

声致穿孔仪的研制

沈 阳, 钱德初, 寿文德
(上海交通大学生物医学工程系, 上海 200030)

摘要: 在超声波作用下所引起的振动能改变细胞膜表面结构, 可使细胞膜通透性增加。利用这一原理, 近十几年来新兴起了使用超声作为辅助手段的声致穿孔方法。可以借助超声作用将目标大分子(如药物、DNA 等) 定点传输到细胞内, 起到精确治疗和基因治疗的作用, 并借助超声增强治疗效果。但其相应的实验用超声设备尚未达到完美, 有多处可作改进。现有设备每次实验时只能对一个样本进行操作, 作者在已有的设计思想基础上进行改进, 设计制造了新的声致穿孔仪, 并从导纳特性、电声效率、声功率以及声压分布等多方面对仪器的性能进行了测试。结果表明, 该仪器性能达到了设计要求, 使用该仪器进行的声致穿孔实验也取得了较为满意的结果。

关键词: 声致穿孔; 超声; 换能器

中图分类号: TB552 文献标识码: A 文章编号: 1000-3630(2004) 02-0088-05

Development of sonoporation instrument

SHEN Yang, QIAN De-chu, SHOU Wen-de

(Department of Biomedical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Vibration caused by ultrasonic waves can change the structure of cell membrane and enhance its permeation. During the last decade, a new ultrasound-aided method, sonoporation, came into being. It uses ultrasound to transmit target molecules (such as drugs and DNA) into cells to perform precise therapy and gene therapy. Since current sonoporation instruments are far from perfect, much needs to be done in improving their performance. As existing instruments can only deal with one specimen, we have made improvements and developed a new type of sonoporation instrument. It has been tested with respect to its admittance, electroacoustic efficiency, transmitted sound power and distribution of sound pressure. The results show that the instrument meets the requirements, and subsequent sonoporation experiments are satisfactory.

Key words: sonoporation; ultrasound; transducer

1 引 言

声致穿孔 (Sonoporation) 是一种使用超声作为辅助手段的基因治疗方法, 利用超声波使大分子透过细胞膜, 进入细胞内。虽然机械作用和空化效应均可影响细胞膜通透性, 但许多学者认为超声提高细胞膜通透性主要源于空化效应。超声波与空化泡相互作用, 将声能转化为机械效应(如非热效应)作用到邻近的细胞上。

当超声剂量较大时, 会引起细胞溶解, 使细胞死

亡; 当剂量较小时, 会引起暂时的、可修复性的细胞膜损伤, 使大分子进入细胞, 实现大分子物质的定位输送。这种实验方法已应用到基因转染。体外实验表明, 超声照射可以使 DNA 质粒(较小的环状 DNA 片段) 进入细胞, 存活下来的细胞可以表达导入的 DNA。一系列体外实验表明, 声致穿孔有望用于体内的基因转移过程。过去 10 年中, 借助声致穿孔技术将载体送入到肿瘤细胞内, 使用基因转移进行治疗的免疫疗法已经取得相当的进展并应用于临床试验, 但这种方法的安全性和有效性仍有待检验 (Berinstein 1998)^[1]。

目前也有实验借助人工空化 (artificial cavitation) 的方法提高声致穿孔的效率。Bao^[2] 等人采用超声造影剂 Alburnex 为空化核进行基因转化的实验, 较不使用空化核时的转化效率明显提高。

2 声致穿孔实验条件与装置

超声影响细胞膜的通透性,其提高细胞膜的通透性存在阈值剂量。在合理控制超声辐照的条件下,既能使膜通透性可逆性增加,又不致使细胞明显受损。细胞膜通透性改变是基因转移的前提。因而在使用声致穿孔时应预先确定准确的实验条件。许多实验小组经过一系列的实验,已确定了几个超声发射的条件:频率 2.25MHz,声压 0.1MPa;频率 1MHz,声压 0.12MPa;频率 1.98MHz,声压 0.2MPa。

其中 Ward 等人确定的实验参数已经为许多实验人员所接受。这套实验的装置示意图如图 1 所示^[3]。实验的具体条件是:直径为 2.5cm 的发射换能器,超声发射频率为 1.98MHz,声场空间峰值声压为 0.2MPa;直流马达带动试管以 200 r/min 的转速转动;换能器与试管的间距为 10cm;整个实验装置放于 20 的水槽中。实验中换能器发射的占空比为 10% (发射时间/休止时间=2ms/18ms),照射时间为 5min。

