

• 研究论文 •

超声照射下血卟啉(HP)对牛血清白蛋白(BSA)损伤的研究

王 君^{*,a} 徐 亮^a 张朝红^b 王 磊^a
张向东^a 潘志军^a 佟 键^a 张 鹏^a

(^a 辽宁大学化学系 沈阳 110036)

(^b 辽宁大学环境科学系 沈阳 110036)

摘要 用紫外-可见光谱(UV)和圆二色(CD)光谱研究了超声波激活血卟啉(HP)对牛血清白蛋白(BSA)的损伤,探讨了超声波照射时间、HP 浓度、离子强度和酸度等因素对 BSA 损伤的影响。结果表明,在一定条件下,BSA 的损伤程度随着超声波照射时间的增长和 HP 浓度的增大而增大,而离子强度和酸度对 BSA 损伤的影响较为复杂。这一结果对声动力学(SDT)疗法应用于临床具有重要的意义。

关键词 超声; 血卟啉; 牛血清白蛋白

Investigation on Damage of Bovine Serum Albumin by Hematoporphyrin under Ultrasonic Irradiation

WANG, Jun^{*,a} XU, Liang^a ZHANG, Zhao-Hong^b WANG, Lei^a
ZHANG, Xiang-Dong^a PAN, Zhi-Jun^a TONG, Jian^a ZHANG, Peng^a

(^a Department of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036)

(^b Department of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036)

Abstract The damage of bovine serum albumin (BSA) under ultrasonic irradiation in the presence of hematoporphyrin (HP) was studied by UV and CD spectra and the influence of irradiation time, HP concentration, ionic strength and acidity was also detected. The results showed that under a certain condition, the damage degree of BSA was increased with the enhancement of the irradiation time and HP concentration, while the influence of ionic strength and acidity was complicated. The research results were of great significance for driving sonodynamic treatment to clinic application.

Keywords ultrasound; hematoporphyrin; bovine serum albumin

血卟啉(HP)是从血清中提取的一种光敏物质,上世纪五六十年代,人们就已用来诊断肿瘤^[1]。1960 年, Lipson 等在光敏药物研制上取得突破,所研制的 HP 衍生物(hematoporphyrin derivative, HPD)对肿瘤细胞有较强的亲和力,用较小的剂量就可以达到诊断和治疗肿瘤的目的^[2~4]。70 年代后,随着激光和光导纤维技术的发展,人们利用激光做光源,以光纤作光路激活 HPD 可以治疗多种肿瘤^[5,6]。1978 年, Dougherty 等^[7~9]把这种利用

光激活 HPD 诊断和治疗肿瘤的方法称为光动力学疗法(photodynamic treatment, PDT)。目前,光动力学疗法已应用于临床,但由于激光在生物组织中的穿透力极低,主要应用于人体表面浅层肿瘤的治疗。超声波具有极强的穿透力且聚焦技术比较成熟,因此,采用超声波抑制肿瘤生长和破坏肿瘤细胞,尤其是治疗深层组织肿瘤已经引起国内外的普遍关注^[10]。另外,超声波亦可激活有机光敏剂(如 HP 等)在内的某些药物产生比单纯超声波

* E-mail: wangjun890@sina.com; Tel: +86-24-81917150; Fax: +86-24-62202053.

Received March 23, 2005; revised June 13, 2005; accepted July 20, 2005.

国家自然科学基金(No. 20371023)资助项目。

更加明显的抗肿瘤效应^[11,12]. 1989 年, 日本学者梅村晋一郎(Umemura)等^[13~16]首次在国际会议上报道了用超声波激活 HP 杀伤肿瘤细胞和抑制肿瘤生长的初步尝试, 并把这种方法称为声动力学疗法(Sonodynamic treatment, SDT). 实验表明, HP 本身无抗肿瘤活性, 但被超声波激活后能产生强烈的抗肿瘤效应, 且能选择性地长时间聚集在肿瘤组织中. 因此, SDT 疗法在肿瘤治疗方面有广阔的应用前景.

