

冻结速率对血小板冷冻干燥保存的影响

周新丽 祝宏¹ 张绍志 朱发明¹ 陈光明* 严力行¹

(浙江大学制冷与低温研究所低温生物实验室, 杭州 310027; ¹浙江省血液中心, 杭州 310006)

摘要 冷冻干燥法是使血小板能够长期保存的一种理想方法。冻结过程对血小板的冻干保存至关重要。采用梯度降温、搁板预冷、液氮冻结等三种冻结方式, 研究了冻结速率对血小板冷冻干燥保存恢复率的影响。实验结果表明用搁板预冷的方式冻结并干燥的血小板复水后的恢复率最高, 达到(93.0±5.2)%, 此时的冻结速度约为 10 °C/min。扫描电镜照片显示冻干复水后的血小板保持了完整的细胞结构, 但与新鲜血小板相比略呈球形。冻干复水后的血小板对 1 U/ml 凝血酶的最大聚集率接近于新鲜血小板, 但聚集速度比新鲜血小板慢。

关键词 血小板; 冷冻干燥; 冻结速率

血小板是血液中的一种重要组成成分, 它主要参与血栓的形成和凝血过程。在对大量失血和低血小板症患者的治疗过程中, 需要进行血小板输注。因此, 保证足够的血小板储备和供应显得尤为重要。与目前用于临床的 22 °C 振荡保存浓缩血小板和低温冰冻保存血小板两种技术相比, 用冷冻干燥法保存血小板克服了方法学上的局限性: (1)冻干的血小板能够在环境温度下长时间稳定储存, 不需要任何低温设备; (2)冻干的血小板能够在使用时直接复水而恢复活性, 适于应对紧急止血情况; (3)冻干的血小板质量大大减轻, 便于运输。这些明显的优势使冻干保存血小板在临床上有巨大的应用潜力。

冷冻干燥过程包括冻结、初次干燥和二次干燥三个环节, 通常会对细胞膜和胞内物质造成损伤, 导致细胞死亡或影响生物功能的正常发挥。目前已经开展了很多研究来减少冻干过程对细胞的损伤, 大多数集中在保护剂系统的选择方面, 其中高分子化合物和糖类被证明是有效的冻干保护剂^[1-6]。实际上, 除了保护剂系统以外, 冻结过程也是影响细胞冻干保存有效性的关键因素。目前有关这方面的研究在药品和生物制品的冻干领域较多^[7-9], 而在哺乳动物细胞的冻干领域很少^[10]。因此, 本文从冻结过程的角度出发, 研究冻结速率对血小板冻干保存恢复率的影响。采用梯度降温、搁板预冷和液氮冻结三种方式冻结血小板冻干悬液, 冻干复水后的血小板恢复率通过比较冻干前及复水后的血小板数确定。此外, 通过对复水后血小板的扫描电镜观察和对 1 U/ml 凝血酶的聚集实验, 检验冻干保存方法对

维持血小板形态和聚集功能的有效性。

1 材料与方法

1.1 血小板冻干悬液的准备

新鲜浓缩血小板($1 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ 个/ml)来自健康无偿献血者, 由浙江省血液中心提供。富含血小板的血浆在 480 g 离心 15 min, 使血小板沉淀, 弃去上层血浆。然后加适量生理盐水使之悬浮洗涤, 在 480 g 离心 10 min 收集血小板, 重复此操作两次。将洗涤后的血小板重悬于冻干缓冲液中, 制成血小板浓度约 0.2×10^9 个/ml 的冻干悬液。冻干缓冲液以 9.5 mmol/L HEPES, 142.5 mmol/L NaCl, 4.8 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂ 作基准溶液, 以 1% 牛血清白蛋白(BSA)和 20% 海藻糖作保护剂, 所有浓度百分比均以 W/V (g/100 ml)表示。

1.2 冷冻干燥

1.2.1 冻结 将血小板冻干悬液 1 ml 等量分装至直径为 25 mm 的玻璃瓶中, 用如下三种冻结方式进行冻结, 并通过布置在玻璃瓶底部中心的铜-康铜热电偶测量溶液的冻结速率。(1)梯度降温: 玻璃瓶放在处于室温的冻干机搁板上, 搁板以恒定的降温速率降至 -50 °C, 这种方法得到冻干悬液的冻结速率约为 0.5 °C/min; (2)搁板预冷: 玻璃瓶放在预

