DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.021
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0701-04

论著

RF对纳米金标记的RNase-S局部加热效应的研究

翟建才[1],施建平[2],Kimberly Hamad-Schifferli[2],张曙光[2] ([1]第三军医大学基础医学部物理学教研室,重庆 400038;[2]Center for Biomedical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, MA02139, USA)

提 要:目的 在纳米级或微米级结构的线度可以和热辐射波长λ相比拟的状态下的辐射热传导的研究具有重要的实用意义,通过建立生物模型来研究射频电磁辐射(RF)对纳米结构辐射热传导的特征,并探讨微波非热效应的可能作用机制。方法 将制备的纳米金标记的RNase-S样品通过常规的Poly-C水解能力的测定及CD谱的测定分析,确定酶的2级结构的重组成功和活性的存在后,比较RF对样品、水和空气的热效应。结果 通过紫外分光光度计对制备的纳米金标记的RNase-S样品的Poly-C水解能力的测定及谱的测定,表明研究中使用的生物模型和RNase A模拟得十分满意。空气浴中的封装空气样品的散热曲线呈现指数衰减规律,而空气样品的加热过程呈指数增加趋势。空气浴中的双蒸馏水样品的加热过程基本上是线性增加。但是,水浴的纳米金标记的RNase-S样品的加热过程却基本上保持恒定值。结论 RF辐射在实验的条件下会由于被加热介质的不同热物理性质表现为不同的加热效果,对于含有纳米金属的微结构,可能会在局部产生微涡流发热。以纳米颗粒为热源的辐射热传导可能会和生物大分子的结构调整发生谐振从而不表现出样品整体宏观的升温。生物功能性大分子关键部位局部加热的谐振吸收是微波等物理因素的非热生物效应的可能作用机制。

关键词:纳米结构;射频;局部加热作用;核糖核酸酶修饰物
中图法分类号:R-33;R312;R341.6 文献标识码:A

Local thermal effect of RF on nanogold-labeled RNase

ZHAI Jian-cai, SHI Jian-ping, Kimberly Hamad-Schifferli, ZHANG Shu-guang (Department of Physics, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a biological model with nanostructure and to investigate the characteristics of the thermal conduction by radio-frequency electromagnetic radiation upon the model for the exploration of the possible mechanism of microwave non-thermal effect. Methods The prepared nanogold-labeled RNase-S sample was analyzed by routine hydrolytic ability of poly-c and CD spectroscopy. After confirmation of the successful recombination of the enzymatic structure and the recovery of the enzyme activity, thermal effects of RF on the sample, water and air were compared. Results The biological model designed and prepared by us satisfactorily simulated the native RNase A in both recovery of enzyme activity and conformation. Air sample in air bathing possessed an exponent decreasing function for thermal dispersion and an exponent increasing function for RF thermal effect. The redistilled water sample had a linear increasing function for RF thermal effect. Meanwhile, nanogold-labeled RNase-S in water bathing kept constant for RF thermal effect. Conclusion Micro-eddy current local heating might occur in microstructure consisting of nanometal cluster. A biological macromolecule with nanostructure, acting as a source of thermal radiation and conduction, might resonantly interact with some changeable domains nearby, so the biological model keeps isothermal during RF heating. This may be a possible mechanism of nonthermal effect for microwave and other physical factors.

Key words: nanostructure; RF; local heating; modified RNase

在纳米级或微米级结构的线度可以和热辐射波长λ相比拟的状态下的辐射热传导的研究具有重要的实用意义。Mulet Jean-Philippe等[1]的研究表明,对纳米结构的加热作用具有局部性;此外,由于渐消波对能量交换的贡献,纳米颗粒向间距在纳米级的半导体材料表面的辐射热传导的波长几乎是单色的,而且在大小上可以加强若干个数量级。本实验研究旨在建立一种人工纳米微结构来探讨电磁辐射对生物大分子热效应

基金项目:国家留学基金委资助项目(200102)
作者简介:翟建才(1944-),男,天津市人,教授,主要从事生物物理技术在医学应用方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752214
收稿日期:2002-08-08;修回日期:2002-11-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的可能作用机制。RNase A 是一种重要的生理功能酶;它可以方便地在第 20～21 残基之间分开成 2 部分:分子量较小的短肽 S-Peptide 和剩余部分 S-Protein,并能重新组装成活性完全复活的 RNase-S,而成为研究蛋白质折叠的适宜模拟物[2]。Nanogold® 是一种新近研制的分散状态纳米金标记物,可以较容易地标记在任何含有巯基的抗原或生物大分子上。于是,我们利用纳米金标记物 Nanogold® 先和含巯基的 S-Peptide 替代物 S-18 短肽结合,再和 S-Protein 合成为修饰的 RNase-S 作为纳米级结构的辐射热传导的生物模型,进行了生物纳米结构辐射热传导机制的实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料设计