近十年来, 国内外许多学者就超声波激活 HP 的实验装置、实验条件、对肿瘤的作用效果、作用机理等进行了大量的研究并取得了初步的成效, 但这些工作都是以肿瘤细胞为研究对象, 通过细胞膜的损伤使肿瘤细胞坏死来达到治疗肿瘤的目的^[17~19]. 实际上, 正常细胞膜和肿瘤细胞膜之间的差别是相当小的, 抑制和杀死肿瘤细胞应以攻击具有各种功能的蛋白质和容易使药物具有靶向性的核酸为目标. 蛋白质是生物细胞最重要的组成物质, 是执行各种生命功能的主要大分子, 如果损伤了蛋白质分子, 那么就有可能造成自然情况下的细胞凋亡. 本文通过紫外-可见光谱(UV)和圆二色(CD)光谱观察 HP 存在下, 超声波对牛血清白蛋白(BSA)的损伤, 为推动分子水平的 SDT 疗法提供有意义的参考.

1 实验部分

1.1 仪器设备

超声照射装置(KQ-100 型, 频率为 80 kHz, 功率为 50 W, 昆山市超声仪器有限公司. 如图 1 所示, 实验过程中用温度计监测体系温度 $[(37.0 \pm 0.2) ^\circ\text{C}]$. 实验用分析仪器: 紫外-可见(UV-vis)光谱仪(Lambda-17 型, 美国 Perkin-Elmer 公司); 圆二色(CD)光谱仪(J-810 型, 日本 Jasco 分光公司).

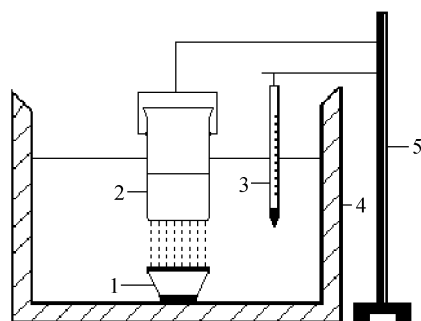


图 1 超声照射装置

Figure 1 Apparatus of ultrasonic irradiation

1: transducer; 2: reaction solution; 3: thermometer; 4: gutter; 5: bracket

1.2 试剂

牛血清白蛋白(BSA, 北京奥博星生物技术责任有

限公司产品), 使用时未经进一步纯化, 在 $0\sim4 ^\circ\text{C}$ 下溶于磷酸盐缓冲溶液配成储备液, 准确浓度由 278 nm 处的吸光度确定, 储备液浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. 血卟啉(HP, Sigma 公司产品), 在 $0\sim4 ^\circ\text{C}$ 下溶于磷酸盐缓冲溶液中配成, 储备液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 使用时根据需要稀释成不同浓度. 磷酸盐缓冲溶液的浓度为 0.1 mol/L . 实验用水为二次蒸馏水. 其余试剂均为市售分析纯.

1.3 实验方法

取四个(分别标记为 a, b, c 和 d)容量瓶, 准确量取浓度为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 BSA 溶液 10.00 mL 放入 a, c 和 d 中, a 中不加 HP, 其中 c 和 d 中分别加入 5.00 mL 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 HP 溶液, b 中只加 HP, 都用磷酸缓冲溶液稀释至 50.00 mL. 将 d 放入超声照射装置, 2.0 h 后取样. 测定 a, b, c 和 d 的 UV 光谱, 以此判断 HP 与 BSA 的相互作用以及超声波结合 HP 对 BSA 分子的损伤作用, 结果如图 2. 另外, 改变照射时间、HP 的加入量、离子强度和溶液酸度等, 考察这些因素对 BSA 分子损伤的影响, 结果分别如图 3~图 7.

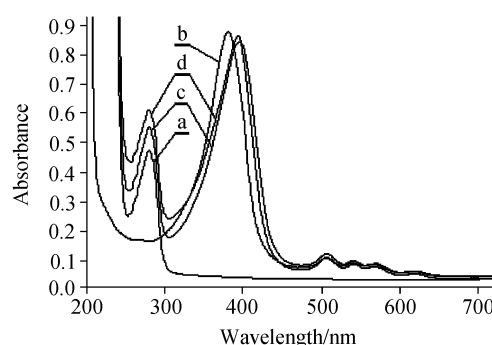


图 2 不同条件下 BSA 和 HP 的紫外-可见吸收光谱

Figure 2 UV spectra of BSA and HP at different conditions

a: BSA (without irradiation); b: HP (without irradiation); c: BSA+HP (without irradiation); d: BSA+HP (with irradiation)

