15-30}=1.720, P>0.05$ $q_{15-45}=9.245, P<0.05$ $q_{30-45}=10.965, P<0.05$
对照组(3)	0.145 ±0.012	0.105 ±0.011	0.082 ±0.015	$F=62.22$ $P=0.000$	$q_{15-30}=9.897, P<0.05$ $q_{15-45}=15.588, P<0.05$ $q_{30-45}=5.691, P<0.05$	0.137 ±0.024	0.110 ±0.020	0.074 ±0.045	$F=9.99$ $P=0.000$	$q_{15-30}=2.700, P>0.05$ $q_{15-45}=6.299, P<0.05$ $q_{30-45}=3.599, P<0.05$
F、P值	$F=119.08$ $P=0.000$	$F=482.21$ $P=0.000$	$F=230.79$ $P=0.000$			$F=184.21$ $P=0.000$	$F=398.42$ $P=0.000$	$F=960.20$ $P=0.000$		
q、P值	$q_{1-2}=21.717$ $P<0.05$ $q_{1-3}=12.738$ $P<0.05$ $q_{2-3}=8.979$ $P<0.05$	$q_{1-2}=37.695$ $P<0.05$ $q_{1-3}=38.365$ $P<0.05$ $q_{2-3}=0.669$ $P>0.05$	$q_{1-2}=27.312$ $P<0.05$ $q_{1-3}=25.184$ $P<0.05$ $q_{2-3}=2.128$ $P>0.05$			$q_{1-2}=25.527$ $P<0.05$ $q_{1-3}=20.758$ $P<0.05$ $q_{2-3}=4.769$ $P<0.05$	$q_{1-2}=34.508$ $P<0.05$ $q_{1-3}=34.637$ $P<0.05$ $q_{2-3}=0.129$ $P>0.05$	$q_{1-2}=54.411$ $P<0.05$ $q_{1-3}=52.900$ $P<0.05$ $q_{2-3}=1.511$ $P>0.05$		

2.2 组内不同时间点比较:给药后磁导向组左、右侧大脑MTX含量升高,45 min时达最高( $q_{15-45(\text{左})}=10.748, P<0.05$ ;  $q_{15-45(\text{右})}=32.252, P<0.05$ ),而非磁导向组和对照组左右侧大脑内MTX含量给药后30 min与15 min时接近,在45 min时含量较前下降(非磁导向组  $q_{15-45(\text{右})}=9.245, P<0.05$ ,对照

组  $q_{15-45(\text{右})}=6.299, P<0.05$ )。

2.3 3组大脑左、右侧MTX含量比较:在3个时点,磁导向组导向侧大脑内MTX含量较非导向侧大脑MTX含量明显高( $t_{15\text{ min}}=7.803, P=0.000$ ;  $t_{30\text{ min}}=7.846, P=0.000$ ;  $t_{45\text{ min}}=21.135, P=0.000$ )。45 min时右侧大脑内MTX含量( $0.564\pm$

0.018) mg/g 是左侧( 0.295 ± 0.036 ) mg/g 的 1.9 倍,非磁导向组与对照组左右两侧脑内 MTX 含量差异无显著性(非磁导向组:  $t_{15\text{ min}} = -0.146$ ,  $P = 0.885$ ;  $t_{30\text{ min}} = -0.638$ ,  $P = 0.531$ ;  $t_{45\text{ min}} = 0.434$ ,  $P = 0.670$ ; 对照组:  $t_{15\text{ min}} = 0.943$ ,  $P = 0.358$ ;  $t_{30\text{ min}} = -0.693$ ,  $P = 0.497$ ;  $t_{45\text{ min}} = 0.533$ ,  $P = 0.600$  )。

### 3 讨论

通过静脉途径使用化疗药物,药物均匀分布在全身循环中,药物在到达肿瘤前要经过同血浆蛋白结合、肝肾代谢、分解、廓清等,对肿瘤缺乏特异亲和性,最终只有少量药物到达肿瘤部位血管,进入肿瘤起直接杀伤作用的药物浓度很有限。即使通过动脉途径,由于瘤区血循环时间短,只能有一过性药物高浓度,不能长时间维持。

靶向药物治疗恶性肿瘤通过特异或非特异的方法能使治疗因子定向在靶部位积聚,提高了药物浓度,延长了持续时间。磁靶向载体可携带多种抗肿瘤因子<sup>[1]</sup>,已有磁导向药物化疗在胃肠道癌症的实验研究和临床试验研究报道<sup>[2-5]</sup>。Devineni 等<sup>[6]</sup>分析了磁性药物载体在大鼠胶质瘤模型大脑及其他组织的分布,发现靶区药物浓度高出其他部位近 6 倍左右,但没有比较左右大脑在磁导向时其药物分布情况。其合成的磁性微球中药物的交联率只有 5%,所以为了增加药物浓度必须给予大量磁性药物载体,大量的磁性微球在磁场作用下很容易集聚,导致血栓形成,阻塞血管。我们采用的磁微球-白蛋白-甲氨蝶呤载体混悬液,微球直径 0.5 ~ 3 μm,能顺利通过毛细血管,药物交联率达 45% 左右,具有很强的磁响应性,且交联的 MTX 以受控的方式缓释出来,靶区 MTX 保持一定的浓度,因而携载化疗药物到靶部位的效率较高。