我们设计了 S-18 短肽,其氨基酸序列为 n-CGGKETAAAKFERQHMDS-c,除 CGG 外,其它部分保留了 S-Peptide 的功能序列。设计加入的 1 个含巯基的半胱氨酸 C 是为了和 Nanogold 共价结合;2 个甘氨酸 GG 充作间隔基团,以避免半胱氨酸 C 结合纳米金后可能发生的结构障碍。

1.2 样品制备

合成的 S-18 肽样品已经过高效液相色谱(HPLC)纯化并通过质谱鉴定。固体纳米金试剂先按 0.3 μmol/L 的浓度溶于异丙醇,再加去氧、去离子水稀释到 1 ml 制成溶液,直接在溶液中加入 150 nmol/L 的 S-18 纯肽,振荡均匀混合后在 4 ℃的冰箱中放置过夜。充分发生反应的溶液系统经 Sephadex G-25 过柱,收集标记了纳米金的肽 S-18;再在缓冲液(pH 6.0)中与 S-蛋白在室温下组装成纳米金标记的 RNase-S。S-18 由 Alpha Diagnostic 公司(San Antonio, TX, USA)合成,纳米金试剂由 Nanoprobe 公司(Yaphank, NY)提供,S 蛋白为 Novagen 公司(Madison, WI)的产品。

1.3 生物模型鉴定

将制备的纳米金标记的 RNase-S 样品先通过常规的 Poly-(C)水解能力的测定鉴定活性大小,在确保酶活性的恢复大于 95% 之后,再通过 CD 谱的测定分析,确定纳米金标记的生物样品 RNase-SU 二级结构的重组成功。使用的 CD 谱仪为 AVIV 62DS 型。

1.4 对样品进行电磁耦合加热作用测试的仪器和装置

自行设计并在塑料骨架上绕制一只空心耦合线圈,线圈的线匝密度疏密得当,既保证螺旋线圈内场的均匀性又利于热交换,并且通过对塑料骨架尺寸和漆包线参数的选择最后使得耦合线圈与射频信号发生器(工作频率为 1 GHz,输出功率范围为 0.4～4 W)的输出阻抗匹配。信号以等时间间隔的方脉冲形式输入线圈,可以无惰性地给耦合线圈空腔内的媒质或者样品加热。实验所使用的多种信号发生器型号为 Hewlett Packard 8646C 型,由 Hp 公司生产。

1.5 RF 对纳米金标记 RNase-S 加热效应的测定

将装有纳米金标记的 RNase S 样品(1.5 ml)的薄壁且密封性很好的 PCR 试管放入线圈中。试管管盖钻小孔,针型热电偶探头插在样品中部。将耦合线圈连同样品等浸入 37 ℃的水浴中。在 1.4 说明的方式下 RF 作用 8 min,每间隔 1 min 测量样品的温度改变。测量温度变化的热电偶温度计型号是 Omega CSC32,系 Omega 公司的产品。

1.6 对比实验

为验证纳米颗粒传热的局部增强特征,我们在同样的 RF 加热条件下,在 PCR 测试管中封装和环境温度平衡的空气或双蒸水浸在空气浴(空气保持稳定,环境温度维持在变化幅度不大于 0.5 ℃的实验空间)中重复同样的实验。

1.7 空气浴封装空气样品的散热曲线测定

做出在上述实验的条件下封装的空气样品浸在空气浴中的散热曲线,以便分析比较。

2 结果

2.1 纳米标记的 RNase S 二级结构的 CD 谱的测定

通过紫外分光光度计对制备的纳米金标记的 RNase S 样品的 Poly-C 水解能力的测定活性恢复高于 95%;CD 谱的系列测定结果见图 1～3,图 1 是具有 α 螺旋结构的 S 蛋白的测量结果,图 2 是纳米金标记的 RNase S 样品的 CD 谱,图 3 是同一样品多次扫描 CD 谱。可以看出,纳米金标记的 RNase S 样品的 CD 谱与参考文献[3]给出的测量结果符合得很好,表明研究中使用的生物模型和 RNaseA 模拟得十分满意。

