

## • 实验研究 •

热籽感应加温对荷瘤小鼠治疗效果的实验研究<sup>\*</sup>夏启胜 刘 轩 徐 波 李红艳 徐 梅 潘 琳 胡润磊<sup>①</sup> 李利亚 孙光飞<sup>②</sup> 祁毓俊<sup>②</sup> 唐劲天<sup>\*\*</sup>

(中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

**【摘要】 目的** 探讨热籽感应加温对荷瘤小鼠的治疗效果。 **方法** 50 只接种 B<sub>16</sub> 黑色素瘤的 C57/BL 小鼠随机分为两部分, 第一部分 7 只, 植入热籽后在磁场中加热 20 min, 分别对肿瘤中心、边缘和小鼠体温进行监测, 加温结束后取下肿瘤组织, 10% 甲醛固定, 组织学切片评估加热后肿瘤坏死情况。第二部分共 43 只小鼠, 小鼠接种肿瘤后随机分为空白对照组 (10 只)、磁场对照组 (10 只)、热籽对照组 (10 只)、加温治疗组 (13 只), 用于加温后小鼠生存期观察和瘤体大小动态观察。 **结果** 肿瘤中心位置加热 5 min 便可达到 46 ℃, 之后达到平台期, 保持在 50 ℃ 左右, 而整个加温过程中小鼠体温无明显变化。加热后热籽周围肿瘤组织呈现凝固性坏死, 加温治疗组 60% (6/10) 小鼠肿瘤生长受到抑制, 生存期延长 ( $P=0.0136$ , 同空白对照组相比较)。 **结论** 热籽组合在小鼠肿瘤内可以取得较好的加热效果, 单次较短时间的热籽感应加温治疗对荷瘤小鼠肿瘤生长有一定抑制作用, 延长小鼠生存期。

**【关键词】** 热籽; 热疗; 感应加温; 肿瘤; 交变磁场

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2007)11-1031-04

**Effect of Thermoseed Inductive Heating on Tumor-bearing Mice** Xia Qisheng, Liu Xuan, Xu Bo, et al. Department of Oncology-Molecular Biology, Institute of Clinical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

**【Abstract】 Objective** To evaluate the therapeutic effect of thermoseed inductive heating on tumor-bearing mice. **Methods** Fifty C57/BL mice inoculated with B<sub>16</sub> melanoma cells were randomly divided into two groups. Group 1 (7 mice) was implanted with thermoseed and heated in an alternating magnetic field for 20 minutes. Temperatures of the tumor center, tumor edge, and the rectum of the mice were monitored during the heating procedure. After the heating treatment, the mice were sacrificed, and the tumor was resected and fixed with 10% formalin. The necrosis of the tumor was evaluated histologically. The Group 2 (43 mice) was randomly divided into four subgroups: C group (control group, 10 mice), M group (magnetic control group, 10 mice), T group (thermoseed control group, 10 mice), and H group (heating treatment group, 13 mice). The tumor size and survival time of each group were observed continuously after the treatments. **Results** The temperature of the tumor center reached 46 ℃ within 5 minutes, and then maintained at 50 ℃. No significant change of the rectal temperature was detected during the heating procedure. The tumor tissues around the thermoseeds showed coagulation necrosis after heating. In the H group, the tumor growth was inhibited in 6 of the 10 mice (60%). The survival time of the H group was significantly longer than that in the control group ( $P=0.0136$ ). **Conclusions** Thermoseeds array can achieve promising heating effects in tumor-bearing mice. Single and short-time thermoseed inductive heating can inhibit the tumor growth and prolong the survival time of the mice.

