

# 超声对细胞膜通透性的影响及应用 \*

刘晓艳 丘泰球 刘石生 胡爱军

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

黄卓烈

(华南农业大学生物技术学院 广州 510641)

2001年10月29日收到

**摘要** 适当参数的超声,使细胞膜发生可以修复的损伤,使细胞膜的通透性提高,从而使细胞内的物质释放到细胞外,细胞外的物质进入细胞内。这一现象可以用于释放代谢产物或中间产物,基因转导,强化化学方法治疗肿瘤等方面。

**关键词** 超声,细胞膜,通透性

## The influence of ultrasound to the permeability of cell membrane and its application

LIU Xiaoyan QIU Taiqiu LIU Shishen HU Aijun

(College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

HUANG Zhuolie

(Biotechnology College, South China Agriculture University, Guangzhou 510641)

**Abstract** Remedial cell membrane damage can occur from ultrasound of appropriate parameter, with the increase of cell membrane permeability the membrane allowing matter within to leave and that outside to enter the cell. This effect can be exploit as to various purposes, which include release product, gene transfection and enhancement of chemotherapy of tumors.

**Key words** Ultrasound, Cell membrane, Permeability

### 1 引言

早已发现低频率、低功率的超声波处理,可在细胞表面瞬间造成微伤,使细胞壁局部破裂,从而改变细胞质膜的通透性,使胞内物质

释放或使胞外物质进入细胞内。当超声强度适宜时,这些伤口很小,很快即被生物体自己修复;当能量过强时,细胞本身就要受到损伤以至逐步衰亡。

利用适当参数的超声,使超声的强度既不

\* 国家自然科学基金资助项目(10174021)

伤害或少伤害细胞本身，而且可以使细胞膜瞬间形成较多的小孔，达到释放代谢产物或中间产物，基因转导，强化化学方法治疗肿瘤等疾病的目的，是超声在生物学中的新应用。

## 2 超声改变细胞膜通透性在发酵工程中的应用

细胞膜对代谢产物的通透性在发酵工业是一个十分重要的问题。在发酵工程中，由于有一些我们希望获得的代谢中产物和终产物通常并不释放到培养基中，而是储存于细胞中，有的产物在细胞内积累，产生反馈抑制作用会影响进一步合成，无法提高产量，甚至代谢途径发生变化，如在使用缺失 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的棒状突变株于葡萄糖培养基中发酵谷氨酸；有的产物不能释放到发酵液中，最终被分解代谢，从而导致根本不能得到产物，如用啤酒酵母细胞生产 FDP (1, 6-二磷酸果糖) 的时候。人为地改变细胞膜的通透性以利于代谢产物在细胞外(培养基中)的积累，使代谢朝着人们希望的方向进行，是实现代谢人工调控的重要方法之一，具有现实的意义。

有研究表明，超声波处理后的绿脓杆菌细胞膜对疏水性化合物 16-上氧硬脂酸(16-DS)的通透性增强，且胞内 16-DS 随声场辐射功率而增大<sup>[1]</sup>。1990 年 Joersbo 等<sup>[2]</sup>人发现超声处理甜菜原生质体后，其膜通透性在 1 小时后才逐渐减少。Ju Chu<sup>[3]</sup>等用 25kHz 的超声发生器(输出电功率为 80W)处理生产庆大霉素的 *Micromonospora* spp 细胞，研究显示，当超声离线处理时间从 30s 增加到 150s 时，胞内 GM(庆大霉素)释放从 38.3% 提高到 75.8%。菌丝体可以耐受超声作用，尽管从显微镜下看到其细胞膜已变成海绵状，但细胞仍然没有损伤，而且合成 GM 的能力加强。超声波在线处理时，80 小时的发酵，后 GM 的释放速度随超声处理时间的增长而提高，在发酵液的流速为 150ml/min 时，连续处理 6 次

的比处理 1 次的 GM 产量提高 3.8 倍。而且在 80-90 小时的发酵后，用超声连续处理 5 次，每次 7 分钟，可使 GM 的产量比不处理的提高 70%。

段学辉<sup>[4]</sup>等用超声波处理生产 ATP 的啤酒酵母后，发现经超声波处理后，细胞膜的通透性比其它方法处理后的更高，由于细胞膜结构损伤的比较严重，超声波处理后细胞的酶活性也比其它方法处理后的高，但因超声波可使酶失活，因而反应的速率没有明显提高。