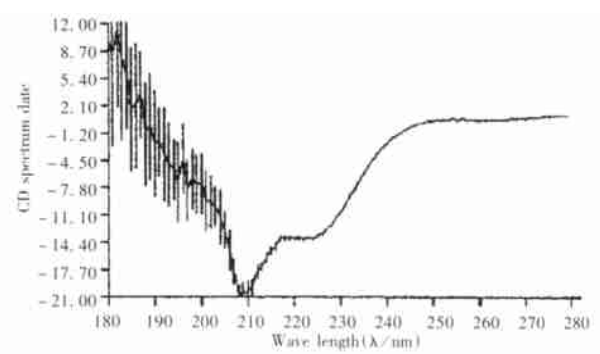


图 1 AVIV 谱仪给出的 S 蛋白的分析结果

Fig 1 AVIV CD spectrum for S-protein

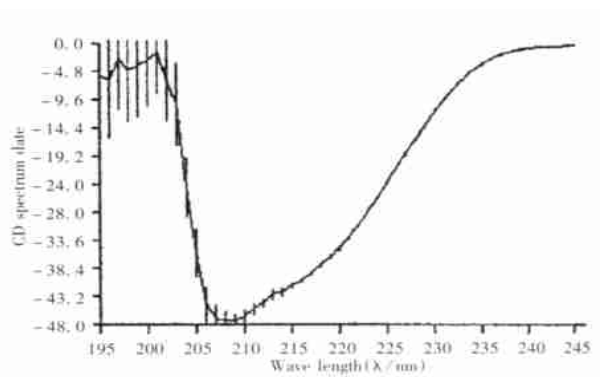


图 2 AVIV 谱仪给出的核糖核酸酶-S 的分析结果

Fig 2 AVIV CD spectrum for RNase S

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

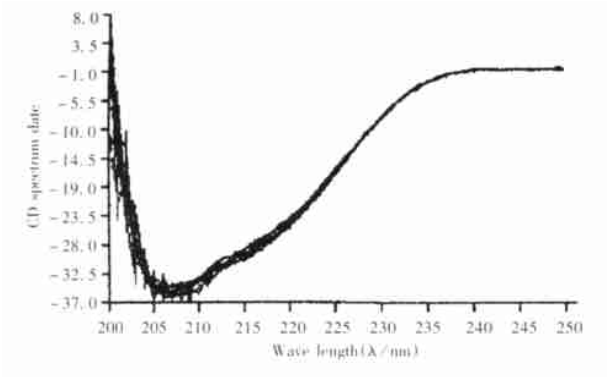


图 3　AVIV 谱仪用多次扫描法给出的核糖核酸酶-S 的分析结果

Fig 3　AVIV CD spectrum for RNase S by multi-scanning

2.2　RF 对纳米金标记 RNase S 样品加热作用及对比实验的结果

RF 对水浴中的纳米金标记的 RNase S 样品的加热作用的实验结果, 及对比实验的实验结果, 见表 1。从结果可以明显看出, RF 对含有纳米结构的样品的加热过程基本上保持恒定值; 而空气样品的加热过程呈指数增加趋势。空气浴中的双蒸馏水样品的加热过程基本上是线性增加。

表 1　RF 对纳米结构和对比媒质的热效应

Tab 1　RF thermal effect to nanostructure and comparing medium

	RF acting time (min)								
	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
Air (air bath)	25	30	34	36	38	38	39	40	40
Water (air bath)	25	26	27	29	31	32	33	34	35
Sample (water bath)	36	37	37	37	37	37	37	37	37

2.3　封装空气样品的散热曲线测量结果

空气浴中的封装空气样品的散热曲线测量结果分别见表 2, 和理论的指数衰减规律符合得很好。

表 2　空气的散热实验结果

Tab 2　Experimental result of air heat dispersion

Temperature (℃)	50	49	48	47	46	45	44	43	42
Time duration (s)	0	4	7	10	14	17	21	26	30
Temperature (℃)	41	40	39	38	37	36	35	34	33
Time duration (s)	35	40	46	52	59	67	75	84	94
Temperature (℃)	32	31	30	29	28	27	26	25	24
Time duration (s)	105	120	135	154	178	207	246	319	400

2.4　RF 对幽人米金标记的 DNA 的热效应

为了验证 RF 对含金属纳米结构的生物功能性大分子的特征热效应, 课题组还对纳米金标记的其他生物大分子的热效应作了实验研究。本实验组在同样的实验装置和接近的测试条件研究了用纳米金标记的 DNA 的热效应。在测出样品不同温度下(变化范围从室温到 70 ℃)的荧光谱的基础上, 再比较受到 RF 作用的样品的荧光光谱。利用曲线插值比较确定受到 RF 作用的样品对应的温度下的效应。测试结果由图 4 给出。