2 结果与讨论

2.1 BSA 和 HP 相互作用及在超声波照射下的 UV 光谱

从图 2 中可以看出, 单纯的 BSA 分子和 HP 分别在 278 和 380 nm 处有强的吸收峰(图中 a 和 b). 由于 BSA 分子与 HP 之间存在相互作用, BSA 分子在 278 nm 处的吸收峰呈现出一定程度的增色并伴随着微小的紫移. 而 HP 的吸收峰则发生红移, 由 380 nm 移到了 395 nm, 吸收峰的强度略有降低(图中 c). 超声照射 2.0 h 后, BSA 分子吸收峰的增色程度进一步加强, HP 吸收峰的峰位几乎没有变化, 但吸光度有少量的增加(图中 d). 理论研

究表明, BSA 分子与小分子之间的作用通常是借助于氢键、静电引力、范德华力和疏水作用力等, 但与 HP 之间的结合应当以疏水作用为主, HP 进入 BSA 分子的疏水腔中而与 BSA 分子形成复合物^[20~23]. 另外, HP 上电负性较大的 O 和 N 原子可以与 BSA 分子中位置合适的某些肽链上的酰胺形成氢键. 278 nm 处的吸收峰是 BSA 分子中肽链上 2 个色氨酸和 19 个酪氨酸残基的芳杂环 π - π^* 跃迁引起的. BSA 分子与 HP 之间的相互作用一方面改变了 BSA 分子的结构, 使芳杂环暴露, 紫外光谱表现为增色效应, 另一方面也改变了 HP 的电子结构, 使其峰位和峰高都发生了变化. 超声波激活 HP 产生的单线态氧($^1\text{O}_2$)将会进攻 BSA 分子的二硫键, 氧化硫原子, 加剧了 BSA 分子结构的变化, 导致 BSA 分子二级结构的破坏, α -螺旋的减少和肽链的伸展等^[24]. 而 HP 吸收峰的增加则是由于 BSA 结构的变化, 减弱或改变了 BSA 与 HP 之间作用的强度或方式.

2.2 照射时间对损伤作用的影响

BSA 和 HP 溶液的浓度都为 1.0×10^{-5} mol/L, 反应温度为 37.0 °C, 频率为 80 kHz, 功率为 50 W, pH=7.2, 超声照射时间分别为 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 和 8.0 h, 采用 UV 光谱考察不同照射时间对 BSA 分子的损伤和 HP 的变化情况.

从图 3 可以看出, 随着超声照射时间的增加, BSA 分子在 278 nm 处的吸收峰不断增加, 呈现出越来越明显的增色效应. 这说明超声照射激活 HP 产生单线态 $^1\text{O}_2$, 破坏了 BSA 分子结构使其发生了肽链伸展现象, 包围在 BSA 分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环疏水基团不断地裸露出来, 使吸收峰增强^[25]. 超声照射时间愈长, 产生的单线态 $^1\text{O}_2$ 愈多, BSA 分子损伤也就越大. 单纯超声照射也会对 BSA 分子造成损伤, 但程度远远低于超声照射和 HP 的联合作用. BSA 分子和 HP 共存时, HP 在 395 nm 处的吸收峰也随时间有微小的增

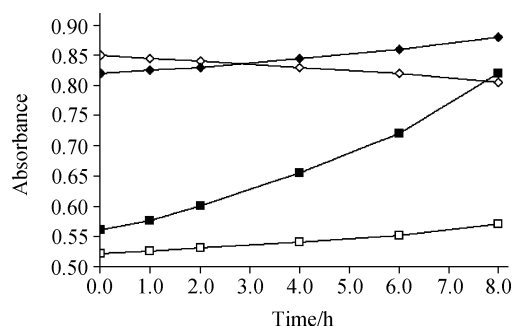


图 3 BSA, HP 和 BSA+HP 溶液的吸光度随照射时间的变化
Figure 3 Changes of absorbance of BSA, HP and BSA+HP solutions with irradiation time

(278 nm for BSA and 395 nm for HP)

■: BSA (and HP); ◆: HP (and BSA); □: BSA (no HP); ◇: HP (no BSA)

加. 这是因为 BSA 分子结构的破坏也改变了 BSA 与 HP 之间的作用方式和强度, 导致 HP 在 395 nm 处的吸收峰升高. 但当 BSA 分子不存在时, HP 的吸收峰却不断下降, 说明超声照射对 HP 也有一定的破坏.

