

超声声化学激活血卟啉效应的研究

石焕文¹, 尚志远¹, 谢娟², 王公正¹, 张坤³

(1 陕西师范大学应用声学研究所, 西安 710062; 2 长安大学应用化学系, 西安 710054;

3 陕西师范大学生命科学院, 西安 710062)

摘要: 本文用 1,3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF) 检测了超声激活血卟啉的效率, 并寻找了声参量与激活效率之间的关系。结果表明, 在一定条件下, DPBF 的相对消耗量随着辐照时间、声强度的增大而增大, 超声频率及血卟啉浓度对 DPBF 相对消耗量也有影响。这一结果为声动力学疗法应用于临床具有重要的意义。

关键词: 超声; 声动力学; 血卟啉; DPBF

中图分类号: TB426 9; O644 **文献标识码:** A

Sonochemically active effect on hematoporphyrin

SHI Huan-wen¹, SHANG Zhi-yuan¹, XIE Juan², WANG Gong-zheng¹, ZHANG Kun³

(1. Applied Acoustics Institute, Shaanxi Normal University, Xi an 710062, China;

2. Department of Applied Chemistry, Chang an University, Xi an 710054, China;

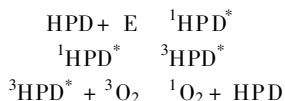
3. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi an 710062, China)

Abstract: By using 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF), the activating efficiency of hematoporphyrin (HPD) by ultrasound has been detected and the relations of acoustic parameters with the activating efficiency have been found. The results show that under a certain condition, the relative loss of DPBF will rise up with the increasing of insonation time and acoustic intensity. Moreover the acoustic frequency and HPD concentration have influenced on the relative loss of DPBF. The result is of great significance for driving sonodynamic treatment to clinic application.

Key words: ultrasound; sonodynamics; hematoporphyrin; DPBF.

1 引言

利用超声激活光敏染料(比如卟啉衍生物)抑制肿瘤生长或杀死肿瘤细胞, 这种方法被日本学者 S. Umemura 称为声动力学疗法^[1]。由于这种方法中血卟啉等光敏物质的选择聚集性以及所需声强较小的特点, 因此目前它已成为国内外研究的热点问题^[2,4]。至于超声激活血卟啉杀死肿瘤细胞的机理, 人们普遍认为这与超声空化时产生的单线态氧(¹O₂)有关。N. Yumita^[5]等人认为超声激活血卟啉(HPD)产生的单线态氧遵从下面的反应式:



(其中* 表示激发态, E 表示超声空化时产生的能

量, 至于是光能还是热能有待于进一步的研究)。单线态氧强烈的氧化性是杀死肿瘤细胞的主要原因, 故检测¹O₂ 的产率是研究声动力学疗法的关键。本文采用单线态氧的强烈捕获剂 1,3-二苯基异苯并呋喃来检测超声激活血卟啉的效率, 为后期的离体、活体实验提供可靠的实验参数, 为推动声动力学疗法向临床应用迈进具有重要的现实意义。

2 实验装置

实验照射系统是由上无 26 厂生产的 XFG 7 型高频信号发生器, 美国 ENI 公司生产的 2100L 型宽带功率放大器, HFP 1 型高频毫伏表, 复频换能器, 水槽, 温度计, 盛放溶液的塑料试管, 旋转装置等组成(如图 1 所示)。温度计是用来监测照射前后水温变化的, 实验过程中水温变化不超过 2 。实验所用水为静置除汽水, 辐照过程中要用软毛刷清除附着在声透镜表面的气泡, 避免影响处理结果。为了保证试管中样品能受到均匀辐照, 实验过程中用微型电机带动试管旋转, 电机驱动电压为 0.5V。试管壁外套上一细钢管以防止试管漂起来, 同时在旋

收稿日期: 2000-03-27; 修订日期: 2000-05-31

国家自然科学基金资助项目(19874042)

