

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61B 18/04 (2006.01)  
A61B 5/00 (2006.01)  
A61B 5/01 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910027142.6

[43] 公开日 2009年12月16日

[11] 公开号 CN 101601607A

[22] 申请日 2009.5.22

[21] 申请号 200910027142.6

[71] 申请人 东南大学

地址 211109 江苏省南京市江宁开发区东南  
大学路2号

[72] 发明人 张宇 胡孙铃 刘继伟 葛玉卿  
顾洪成 陈忠文 顾宁 马明

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 叶连生

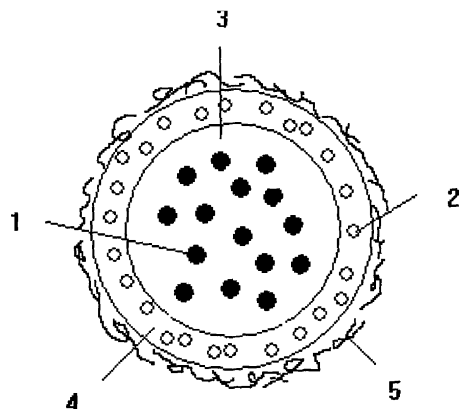
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

## [54] 发明名称

一种对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法

## [57] 摘要

一种对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法是针对肿瘤细胞内热疗中磁性纳米粒子进入细胞后作为纳米加热器如何加热细胞，每个细胞经受的局部温度如何测量等问题，提出了一种借助多功能纳米微球实现对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及细胞内测温的方法，以进一步推动肿瘤磁感应热疗技术的发展。其方法是将具有磁感应加热功能的磁性纳米粒子和具有成像及测温功能的荧光量子点同时复合于高分子或无机纳米微球中，在交变磁场作用下利用结合到肿瘤细胞上的纳米微球对细胞进行加热，同时在荧光显微镜下利用荧光量子点对细胞进行成像及测温。



1. 一种对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法，其特征在于将具有磁感应加热功能的磁性纳米粒子和具有成像及测温功能的荧光量子点同时复合于高分子或无机纳米微球中，在交变磁场作用下利用结合到肿瘤细胞上的纳米微球对细胞进行加热，同时在荧光显微镜下利用荧光量子点对细胞进行成像及测温。

2. 根据权利要求 1 所述的对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法，其特征在于所述的磁性纳米粒子选择  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  或  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  磁性纳米粒子，具有磁感应加热细胞的功能。

3. 根据权利要求 1 所述的对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法，其特征在于所述的荧光量子点是热敏性  $\text{CdTe}$ 、掺杂  $\text{Mn}^{2+}$  的  $\text{ZnS}$  半导体纳米粒子，它们的荧光强度具有可逆的线性温度响应，用于测量磁性纳米粒子磁感应加热细胞时的温度及用于对细胞进行荧光成像。

4. 根据权利要求 1 所述的对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法，其特征在于所述的高分子或无机纳米微球选择聚苯乙烯、聚乳酸、海藻酸钠、壳聚糖等高分子或  $\text{SiO}_2$  无机材料，作为磁性纳米粒子和荧光量子点的载体。

5. 根据权利要求 1 所述的对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法，其特征在于所述的纳米微球经有机分子表面修饰后形成稳定的水悬浮液体系，具有生物相容性，微球尺寸在几十纳米到 1 微米范围。

6. 根据权利要求 1 所述的对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法，其特征在于所述的纳米微球与肿瘤细胞共培养后吸附到肿瘤细胞表面或内化进入细胞内时，施以交变磁场驱动纳米微球中的磁性纳米粒子进行加热，同时纳米微球中的热敏荧光量子点的荧光强度发生改变以监测加热的温度，荧光强度改变可以通过光纤光谱仪进行测量或用荧光显微镜进行直接成像，从而实现对肿瘤细胞的同时加热、测温 and 成像。

7. 根据权利要求 6 所述的对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法，其特征在于所述的在交变磁场作用下进行荧光成像和测温时，采用非金属激发光路系统和非金属检测光路系统，以避免金属在交变磁场中易被加热的问题。