**【Key Words】** Thermoseed; Hyperthermia; Inductive heating; Tumor; Alternating magnetic field

热籽感应加温是在射频感应加温技术的基础上发展起来的肿瘤微创治疗新技术<sup>[1]</sup>, 它是指通过经皮穿刺或术中植入等方法将热籽植入到肿瘤区域, 然后置于交变磁场中, 热籽因为涡电流等机制产热并传递到周围组织, 使肿瘤区域温度升高到需要的温度而达到治疗肿瘤的目的。同传统加温方法相比, 该加温技术具有可适形、自控温、内加热、温差大、可重复等特点<sup>[2-4]</sup>, 在肿瘤加温治疗中具有较好

的应用前景。本文探讨热籽感应加温对接种 B<sub>16</sub> 黑色素瘤 C57/BL 小鼠治疗效果, 为这一肿瘤微创热疗新技术的进一步发展和完善提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与设备

热籽: 为镍-铜合金, 居里点为 57 ℃, 72% 镍、27% 铜, 直径 0.9 mm, 长约 1.1 cm, 与北京科技大学

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271465, 10645005 和 30571779), 北京市科技计划项目 (编号 H030230160130), 清华大学裕元医学基金 (20240000519)

\*\* 通讯作者 (清华大学工程物理系医学物理与工程研究所, 北京 100084)

① (杭州市第一人民医院胸外科, 杭州 310006)

② (北京科技大学材料科学与工程学院, 北京 100083)

金属物理研究室合作研制。交变磁场仪:型号 SP-04ABC 4 kW, 频率 100 ~ 250 kHz, 加热电流 100 ~ 450 A, 感应线圈直径 5 cm, 4 匝双股, 由深圳双平电源技术有限责任公司制造。温度测量与记录系统:测温探头为 IT-18 型铜-康铜热电偶, 直径 1 mm, 温度响应时间 0.1 s, 由美国 Physitemp 公司制造。温度显示装置, 为四通道数显仪, 型号 XS01A-4, 由北京昆仑天辰仪表科技有限公司制造, 数显仪连接计算机对数据进行记录并存盘。其它设备:美国 Thermo 公司 Forma 3111 型二氧化碳细胞培养箱; DL-CJ-1N 高性能无菌实验台, 购自哈尔滨东联电子技术开发有限公司北京分公司; 穿刺针与测温套管, 中日友好医院放射肿瘤科提供; TOSHIBA KXO 15R 型 X 光机。

## 1.2 主要试剂

DMEM 培养基为美国 GIBCO 公司产品; 胰蛋白酶为 GIBCO 公司产品; 小牛血清为 SIGMA 公司产品; 速眠新 II (麻醉剂), 购自长春军需大学兽医研究所; 甲醛溶液为北京旭东化工厂产品。

## 1.3 细胞培养和实验动物肿瘤模型的建立

1.3.1 细胞株 B<sub>16</sub> 黑色素瘤细胞, 购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.3.2 细胞培养 B<sub>16</sub> 细胞接种于 DMEM 培养基 (含 10% 小牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 庆大霉素), 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。隔日 5% 胰蛋白酶消化传代。

1.3.3 实验动物 选用健康 C57/BL 小鼠 50 只, 购自北京维通利华实验动物中心, 雄性, 8 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 在 (23 ± 2) °C 室温下饲养。

1.3.4 肿瘤接种 当培养的肿瘤细胞达到需要浓度后, 取 5 只 C57/BL 小鼠, 接种于皮下, 10 天左右后待小鼠肿瘤长到 1.5 ~ 2 g 时, 离断法处死小鼠, 在无菌条件下, 切开皮肤, 钝性剥离皮下肿瘤, 切去包膜、血块及坏死组织, 将选取的肿瘤组织放入玻璃匀浆器中, 150 目金属丝网过滤, 用无菌生理盐水研磨成悬液, 使每 0.1 ml 悬液含 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup> 个细胞, 每克肿瘤约可提供 10 只实验用小鼠接种。接种于小鼠右侧腋部皮下。接种后 10 天左右肿瘤长到直径约 1 cm 时随机分组 (随机数字表分组法), 开始实验。