作者简介: 石焕文(1967-), 男, 陕西人, 在职博士, 长安大学讲师。

转过程中起到稳定试管使之不偏离焦区的作用。水槽上的支架能灵活地进行三维移动并定位,用来调整试管位置从而使辐照样品处于换能器的焦区内。实验中声强均指焦区声强。

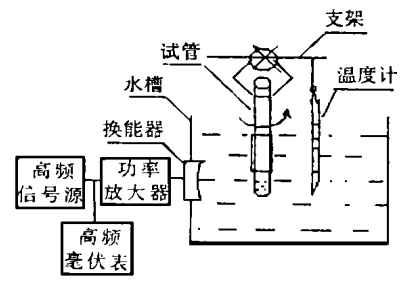


图1 超声辐照血卟啉溶液实验装置图

3 材料和方法

血卟啉 (hematoporphyrin dihydrochloride) 和 1,3-二苯基异苯并呋喃分别购于美国的 Sigma 和 Fluke 公司。其余化学试剂均购自西安化学试剂厂,分析纯。

实验中用 DPBF 作为单态氧的捕获剂来检测超声激活 HPD 的效率,通过捕获剂的相对消耗量来反映超声激活 HPD 的效率^[6]。取 1ml、 2×10^{-4} M 的 DPBF 溶液放入塑料试管中,加入 1ml、0.9% 的 NaCl 溶液使最终体积为 2ml,制备这样的溶液两份。其一经 400kHz 超声(1.5 W/cm^2)辐照 60s;另一未经超声处理。然后用三氯甲烷(CHCl_3)萃取两次,得到 DPBF 的三氯甲烷溶液(其中也含有无水乙醇),经测定得知:超声直接作用 DPBF 溶液,使 DPBF 平均相对减少量不到 1%,因此可以忽略超声直接引起的 DPBF 的减少量,即近似认为单纯超声不会引起 DPBF 量减少。

基于以上原因,每次实验时将 DPBF+ HPD 溶液分为两组:即对照组和超声(US)加血卟啉组。

(1) 对照组:将 1ml、 2×10^{-4} M 的 DPBF 溶液放入塑料试管中,加入 1ml、100 g/ml 的 HPD 溶液,使最终体积为 2ml。

(2) 超声加 HPD 组:将 1ml、 2×10^{-4} M 的 DPBF 溶液放入塑料试管中,加入 1ml、100 g/ml 的 HPD 溶液,使其体积为 2ml。再经不同参数超声处理。

(1) 组、(2) 组分别用 1ml+ 1ml 的 CHCl_3 各萃取两次,得到 DPBF 的 CHCl_3 溶液(HPD 未被萃取出来,因为 HPD 的 NaCl 溶液不溶于 CHCl_3),然后用 Deckman 公司生产的 Du640 紫外可见分光光度计测 DPBF 溶液对 400nm 的吸光度。无水乙醇在 400nm 附近无吸收峰,以三氯甲烷为空白(即 CHCl_3

的吸光度以 0 线处理)。设两者的吸光度分别为 A_0 (对照组)、 A_1 (US+ HPD 组),则 $(A_0 - A_1) / A_0$ 就是经超声处理前后吸光度的相对变化量,也即 DPBF 在超声处理前后浓度的相对变化量。

4 结果及分析

4.1 超声作用时间与 DPBF 相对减少量的关系

选择 HPD 浓度为 50 g/ml;作用时间为:20s、40s、60s、80s、100s;超声参数为: $f_1 = 400 \text{ kHz}$, $I_1 = 1.0 \text{ W/cm}^2$; $f_2 = 800 \text{ kHz}$, $I_2 = 1.0 \text{ W/cm}^2$ 。对 HPD 的激活情况分别如图 2(a)、(b) 所示。