Yoshio Ishimoyi 等<sup>[5]</sup>人报道，使用 15W 低功率超声波对黑曲霉作用，使葡萄糖氧化酶能够连续地从活细胞释放出来。

与其它方法的比较：

目前国内外所使用的调控代谢产物的方法主要包括：化学法如有机溶剂法、抗生素法；物理法如空气干燥、渗透压冲击、温度冲击、超声波处理等，以及 pH 扰动等。化学法有一定的局限性，不同来源的细胞膜大致相同，但它们的化学组成及复杂性却不尽相同，因而对某种细胞膜通透性有响应的药物不一定适合于另一种细胞膜，缺乏安全性。另外，化学方法需要消耗大量的化学药品，不仅增加了成本，而且对于产物的后分离及环境卫生方面都有不利的影响。

低频超声波的空化作用可以导致细胞的非热生物效应，使细胞膜短时局部破裂，从而改变细胞质膜的通透性，使胞内物质释放或胞外物质入细胞内。选择适当的超声参数，使细胞壁瞬间形成较多的小孔，代谢产物或中产物迅速释放，同时不伤害或少伤害细胞本身，从而不影响代谢反应的进一步进行。这对于发酵产物的获得具有重要的意义。

另外，超声的作用还可以使细胞内物质包括胞内酶从细胞内释放出来，使酶与底物的接触面积增大，增加了酶的活性。如果能选择合适的超声参数，使酶释放出来，而又不使酶失活，那么就可以用于生产中提高反应速度，缩短反应时间，提高生产效率。

### 3 超声改变细胞膜通透性在基因转导方面的研究进展

1994年,许宁<sup>[6]</sup>等人根据超声波的空化作用,将外源基因导入植物组织及原生质体中,获得了极高的稳定转化率。从而发展成了一种新的外源基因导入方法。并证明可直接转化带壁的植物细胞。现已推广应用到小麦幼胚<sup>[6]</sup>及哺乳动物细胞<sup>[7]</sup>,均获得了较好的结果。

丁志山<sup>[8]</sup>等利用超声波转基因技术引入到转化酵母原生质体中,获得了 $10^3$ 转化子/UG质粒DNA的转化率。超声处理时间会影响转化率,较长时间的处理引起原生质体死亡率升高,从而导致转化率降低。

Trick<sup>[9,10]</sup>等将该技术与农杆菌转化法结合,建立了SAAT(sonication-assiated Agrobacterium-mediated transformation)转化技术,使GUS基因的平均短暂表达频率提高100-1400倍。该技术适用于多种植物组织。通过电镜和光镜,证明超声处理可引起植物细胞壁和细胞膜产生裂缝(fissures)和通道(channels)—这种生物效应使得农杆菌容易进入到植物内部组织。

董云洲<sup>[11]</sup>用超声波法处理烟草花粉的生物学效应及它诱导GUS基因转化烟草花粉,获得了短暂表达。研究表明,超声处理的强度和ación都会影响到花粉的活力,其中以声强的影响更甚。随着超声强度提高和处理时间的延长,对烟草花粉的活力和萌发率具有显著影响。声强 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ 、时间10-20min是比较理想的参数,对单核晚期和双核早中期的烟草花粉进行超声波转化,分别获得了18.6%和35.7%的GUS基因短暂表达频率。他认为这是由于超声波的空化作用等力量,造成花粉内外发生了物质交换,外源基因进入花粉并得到了短暂表达。这进一步证明了超声波具有高效的使细胞膜通透性增强,从而诱导外源基因进入细胞的能力。

最近,不同形态的超声相继用于基因转导

实验,包括脉冲<sup>[12]</sup>,连续超声<sup>[13]</sup>,和冲击波<sup>[14]</sup>及旋转管<sup>[15]</sup>(目的是增强空化效应)。这些报道都发现转导的细胞数和蛋白质的表达率都随着超声强度的增加而增加。

Peter E. Huber<sup>[16]</sup>等发现在细胞的存活率为5%的时候,与细胞和DNA直接混合技术相比,冲击波导致高8倍的转导率。而在其细胞的存活率为45%,正弦曲线波可以使转化率提高80倍,细胞用冲击波与正弦曲线波的转导率分别为0.08%和3%,他还指出超声的热效应可以影响转染率,建议最好使用正弦曲线波的脉冲形式以避免使细胞失活热效应。

**超声转导基因的优点:**

相对于基因枪技术,超声转导基因操作简单,处理量大,具有更好的均衡性和持续性。超声处理的面积大,从而提高了基因转化的效果,减小了基因枪技术的随机性。

另外,因为超声波转导是由空化作用引起的,因此可以通过控制超声来控制转导,可以通过控制超声作用时间和与超声接触的面积来控制转导的方位与时间,这种独特的机制使得这种方法对活体实验很适用,使其可作为一种很有发展的潜力基因疗法。