## 1.4 实验动物分组

全部荷瘤小鼠分为两部分, 分别进行以下实验: ①加温时瘤体温度监测和肿瘤组织病理学观察; ②分组加温疗效实验。

第一部分: 加温时瘤体温度监测和肿瘤组织病理学观察, 共 7 只, 分别在小鼠瘤体内植入 2 颗长 1.1 cm 左右平行排列的热籽, 置于交变磁场内加热, 使热籽长轴方向与磁场方向平行。每只小鼠选择 3 个测温点, 分别为瘤体内、肿瘤旁正常组织、小鼠体温 (肛温)。加热 20 min。加热完成后分别处死小鼠, 取下肿瘤组织, 10% 甲醛固定, 组织学染色

切片, 观察加热后肿瘤组织坏死情况。

第二部分: 分组加温疗效实验, 分成四组, 3 个对照组每组 10 只小鼠, 加温治疗组 13 只。空白对照组 (C 组): 对荷瘤小鼠不做任何处理; 磁场对照组 (M 组): 将荷瘤小鼠在同样磁场中放置 10 min; 热籽对照组 (T 组): 仅在小鼠瘤体内植入 2 颗长 1.1 cm 左右的热籽, 不进入磁场加温; 加温治疗组 (H 组): 处理方法为 T 组 + M 组, 即瘤体内平行植入 2 颗热籽后, 在磁场内加温 10 min。用游标卡尺对每组小鼠肿瘤平均直径 (mean diameter, MD) 进行监测, 每 2 天测量一次, 测出最大直径 (a) 和垂直方向最大直径 (b),  $MD = (a + b) / 2$ , 计算出小鼠肿瘤平均大小, 动态观察各组每只小鼠 MD 的变化, 并以每只小鼠处理前的 MD 为基准 MD, 将其它数据换算为相对 MD, 换算公式为: 相对 MD = MD / 基准 MD, 用相对 MD 数据做出各组每只小鼠的肿瘤生长曲线。

## 1.5 瘤体内热籽植入

小鼠瘤体直径约 1 cm, 每个肿瘤区域平行植入 2 颗热籽, 间隔 0.5 cm。热籽植入完成后, 进行 X 线拍照, 验证热籽植入后和测温探头的位置。

## 1.6 感应加温

需要进入磁场的小鼠分别腹腔注射速眠新 II (1.5 ml/kg) 麻醉后, 置入交变磁场中, 其中第一部分小鼠和第二部分 H 组小鼠植入的热籽长轴方向与交变磁场方向平行, 对第一部分小鼠用 3 根热电偶监测瘤体内、肿瘤旁正常组织、小鼠体温 (肛温) 温度的变化, 加热电流固定在 450 A, 加热时间 20 min。第二部分小鼠用于小鼠生存期观察, 加温时不进行温度监测, 加热电流固定在 450 A, 加热时间 10 min。

## 1.7 数据处理与统计学分析

实验所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS10.0 统计软件进行处理, 各组间肿瘤平均大小以方差分析进行差异性分析, 生存曲线以 log-rank 检验进行分析,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 热籽植入小鼠瘤体后 X 线摄影照片

如图 1, 小鼠右侧肿瘤内高密度影为植入的热籽, 可以看出植入的热籽基本满足设计要求。

### 2.2 热籽在小鼠肿瘤内加热时温度监测

第一部分 7 只中 5 只顺利完成加温过程, 有 2 只小鼠因麻醉或植入热籽等原因, 在加温过程尚未结束时意外死亡。图 2 为 5 只小鼠植入热籽后在交变磁场中加温时的温度曲线, 加温前小鼠的起始温度约为 27 °C。肿瘤中心位置加热 5 min 便可达到 46 °C, 之后便到达平台期, 保持在 50 °C 附近直至加温结束; 肿瘤边缘温度则上升较慢, 加温结束时可达到 38 °C; 而在整个加温过程中小鼠肛温则变化不大, 始终保持在 30 °C 以下。