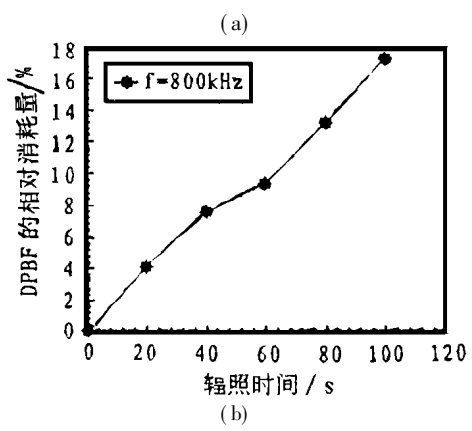
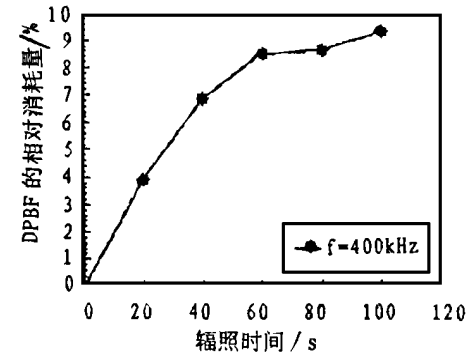


图2 DPBF的相对消耗量和超声作用时间的关系

由图2可知, DPBF 的相对消耗量与辐照时间有关,即随着作用时间的增加, DPBF 的相对消耗量也随之增加。对于 $f = 400 \text{ kHz}$ 的超声,在照射时间 $t = 60 \text{ s} \sim 80 \text{ s}$ 之后随作用时间的增加, DPBF 的消耗量增加趋于缓慢。由于声动力学疗法最终是要应用于人体,即用超声激活 HPD 杀死人体肿瘤细胞。因此为了尽量减少对正常组织的损伤,作用时间不宜过长,故在本实验条件下,超声辐照的最佳时间应为 60s~ 80s。

4.2 超声强度与 DPBF 相对消耗量之间的关系

超声辐照时间为 60s, HPD 浓度为 50 g/ml, 改

变高频信号发生器的输出信号从而调节焦区声场的声强,测得 400kHz,800kHz 超声激活 HPD 的效率随声强的变化曲线如图 3 (a)、(b) 所示。

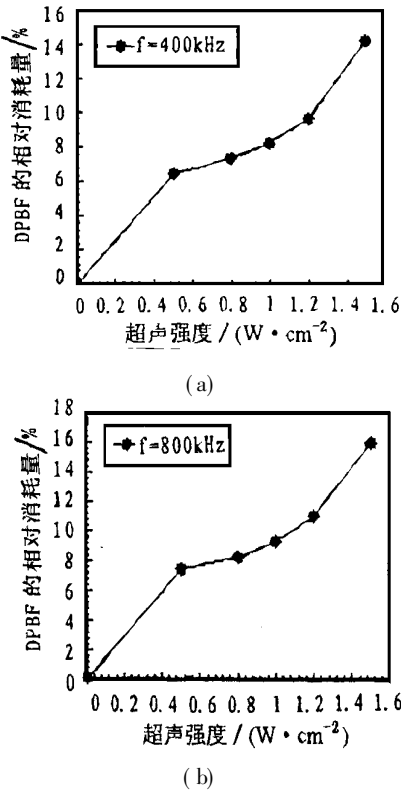


图 3 超声辐照时 DPBF 相对消耗量与超声强度的关系

由图 3 (a) 可见, 400kHz 超声作用下, 当声强在 $1.2W/cm^2$ – $1.5W/cm^2$ 时, DPBF 消耗量变化很快; 由图 3 (b) 可知, 800kHz 超声声强在 $1.2W/cm^2$ – $1.5W/cm^2$ 时, DPBF 消耗量变化最陡。故随着超声强度的提高, DPBF 的相对消耗量在不断增加。