2.3 HP 浓度对损伤作用的影响

改变 HP 的浓度, 分别为 1.0×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} 和 5.0×10^{-5} mol/L, 超声照射 2 h, 其它条件同上.

从图 4 可以看出, 随着 HP 浓度的增加, 在超声波的作用下, BSA 在 278 nm 处的吸收峰逐渐增加, 其增加程度要大于未加超声波的 BSA 与 HP 之间相互作用的吸收峰, 这说明 BSA 分子二级结构所受损伤程度越来越严重, α -螺旋结构不断减少, 肽链逐渐伸展, 有更多的芳杂环疏水基团裸露出来, 使吸收峰增强. 但当 HP 浓度增至 5.0×10^{-5} mol/L 时, 增色作用反而减弱. 这是因为当 HP 的浓度增加到一定量时, 不但使 BSA 分子受到损伤, 使芳杂环疏水基团裸露, 而且还使部分裸露的芳杂环破坏, 导致 BSA 分子部分降解, 因此, 吸收峰反而减弱. HP 在 395 nm 处的吸收峰表现出非线性的增加, 但超声波存在时增加的程度要显著一些.

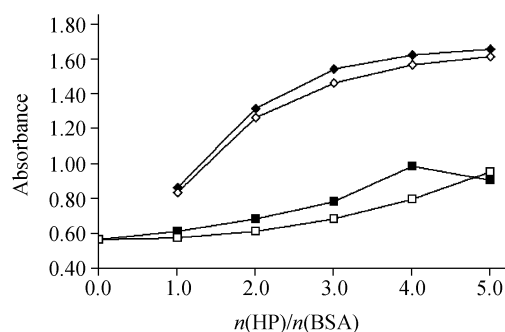


图 4 BSA+HP 溶液的吸光度随 HP 浓度的变化

Figure 4 Changes of absorbance of BSA+HP solutions with HP concentration

(278 nm for BSA and 395 nm for HP)

■: BSA (with irradiation); ◆: HP (with irradiation); □: BSA (without irradiation); ◇: HP (without irradiation)

另外, CD 光谱也证实了这种变化. 如图 5 所示, 随着 HP 浓度的增加(图中 a→c), BSA 分子典型二级结构的 208 和 222 nm 处负峰的振幅逐渐降低, 说明结构中 α -螺旋含量不断减少^[26~28]. 当 HP 浓度增大到 4.0×10^{-5} mol/L 时(图中 d), 峰型发生变化, 208 nm 处负峰的振幅增大, 而 222 nm 处负峰的振幅继续减小, 说明此时部分降解后的 BSA 分子在组成和结构上都发生了变化, 很可能发生了断链. 进一步增大浓度, 两个峰的振幅不减反增, 说明断链后的 BSA 分子发生收缩, α -螺旋含量有所增加, 但达不到原来的水平(图中 e).

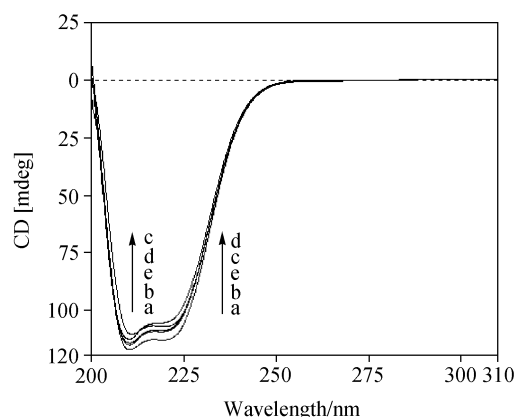


图5 BSA+HP溶液的CD光谱随HP浓度的变化

Figure 5 CD spectra of BSA+HP solution with various HP concentration

a: 0; b: 1.0×10^{-5} mol/L; c: 3.0×10^{-5} mol/L; d: 4.0×10^{-5} mol/L; e: 5.0×10^{-5} mol/L