## 一种对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法

### 技术领域

本发明提出了一种用于肿瘤细胞内热疗的多功能纳米材料和同时进行磁感应加热、成像及细胞内测温的方法，属于生物与医学纳米材料及技术领域。

### 背景技术

磁感应热疗是肿瘤热疗的一种，是将磁性介质定位于肿瘤部位并在交变磁场的作用下产生热量，使瘤区的温度达到 42℃ 以上，从而杀死肿瘤细胞，达到治疗的目的。

1971 年，Burton 较早研究了铁磁热籽的组织间质热疗 (magnetic interstitial hyperthermia, MIH)，他们把一组直径约 1mm，长约 1.5cm 合金铁磁体（称为“热籽”，thermoseed）按一定的间距，均匀植入肿瘤内，由体外线圈提供交变感应磁场，热籽在电磁场（一般 50k~2MHz）作用下由于涡流损耗与磁滞损耗而产生热量，并传导至肿瘤组织，使之升温。热籽一般采用居里点温度较低（45~60℃）的合金材料构成，如 Ni-Si（4%）、Ni-Ca（29.6%）、Ni-Pd（73%）等。由于热籽不需要外接电缆，植入体内放置可多次使用，这对于深部肿瘤的热疗很有意义。这种“热籽”法的缺点就是需要手术将热籽植入，而且由于热籽的分布必然存在距离，不可能对瘤体均匀加热并且存在冷点。

1979 年 Gordon 等提出了磁性液体热疗 (magnetic fluid hyperthermia, MFH) 或细胞内热疗 (intracellular hyperthermia, IH) 的观点。即采用磁性液体 (magnetic fluid, MF) 作为磁感应热疗的加热介质。德国的柏林洪堡大学医学院的 Jordan 研究组从 1993 年起就进行磁性液体热疗的研究。他们是细胞内热疗的最主要的支持者。他们认为将磁性液体注入到靶（病灶或组织）部位中，由于细胞的吞噬和融合作用，磁性粒子会进入到细胞中，而且随着细胞的分裂，母细胞内的磁性粒子会进入子细胞，再将靶置于功率足够大、频率足够高的交变磁场中，随着细胞内部的磁性粒子的产热，靶细胞会因局部的热效应而死亡，从而达到治疗效果。在这一研究领域，Jordan 的研究组进行了一系列的工作，包括细胞内热疗的细胞学实验和对小型动物（小鼠）的肿瘤模型进行的磁性液体热疗动物实验。日本名古屋大学的 Kobayashi 研究组也进行了一系列的磁性液体热疗的小型动物实验研究，也是细胞内热疗的主要支持者之一。Mitsumori 等还将磁热疗与动脉栓塞疗法结合，提出了所谓的动脉栓塞热疗 (arterial embolization hyperthermia, AEH) 的疗法，他们将磁性液体经兔肾动脉灌注，不仅可栓塞肾动脉，同时施加的磁场使肾区产生高温。

磁性液体热疗作为一种新的治疗肿瘤技术，由于其特有的靶向、微创、低毒副作用等优点正逐渐受到人们的关注并成为研究的热点。目前，Jordan 研究组在实验用交变磁场加热装置研制的基础上，与德国柏林 Magforce 公司联合研制出了 MFH300F 型磁感应热疗机，现已安装

在柏林夏里特医疗中心, 据报道利用该设备结合纳米磁流体已经成功治疗 25 例患者。近年来国内的清华大学、东南大学、上海交通大学、复旦大学、中科院化学所以及湘雅医院等单位在磁感应热疗方面也开展了大量的研究工作, 包括设备研制、磁加热介质开发、动物实验等, 已在国际上形成一定的影响, 并正在积极向临床推进。

尽管如此, 磁性液体热疗的一些基础的生物学机制、温度测量及热计量学问题、以及先进的磁加热介质开发, 仍然是需要急迫解决的基础及瓶颈问题。细胞内热疗虽然得到了一些实验证据支持, 但磁性纳米粒子进入细胞后作为纳米加热器如何加热细胞, 每个细胞经受的局部温度如何测量, 仍然是我们所未知的。为此, 本专利提出了通过先进的多功能磁加热介质设计, 实现对细胞的加热及同时的细胞内温度测量, 并赋予材料能作为影像学评价的探针功能。设计的多功能纳米微球是同时包含磁性纳米粒子(用于加热及磁共振成像, 可选择  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  等磁性纳米粒子)和热敏荧光量子点(用于测温及荧光成像, 可选择  $\text{CdTe}$ 、掺杂  $\text{Mn}^{2+}$  的  $\text{ZnS}$  等半导体纳米粒子, 它们的荧光强度具有可逆的线性温度响应)的高分子或无机纳米微球。磁性纳米粒子由于磁滞效应、Neel 弛豫和 Brownian 弛豫而具有很好的交流磁热效应, 比亚微米或更大尺寸微球能吸收更多磁场能量, 并且由于纳米磁性颗粒易于分散和给药, 可以降低对外加交变磁场输出功率的要求, 或者降低给药量, 因而得到了广泛研究和应用。同时, 磁性纳米粒子作为磁共振成像(MRI)对比增强剂已经被批准在临床上使用, 美国 Advanced Magnetics 公司和德国 Schering 公司已经开发出系列产品。半导体量子点作为荧光标记已经被广泛用于生物医学研究及应用。利用热敏荧光量子点进行温度传感已发展成一个新的研究领域“Nanoparticle Luminescence Thermometry”, 一些荧光量子点不断被设计与合成, 它们具有稳定的和可逆的线性温度响应。通过纳米复合技术将磁性纳米粒子和热敏荧光量子点进行巧妙结合, 从而实现对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及细胞内测温, 形成了本专利最大的创新和特色。