多次的实验已经证明这套装置能够较好地实现声致穿孔,将目标大分子导入细胞,但是每一次实验只能对一个样品进行操作。实验人员对此提出了改进方案,主要思路是将换能器发射的声场范围增大,从而能够对多个样品同时进行操作。相应的,试皿的转动方式也要作相应的变化。因而我们设计的实验装置使用大的平板换能器,用摇床使试皿匀速往复运动。

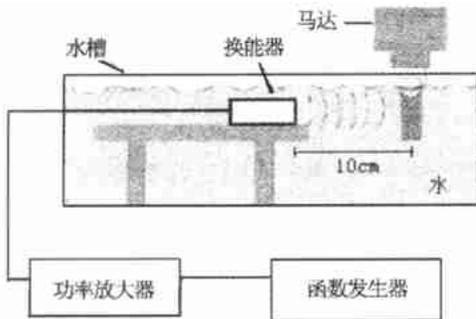


图 1 Ward 等人的实验装置示意图

改进后实验装置的示意图如图 2 所示。实验装置由两个主要部分构成:超声发射部分和超声辐照部分。其中超声发射部分要根据实验要求产生声场;超声辐照部分主要保证所有样品都位于声场中,

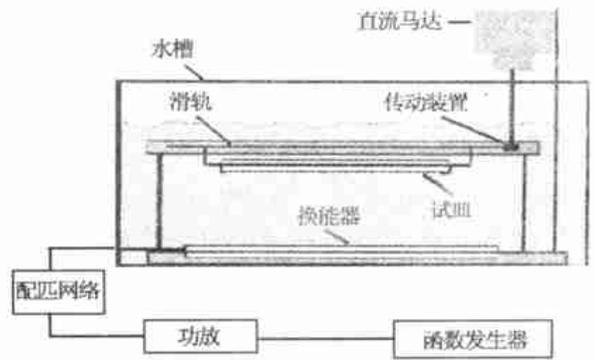


图 2 本实验装置示意图

并使样品保持匀速往复运动。超声发射部分是整个实验装置的核心。

3 实验装置的设计与实现

3.1 超声发射部分

超声发射部分的核心是超声换能器。借鉴 Ward 等人的实验条件,实验人员提出要求换能器发射频率为 1MHz 左右,换能器在试皿底部的声强为 $0.4\text{W}/\text{cm}^2 \sim 0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 。由于实验需要的换能器面积较大,故从实验室现有的换能器中选择 4 块特性频率最接近的陶瓷片(4 片陶瓷片的谐振频率分别为 1180kHz、1162kHz、1173kHz 和 1179kHz,大小均为 $40 \times 57\text{mm}^2$,厚度为 2mm)组成换能器。采用铝合金作为匹配层,工作频率选为 1175kHz。由于换能器本身的特性具有电容性,为了使功率源和换能器的阻抗匹配,在 1175kHz 的工作频率上利用实验测得的换能器数据,设计并制作了相应的匹配网络,与换能器一同构成超声发射系统。

功率源是根据实验要求设计定制的 5887H 功率源。根据实验人员的要求,试皿底部所需最大声强为 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$,考虑到以后实验的需要和试皿底部产生的衰减,功率源的最大发射功率要留有足够的余量。

控制器采用和功率源配套的 5887H 控制器。

3.2 超声辐照部分

实验平台的底板采用厚铜板挖凹槽,将换能器定位;在滑轨上将试皿予以定位。从而保证样品能位于声场内。

水浴使用上海博迅公司的 HHS 电热恒温水浴器。

4 装置性能的测试

4.1 功率源的标定

控制器连续输出高电平, 功率放大器输出频率为 1MHz 的正弦波, 外接 5 标准无感电阻(200W)作为负载, 测量功率放大器的输出。使用 IWATSU 的 SS-7804 型示波器测量功率放大器输出电压和负载两端的电压, 由此计算相应的输出功率。

根据得到的数据, 绘制功率放大器输出电压有效值的平方与输出功率间的拟合曲线(见图 3), 直线拟合度很好, 说明功率放大器输出稳定。

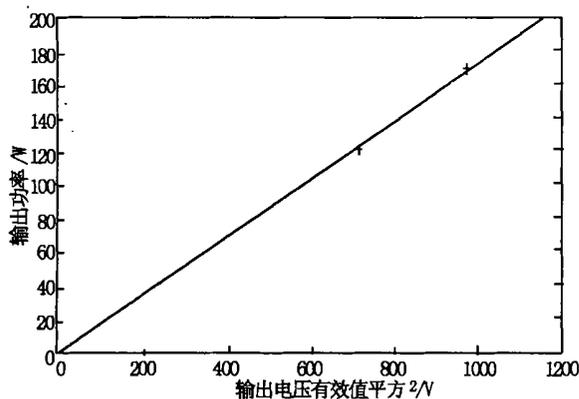


图 3 输出功率 输出电压有效值平方的拟合曲线

4.2 换能器系统的测定

4.2.1 换能器系统导纳(阻抗)特性与电声效率测定

使用 HP4192A 型阻抗分析仪测量换能器和匹配网络组成的系统在水中和空气中的导纳-频率特性, 数据见表 1 和表 2(其中 G 代表导纳的实部, B 代表导纳的虚部, 单位为西门子)。