2.4 溶液离子强度对损伤作用的影响

用NaCl调节溶液的离子强度,使溶液中的NaCl浓度分别为0, 100, 200, 300, 400和500 mmol/L,其它条件同上。

如图6所示,适当的离子强度有利于超声波结合HP对BSA分子的损伤。从图中可以看出随着离子强度的增加,BSA分子在278 nm处的紫外吸收峰逐渐上升。这是因为与BSA分子结合的自由水与盐解离产生的离子进行配位,蛋白质表面的水层被破坏,导致BSA分子与HP之间的相互作用增强。但当离子强度(即NaCl含量)进一步增大时,部分HP呈聚集态(395 nm处的吸收峰降低),与BSA分子的作用能力减弱;同时增大离子强度会使BSA分子以 α -螺旋结构为主存在,这种结构更易受到损伤,但前者起主要作用,因此,BSA分子的损伤程度又开始减弱。而单纯超声照射使BSA分子的

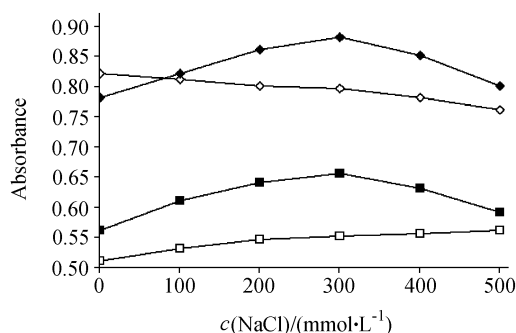


图6 BSA, HP和BSA+HP溶液的吸光度随NaCl浓度的变化

Figure 6 Changes of absorbance of BSA, HP and BSA+HP solutions with NaCl concentration

(278 nm for BSA and 395 nm for HP)

■: BSA (and HP); ◆: HP (and BSA); □: BSA (no HP); ◇: HP (no BSA)

吸光度随NaCl浓度的增加而微弱上升。HP单独存在时的吸光度在超声波照射下也随离子强度的增加而下降,说明NaCl的存在促进了超声波对HP的破坏。

2.5 溶液酸度对损伤作用的影响

人体正常组织中的pH为7.35~7.45,而在肿瘤细胞中的pH有时会发生微小的改变(约为6.9)。考虑到这一因素,改变pH值,考察了在超声波与HP协同作用下溶液酸度对BSA分子损伤的影响。溶液pH值的变化范围为6.0~8.0,其它条件同上。

由图7可以看出,与中性条件相比,不论降低pH还是升高pH,都会使BSA分子的损伤程度减弱。改变溶液的酸碱度,会使BSA的分子结构发生微小变化,结构的变化对疏水性氨基酸残基在BSA分子内外的分配产生影响,从而改变蛋白质分子的表面疏水性^[29]。酸性条件下,色氨酸残基微环境的疏水性减弱,BSA分子局部表面疏水性有所降低,使BSA分子和HP作用能力减弱。在中性溶液中BSA分子的酪氨酸残基位于蛋白质分子与环境接触的表面,基本上是“暴露”的,更容易与HP作用,因此BSA分子受损伤更明显。尽管碱性条件下HP和BSA分子的结合更紧密一些,但超声照射HP产生的单线态 $^1\text{O}_2$ 的数目与中性条件下相比要减少,且微碱性环境中单线态 $^1\text{O}_2$ 的氧化能力也有所降低,因此BSA分子的损伤程度大幅度的减弱。相反,单纯超声照射时BSA分子的损伤程度会随pH值的升高而略有上升,估计这与BSA分子的构型有关。中性或偏碱时以 α -螺旋结构为主的BSA分子更易受到损伤。而HP的吸光度无论有无超声照射都会随pH升高而升高,但超声照射时的吸光度略高一些。

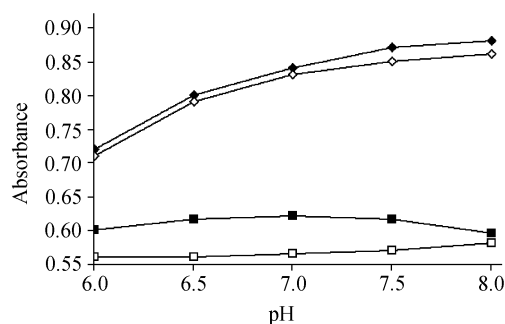


图7 BSA, HP和BSA+HP溶液的吸光度随pH的变化

Figure 7 Changes of absorbance of BSA, HP and BSA+HP solutions with pH

(278 nm for BSA and 395 nm for HP)