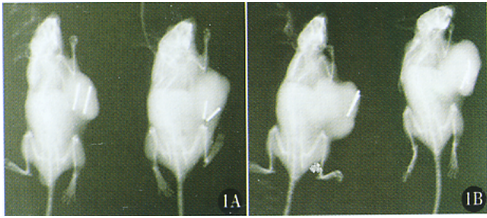


图 1 小鼠肿瘤内植入热籽后 X 线摄影照片  
A 为热籽对照组; B 为加温治疗组

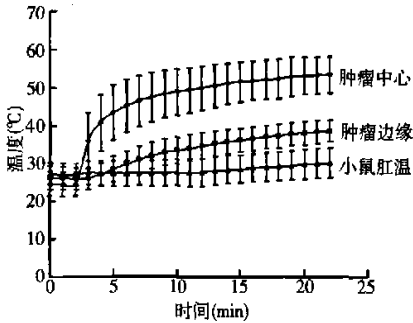


图 2 热籽在小鼠肿瘤内加热升温曲线, 加热时分别对小鼠肿瘤中心、肿瘤边缘、小鼠肛门温度进行监测。加温 2 min 开始, 22 min 结束。测温实验数据为 5 只小鼠数据的平均值

### 2.3 瘤体组织病理学观察

第一部分小鼠在加温测温结束后处死, 取下肿瘤组织, 瘤体切面呈熟肉状, 组织学切片见图 3, 图中空洞为热籽植入部位, 肿瘤组织加热后, 热籽植入位置附近肿瘤组织大片凝固性坏死, 镜下表现呈嗜酸性增强, 细胞结构消失, 核碎裂、溶解, 大量细胞碎片形成, 也有部分肿瘤细胞表现为核固缩, 染色质边聚、浓缩等凋亡的形态学改变; 未加热肿瘤组织中心

部位也可见大量肿瘤组织缺血性坏死, 但可见许多围绕在供养血管周围的癌灶, 此处肿瘤细胞仍保持旺盛的增殖状态, 而热籽加热后肿瘤组织内供养血管周围肿瘤细胞也出现凝固性坏死改变, 血管内红细胞溶解成粉染网状结构, 血管内皮细胞结构消失。

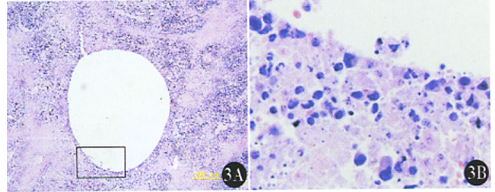


图 3 小鼠 B<sub>16</sub> 黑色素瘤热籽加热后, 10% 甲醛固定, 组织学切片, HE 染色, A 中空洞为热籽植入部位,  $\times 100$ ; B 为 A 中矩形部分放大后观察,  $\times 400$

### 2.4 热籽感应加温对荷瘤小鼠的疗效

第二部分中热籽对照组和加温治疗组各有 1 只小鼠在植入热籽后意外死亡, 加温治疗组有 2 只加温后在笼内被其它小鼠噬咬, 创伤过大而死亡。故进入疗效观察的各组小鼠数量分别为空白对照组 10 只、磁场对照组 10 只、热籽对照组 9 只、加温治疗组 10 只。各组小鼠肿瘤平均直径 MD 在处理前差异无显著性 ( $F = 1.12, P = 0.354$ ), 分别为空白对照组 ( $16.5 \pm 4.7$ ) mm、磁场对照组 ( $15.6 \pm 5.1$ ) mm、热籽对照组 ( $14.1 \pm 3.4$ ) mm、加温治疗组 ( $13.4 \pm 3.1$ ) mm。

图 4 为各组小鼠经处理后肿瘤相对 MD 的变化曲线, 各组小鼠肿瘤大小均呈一定程度的增大趋势。空白对照组和磁场对照组较为明显; 热籽对照组增长幅度稍低, 但死亡率较高; 加温治疗组 6/10 只小鼠处理后肿瘤大小 1 周内未见明显增大, 但约 1 周后又继续增长, 其它小鼠肿瘤大小则始终增大趋势。

