

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000351

高强度聚焦超声对溶菌酶结构的影响

杨 萌¹, 王 嫣¹, 王 琦¹, 吴君汝², 李发琪¹

(1. 超声医学工程重庆市市级重点实验室、重庆医科大学生物医学工程学院、省部共建超声医学工程国家重点实验室, 重庆 400016; 2. 佛蒙特大学物理系, 美国伯灵顿 VT 05405)

【摘要】目的:探讨高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)对一种蛋白质—溶菌酶结构的影响。**方法:**使用频率 0.94 MHz、声强 3.25×10^4 W/cm²、脉冲重复频率 4 Hz、占空比 10% 的脉冲高强度聚焦超声辐照溶菌酶溶液 10 s。利用圆二色光谱(CD 光谱)、荧光光谱、核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, SDS-PAGE)方法, 分别研究高强度聚焦超声对溶菌酶二级、三级和四级结构的影响。**结果:**高强度聚焦超声处理后, CD 光谱无明显变化, 表明高强度聚焦超声对溶菌酶二级结构影响不大; 而荧光强度减弱, 说明溶菌酶色氨酸周围的疏水结构发生了变化; SDS-PAGE 结果显示, 经高强度聚焦超声辐照后溶菌酶出现支链降解; 分析 ¹H-NMR 发现, 辐照后溶菌酶色氨酸发生了化学位移。**结论:**高强度聚焦超声可以改变溶菌酶的高级结构。

【关键词】高强度聚焦超声; 溶菌酶; 蛋白结构; 影响**【中图分类号】**Q681**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-03-24

Effects of high intensity focused ultrasound on lysozyme structure

Yang Meng¹, Wang Yan¹, Wang Qi¹, Wu Junru², Li Faqi¹

(1. Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Medical Engineering; Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University; State Key Laboratory of Ultrasound Medical Engineering Co-founded by Chongqing and MOST; 2. Department of Physics, University of Vermont)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of high intensity focused ultrasound(HIFU) on the lysozyme molecular structure. **Methods:** The lysozyme solution was exposed at HIFU with pulse frequency of 0.94 MHz, sound intensity of 3.25×10^4 W/cm², pulse repetition period of 4 Hz and duty cycle of 10% for 10 s. The effect of HIFU on the lysozyme molecular structure was studied using CD spectra, fluorescence spectrum, ¹H nuclear magnetic resonance(¹H-NMR) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) method. **Results:** The Result showed that after HIFU treatment, there was no obvious change in CD spectrum, indicating that HIFU might cause little effect on lysozyme lower structure. Whereas a weaken fluorescence intensity appeared indicating lysozyme conformation change. Data of SDS-PAGE showed obvious degradation of lysozyme branches. ¹H-NMR analysis demonstrated that tryptophan(Trp) residue of lysozyme displayed chemical shift after treatment. **Conclusion:** The conformation structure of lysozyme could be changed by HIFU.

【Key words】high intensity focused ultrasound; lysozyme; protein structure; effect

蛋白质在生物体生命活动中起着极为重要的作用, 是生物体遗传、表达、新陈代谢的载体, 可以

作为生物催化剂(酶和激素)控制机体的生长, 是生物体内免疫作用所必需的物质^[1]。蛋白质一般具有四级结构, 其中一、二级结构决定功能^[2], 三、四级结构决定活性^[3]。具有四级结构的蛋白质受到外界因素的影响, 会引起亚基间一些键的断裂或形成, 从而改变了亚基及亚基间空间接触和排布, 使得蛋白质的生物活性增高或降低^[4]。目前改变蛋白质结构的手段有很多, 主要包括高压^[5]、激光^[6]、分子剪切^[7]等。但是高压局限于蛋白质高级结构的改变, 而激光是热致变性, 分子剪切主要针对蛋白质单体。超声因其方向性好, 穿透能力强, 具有机械效应、热效

作者介绍: 杨 萌, Email: yymm1219@163.com,
研究方向: 超声生物学效应与治疗。

通信作者: 李发琪, Email: lifaqi70@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 11274404, 81127901);
973 计划资助项目(编号: 2011CB707900, 2012CB722402);
重庆市科委自然科学基金资助项目(编号: CSCT, 2010BB
5368); 巴渝海外引智计划资助项目(编号: 渝教外[2013]
65 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1113.018.html>
(2014-06-12)