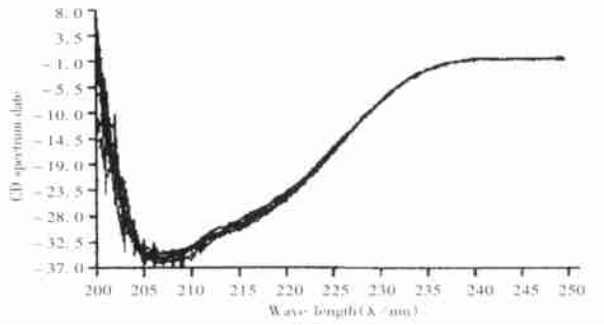


图 4　纳米金标记的 DNA 的热效应试验曲线

Fig 4　Experimental curve of nanogold-labeled DNA thermal effect

3　讨论

3.1　均匀高频电磁场的加热作用

从实验结果可知, 样品温度高于周围温度维持恒定不变的环境时, 封装的空气样品遵从温度-时间变化曲线呈指数衰减规律进行散热。RF 辐射在线圈内产生的均匀电磁场对介质在实验的条件下的间隔性加热作用, 由于被加热介质的不同热物理性质而表现为不同的加热效果: 空气样品在 RF 作用过程中, 温度呈指数增加的趋势变化, 增加的速度由快到慢, 最后达到平衡。以上结果说明, 比热小的空气等媒质在受到电磁场的作用吸收能量而使内能增加, 但同时存在的散热过程又使得系统内能减少, 但是能量的吸收率大于发散率, 从而形成按指数函数增温的净效果。去离子水(纳米金标记的核糖核酸酶 RNase S 样品的溶液)的比热比空气高得多, 空气浴中的去离子水样品在加热过程中, 温度基本上保持线性增加, 则表明在同样的试验条件下, 比热值大的媒质净效果的能量沉积率基本上为常数, 即相当于对一个绝热系统加热。但是, 水浴中的纳米金标记的 RNase-S 溶液在加热过程却能保持温度恒定, 表明样品体系内部必然存在某种效率极高的能量吸收机制。根据 Mulet Jean-Philippe 等[1] 的研究结果, 对纳米结构的加热作用具有局部性; 纳米颗粒向间距在纳米级的半导体材料表面的辐射热传导的波长几乎是单色的, 而且在大小上可以加强若干个数量级。我们所采用的样品是具有半导体性质的偶联着纳米金的蛋白质。这个生物实验模型满足 Mulet Jean-Philippe 等[1] 的条件, 因此纳米结构的辐射热传导共振吸收局部加热增强是对实验结果的合理解释。

3.2　局部纳米结构共振热辐射增强是高频电磁场的非热生物效应的可能机制

微波、激光等高功率辐射的生物效应中的非热效

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

应的作用机制至今尚没有公认的结论，Lednev 等[4] 提出了一些可能的机制，我们也曾在研究的基础上提出“类似激光、脉塞等谐振增强机制”的假设[5]。上述的实验结果和 Mulet Jean-Philippe 等[1] 关于纳米结构的辐射热传导共振吸收局部加热增强的研究结果的契合是对文献[4] 和[5] 的支持。综合上述我们认为，对于含有纳米级金属晶体或者电荷集聚区等的微结构，可以类似于天线接收电磁辐射后在局部产生涡流发热，但是由于以纳米颗粒为热源的辐射热传导可能会和距离在纳米级范围内生物大分子的易变的结构功能区之间发生能量集中的单色的谐振能量转移，所产生的生物效应大大高于整体加热的作用效果。生物大分子吸收的能量主要消耗在分子构象调整而并不会表现出样品整体宏观的升温。我们课题组在同样的实验装置和接近的测试条件研究了用纳米金标记的 DNA 的热效应。在测出样品在不同温度下（变化范围从室温到 70 ℃）的荧光谱的基础上，比较受到 RF 作用的样品的荧光光谱。结果表明，效应的强度和 40 ℃左右的热效果相当，不仅和本研究报道的实验结果相互对应，而且也对我们的假说提供了有力的支持。

参考文献：

[1] Mulet Jean-Philippe, Joullain K, Carminati R, *et al*. Nanoscale radiative heat transfer between a small particle and a plane surface [J]. Appl Phys Lett, 2001, 78 (19): 2931－2933.

[2] Goldberg J M, Baldwin R L. A specific transition state for S-protein combining with folded S-protein and then refolding [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 2019－2014.