■: BSA (and HP); ◆: HP (and BSA); □: BSA (no HP); ◇: HP (no BSA)

2.6 对BSA损伤机理的探讨

利用超声波激活HPD抑制肿瘤生长或杀死肿瘤细胞

胞的方法被日本学者 Umemura 称为 SDT 疗法. 在 SDT 疗法中, 由于 HPD 等光敏物质的选择聚集性以及所需超声波声强小等特点, 目前已成为国内外研究的热点. 对于超声波激活 HP 杀死肿瘤细胞的机理, 一些研究者认为超声波对 HP 有类似激光的激活过程, 并产生相似的产物如单线态 $^1\text{O}_2$ 、过氧化物和氢氧自由基等^[30,31].

BSA 分子和 HP 之间通过弱的结合力产生相互作用, 对于 HP 利用的是超声空化时产生的热能还是光能有待进一步的研究. 目前普遍认为“声致发光”和“热点”可用于解释这种激活的原因^[32]. 最近的研究认为产生单线态 $^1\text{O}_2$ 的主要诱因是超声空化后“热点”的高温效应^[33]. 另外, 超声辐射能够导致较宽波长范围光的产生, 这些光会激发作为光敏剂的 HP, 从而产生单线态 $^1\text{O}_2$. 当然, 关于超声波激活 HP 损伤 BSA 分子的详细机理还需更深入的研究.

3 结论

利用 UV 光谱和 CD 光谱考察了在超声波和 HP 的联合作用下, 照射时间、HP 浓度、离子强度和溶液酸度等因素对 BSA 分子损伤程度的影响. 照射时间越长, BSA 分子的二级结构破坏越严重, UV 光谱显示出明显的增色效应. HP 浓度的增大不但破坏 BSA 分子的二级结构, 而且还导致肽链的断裂, CD 光谱表现为先减色后增色的现象. 适当的离子强度有利于 BSA 分子的损伤, 但离子强度过高导致 HP 和 BSA 分子之间作用力减弱, 降低了 BSA 分子的损伤程度. pH 过高和过低都不利于 BSA 分子的损伤. 从实验结果可以获得启示, 如果选择对肿瘤细胞具有靶向聚集性且能够穿过细胞膜的 HPD 类化合物结合超声波照射, 可以比较容易地直接破坏肿瘤细胞内的各种蛋白质分子, 在深入研究的基础上, 或许不失为一种可行的肿瘤治疗方法.