### 4 超声对细胞膜通透性的影响可以强化药物作用,用于治疗肿瘤

化学疗法治疗肿瘤时,往往因为药物的渗透性不好而影响组织细胞对药物的吸收,从而导致药效不能很好的发挥。单纯地增加药物的使用量可以提高药物的渗透压,但往往又伴随着对正常组织细胞的伤害加重,因而化学疗法的作用受到很大限制。在超声作用下,细胞可以让胞外大分子进入,这种现象已在20kHz超声,冲击波和kHz声波作用下观察到<sup>[17]</sup>。

Katsuro Tachibana<sup>[18]</sup>将HL-60细胞在 $0.3\text{W}/\text{cm}^2$ ,48kHz超声下处理,然后用电子显微镜观察,发现细胞的表面的茸毛消失,细胞膜的通透性有短暂的加强,从而导致HL-60

对 Ara-C 的吸收。而且在其实验的超声强度和频率下, 没有发现细胞的抗增生的作用。压力波导致短暂的细胞膜通透性提高而不影响细胞的活力, 他认为可能是细胞膜上的水通道或小气孔短时地扩大或受到影响, 这导致药物进入细胞的量增加。

文献 [19-21] 还报道了药物进入细胞的量与超声强度的关系。

Alexander Marin<sup>[22]</sup> 等研究了连续超声和脉冲超声作用于在磷酸盐溶液 ( PBS ) 中的 HL-60 细胞对阿霉素的吸收。在 PBS 中, 二者作用都强化了对 DOX 的吸收。脉冲超声和中间脉冲超声的间隙对药物的吸收没有显著影响。药物的吸收的主要影响因素是超声强度, 但是, 随着超声强度的增大, 伴随着强化现象的是超声对细胞的分解作用加强。

由于超声作用可能导致细胞膜的通透性增强, 使大分子药物通过而进入细胞, 目前这一技术已用于强化化学试剂对细胞的杀伤力。

超声波非热的生物效应和抗癌药物的共同作用不仅可以强化治疗效果, 而且可以减少化学药剂的使用量。但并不是所有的治疗肿瘤的化学药剂都可以用超声来强化吸收<sup>[18]</sup>。

## 5 超声波对细胞膜通透性影响的作用机制

超声波对细胞膜通透性影响的作用机制是十分复杂的, 主要是空化作用引起的机械力和热作用。所谓空化, 即在液体内形成空泡的现象。在空泡湮灭的过程中, 产生强压球面波和高温。当超声波在液体中传播时, 将引起媒质分子以其平衡位置为中心的振动, 在超声波压缩相内, 分子间的距离减少, 而在稀疏相内, 分子间的距离将增大, 如果声强足够大, 液体受到相应负压力亦足够大, 那么分子间的平均距离将增大, 以至超过极限距离, 从而破坏液体结构的完整性<sup>[23]</sup>。该作用可能导致空泡周围的细胞的细胞壁和质膜的击穿或可逆的质膜通透性改变<sup>[24]</sup>。如果这种改变是可逆的, 细胞应用声学

自身能修复壁和膜的破损则可以提高细胞膜和细胞壁通透性, 并且不影响细胞的生物活性。因而超声对细胞膜的作用是暂时的, 当超声作用终止后, 细胞膜的通透性就会恢复到原来的状态<sup>[11]</sup>。

1991 年由 Zimmermann 等<sup>[25]</sup> 人的电-机械模型提出了超声导致膜通透性改变的另一种可能性: 在超声波作用下, 膜内的流体静压力足能够诱导细胞膜机械破裂。这也许是超声导致细胞膜通透性改变的原因, 或许与上述空化现象一起存在, 导致膜通透性改变。

## 参 考 文 献

- 1 Rapoport N, Smironov A, Itimoshin A, et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, **344**(1): 114-124.
- 2 Joersbo, Morten, Brunstedt. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 1990, **16**(7): 719-724.
- 3 Ju Chu, Bailin Li, Siliang Zhang, et al. *Process Biochemistry*, 2000, (35): 569-572.
- 4 段学辉, 叶勤, 张嗣良. 华东理工大学学报, 2000, **26**(1): 33-36.
- 5 Yoshio, Ishimoyi et al. *Enzyme Microbe Technol*, 1982, **4**(3): 85-88.
- 6 许宁, 张宏. 自然科学进展 - 国家重点实验室通讯, 1994, **4**(4): 507-509.
- 7 许宁, 邹翔. 自然科学进展 - 国家重点实验室通讯, 1994, **4**(3): 368-370.
- 8 丁志山, 沃兴德. 生物技术, 1996, **6**(4): 41-43.
- 9 Trick H N, Finer J J. *Transgenic Res*, 1997, (6): 329-336.
- 10 Trick H N, Finer J J. *Plant Cell Rep*, 1988, **17**: 482-499.
- 11 董云洲. 应用基础与工程科学学报, 1999, (4): 393-341.
- 12 Tata D B, Dunn F, Tindall D J. *Biochim Biophys Res Commun*, 1997, **234**: 64-67.
- 13 Kim H J, Greenleaf J F, Kinnick R R, et al. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**: 1339-1346.
- 14 Lauer U, Bürgelt E, Squire Z, et al. *Gene Ther*, 1997, **4**: 710-715.
- 15 Bao S, Thrall B D, Miller D L. *Ultrasound Med Biol*, 1997, **23**: 953-959.