## 发明内容

**技术问题:** 本发明的目的是针对肿瘤细胞内热疗中磁性纳米粒子进入细胞后作为纳米加热器如何加热细胞, 每个细胞经受的局部温度如何测量等问题, 提出了一种借助多功能纳米微球实现对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及细胞内测温的方法, 以进一步推动肿瘤磁感应热疗技术的发展。

**技术方案:** 本发明的对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法为: 将具有磁感应加热功能的磁性纳米粒子和具有成像及测温功能的荧光量子点同时复合于高分子或无机纳米微球中, 在交变磁场作用下利用结合到肿瘤细胞上的纳米微球对细胞进行加热, 同时在荧光显微镜下利用荧光量子点对细胞进行成像及测温。

所述的磁性纳米粒子选择  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  或  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  磁性纳米粒子, 具有磁感应加热细胞的功能。

所述的荧光量子点是热敏性  $\text{CdTe}$ 、掺杂  $\text{Mn}^{2+}$  的  $\text{ZnS}$  半导体纳米粒子, 它们的荧光强度具有可逆的线性温度响应, 用于测量磁性纳米粒子磁感应加热细胞时的温度及用于对细胞进行荧光成像。

所述的高分子或无机纳米微球选择聚苯乙烯、聚乳酸、海藻酸钠、壳聚糖等高分子或  $\text{SiO}_2$

无机材料，作为磁性纳米粒子和荧光量子点的载体。

所述的纳米微球经有机分子表面修饰后形成稳定的水悬浮液体系，具有生物相容性，微球尺寸在几十纳米到1微米范围。

所述的纳米微球与肿瘤细胞共培养后吸附到肿瘤细胞表面或内化进入细胞内时，施以交变磁场驱动纳米微球中的磁性纳米粒子进行加热，同时纳米微球中的热敏荧光量子点的荧光强度发生改变以监测加热的温度，荧光强度改变可以通过光纤光谱仪进行测量或用荧光显微镜进行直接成像，从而实现同时对肿瘤细胞的同时加热、测温和成像。

所述的在交变磁场作用下进行荧光成像和测温时，采用非金属激发光路系统和非金属检测光路系统，以避免金属在交变磁场中易被加热的问题。

#### 有益效果：

- (1) 针对磁感应肿瘤细胞内热疗研究，创新性的提出通过构建多功能纳米微球体系，将具有测温和成像功能的热敏荧光量子点与具有磁感应加热和磁共振成像功能的磁性纳米粒子进行巧妙结合，以提供一个可同时进行加热、测温及影像学评价的纳米技术解决方案，这对磁感应热疗及应用研究具有重要意义。
- (2) 量子点荧光测温功能可以反映纳米球加热器微区的温度，同时荧光标记可进行成像观察，这对研究细胞内热疗的微观机制具有重要意义。

#### 附图说明

图1是多功能核壳复合纳米微球的结构。其中包括：具有磁感应加热功能的磁性纳米粒子1，具有成像及测温功能的荧光量子点2，含磁性纳米粒子的高分子或无机纳米内核3，含荧光量子点的高分子或无机壳层4，有机分子表面修饰层5。

#### 具体实施方式

设计的多功能纳米微球是同时包含磁性纳米粒子（用于加热及磁共振成像，可选择 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 等磁性纳米粒子）和热敏荧光量子点（用于测温及荧光成像，可选择 $\text{CdTe}$ 、掺杂 $\text{Mn}^{2+}$ 的 $\text{ZnS}$ 等半导体纳米粒子，它们的荧光强度具有可逆的线性温度响应）的高分子或无机纳米微球（作为载体，可选择聚苯乙烯、聚乳酸、海藻酸钠、壳聚糖等高分子或 $\text{SiO}_2$ 等无机材料）。这种纳米微球经有机分子表面修饰后可形成稳定的水溶液体系，同时通过表面偶联特异性肿瘤细胞识别分子，还可以实现对肿瘤细胞的靶向。纳米微球与细胞共培养后靶向到肿瘤细胞表面或内化进入细胞内，这时施以一定频率和强度的交变磁场驱动纳米微球中的磁性纳米粒子进行加热，同时纳米微球中的热敏荧光量子点的荧光强度发生改变以监测加热的温度，荧光强度改变可以通过光纤光谱仪进行测量或用荧光显微镜进行直接成像，从而实现同时对肿瘤细胞的同时加热、测温和成像。