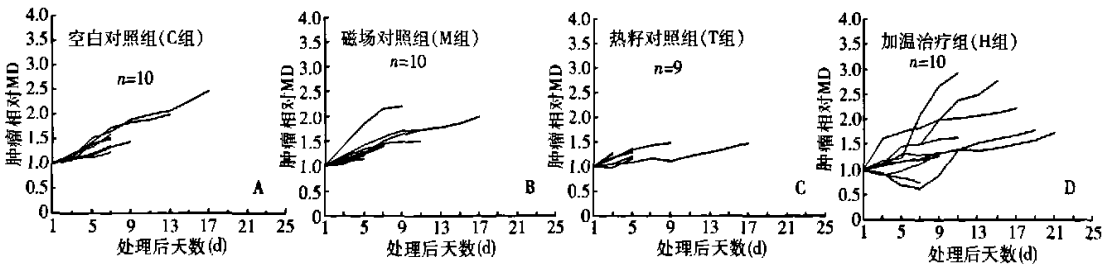


图 4 各组小鼠经过处理后肿瘤相对平均直径 (MD) 变化曲线, 图中每根折线代表各组每只小鼠 MD 变化的情况, 折线终止表示小鼠死亡

图 5 为各组小鼠接种肿瘤后的生存曲线, 各组小鼠在处理后陆续开始出现死亡, 3 个对照组小鼠死亡速度稍高于加温治疗组, 其中以热籽对照组死亡率最高, 考虑可能为热籽植入的创伤对小鼠而言过大, 而加温治疗组同样也有热籽植入的创伤, 但死亡率相反最低, 但继续观察, 加温治疗组小鼠也最终

因肿瘤复发而死亡。表 1 为各组生存曲线的 log-rank 检验结果, 3 个对照组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 加温治疗组 (H 组) 与空白对照组 (C 组) 之间差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), H 组与 T 组间差异非常显著 ( $P < 0.01$ ), 但 H 组与 M 组间差异不显著。

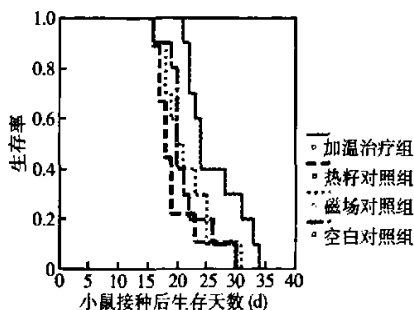


图 5 各组小鼠接种肿瘤后 Kaplan-Meier 生存曲线, 接种后第 14 天开始处理

表 1 各组小鼠生存曲线的 log-rank 检验 P 值

	C 组	M 组	T 组
M 组	0.8410	/	/
T 组	0.2641	0.2354	/
H 组	0.0136	0.0635	0.0025

### 3 讨论

国外有关热籽感应加温技术的研究已有近 30 年的历史,对各种不同的磁性材料组成的热籽进行了广泛的研究<sup>[5,6]</sup>,并且已经进行了少量的临床试验<sup>[7-9]</sup>,近年来,由于交变磁场和热籽制备等物理学领域的进展,热籽感应加温技术也取得了较大的进展,并且使用各种不同的磁性材料在基础实验和临床试验方面进行了广泛的研究,取得了不少令人振奋的结果,但主要集中在欧美和日本,国内也有少数学者进行过一些小动物实验<sup>[10,11]</sup>,尚未见大动物实验和临床试验方面的报道。目前热籽感应加温的基础研究主要集中在不同材料组成和加工方法制作成的热籽产热性能的比较;使温度分布更加均匀;提高小动物疗效等方面的研究。临床研究则主要在颅内肿瘤和前列腺癌方面,前列腺癌则近期报道较多,并取得了较好的治疗效果,显示出热籽感应加温治疗技术在前列腺癌治疗中有良好的应用前景。