(下转第 25 页)

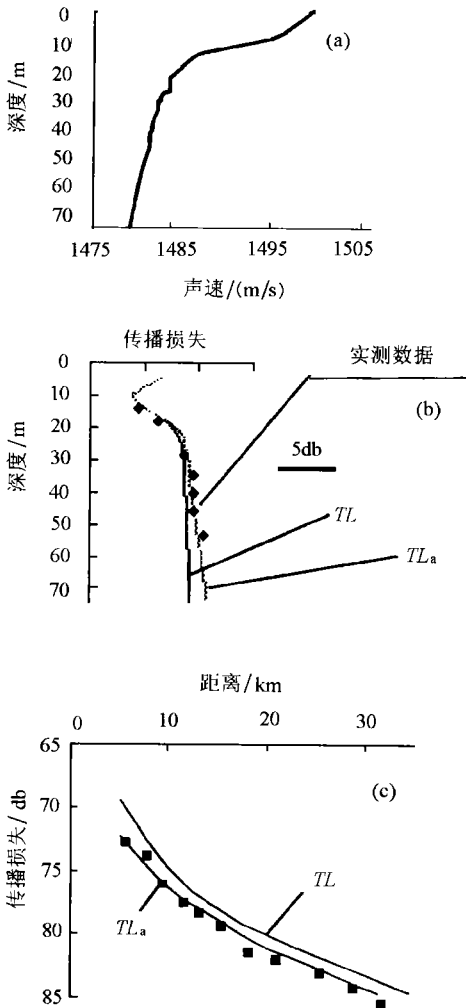


图1 传播损失理论计算与实测数据对比

从图1可以看出：(1)附加传播损失随着接收与声源深度差的增加而增加，这是由声

线掠角随深度差增加而引起的。(2)在较近距离处，附加传播损失较大；随着接收距离增加，附加传播损失逐渐减小至一确定值。这和用 Snell 定律的分析结果一致。

## 4 讨论

(1)附加声传播损失与声速梯度、声源和接收的相对深度、基阵深度方向指向性和接收距离等因素有关，在较远距离上几乎不随距离变化。

(2)本文给出的有深度指向性声纳的声纳方程，在应用上有更宽的适用范围，尤其声速梯度值较大时，(1)式会引起较大误差，需使用(7)式。

(3)当使用有深度指向性基阵测量声传播损失时，需修正附加声传播损失的影响，才能真正反映水声环境的声传播特性。

(4)实际使用基阵探测目标时，沿深度方向缓慢转动波束，对准信号最强方向是重要的。它可以使附加声传播损失降至最低而有利于探测。这已经为海上实践所证实。

## 参 考 文 献

- 1 尤立克. 水声原理. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1991.
- 2 张仁和. 声学学报, 1979, 4(2): 102-108.
- 3 张仁和. 声学学报, 1981, 3(4): 535-545.
- 4 周坚力, 张仁和. 海洋学报, 1982, 4(3): 283-291.
- 5 王玉泉. 水声设备. 北京: 国防工业出版社, 1981.

(上接第 29 页)

- 16 Huber P E, Juergen, Jenne, et al. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1999, 25(9): 1451-1457.
- 17 Miller D, Bao S P, Morris J E. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1999, 25(1): 143-149.
- 18 Tachibana K, Uchidab T, Tamura K. *Cancer Letters*, 2000, (149): 189-194.
- 19 Gambihler S, Delius M. *Br.J.Cancer*, 1992, (66): 69-73.
- 20 Weiss N, Delius M, Gambihler S, et al. *Int.J.Cancer*, 1994, (58): 693-699.
- 21 Prat F, Sibille A, Luccioni C, et al. *Gastroenterology*, 1994, (106): 937-944.
- 22 Marin A, Muniruzzaman M D, Rapoport N. *Journal of Controlled Release*, 2001, (71): 239-249.
- 23 袁易全. 近代超声原理与应用. 南京: 南京大学出版社, 1996. 108-168.
- 24 丁志山, 沃兴德. 生物技术, 1996, 6(4): 41-43.
- 25 Zimmermann U, et al. *Biophys*, 1991, 14: 881-899.