应、空化效应等,逐渐受到国内外学者的关注^[8-12]。目前,超声主要用于使一些大分子降解、结构改变以及化学键断裂等,有文献报道说低频超声可以改变纤维素酶结构^[13]。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)已在医学领域展现出良好的应用前景^[14]。HIFU 焦点峰值声压可以达到 10^7 Pa 量级,控制脉冲辐照参数可获得更为显著的机械效应以及空化效应,可为改变、研究蛋白质结构提供一种新的手段。但长期以来,有关高声压对蛋白质结构、功能的影响罕有报道。

溶菌酶是一种单体球蛋白,具有完整的四级结构,分子结构简单明确,且分子内的色氨酸可作为内源荧光探针,是研究蛋白质结构变化的良好模型^[15]。本文采用 HIFU 处理溶菌酶,借助 CD 光谱、荧光光谱、核磁共振氢谱(^1H nuclear magnetic resonance, ^1H -NMR)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, SDS-PAGE)技术探讨蛋白质分子结构的变化,以期为研究高声压与蛋白质相互作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

溶菌酶(蛋清,超纯水级,Amresco 公司)和重水(上海泰坦科技有限公司),其他试剂均为分析纯。溶菌酶溶液用超纯水配制,浓度为 2 mg/ml。

1.2 实验方法

JC-200 型聚焦超声肿瘤治疗系统(重庆海扶医疗科技股份有限公司),选择的脉冲 HIFU 辐照参数为:声强 3.25×10^4 W/cm²,时间 10 s,脉冲重复频率 4 Hz,占空比 10%,治疗换能器频率 0.94 MHz,焦距 140 mm,开口直径 220 mm,实验过程保持 25 °C 恒温,实验分为对照组与实验组,对照组不接受 HIFU 辐照,实验组有 5 个样本,每个样本均按照上述参数辐照。

紫外分光光度计(美国瓦里安技术有限公司),测定溶菌酶溶液的最大吸收波长。

圆二色光谱仪(日本分光公司),采用波长扫描方式,扫描范围 200~350 nm,测定溶菌酶溶液经超声辐照后其二级结构的变化情况。

荧光光谱仪(日本岛津公司),激发波长为 295 nm, (25 ± 1) °C 下扫描 3 次,扫描波长范围为 300~450 nm。荧光光谱激发光谱分辨率 3 nm,发射光谱分辨率为 1 nm。测定超声辐照溶菌酶后色氨酸的荧光强度变化情况。

核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司),测定溶菌酶经超声辐照后,其色氨酸的化学位移变化情况。

电泳仪(北京博翔兴旺科技有限公司),采用非还原 SDS-PAGE 方法,测定溶菌酶溶液经超声辐照后其分子量的变化情况。

1.3 统计学处理

对 CD 光谱采集的数据采用 CONTIN 软件处理,二级结构 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则卷曲的含量比值关系通过 GraphPad Prism 统计软件处理,溶菌酶的二级结构数据均以均数 $\pm$ 标准差的形式表示,采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 紫外吸收光谱

图 1 为 2 mg/ml 溶菌酶溶液的紫外吸收光谱,由于溶菌酶分子内含有色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸,由此得出溶菌酶最大吸收波长在 208 nm,且在 229 nm 处有较强吸收。

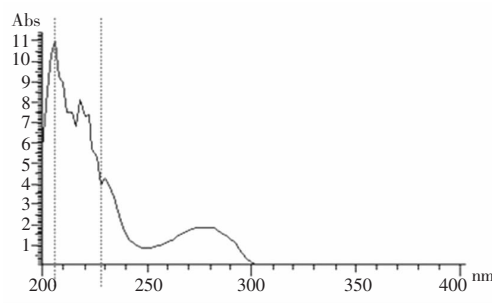
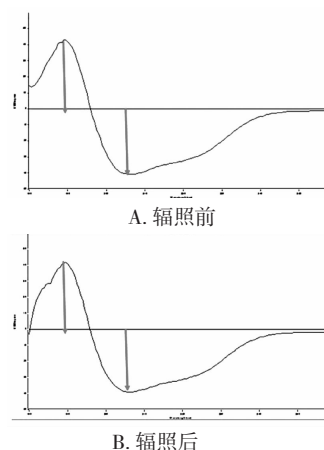


