

文章编号:1000-582X(2002)10-0139-04

低强度超声波在生物技术中应用的研究进展

时兰春, 王伯初, 杨艳红, 戴传云

(重庆大学生物工程学院教育部生物力学与组织工程重点实验室, 重庆 400044)

摘要:低强度超声波在生物技术中的应用,是一个比较新的热点研究领域。超声波作用的物理机制主要包括机械传质作用、加热作用和空化作用。研究发现低强度超声波可以促进底物分子之间的相互作用,强化反应物进入及生成物离开酶活性中心的过程,提高酶的活性;改变细胞膜的透性,加强物质运输,促进有益物质的生成;提高整个细胞的新陈代谢效率,加速细胞生长;增加细胞膜的透性,有助于细胞对药物的吸收。因而可以将之应用于酶工程、发酵工程、细胞工程以及肿瘤的生物治疗中。文中就有关这方面的研究,在综述了国内外研究进展的基础上,提出了此领域今后的发展趋向。

关键词:低强度超声波;生物技术;应用

中图分类号:Q681

文献标识码:A

超声波是高于人耳听觉上限阈值的声波,也是物质介质中的一种弹性机械波,在金属探伤、水下定位、化学与化工、医学诊断与治疗领域中已被广泛应用。20世纪80年代以来,强超声波在生物技术领域中的应用日益受到重视,较高强度的超声波已在破碎细胞,使酶失活和基因转移方面得到了较好应用。同时,随着研究的深入和拓宽,许多研究者对低强度超声波在生物工程技术中的应用研究也日益感兴趣,他们在研究中发现低强度超声波还具有可促进酶的生物活性、刺激细胞生长、增加细胞透性等特点^[1-16]。笔者就有关这方面的研究,综述了国内外的研究概况,同时,提出了今后的发展趋向。

1 低强度超声波作用的物理机制

超声波在物质介质中传播时形成介质粒子的机械振动,这种含有能量的超声振动在亚微观范围内引起的的作用有:机械传质作用、加热作用和空化作用^[2]。这些作用的强弱与超声波的频率和强度有关。

加热作用:超声波在介质内传播的过程中,其能量不断地被传播介质吸收而使介质温度升高,在生物反应过程中,超声波引起介质升温不是其作用的主要方式,但亦是重要的影响因素之一。

空化作用:空化作用是液体中气泡在声强作用下发生的一系列动力学过程。在压力波的作用下,液体中分子的平均距离随着分子的振动而变化,当对液体施加足够的负压时,分子间距离超过保持液体作用的

临界分子间距,就会形成空穴,即空化泡。空化分为瞬态空化(指声强度大于 10 W/cm^2 时产生的生存周期较短的空化泡)和稳态空化(指在声强度较低时产生的空化泡,其大小在其平衡尺寸附近振荡,生成周期达数个循环)。液体内可同时产生上述两种空化作用,且在一定条件下稳态空化可转化为瞬态空化。瞬态空化泡绝热收缩至崩溃瞬间,泡内可产生高温和空压,导致自由基形成及产生强大冲击波和射流,从而破坏细胞结构或使酶失活,这可用于破碎细胞,而在生物反应过程中是不希望的。稳态空化作用形成的空化泡可使其周围的酶或细胞颗粒受微声流作用下的切应力的作用。这种类型的空化作用对超声波在生物技术中的应用具有重要意义。

机械传质作用:超声波,甚至是低强度的超声波作用,都可使介质点进入振动状态,从而增强液态介质的质点运动,加速质量传递作用。在生物技术中,这个过程主要发生在界面层、膜或细胞壁附近以及在细胞液内。超声波可增强生物膜以及细胞壁的质量传递,在声强作用下振动的气泡,在其界面层周围相对于微声流会产生液体的圆周运动。这对于反应底物进入酶生物催化剂的活性部位及其产物进入介质中的传质作用有利,从而可提供高生物反应的速度,这就是超声波对传质的促进作用。

低强度超声波在介质中传播时,产生的是有规律而缓和的稳态空化作用,空化泡以非线性的形式在媒质中振荡若干个声周期,振荡过程中空化泡周围的微

• 收稿日期:2002-06-13

作者简介:时兰春(1971-),女,河南郸城人,重庆大学硕士研究生,从事生物医学研究。

流对其它微粒产生剪切作用。同时,超声波在传播过程中使介质质点进入机械振动状态,增加了质点的振动能量,低强度超声波依靠机械振动和稳态空化效应使传质边界层减薄,并且使溶质粒子运动加速,提高了反应物进入酶或细胞活性部位和生成物进入液体媒质的传质扩散过程。此外,适宜的低强度超声波作用于细胞时会产生胞内微流,胞内质的旋转及涡流运动,并且提高了细胞膜和细胞壁的穿透性,从而提高细胞的新陈代谢功能,促进了细胞的生长^[1]。