在预实验中我们发现 C57/BL 小鼠植入热籽后加热的时间不宜超过 15 min,否则小鼠不能耐受,一般在 1~2 天内死亡。实验中为了植入热籽,荷瘤小鼠的肿瘤大小需达到约 1 cm,而这个大小的肿瘤相对于小鼠的体形来说已经较大,时间过长小鼠很难耐受,因此为了确保小鼠加温后的存活率,分组实验中我们选择了加热 10 min。此外,根据前期体模实验和离体猪肝实验的温度分布数据,要完全加热直径 1 cm 的肿瘤,应该至少植入 2 颗热籽,排列间距不应超过 0.5 cm。实验中我们对这种热籽组合在小鼠肿瘤内的加热进行了测温,升温曲线显示可以将肿瘤区域温度升高到 46℃ 的有效治疗温度以上。实验结果显示单纯磁场和单纯热籽植入对荷瘤小鼠肿瘤生长和小鼠的生存期影响不大,其中热籽对照组的生存期较其它对照组之间减小,考虑可能

是热籽的植入对小鼠来说是一个较大的创伤,对其肿瘤的生长和生存期会产生一定的影响,但统计学结果显示差异不显著,还需要进一步实验进行验证。加温治疗组部分小鼠(6/10)加温后肿瘤大小有暂时性的缩小,肿瘤生长减缓,但 1 周后多出现了局部复发,最终导致小鼠死亡,提示单次较短时间的热籽感应加温能够延缓或暂时性控制小鼠肿瘤的生长,实验结果也显示加温治疗组小鼠的生存期有所延长,并且与空白对照组和热籽对照组相比有统计学意义( $P$  值分别为 0.0136 和 0.0025),但和磁场对照组相比则无统计学意义( $P = 0.0635$ ),但已经接近临界值,考虑可能与本实验的样本量较小( $n = 10$ )有关,因此尚不能排除单独磁场因素的影响,加大样本量可能会出现差异,需进一步的实验证实。

总之,热籽感应加温在小鼠肿瘤内可以取得较好的升温效果,对荷瘤小鼠肿瘤生长有一定抑制作用,延长荷瘤小鼠生存期,荷瘤动物疗效实验还有待进一步优化热籽性能和交变磁场参数,进一步改进实验方法,选用适宜的动物模型来进行更深入的研究。

致谢:本课题研究得到了中日友好医院临床医学研究所赵天德教授、陈惟昌教授的大力指导,在此谨致谢意。

### 参考文献

- 1 林世寅,李瑞英,主编. 现代肿瘤热疗学 - 原理、方法与临床. 北京:学苑出版社,1998.5-6.
- 2 Moroz P, Jones SK, Gray BN, et al. Magnetic mediated hyperthermia: current status and future directions. Int J Hyperthermia, 2002, 18:267-284.
- 3 夏启胜,刘 轩,徐 波,等. 铁磁热籽加温治疗肿瘤机理研究现状. 中国医学物理学杂志,2004,21:213-215.
- 4 夏启胜,刘 轩,李红艳,等. 热籽感应加温治疗肿瘤实验与临床研究进展. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:380-382.
- 5 Lee YK, Lee SB, Kim YU, et al. Effect of ferrite thermoseeds on destruction of carcinoma cells under alternating magnetic field. J Mater Sci,2003,38:4221-4233.
- 6 Park BH, Koo BS, Kim YK, et al. The induction of hyperthermia in rabbit liver by means of duplex stainless steel thermoseeds. Korean J Radiol,2002,3:98-104.
- 7 Tucker RD, Platz CE, Huidobro C, et al. Interstitial thermal therapy in patients with localized prostate cancer: histologic analysis. Urology, 2002, 60:166.
- 8 Deger S, Boehmer D, Turk I, et al. Interstitial hyperthermia using self-regulating thermoseeds combined with conformal radiation therapy. Eur Urol, 2002, 42:147-153.
- 9 Rehman J, Landman J, Tucker RD, et al. Ferromagnetic self-regulating reheatable thermal rod implants for in situ tissue ablation. J Endourol,2002,16:523-531.
- 10 耿跃春,王想想,胡 焰,等. 铁磁热籽诱导加热治疗肝癌的实验研究. 中华理疗杂志, 1997, 20:204-206.
- 11 熊国欣,李 伟,王光志,等. 温敏磁性材料居里点效应治疗肿瘤的研究. 中国医学物理学杂志,2000,17:101-102.

(收稿日期:2007-01-15)

(修回日期:2007-06-15)

(责任编辑:王惠群)