(1) 多功能纳米微球具有核壳结构，内核为包含磁性纳米粒子的高分子或无机（聚乳酸、海藻酸盐、二氧化硅等）微球，通过选择合适尺寸的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 或 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 等磁性纳米粒子（10-30纳米）以及增加磁负载量可以有效增强磁感应加热效果；外壳为包含热敏荧光量子点的高分子（聚电解质、聚乙烯醇等）或 $\text{SiO}_2$ 壳层，以保护和阻隔量子点与磁性纳米粒子的接触，避免

发生荧光猝灭。这种核壳复合纳米微球经多聚赖氨酸、壳聚糖或白蛋白表面修饰后可形成稳定的和生物相容性的水溶液体系，其具有增强的进入细胞的能力，在交变磁场作用下直接加热肿瘤细胞，并可用荧光测量的方法对细胞内加热的温度进行测量，用荧光显微镜进行直接观察，从而实现对肿瘤细胞的同时加热、测温以及影像学研究。

对多功能纳米微球的具体要求：

- 1) 纳米微球尺寸在几十纳米到 1 微米范围，表面具有生物相容性分子修饰，可形成稳定的水悬浮液；
- 2) 构成纳米微球的高分子或无机材料具有生物相容性，对磁性纳米粒子和荧光量子点进行包埋后使得整个纳米微球具有足够的磁负载量和荧光强度，同时具有低的细胞毒性；
- 3) 磁性纳米粒子选择生物相容性好的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  等材料，尺寸控制在 10-30 纳米，在交变磁场中具有强的升温效果；
- 4) 热敏荧光量子点选择 CdTe、掺杂  $\text{Mn}^{2+}$  的 ZnS 等半导体纳米粒子，其荧光强度具有可逆的线性温度响应。

(2) 可同时进行交变磁场加热和荧光测量的方法。交变磁场发生采用磁感应加热装置（频率 50-200KHz，强度 0-15KA/m，平面感应线圈），荧光激发（如 488nm）和发射光（如 3nm 直径 CdTe 纳米粒子的 567nm 发射光）测量采用光纤探头和非金属收集光路，以避免金属在交变磁场中被加热甚至熔化，光谱测量采用光纤光谱仪。另外，交变磁场作用下量子点热敏荧光还可以通过倒置荧光显微镜来观察，实验中需要使用与显微镜匹配的非金属物镜。

实施例一、以磁性海藻酸微球为核，通过层层自组装方法构建含热敏荧光量子点的聚合物壳层的方法：

- 1) 采用化学共沉淀法制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子，在酸性条件下直接氧化制备  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  磁性纳米粒子，并用二巯基丁二酸(DMSA)进行表面修饰以形成稳定的和生物相容性的水溶液体系。
- 2) 采用电化学法以阴极碲为碲源生成的前驱体合成了巯基丙酸(MPA)修饰的水溶性碲化镉量子点(CdTe QDs)，通过控制前驱体水浴加热时间获得不同粒径和荧光发射波长的量子点。
- 3) 采用微乳液法以海藻酸钠和 DMSA 修饰的  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  磁性纳米粒子混合溶液为水相，异辛烷为油相，吐温 85 和司盘 85 为表面活性剂形成油包水的胶束，再加入  $\text{CaCl}_2$  水溶液进行交联制备复合磁性海藻酸微球，并通过控制磁性颗粒与海藻酸钠的质量比、亲水亲油平衡值(HLB)、搅拌速度及  $\text{CaCl}_2$  的滴加速度得到不同尺寸和磁负载量的微球。整个复合微球的尺寸控制在几百纳米到 1 微米。
- 4) 通过层层自组装方法(layer-by-layer)制备核壳结构复合微球。原理是利用复合磁性海藻酸微球表面带负电，通过交替吸附阳离子聚电解质和阴离子聚电解质，形成聚合物过渡层，再交替吸附阳离子聚电解质和带负电荷表面的 CdTe 量子点形成含热敏荧光量子点的聚合物外壳层。
- 5) 用多聚赖氨酸、壳聚糖或白蛋白等有机分子对得到的核壳结构复合微球表面进行修