2 低强度超声波在酶工程中的应用

在不破坏酶蛋白质结构的超声工作条件下,超声辐照能促进底物分子之间的相互作用,强化反应物进入及生成物离开酶活性中心的过程,从而提高酶活性,促进酶催化反应^[1]。

有关超声在水溶液中可增强酶活力,促进酶催化反应的研究已有一些报道。Barton^[3]等人在研究蔗糖酶水解蔗糖, α -淀粉酶水解淀粉和糖原及葡糖淀粉酶水解淀粉时发现,当底物处在一个较低浓度水平时,如果在水解过程中加以超声作用,能显著提高这3种酶活力,使水解反应更加彻底。食品工业中生产低乳糖含量的酸牛奶时引入超声作用,可使 β -半乳糖苷酶活力明显提高^[4]。实验表明,加入超声时乳糖浓度减少71%~74%,而不加时仅减少39%~51%。在非水溶液中进行酶催化反应是生物技术的最新成果,许多在水溶液中不能进行的酶促反应却能在有机溶剂中进行,同时一些实验表明,如果再在其上加以超声作用,反应速率明显增加。Evgeni^[5]等人报道了超声对有机溶剂中枯草杆菌蛋白酶催化N-苯丙氨酸乙酯(APAEE)的转酯反应的影响,实验表明在几种不同的醇溶液(丁醇,己醇,辛醇)中,超声处理对转酯反应的速率都有大幅提高,而且有机溶剂的碳链越长,处理效果越显著,辛醇中的反应速率可提高6~8倍。Zeng^[6]等报道用30 kHz、0.5 W/cm²的超声波辐照1 min,可使溶于二异丙醚中的苯乙醇酯酶的分解速度提高10多倍。超声波激活固定化酶也是一个富有成果的研究领域。如以酪蛋白作底物,用20 kHz的超声波辐照固定于琼脂胶上的 α -胰凝乳蛋白酶,可使其活性提高2倍。国内也进行了类似的研究,林影^[7]等认为频率为20 kHz,功率为20 W的超声波可促进固定化菊糖酶的催化作用,使得以蔗糖为底物的酶活力提高了60%。

3 低强度超声波在发酵工程中的应用

低强度超声波产生的稳态空化作用对细胞的破坏很小,主要可改变细胞膜的透性,促进可逆渗透,加强物质运输,从而增加代谢活性和促进有益物质的生成^[1]。

林影等^[8]在脆壁克鲁维氏酵母菊糖酶的发酵生产中引入20 kHz,10 W的超声波后发现,脆壁克鲁维氏酵母菊糖酶产量提高了1倍以上,并通过显微镜观察及核酸测定证明:这种低强度超声波不会对细胞造成破坏。李柏林^[9]等根据超声波的作用原理,进行了在线超声波处理对青大霉素生物合成影响的研究,实验结果表明超声波能够改变菌丝体胞壁对青大霉素的吸附性能,使部分被胞壁吸附的青大霉素释放到发酵液中,从而解除胞内产物抑制,促进了青大霉素的合成,其发酵效价可提高1.5倍。在食品工业的发酵生产中,超声波也有运用。日本早在1994年就有在酒类发酵中使用低强度超声波的研究报告发表^[10],他们的研究结果称超声波虽能促进酵母繁殖,缩短发酵时间,增加酒香,加速酒的老熟,但过强的超声波会破坏酵母菌体,因此不同的发酵液应有各自适宜的超声波强度。由于超声波刺激可引起膜内部极化和通透性改变,提高胞外酶的产率,于淑娟^[11]等进行了超声波催化米曲霉发酵酱油的研究,结果表明利用超声波催化法发酵20 d的酱油,其氨基酸含量与氨基氮的含量相当于传统工艺的2个月的含量,而且味道鲜美,色泽诱人,具有一定的推广使用价值。由此可见,低强度超声波在发酵工业中的应用越来越受到人们重视,具有美好的发展前景。

4 低强度超声波在细胞工程中的应用

超声波对生物体有多方面的作用,在不破坏细胞的前提下,采用适当的频率、强度和辐照时间,可以提高整个细胞的新陈代谢效率,加速细胞生长^[1]。

美国学者S.R. Tiler等人发现超声波能加速蓝藻类细胞的生长,使细胞密度增加30%~40%,蛋白质可增加2~3倍^[1]。张元标^[12]等用18 kHz,3 W的超声波辐照海水小球藻,其生长速率可为对照组的1.86~2.26倍,脂肪酸不饱和度亦比对照组提高7.7%~12.5%。此外,研究还发现微生物细胞在适宜强度的超声作用下,也会加快生长速度。高大维^[13]等采用低强度超声辐照啤酒酵母后,细胞对数生长期提前,细胞生长速率提高,细胞干重也有所增加,说明超声波对啤酒酵母细胞的生长有利。