图 1 溶菌酶溶液的紫外吸收光谱图

Fig.1 UV absorption spectrum of lysozyme solution

2.2 CD 光谱分析

在蛋白质的二级结构中,肽键是高度有序排列的,其排列的方向性决定了肽键能级跃迁的分裂情况,不同二级结构的蛋白质产生谱带的位置和吸收的强弱都不相同。CD 光谱能反映蛋白质二级结构的信息^[16],溶菌酶经 HIFU 辐照前后的 CD 光谱见图 2。光谱特征说明辐照前图 A 与辐照后图 B 溶菌酶的 CD 光谱曲线没有发生明显的变化,溶菌酶的二级结构非常稳定,几乎没有发生改变。



采用波长扫描方式,扫描范围 200~350 nm

图 2 溶菌酶溶液的 CD 光谱

Fig.2 CD spectra of lysozyme solution

根据 CD 光谱曲线,利用 CONTIN 软件计算蛋白中各种二级结构的百分比含量见表 1。统计分析发现溶菌酶溶液经

过 HIFU 辐照过后,其二级结构 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则卷曲 P 值均大于 0.05,这表明辐照前后溶菌酶二级结构 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲比例均没有明显变化。

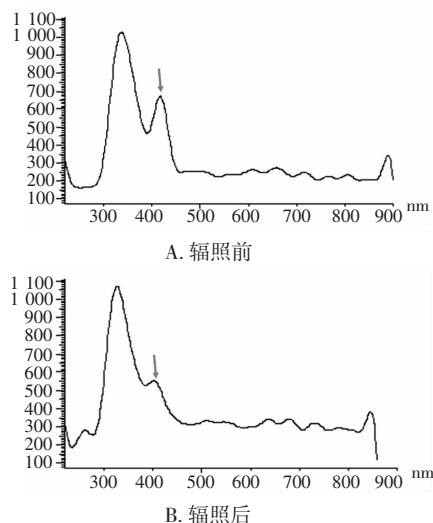
表 1 溶菌酶在辐照前后二级结构的比例

Tab.1 Proportion of lysozyme secondary structure after the irradiation

二级结构	溶菌酶 (辐照前%)	溶菌酶 (辐照后%)	t 值	P 值
α -螺旋	32.3 ± 0.5	31.6 ± 0.8	1.745	0.119
β -折叠	16.9 ± 0.3	16.7 ± 0.5	0.779	0.459
β -转角	7.5 ± 0.8	7.9 ± 0.4	1.033	0.332
无规则卷曲	43.3 ± 0.4	43.8 ± 0.3	2.282	0.052

2.3 荧光光谱分析

图 3 显示了 HIFU 辐照后溶菌酶荧光光谱的变化。由图 3 可见,其 410 nm 处的内源荧光强度出现了变化,根据蛋白三级结构的数据^[17],色氨酸的第 28、63 和 108 均位于蛋白的表面外,其余的 3 个色氨酸处于程度不同的疏水环境中,荧光强度的大小与色氨酸微环境的疏水性相关^[18]。与未经辐照处理的对照样品相比,在超声辐照后,维持蛋白三级结构的疏水键和氢键被破坏,亚基肽链结构趋于松散,使原处于疏水环境中含有荧光生色团的色氨酸暴露在溶剂中,溶菌酶的内源荧光强度有所减弱。当溶菌酶的分子结构发生去折叠变性,即肽链由紧密有序的球状结构转为松散的长链状态,色氨酸所处微环境的疏水性降低,荧光强度也随之降低。表明经过聚焦超声辐照过后,溶菌酶的三级结构发生了改变。



激发波长为 295 nm, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下扫描 3 次,扫描波长范围为 300 ~ 450 nm。荧光光谱激发光谱分辨率 3 nm,发射光谱分辨率为 1 nm

图 3 溶菌酶溶液的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of lysozyme solution

2.4 ^1H -NMR 分析

^1H -NMR 结果(图 4)表明,溶菌酶の色氨酸经 HIFU 辐照后的化学位移发生了变化。因溶菌酶在 229 nm 处有较强的吸收,对此波长的超声敏感,高级结构易于被破坏。因此,推测 HIFU 辐照后溶菌酶的空间结构受到了影响。

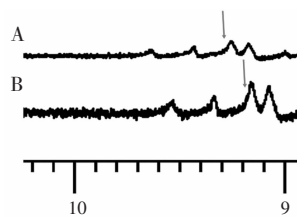
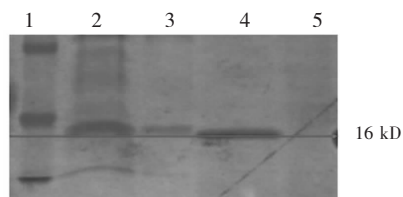