根据表 1 和表 2 绘制导纳圆图(其中 f_s 为换能器系统的谐振频率, f_1 、 f_2 是导纳虚部出现极值时对应的频率), 见图 4 和图 5。

对比换能器系统在不同介质中的导纳圆图, 可以得到换能器系统在水中谐振发射的电声效率 d_e

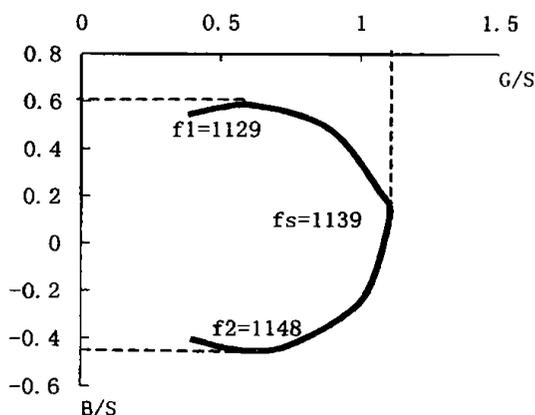


图 4 换能器系统在空气中的导纳圆图

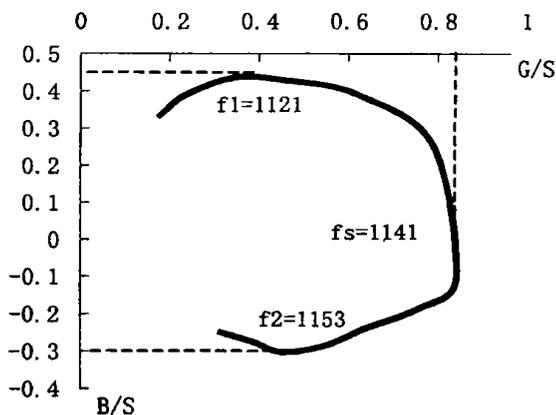


图 5 换能器系统在水中的导纳圆图

(换能器系统在空气中看作空载, 水中为有负载), 计算公式为:

$$d_e = \frac{Dw(Da - Dw)}{Da * G_T}$$

其中, Da 、 Dw 为空气中和水中的导纳圆的直径, G_T 为水中达到谐振时对应的 G 。

根据测量数据计算可得 $d_e = 25.4\%$, 即为换能器系统在小电压驱动发射时的电声效率。

4.2.2 谐振辐射时的声功率标定

声功率的测量采用辐射力法, 微量天平下挂吸声橡胶贴面板(面积覆盖整个换能器的发射面)。换能器发射时, 天平示数的减少值就是产生的辐射

表 1 换能器系统在空气中发射的导纳-频率特性

f/kHz	1124	1127	1129	1132	1134	1137	1139	1141	1143	1146	1148	1150	1153
G/S	0.394	0.505	0.609	0.804	0.932	1.069	1.107	1.035	0.934	0.739	0.613	0.511	0.405
B/S	0.547	0.574	0.584	0.532	0.440	0.221	0.13	-0.182	-0.314	-0.435	-0.454	-0.440	-0.408

表 2 换能器系统在水中发射的导纳-频率特性

f/kHz	1111	1116	1121	1126	1131	1136	1141	1144	1147	1150	1153	1156	1159
G/S	0.178	0.232	0.342	0.454	0.620	0.790	0.839	0.758	0.635	0.550	0.454	0.389	0.317
B/S	0.334	0.387	0.435	0.429	0.391	0.252	-0.105	-0.184	-0.240	-0.284	-0.303	-0.276	-0.250

力。按公式 $P = Fc$ 计算声功率(其中 P 为声功率(W), F 为吸收靶所受的辐射力(N), c 为水中声速(m/s)), 故有辐射力和声功率间的换算关系: 产生 1g 辐射力对应的声功率为 14.72W。