有关超声波对植物细胞刺激效应的研究也取得了很大进展,Bochu^[14]和Bohm^[15]研究了超声波对植物细胞的影响,都得出了适当低强度超声波不会对植物细胞造成伤害,并能促进其生长的结论。张姝^[16]等在此基础上进行了超声波对红豆杉悬浮细胞生长和紫杉醇释放的研究,他们认为紫杉醇是一种植物毒素,难以象其它次生代谢产物那样在细胞内达到很高浓度。超声波能够改变膜透性,使胞内积累的代谢物较好地释放到体外,实验结果证明低强度超声波能在保持红豆杉

细胞正常生长的前提下,使紫杉醇的总产量提高47%。所以在生物合成次生代谢产物的释放研究中,超声亦可作为一种廉价、简单的操作技术。

5 低强度超声波在肿瘤生物治疗中的应用

许多抗肿瘤药物需进入细胞内才能发挥有效的抗癌活性,而药物进入细胞内与细胞膜的透性密切相关。在不对机体造成伤害的前提下,可采用低强度超声借助机械作用和空化作用使其膜透性增加,从而有助于细胞对药物的吸收。

Harrison^[17]报道低强度超声可增强 ADR、AZQ 对 CHO、MCF7WT 细胞的细胞毒作用,他认为这可能是超声使细胞内聚集量增加所致。超声也可用于使微粒中的药物进入细胞组织。Munshi^[18]和 Rapoport^[19]用含 ADR 或其类似物的共聚物微粒 P-105,发现超声可使 HL-60 细胞摄入药物量增加,而且微粒结构对药物导入也有影响。这是由于一方面超声使微粒内药物释放增加,另一方面超声又促使 ADR 进入肿瘤细胞。Munshi^[18]的实验发现:超声与 P-105 联合应用,HL-60 的 TC₅₀ 为 0.19 mg/L,而仅用 P-105、ADR 或超声与 ADR 联合应用的 TC₅₀ 分别为 1.25 mg/L、2.35 mg/L、0.9 mg/L。提示可以微囊携带抗肿瘤药物,与超声辐照相结合进行导向化疗,使肿瘤组织内药物浓度增加,发挥最大抗癌活性,且可减小细胞毒药物对正常组织的毒性。多药耐药(multidrug resistance MDR)是肿瘤治疗中一个颇棘手的问题,由于肿瘤对多种细胞毒药物交叉耐受,给临床选择抗癌药物带来困难。目前研究的耐药逆转剂均是通过提高细胞内药物聚集量逆转耐药性,但能有效逆转的剂量对机体往往是中毒性,甚至是致死性的,难以在临床应用。超声提高细胞膜通透性而使细胞内药物聚集增加,这意味着超声可用于 MDR 肿瘤的辅助治疗,对 MDR 的治疗将开辟新途径。

总之,通过对国内外的研究综述分析可知超声波对生物体的作用是多方面的,这决定于超声波的频率、强度和作用时间。我们知道,高强度的超声会破碎细胞,使酶失活,而低强度的超声又可以促进细胞生长,增加酶活性,这使得超声波在生物技术中的应用具有双重性。近二年来,国际上正掀起以生物科学为中心的交叉科学的研究热潮,交叉科学的兴起,为生命科学的研究提供了一个全新的研究思路,很多令人兴奋的研究成果及发现往往出现在这些交叉学科的前沿。低强度超声波在生物技术中的应用研究就是这样一个热点,它将会在 21 世纪的生物技术产业中发挥巨大的作用。但发展超声波在生物技术中应用的同时,还需要做大量的基础研究工作去了解超声波对细胞、酶、基因、生物大分子作用的机制,掌握超声波的作用参数库,使其在实际应用中更加安全有效。

参考文献:

- [1] SINISTERRA J V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview[J]. *Ultrasonics*, 1992,30(3):180-185.
- [2] 周永昌,郭万学.超声医学[M].北京:科学出版社,1989. 43-58.
- [3] BARTON S, BULLOCK C, WEIR D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996,18(3):190-194.
- [4] 朱国辉,黄卓烈,丘泰球,等.功率超声对酶促反应的影响[J].*应用声学*,2001,20(4):45-48.
- [5] EVGEN N, VULFSON D, SARNEY B, et al. Enhancement of subtilisin - catalysed interesterification in organic solvents by ultrasound irradiation[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1991,13:123-126.
- [6] 冯若,赵逸云,李化茂,等.超声在生物技术中应用的研究进展[J].*生物化学与生物物理进展*,1994,21(6):500-503.
- [7] 林影,高大维,李国基,等.超声波对葡萄糖催化作用的影响[J].*华南理工大学学报(自然科学版)*,1997,25(9):142-144.
- [8] 林影,高大维,梁宏,等.微超声波对脆壁克鲁维氏酵母菊糖酶生产的作用[J].*华南理工大学学报(自然科学版)*,1997,25(10):110-113.
- [9] 李柏林,储炬,李友荣,等.在线超声波处理对青大霉素生物合成的影响[J].*中国抗生素杂志*,1997,22(4):250-253.
- [10] 松浦一雄.超声波の酒类酿造への利用[J].*日本酿造协会志*,1994,89(1):13-17.
- [11] 于淑娟,高大维,李国基,等.超声波催化米曲酶发酵酱油的研究[J].*中国调味品*,1999,11:18-20.
- [12] 张元标,李文权,王清池,等.超声辐射对海水小球藻的生物效应[J].*厦门大学学报(自然科学版)*,2001,40(3):653-657.
- [13] 高大维,高文农,雷德柱,等.线形超声波辐照对啤酒酵母细胞生长的影响[J].*华南理工大学学报(自然科学版)*,1999,27(12):34-37.
- [14] BOCHU W, YOSHIKOSHI A, SAKSNISHI A. Carrot cell growth response in a stimulated ultrasonic environment[J]. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 1998,12:89-95.
- [15] BÖHM H, ANTHONY P, DAVEY M R, et al. Viability of plant cell suspensions exposed to homogeneous ultrasonics fields of different energy density and wave type[J]. *Ultrasonics*, 2000,38:629-632.
- [16] 张姝,余斐,王传贵,等.超声波对红豆杉悬浮细胞生长及紫杉醇释放的研究[J].*生物技术*,2001,11(2):14-17.
- [17] HARRISON G H, BALCER - KUBICZK E K, EDDY H A. Potentiation of chemotherapy by low - intensity ultrasound[J]. *Int J Radiat Biol*, 1991,59:1453-1466.
- [18] RAPOPORT N Y, HEMON J N, PITT W G, et al. Micellar delivery of doxorubicin and its papamgenetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: effects of micellar structure and ultrasound on the intracellular uptake[J]. *J Controlled Release*, 1999,58:153-162.
- [19] MUNSHI N, RAPOPORT N, PITT W G. Ultrasonic activated drug delivery from Pluronic P-105 micelles[J]. *Cancer Lett*, 1997,118:13-19.

Application of Low Intensity Ultrasound to Biotechnology

SHI Lan - chun, WANG Bo - chu, YANG Yan - hong, DAI Chuan - yun

(College of Bioengineering, Key Lab for Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Application of low intensity ultrasonic waves to the biotechnology is one of new and hot research fields. The physical mechanisms of ultrasound mainly include the effects of mass transfer, heating and cavitation. Many researchers found that low intensity ultrasonic waves could accelerate the interaction of substrate and help reactant to enter the active center of enzyme and production to leave center; it could also alter the permeability of membrane and enhance the transfer of mass, and so promote the production of beneficial matter and the absorption of drug to cells; in addition, it could raise the efficiency of cell metabolism and the growth of cells; so low intensity ultrasonic waves can be used in enzyme engineering, fermentation engineering, cell engineering and biological therapeutics of Neoplasm. In this paper, we reviewed the application of low intensity ultrasound to biotechnology at home and abroad.

Key words: low intensity ultrasonic waves; biotechnology; application

(责任编辑 李胜春)

(上接第 138 页)

Structure of Positive-parity Levels in ^{138}Ce Nucleus in Microscopic sdIBM-2 + 2q.p

TONG Hong, SHI Zhu - yi

(Department of Physics, Guizhou Institute for Nationalities, Guiyang 550025)

Abstract: In the view of microscopic interacting boson - fermion formalism, a microscopic realization, microscopic sdIBM - 2 + 2q.p approach has been formed for phenomenological IBM - 1 + 2q.p model. It is used successfully to describe the ground state band, β - band, γ - band and partial two quasi - particle band for ^{138}Ce nucleus. It can explain the recent experimental result that collective structure may coexist with the single - particle states in ^{138}Ce nucleus. From that model, it may be calculated that minimum energy is needed by it, and a boson is made appearance firstly from decoupling, then breaking pair, in turn occupying intrusion orbit and finally jointing alignment. The microscopic information calculated shows that when broken pair of a boson takes place suddenly, no significant change of states between foremost state and latter state is caused by broken pair; the energy related by nucleons in alignment is favorable to other boson's broken pair, and the high - spin states of ^{138}Ce nucleus reproduced belong to two quasi - proton rotational band.

Key words: microscopic sdIBM - 2 + 2q.p approach; broken pair; high - spin states; ^{138}Ce nucleus

(责任编辑 张小强)