References

- Rassmussen, T. D. S.; Ward, G. E.; Figge, F. H. J. I. *Cancer* **1955**, 8, 78.
- Lipson, R. L.; Baldes, E. J.; Olsen, A. M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1961**, 26, 1.
- Gregorie, H. B. *Ann. Surg.* **1968**, 107, 820.
- Lipson, R. L.; Gray, M. J.; Baldes, E. J. *Cancer* **1967**, 20, 2255.
- Kelly, J. F.; Snell, M. E.; Berenbaum, M. C. *Br. J. Cancer* **1975**, 31, 237.
- Takahashi, S.; Zhavrid, E. A. *Jpn. Soc. Laser Med.* **1984**, 4, 99.
- Dougherty, T. J.; Kaufman, J. H.; Goldfarb, A. *Cancer Res.* **1978**, 38, 2628.
- Dougherty, T. J.; Lawrence, G.; Kaufman, J. H. *J. Natl. Cancer Inst.* **1979**, 62, 233.
- Dougherty, T. J.; Grindery, G. B. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, 55, 115.
- Umemura, S.; Kawabata, K.; Sasaki, K.; Yumita, N.; Umemura, K.; Nishigaki, R. *Ultrason. Sonochem.* **1996**, 3, S187.
- Tachibana, K.; Kimura, N.; Okumura, M.; Eguchi, H.; Tachibana, S. *Cancer Lett.* **1993**, 72, 195.
- Peng, J.-X.; Ma, Y.-Y. *Acoust. Technol.* **1995**, 14, 187 (in Chinese).
(彭健新, 马玉英, 声学技术, **1995**, 14, 187.)
- Yumita, N.; Nishigaki, R.; Umemura, K.; Umemura, S. *Jpn. J. Cancer Res.* **1990**, 81, 304.
- Yumita, N.; Nishigaki, R.; Umemura, K.; Umemura, S. *Jpn. J. Cancer Res.* **1989**, 80, 219.
- Umemura, S.; Yumita, N.; Nishigaki, R. *Jpn. J. Cancer Res.* **1990**, 81, 962.
- Umemura, S.; Yumita, N.; Nishigaki, R. *Jpn. J. Cancer Res.* **1993**, 84, 582.
- Suzuki, T.; Kamada, S.; Yoshida, Y.; Unno, K. *Heterocycles* **1994**, 38, 1209.
- Umemura, S.; Yumita, N.; Umemura, K.; Nishigaki, R. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, 43, 389.
- Naoto, N.; Norio, M. *Life Sci.* **2002**, 72, 321.
- Zhang, X.-W.; Zhao, F.-L.; Li, K.-A. *Chem. J. Chin. Univ.* **1999**, 20, 1063 (in Chinese).
(张小威, 赵凤林, 李克安, 高等学校化学学报, **1999**, 20, 1063.)
- Guo, C.-C.; Li, H.-P.; Zhang, X.-B.; Tong, R.-B. *Chem. J. Chin. Univ.* **2003**, 24, 282 (in Chinese).
(郭灿城, 李和平, 张晓兵, 童荣标, 高等学校化学学报, **2003**, 24, 282.)
- Lu, J.-X.; Zhang, G.-Z.; Zhao, P.; He, X.-W.; Shi, H.-M. *Acta Chim. Sinica* **1997**, 55, 915 (in Chinese).
(卢继新, 张贵珠, 赵鹏, 何锡文, 史慧明, 化学学报, **1997**, 55, 915.)
- Jia, T.; Wang, K.; Bao, X.-P.; Zhao, Y.-M.; Li, Z.-Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **2004**, 25, 1604 (in Chinese).
(贾涛, 王凯, 鲍小平, 赵一玫, 李早英, 高等学校化学学报, **2004**, 25, 1604.)
- Gantchev, T. G.; Lier, J. E. *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 123.
- Huang, J.; Yuan, Y.-Z.; Liang, H. *Sci. China, Ser. B* **2001**, 31, 6 (in Chinese).
(黄瑾, 袁余洲, 梁宏, 中国科学(B), **2001**, 31, 6.)
- Shen, X.-C.; Liang, H.; He, X.-W.; Wang, X.-S. *Chin. J. Anal. Chem.* **2004**, 32, 388 (in Chinese).
(沈星灿, 梁宏, 何锡文, 王新省, 分析化学, **2004**, 32, 388.)
- Kelly, S. M.; Price, N. C. *Biochem. Biophys. Acta* **1997**, 1338, 161.
- Wang, J.-S.; Xu, Q.; Ruan, X.; Gong, Y.-D.; Zhao, N.-M.; Shan, J.-X.; Li, L.-B.; Kuang, T.-Y. *Prog. Nat. Sci.* **1999**, 9,

- 1040 (in Chinese).
(王居硕, 许强, 阮翔, 公衍道, 赵南明, 单际修, 李良壁, 匡廷云, 自然科学进展, **1999**, *9*, 1040.)
- 29 Wei, X.-F.; Ding, X.-M.; Liu, H.-Z. *Spectrosc. Spectra Anal.* **2000**, *20*, 556 (in Chinese).
(魏晓芳, 丁西明, 刘会洲, 光谱学与光谱分析, **2000**, *20*, 556.)
- 30 Worthington, A. E.; Thompson, J.; Rauth, A. M.; Hunt, J. W. *Ultrasound Med. Biol.* **1997**, *23*, 1095.
- 31 Miyoshi, N.; Igarashi, T.; Riesz, P. *Ultrason. Sonochem.* **2000**, *7*, 121.
- 32 Wang, J.; Han, J.-T.; Zhang, Y. *Bull. Chin. Cancer* **2003**, *12*, 339 (in Chinese).
(王君, 韩健涛, 张杨, 中国肿瘤, **2003**, *12*, 339.)
- 33 Shang, Z.-Y.; Shi, H.-W.; Liu, Y.-S.; Geng, S.-L.; Wang, G.-Z.; Zhang, K. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 1277 (in Chinese).
(尚志远, 石焕文, 刘渊声, 耿森林, 王公正, 张坤, 化学学报, **2004**, *62*, 1277.)

(A0503235 SONG, J. P.; DONG, H. Z.)