4.3 血卟啉浓度与 DPBF 相对消耗量的关系

将浓度分别为 200 g/ml、150 g/ml、100 g/ml、50 g/ml、20 g/ml 的 HPD 溶液各 1ml 装在 5 支试管中, 再分别加入 $1ml \cdot 2 \cdot 10^{-4}M$ 的 DPBF 溶液, 使最终浓度分别为 100 g/ml、75 g/ml、50 g/ml、25 g/ml、10 g/ml。制备这样的溶液两组(共 10 份), 分别用 400kHz 超声($1.0W/cm^2$)、800kHz 超声($1.0W/cm^2$) 处理 60s。测得的 DPBF 消耗量与浓度的关系曲线如图 4 所示。

从图 4 中可以看出, DPBF 的消耗量在 HPD 浓度为 50 g/ml 处取得最大值, 在浓度大于 50 g/ml 时 DPBF 消耗量还有些减小。这一结果与 N. Yumita^[5]用生物方法得到的、HPD 浓度增到 50 g/ml 时

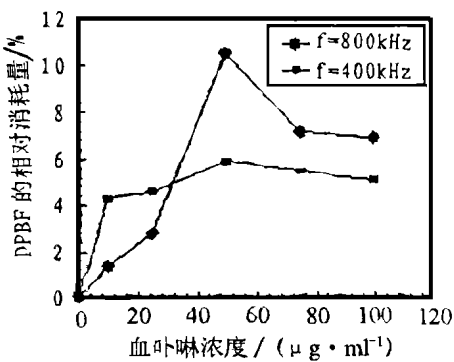


图 4 DPBF 消耗量与 HPD 浓度的关系曲线

HPD 的增敏效应趋于饱和这一结论相吻合。至于浓度大于 50 g/ml 时, DPBF 的消耗量有些减小可能与溶液的粘性上升引发空化变弱有关。

4.4 超声频率对 HPD 激活效率的影响

对浓度为 50 g/ml 的 HPD 溶液, 用强度都是 $1.0W/cm^2$ 的 400kHz、800kHz、1.2MHz 超声分别处理 60s, 将得到的 DPBF 相对消耗量列于表 1 中。

表 1 超声($1.0W/cm^2$) 激活 HPD(50 g/ml) 的频率效应

频率(kHz)	DPBF 的相对消耗量(%)
400	8.21
800	9.42
1200	10.6

从表 1 可以看出, 当频率从 400kHz 变到 1.2MHz 时, 超声激活 HPD 引起的 DPBF 消耗量也在增加, 也就是说超声激活 HPD 的最佳频率应在 1.2MHz 以上, 这与马玉英教授^[7]等人得出的最佳频率在 1.8MHz–2.0MHz 之间的结论相一致。

5 结 论

当 HPD 浓度为 50 g/ml、400kHz 和 800kHz 超声强度为 $1.0W/cm^2$ 时, 最佳辐照时间在 60s–80s 之间; 而且随着作用时间的增加 DPBF 消耗量也在增加; 而当辐照时间为 60s 固定不变时, DPBF 相对消耗量随着超声强度的增强而增加, 而且不同频率超声引起的 DPBF 相对消耗量的快速增长区在不同强度范围内; 另外 HPD 浓度对 HPD 激活效率也有影响, 在本实验条件下最佳 HPD 浓度应为 50 g/ml; 超声激活 HPD 也有频率效应, 在相同声强条件下, 不同频率超声激活 HPD 效率的关系是 $400kHz < 800kHz < 1.2MHz$ 。

参考文献:

- [1] S. Umemura, N. Yumita, R. Nishigaki, *et al.*. Sonochemical activation of hematoporphyrin: A potential modality for cancer treatment[J]. Proc. IEEE Ultrasonics Symposium, 1989: 955-960.
- [2] S. Umemura, N. Yumita, R. Nishigaki. Enhancement of ultrasonically induced cell damage by a Gallium-porphyrin complex[J]. ATX-70. Jpn. J. Cancer Res, 1993, 84: 582-588.
- [3] S. Umemura, N. Yumita, R. Nishigaki, *et al.*. Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin[J]. Jpn. J. Cancer Res, 1990, 81: 962-966.
- [4] S. Umemura, K. Kawabata, K. Sasaki. In vitro and in vivo enhancement of sonodynamically active cavitation by second harmonic superposition[J]. J. Acoust. Soc. Am., 1997, 101(1): 569-577.
- [5] N. Yumita, R. Nishigaki, K. Umemura, *et al.*. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound[J]. Jpn. J. Cancer Res. 1989, 80: 219-222.
- [6] K. Omar Zahir. Yields of singlet dioxygen produced by the reaction between the excited state of tris(bipyridine) ruthenium(II) and triple dioxygen in various solvents[J]. J. Photochem. Photobiol. A: Chem, 1992, 63: 167-172.
- [7] 马玉英, 张伊力, 张军平. 声化学激活血卟啉对 S180 肿瘤作用的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 1995, 14(4): 374-377.

简 讯

国际声学会议报道

第 7 届西太平洋地区声学会议于 2000 年 10 月 3-5 日在日本南部熊本市举行, 近 20 个国家和地区的声学界人士 400 余人出席, 论文 362 篇, 是历届之最, 其中全体大会报告 2 篇(日本东北大学名誉教授城户健一: 声学和信息科学; 澳大利亚国立大学名誉教授 N. Fletcher: 吹奏乐器的艺术和科学成就), 专题特邀报告 4 篇(韩国汉城国立大学 sung 教授: 水声研究所在声纳设计研究方面的若干成果; 美国加州理工学院 Konishi: 人脑对声定位的机理; 德国慕尼黑大学 Fastl 教授: 基于听感的噪声评估; 日本 ATR 言语翻译研究所 Yamamoto 博士: 言语翻译技术的现状和发展-为克服言语交流障碍向多语种通信之过渡)。除大会报告外, 论文分 36 个分组进行, 同一时段内有多达 7 个分组同时活动。会议组织的专题组有 12 个之多, 它们是: 虚拟的 SD 声学展示表演与聆听, 太平洋地区的新老乐器, 声成像, 可听化和可视化, 大厅音质, 交通噪声控制, 环境声学中的心理学问题, 音乐表演和听音的声学和心理学分析, 海洋声层析技术, 交通噪声(道路、铁路和航空) 预计, 社区噪声和噪声政策, 听觉系统的频率-时间信息处理及模拟, 鲁棒言语通讯中的声学问题。各专题组分别有邀请报告若干篇。

出席本次会议的中国学者有 30 余人, 他们来自大陆、香港和台湾, 也有在日本的中国学者, 在会场内外, 频频交流, 气氛亲切热烈。西太平洋地区声学委员会副主席, 中科院院士, 水声专家张仁和教授也出席了本届年会, 下届年会将于 2003 年在澳大利亚墨尔本举行。

(王季卿)

编辑部告示

读者、作者们:

本刊于 1994 年首批入编 中国学术期刊(光盘版)。2000 年 8 月中国学术期刊光盘版编辑委员会、中国科学文献计量评价研究中心、中国科学院文献情报中心和北京大学图书馆等单位颁发给本刊 3 份证书。内容如下:

- 1、声学技术 由 中国期刊网、中国学术期刊(光盘版) 全文收录。证书编号: Q0073, 收录期限为 1994-2002 年。
 - 2、声学技术 作为 中国学术期刊综合评价数据库 来源期刊全文收录, 证书编号: (Z) 0073, 收录期限为 1994-2002 年。
 - 3、声学技术 被认定为 中国科学引文数据库 来源期刊, 证书编号: (K) 0073。
- 上述 3 项均是国家级火炬计划项目, 特此通报广大读者与作者。

(本刊编辑部)