测量中, 根据功率放大器的表头示数读出高频输出有效电压 U_{rms} 和消耗的总功率 W_e ; 使用 SS-7804 型示波器测量功率放大器输出的电压峰峰值 U_{pp} ; 实验中测得的辐射力根据 14.72W/g 的关系折算为声功率 P 。

计算声强时使用的平板换能器的面积为 $8 \times 11.4 \text{ cm}^2 = 91.2 \text{ cm}^2$ 。

(1) 选择发射频率为 1141kHz

根据换能器和匹配网络系统在水中发射的导纳圆图, 谐振频率为 1141kHz。在此频率下测量的电压-声功率数据如表 3 所示:

表 3 1141kHz 时的电压-声功率特性

U_{rms}/V	消耗总功率 W_e/W	电压峰峰值 U_{pp}/V	声功率 P/W
5	20	12.1	2.85
8	48	17.5	7.50
10	70	21.4	10.95
12	97	24.3	13.50
16	150	34.6	16.20

当 U_{rms} 达到 16V 之后, 匹配网络消耗功率过大, 已经无法继续进行测量。其原因是匹配网络针对换能器系统在工作频率为 1175kHz 时的发射情况而设计的, 在 1141kHz 的电声效率过低。

(2) 选择发射频率为 1175kHz

设计工作频率为 1175kHz, 在此频率下测量的电压-声功率数据见表 4。根据表 4, 绘制 $U_{pp}^2 \sim P$ 拟合曲线如图 6 所示。

表 4 1175kHz 时的电压-声功率特性

U_{rms}/V	消耗总功率 W_e/W	电压峰峰值 U_{pp}/V	声功率 P/W	声强 W/cm^2
4	7	8.56	0.975	0.0107
8	20	17.5	6.375	0.0699
10	31	21.4	10.575	0.1160
14	61	29.7	19.875	0.2179
18	98	38.15	32.400	0.3553
20	119	41.6	39.300	0.4309
24	163.5	49.9	52.875	0.5798
28	218	57.3	67.350	0.7385

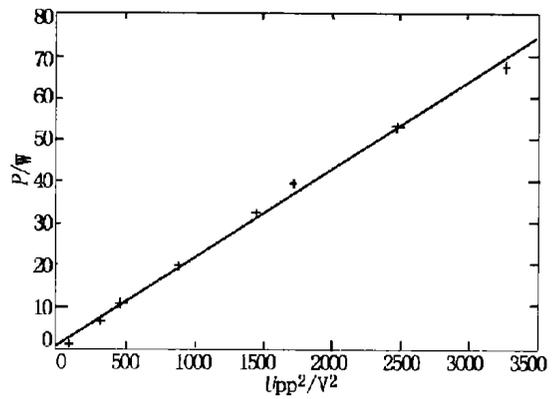


图 6 $U_{pp}^2 \sim P$ 拟合曲线

根据实验数结果, 在 $U_{rms} = 28.2V$ 时声强即可达到设计要求的 $0.8W/cm^2$ 。测量数据与一年半前刚装配好时相比略有下降(刚装配好时, $U_{rms} = 27.5V$ 时声强为 $0.8W/cm^2$)。

(3) 采用不同的发射频率

保持 $U_{rms} = 24V$ 不变, 测量计算得到不同频率的电声效率如表 5 所示。

由实验数据可见, 工作频率 1175kHz 基本保证了电声效率达到最大。但测得的电声效率最大时的频率与一年半前刚设计装配好时相比略有漂移。

4.2.3 换能器声压相对幅度分布

平板换能器在近场的声压分布较为复杂, 若要精确绘制, 起伏情况十分严重, 考虑到本换能器在使用过程中所需的是一定时间内某一面积上的平均值, 所以采用了一个表面积较大的水听器, 以在声辐射面上沿横轴和纵轴每隔 0.5cm 取一个点, 将测量值折算到以这个点为中心的、边长为 0.5cm 的正方形内的平均声压。

在工作频率为 1175kHz 时, 选择输出声功率为 $0.58w/cm^2$ 。以灰度表示声压幅度的相对大小, 见图 7(a); 用灰度表示声压幅度相对幅度梯度大小, 见图 7(b); 灰度与相对声压幅度(梯度)的对应关系见图 7(c)。

由实验可以看出, 平板换能器在近场时的声压分布具有区域性, 但在每片换能器的中心区域声压幅度还是比较大。在同一检测平面上, 不同的换能器表现出的声压特性不相同。

表 5 不同发射频率下的电声效率

f/KHz	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180
$dL/\%$	27.78	28.94	30.68	31.80	32.20	32.39	32.82	32.61	32.24	31.19	30.47