图 4 溶菌酶溶液的核磁共振 ^1H 谱

Fig.4 ^1H -NMR spectrum of lysozyme solution

2.5 SDS-PAGE 分析

四级结构是由一些紧密结构聚集而形成的,它由非共价的相互作用保持结构稳定。为研究 HIFU 辐照后溶菌酶的存在形式,本实验参考边六交等人^[19]的方法,以非还原 SDS-PAGE 法检测溶菌酶结构的变化。图 5 表明,在 HIFU 处理后,分子量约为 16 kD 的 2 mg/ml 溶菌酶轻链减少,条带几乎消失。表明主要由疏水相互作用维持的四级结构对超声非常敏感,蛋白质四级结构在 HIFU 辐照下受到破坏,诱使溶菌酶伸展。



1. 蛋白 marker; 2. 牛血清白蛋白; 3. 辐照后的牛血清白蛋白;
4. 溶菌酶 (2 mg/ml); 5. 辐照后的溶菌酶 (2 mg/ml)

图 5 溶菌酶溶液的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE of lysozyme solution

3 讨论

目前改变蛋白质结构的方法有超高压、激光、分子剪切等。超高压改变蛋白质结构的作用机制主要是出口处液体高速流动产生的剪切力。超高压处理蛋白质已经广泛应用于食品工程领域,经过超高压处理的蛋白质样品,在色泽、弹性、风味、硬度等方面都有较大的优势。此外,超高压还可以用于生物工程领域,常见的应用有破碎细胞、制备脂质体等。这些都是超高压处理对蛋白质高级结构的改变,即三级结构、四级结构的改变。目前,尚没有超高压破坏蛋白质一级结构的报道。激光改变蛋白质结构的作用机制主要是热机制,通过高温使得蛋白质变性。分子剪切则是一种组织工程学手段,利用蛋白质内含肽来破坏蛋白质的结构。

超声声场是一种交变声场,具有剪切、拉伸的双重作用,不同于超高压所产生的静压力,罗绍峰等^[20]研究了低频超声与超高压作用于牛血清白蛋白

所产生的不同效应,结果显示,超声辐照使得牛血清白蛋白产生严重聚集,而超高压处理的牛血清白蛋白则没有聚集现象的产生。超高压处理的牛血清白蛋白二级结构有很大变化, helix 与 turn 结构有所增加, random 结构明显减少。而超声辐照牛血清白蛋白,其二级结构没有明显变化。究其原因,也许是所使用的超声声压较低缘故。超声辐照作用蛋白质的机制不同于上述的几种方法。首先,超声产生的声场是一种交变声场,具有剪切、拉伸的双重作用力,不同于超高压所产生的静压力。其次,超声波聚焦后可以获得一个能量高度集中的区域。HIFU 技术的出现,把焦域内的声压推到了一个更高的水平。现有采用单纯行波聚焦方式所能达到的最高声压,对连续波而言为 10^7 Pa 量级,对脉冲波而言可达 10^8 Pa 量级^[21-22]。再次, HIFU 焦域内的高声压可对介质产生强烈的机械作用、超声空化以及复合伴随的高温、高压、冲击波、高速射流以及自由基的产生带来的理化效应。这可作为一种不同于超高压、激光、分子剪切改变蛋白质结构的新方法。

本文采用 HIFU 辐照溶菌酶溶液,来研究 HIFU 对溶菌酶结构变化的影响。实验结果表明,溶菌酶经过 HIFU 辐照后,其荧光光谱、 ^1H -NMR 和 SDS-PAGE 都发生了改变。其中荧光光谱中色氨酸荧光强度明显减弱,表明溶菌酶的高级结构发生了变化。这与 Wang 等人^[13]的研究结果相符。SDS-PAGE 结果显示,经超声辐照后 16 kD 分子量段的溶菌酶出现支链降解,这表明溶菌酶分子结构经 HIFU 辐照后,产生了降解,四级结构被破坏。 ^1H -NMR 结果显示色氨酸 ^1H 发生了化学位移,可以推测溶菌酶空间结构受到影响。CD 光谱分析得出辐照前后溶菌酶 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲均没有明显变化,证明 HIFU 对溶菌酶二级结构影响不大。分析其原因,可能是因为在 HIFU 辐照过程中,辐照时间过短(10 s),辐照能量不足以破坏溶菌酶的二级结构,甚至于一级结构。