本研究结果显示,注射载体后 15 分钟 MTX 即在靶区积聚,注药后 15 min,磁导向组导向侧(右侧)大脑 MTX 含量显著高于非磁导向组和对照组,对照组高于非磁导向组。含量随时间延长逐渐增加,30、45 min 时磁导向组高于非磁导向组和对照组,但非磁导向组与对照间无显著差异,45 min 时磁导向组导向侧大脑内 MTX 平均含量(0.564 ± 0.018) mg/g 是非磁导向组右侧大脑 MTX 平均含量(0.060 ± 0.015) mg/g 的 9.4 倍,是对照组(0.074 ± 0.045) mg/g 的 7.6 倍。同一时点,磁导向组磁导向侧(右侧)大脑内 MTX 含量与非磁导向侧(左侧)大脑 MTX 含量比亦有显著差别,45 min 时右侧(0.564 ± 0.018) mg/g 是左侧(0.295 ± 0.036) mg/g 的 1.9 倍,而非磁导向组与对照组左、右侧大脑内 MTX 含量相差不显著,提示磁性药物载体在磁场作用下可在靶向侧聚集。磁导向组非导向侧(左侧)大脑内 MTX 含量与非磁导向组和对照组左侧比较亦有显著差别,提示磁导向对侧亦受到磁效应的影响,与外磁场的强度和梯度有关。随着时间的延长,磁导向组靶部位大脑 MTX 含量逐渐增加,提示在外磁场作用下磁性药物载体聚集越多,MTX 有逐渐蓄积的效应。而非磁导向组与对照组随时间延

长,右侧大脑内 MTX 含量下降,45 min 时含量较 15 min 时明显下降,提示磁性药物载体缓释药物的特性,而非磁导向组和对照组 MTX 随血液代谢,局部药物浓度下降。磁导向改变了化疗药物随血液分布的特征,使得靶区药物浓度逐渐增高,从而保持局部化疗的有效浓度。同期进行的血细胞、肝肾功监测能显示化疗药在非靶向区浓度低,对肝、肾及骨髓的毒性减轻<sup>[7]</sup>。

磁场的性质、强度、梯度的大小及作用时间,也是影响磁导向的直接因素。在本实验中选用聚焦磁场,强度 0.72 T,具有一定的梯度 0.27 T/cm<sup>2</sup>。Alexiou 等<sup>[4]</sup>通过研究提出,当磁场强度大于 0.4 T/h 后,即使增加磁场度,作用在磁性微球上的磁引力也不再增加,而磁场梯度则可明显增加对磁微球的作用力。这说明在磁性微球定向聚集方面,磁场梯度比磁场强度更重要。受铁磁载体与抗肿瘤制剂性质的影响,交联率、形成微球的大小、药物吸附解脱时间等因素可影响其携载到靶区的效率和积聚时间的长短<sup>[8]</sup>。外磁体的形状、外磁场的强度、梯度是决定化疗药物定位准确性和浓度高低的重要因素,电磁铁可能在磁场强度、梯度及磁场调节等方面有优势<sup>[9]</sup>。本实验也显示了磁导向组在非导向侧(左侧大脑)MTX 含量与对照组比亦升高,可能与磁场强度、作用范围有关。进一步探讨磁靶向定位的准确性,从靶区、靶血管、靶器官、到靶细胞(肿瘤细胞),对完善磁靶向系统有重要意义。

实验研究表明铁磁流体携载化疗药物靶向治疗恶性肿瘤可提高抗肿瘤制剂在靶区的浓度,延长作用时间,进而可能提高疗效,减少了化疗药物在全身的代谢浓度,减轻了副反应。

### 参考文献

- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* 2000; 60: 6641-6648.
- 陶凯雄, 陈道达, 王国斌, 等. 阿霉素磁性蛋白微球靶向治疗胃癌的实验研究及临床应用. *中华外科杂志*, 1999; 37: 205-208.
- 周平红, 姚礼庆, 秦新裕, 等. 磁性阿霉素脂质体靶向治疗裸鼠大肠癌的实验研究. *中华医学杂志* 2003; 83: 2073-2076.
- Alexiou C, Jurgons R, Schmid RJ, et al. Magnetic drug targeting - biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J Drug Target* 2003; 11: 139-149.
- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, et al. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* 2000; 60: 6641-6648.
- Devineni D, Gallo JM, Klein SA. Tissue distribution of methotrexate following administration as a solution and as a magnetic microsphere conjugate in rats bearing brain tumors. *J Neurooncol* 1995; 24: 143-152.
- Alexiou C, Jurgons R, Schmid RJ. Magnetic drug targeting - biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J Drug Target* 2003; 11: 139-149.
- Rudge S, Peterson C, Vessely C. Absorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC). *J Control Release* 2001; 74: 335-340.
- Nobuto H, Sugita T, Kubo T. Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet. *Int J Cancer* 2004; 109: 627-635.

(收稿日期 2004-05-27)

(修回日期 2004-10-18)