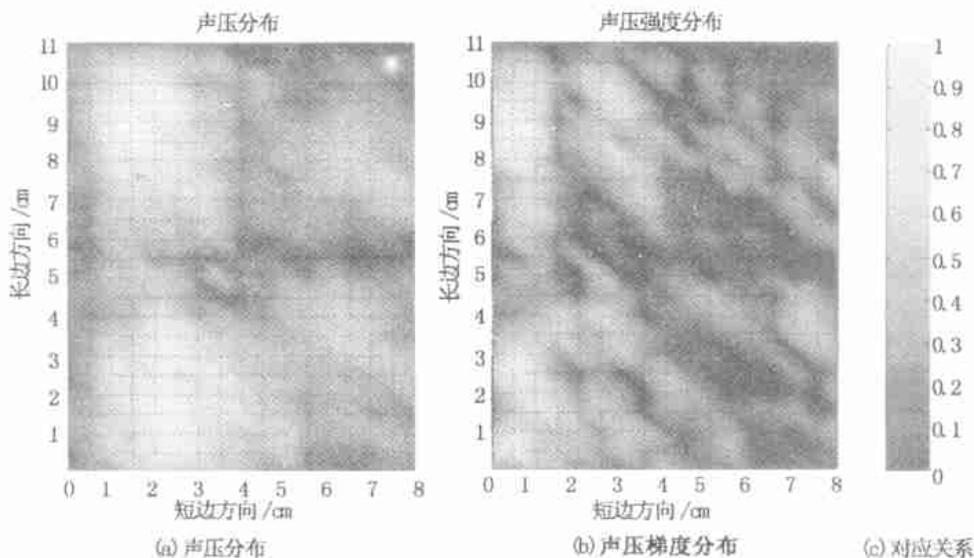


图 7 相对声压幅度(梯度)分布

5 装置实际使用结果

上海交通大学徐宇虹实验室的何伟等人利用这套设备进行了实验,验证了超声对细胞活性的影响。在不使用人工空化核的条件下,使用不同的超声剂量,细胞经过照射后的存活率如表 6 所示。

表 6 不同超声辐照剂量对细胞活性的影响

超声声强/(W/cm^2)	超声照射时间/min	细胞存活率/%
0.8	1	64 5
0.8	2	52 5
0.4	1	100 8
0.4	2	100 4

由表 6 可见,换能器的发射强度已经能够满足声致穿孔的需要,实验装置基本实现了预定目的。

参 考 文 献

- [1] Berinstein N L. Biological therapy of cancer. In: Tannock IF, Hill RP, eds. The basic science of oncology. 3rd ed[M]. New York, NY: McGraw Hill, 1998. 420-442.
- [2] Bao S, Thrall B D, Miller D L. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. [J]. Ultrasound in Med & Biol, 1997, **23**(6): 953-959.
- [3] Mark Ward, Wu Jun-ru. Experimental study of the effects of OPTISN concentration on sonoporation in vitro. [J]. Ultrasound in Med & Biol, 2000, **26**(7): 1169-1175.

简 讯

声学技术 入编 中文核心期刊要目总览

由中科院声学所东海研究站、同济大学声学研究所、上海市声学学会和中船重工集团公司第 726 研究所四单位合办的学术性刊物《声学技术》杂志,最近收到了中文核心期刊要目总览 2004 年版编委会的入编通知。

依据文献计量学的原理和方法,经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析,并通过学科专家评审,《声学技术》被确定为一般工业技术类的核心期刊,编入了中文核心期刊要目总览 2004 年版(即第四版),该书定于 2004 年 7 月由北京大学出版社出版。

本版核心期刊评选,采用了被引量、被摘量、被引量、它引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标。选作评价指标统计源的数据库(个别为文摘刊物)有 51 种,统计到的文献数量共计 9435301 篇次,涉及期刊 39893 种次。参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊,本刊名列其中。

从 1982 年创刊到 2003 年底,《声学技术》杂志共出版发行了 84 期,计 730 万字,其中包括生物医学超声等 3 个专辑和 20 多个会议论文集,成为了全国科技工作者发表科研成果、反映他们的学术造诣的重要阵地。《声学技术》入编中文核心期刊要目总览,是本刊发展历程中的一件大事,表明了《声学技术》的影响力大大增强,已经走到了全国科技期刊的发展前列,这是继本刊在 2004 年 3 月被《中国科技核心期刊》收录后,我国科技界、出版界对《声学技术》的又一次肯定。

声学技术 编辑部 丁玉薇