由此可见, HIFU 技术虽然可以改变溶菌酶的高级结构,但是对溶菌酶低级结构的破坏并不明显,这可能与超声参数的设置以及溶菌酶本身的属性有关。在下一步实验计划中,拟增加辐照时间,使焦域处得到更大的能量沉积,再来观测 HIFU 对溶菌酶低级结构的影响情况。本文就 HIFU 对溶菌酶结构的影响做了初步摸索,但有关 HIFU 破坏蛋白质结构的作用机制及由结构改变引起的功能变化,以及 HIFU 破坏蛋白质结构的影响因素等还需进一步深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 王建华,卫亚丽,文宗河,等.蛋白质结构的 FT-IR 研究进展[J].化学通报,2004,67(7):482-486.
- [2] 沈子威,孙克利.应用傅里叶红外光谱研究强声波作用下植物壁蛋白质二级结构变化[J].光子学报,1999,28(7):600-602.
- [3] 向文斌,罗发兴,邵亚明.分离纯化对蛋白质活性的影响[J].生命的化学,2003,23(3):238-240.
- [4] 方盈盈,胡新根,于丽,等.溶菌酶热变性的 DSC 研究[J].物理化学学报,2007,23(1):84-87.
- [5] 王存章,徐贤.超高压处理对蛋白质结构及功能性质影响[J].粮食与油脂,2007(11):10-12.
- [6] 倪志华,陈景春,张玉明,等.XeCl 准分子激光辐照对溶菌酶结构的影响[J].生物物理学报,2011,27(12):1038-1044.
- [7] 齐莲子,迟玉杰.高速剪切对大豆分离蛋白限制性酶修饰的影响[J].食品科学,2010,31(22):11-15.
- [8] 李发琪,张楠,杜永洪,等.高强度聚焦超声治疗剂量对组织升温影响的研究[J].生物医学工程杂志,2003,20(3):466-471.
- [9] Kennedy JE. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 321-327.
- [10] Illing R, Kennedy J, Wu F, et al. The safety and feasibility of extracorporeal high-intensity focused ultrasound (HIFU) for the treatment of liver and kidney tumours in a Western population[J]. Br J Cancer, 2005, 93(8): 890-895.
- [11] Machova E, Kvapilova K, Kogan G, et al. Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin - glucan complex from *Aspergillus niger* [J]. Ultrason Sonochem, 1999, 5(4): 169-172.
- [12] Riesz P, Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications [J]. Free Radic Biol Med, 1992, 13(3): 247-270.
- [13] Wang ZB, Lin X, Li P, et al. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment [J]. Bioresour Technol, 2012(117): 222-227.
- [14] Coakley W, Dunn F. Degradation of DNA in High-intensity focused ultrasonic fields at 1 MHz [J]. J Acoust Soc Am, 2005, 118(6B): 1539-1545.
- [15] 陈艳,江明锋,叶煜辉,等.溶菌酶的研究进展[J].生物学杂志,2009,26(2):64-66.
- [16] 黄汉昌,姜招峰,朱宏吉.紫外圆二色光谱预测蛋白质结构的研究方法[J].化学通报,2007(7):501-506.
- [17] 吴序栋,朱倩倩,成小娟,等.光谱法研究鸡蛋溶菌酶热变性与免疫原性的关系[J].分析化学,2011,39(2):198-202.
- [18] Tian ZM, Wan MX, Wang SP, et al. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin [J]. Ultrason Sonochem, 2004, 11(6): 399-404.
- [19] 边六交,梁长利,杨晓燕,等.非还原脲变性蛋白溶菌酶稀释复性过程中集聚现象的研究[J].化学学报,2007,65(24):2891-2897.
- [20] 罗昭峰,瞿鑫,沐万孟,等.超声和高压处理对牛血清白蛋白结构的影响[J].中国生物工程杂志,2006,26(1):46-49.
- [21] Canney MS, Bailey MR, Crum LA, et al. Acoustic characterization of high intensity focused ultrasound fields: A combined measurement and modeling approach [J]. J Acoust Soc Am, 2008, 124(4): 2406-2420.
- [22] Maruvada S, Harris GR, Herman BA, et al. Acoustic power calibration of high-intensity focused ultrasound transducers using a radiation force technique [J]. J Acoust Soc Am, 2007, 121(3): 1434-1439.

(责任编辑:冉明会)