[3] Berova N, Nakanishi Koji, Robert W W. Circular dichroism: principles and applications[M]. 2nd ed. New York: A. John & Suns Inc USA, 2000. 601－610.

[4] Lednev M L. Possible mechanism for the influence of weak magnetic field on biological systems [J]. Bioelectromagnetics, 1991, 12(1): 71－75.

[5] 翟建才，史立群，马显光. 基底材料对微波场分布影响的研究[J]. 中国医学物理学杂志，2000, 17(4): 245－246.

（编辑 薛国文）

（上接 697 页）

例，耐药分别为 18、19、3 及 2 例，铜绿假单胞菌敏感分别为 7、8、13 及 15 例，耐药为 8、7、2 及 0 例，克雷伯肺炎杆菌敏感分别为 2、3、9 及 13 例，耐药为 8、10、4 及 1 例，表皮葡萄球菌敏感分别为 0、0、0 及 2 例，耐药为 3、3、1 及 0 例，变形杆菌敏感分别为 1、2、3 及 3 例，耐药分别为 2、1、0 及 0 例。

2 治疗方法及其结果

病人一旦出现腹膜炎的典型临床表现，即在支持、保肝的同时，积极使用广谱抗菌药物，可不待腹水检查结果。以后根据病原菌和药敏结果调整抗生素。以体温、腹痛、腹水减少情况及外周血白细胞、腹水培养转阴来判断，有效 57 例，总有效率为 65.5%；死亡 30 例，总的病死率 34.5%。无严重的药物不良反应。

3 讨论

重症肝炎可由甲、乙、丙、丁、戊型肝炎病毒感染引起，最常见是由乙肝病毒引起的慢性重型肝炎[2]。重症肝炎患者易并发感染可能与肝炎病毒、免疫反应、低蛋白血症和肝脏结构失常致网状内皮系统吞噬功能丧失等原因有关[3]。由于患者多处于衰竭状，对感染的反应性差，缺乏典型临床表现，易造成腹膜炎漏诊。本组病例由于原发病的特点，发热占 66.67%，与有关报道结果类似[4]，腹痛及腹部压痛 41 例（47.69%），外周血白细胞＞ 10×10^9/L 也仅为 46 例（52.87%）。我们的体会是：对腹水顽固不退、急剧增加或病情迅速恶化、外周血白细胞计数较前升高者，找不到其它感染灶时，应高度警惕腹腔感染，如同时伴有不规则发热及腹痛，可不待腹水检查结果即按腹膜炎处理。治疗上应依据腹水病原学检查选择抗菌药。本组资料中腹水培养以革兰阴性菌为主，大肠埃希菌居首位占 43.1%，其次为肺炎克雷伯菌及铜绿假单胞菌，分别占为 23.1% 和 20%。在病原学检查结果出来前，为了使治疗争分夺秒地进行，依据本组治疗经验，可首选第三代头孢菌素或第三代喹诺酮类抗菌素，感染较重的可两种药物联合使用，以后再根据病原学和药敏结果调整。本组病例有效率较低可能与原发病较重有关。值得注意的是，喹诺酮类抗菌药在肝内的浓度较高，虽本组未见严重的副作用，但对肝功能严重不全的患者还是应慎用[5]。另外本组中真菌感染（白色念珠菌及酵母菌）占 6.0%，由于真菌多数为条件致病菌，其发生可能与机体抵抗降低、血糖增高、补体及大量抗生素使菌群失调等因素有关[6]，故在治疗过程中应引起高度重视。

关键词：重症肝炎；腹膜炎

中图法分类号：R572.2；R575.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 1995 年 5 月北京第五次全国传染病寄生虫学术会议讨论修订. 病毒性肝炎防治方案（试行）[J]. 中华传染病杂志，1995, 13(4): 241－247.

[2] 徐新献，袁学文，何有成. 传染病危重症现代治疗[M]. 成都：四川科学技术出版社，1998. 121－128.

[3] 顾长海，王字明. 急性肝衰竭[M]. 成都：四川科学技术出版社，1997. 263－271.

[4] 许荫芝. 重症肝炎继发细菌感染 89 例临床分析[J]. 福建医药杂志，2000, 22(5): 60－61.

[5] 周自水，王世祥. 新编常用药物手册[M]. 第 3 版. 北京：金盾出版社，1998. 649

[6] 李 骥，卢明芹，陈永平，等. 重症病毒性肝炎患者深部真菌感染及危险因素分析[J]. 中华传染病杂志，2002, 20(5): 308－309.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net