饰，获得稳定的水悬浮体系。

**实施例二、以磁性聚乳酸微球为核，通过化学偶联方法构建含热敏荧光量子点的聚合物壳层的方法：**

- 1) 采用化学共沉淀法制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子，黑色纳米粒子一旦形成后加入油酸作为表面修饰剂，经水洗和醇洗后得到油溶性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子，将其分散于正己烷中。
- 2) 采用电化学法以阴极碲为碲源生成的前驱体合成了巯基丙酸(MPA)修饰的水溶性碲化镉量子点(CdTe QDs)，通过控制前驱体水浴加热时间获得不同粒径和荧光发射波长的量子点。
- 3) 采用溶剂蒸发法制备磁性聚乳酸微球：将聚乳酸和油溶性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子分散于二氯甲烷与丙酮的混合溶液（比例为 7：3）中，充分超声分散，制成油相；配置 1% 浓度的聚乙烯醇水溶液作为水相；将油相与水相溶液混合，用均质分散仪（12000rpm 常温）乳化 3 次每次 7min；将乳化得到的乳浊液转入 400ml 二次水中 40 摄氏度恒温低速搅拌挥发 2h；将挥发所得的样品磁分离洗涤三次，用二次水定溶到 50ml，得到磁性聚乳酸微球。
- 4) 磁性聚乳酸微球表面上荧光量子点的偶联：首先用含氨基的硅烷偶联剂对得到磁性聚乳酸微球表面进行包覆，在微球表面上引入氨基；再用碳化二酰亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺作为偶联剂，将表面含有羧基的碲化镉量子点偶联到微球表面。
- 5) 用多聚赖氨酸、壳聚糖或白蛋白等有机分子对得到的核壳结构复合微球表面进行修饰，获得稳定的水悬浮体系。

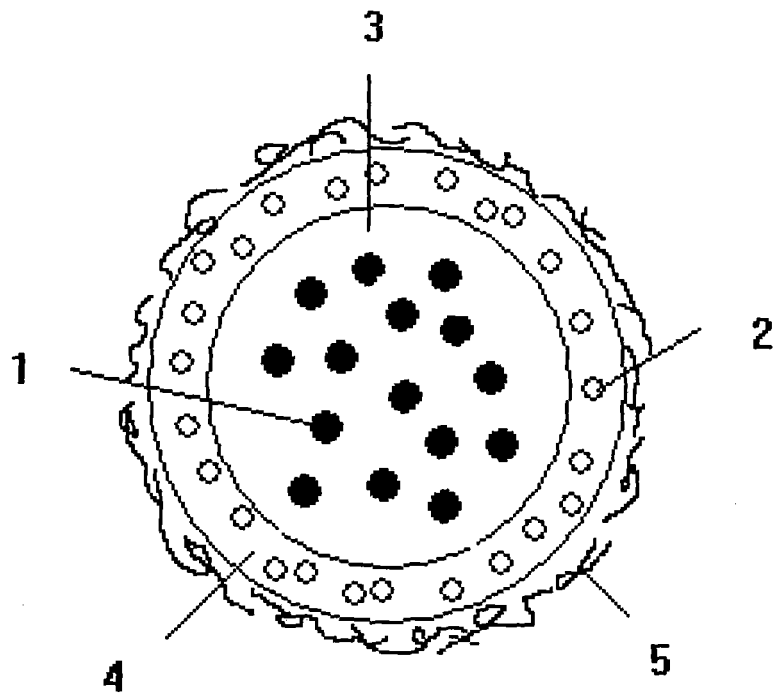


图1

专利名称(译)	一种对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101601607A</a>	公开(公告)日	2009-12-16
申请号	CN200910027142.6	申请日	2009-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	张宇 胡孙铃 刘继伟 葛玉卿 顾洪成 陈忠文 顾宁 马明		
发明人	张宇 胡孙铃 刘继伟 葛玉卿 顾洪成 陈忠文 顾宁 马明		
IPC分类号	A61B18/04 A61B5/00 A61B5/01		
代理人(译)	叶连生		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及测温的方法是针对肿瘤细胞内热疗中磁性纳米粒子进入细胞后作为纳米加热器如何加热细胞，每个细胞经受的局部温度如何测量等问题，提出了一种借助多功能纳米微球实现对肿瘤细胞同时进行磁感应加热、成像及细胞内测温的方法，以进一步推动肿瘤磁感应热疗技术的发展。其方法是将具有磁感应加热功能的磁性纳米粒子和具有成像及测温功能的荧光量子点同时复合于高分子或无机纳米微球中，在交变磁场作用下利用结合到肿瘤细胞上的纳米微球对细胞进行加热，同时在荧光显微镜下利用荧光量子点对细胞进行成像及测温。