收稿日期: 2005-10-28 接受日期: 2006-02-06

国家自然科学基金(No.50076039)和卫生部科学研究基金(No. WKJ2005-2-037)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-87951680, Fax: 0571-87952464, E-mail: gmchen@zju.edu.cn

冷至 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冻干机搁板上, 这种方法得到冻干悬液的冻结速率约为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$; (3)液氮冻结: 玻璃瓶直接浸入液氮中, 这种方法得到冻干悬液的冻结速率约为 $200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。冻结溶液在冻结平衡温度下维持 1 h 后进入干燥阶段。

1.2.2 干燥 干燥在自行研制开发的低温冷冻干燥装置中进行, 详见文献[11]。为了实时监测样品、搁板和冷阱的温度, 分别在样品底部中心、搁板进出口、冷阱进出口布置铜-康铜热电偶。冻结过程结束后, 开启冷阱制冷阀使冷阱温度降至 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下, 开启真空泵使冻干室真空度达到 15 Pa , 关小搁板制冷阀使搁板温度升至 $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$, 维持这样的一次干燥条件 20 h。当从玻璃观察窗观察到瓶内冻结溶液的升华界面消失且热电偶反映出瓶内样品的温度在短时间内出现迅速升高, 表明一次干燥过程结束。此后, 以 $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的加热速度使搁板温度升高至 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并维持在此温度直到二次干燥过程结束, 这个过程共持续 8 h。冻干过程结束后, 用橡皮塞密封玻璃瓶, 将冻干后的血小板保存在室温。

1.3 复水

冻干的血小板密封保存在室温, 30 天后将它们复水。每个冻干样品原含有 1 ml 血小板悬浮液, 将血浆(PPP): 水 = 1 : 1 的复水溶液 1 ml 在室温下直接加入每个冻干样品瓶中, 轻轻振荡直到样品完全溶解于复水溶液中。

1.4 血小板恢复率

冻干复水后的血小板恢复率通过在冻干前及复水后分别进行血小板计数来确定。血小板计数在 CELL-DYN1700 型(雅培, 美国)血球计数仪上完成。比较冻干前和复水后的血小板数, 得到血小板冻干保存的数值回复率 = (复水后的血小板数 / 冻干前的血小板数) $\times 100\%$ 。

1.5 扫描电镜

三种不同冻结方式得到的冻干样品的内部结构用 XL-30-ESEM (飞利浦, 荷兰)型环境扫描电镜进行观察。将冻干后的饼状样品用锋利的小刀沿横截面方向小心切开以免破坏饼状的内部结构, 然后用 IB-3 型离子溅射仪(日立, 日本)在样品表面喷镀金膜, 镀膜后的样品在扫描电镜下观察。

冻干复水后血小板的形态也用 XL-30-ESEM 型扫描电镜进行观察, 并与新鲜血小板的形态进行比较。新鲜血小板和冻干复水后的血小板用 1.5% 的戊二醛溶液按 1 : 9 混合固定过夜, 漂洗后用 1% 的

锇酸溶液固定样品 2 h, 漂洗后用梯度浓度(包括 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 和 100% 六种浓度)的乙醇溶液对样品进行脱水, 再用醋酸异戊酯处理样品 2 h, 之后样品在 HCP-2 型临界点干燥仪(日立, 日本)中进行临界点干燥, 干燥后的样品用 IB-3 型离子溅射仪在样品表面喷镀金膜。制备好的样品在扫描电镜下观察。

1.6 血小板聚集实验

血小板聚集功能按照比浊法原理用血小板聚集分析仪 560CA (Chrono-Log, USA)进行检测。将 400 μl 新鲜血小板和复水后的血小板悬浮液加入预先放入搅拌珠的 PAG 玻璃测试杯中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min, 向预热后的血小板悬浮液中加入最终浓度为 1 U/ml 的凝血酶, 血小板悬浮液吸光度的信号被转换为电讯号, 在记录仪上记录下电讯号的变化。根据描记曲线可以计算血小板的最大聚集率和坡度。最大聚集率 = $(h_1/h_0) \times 100\%$, 其中 h_1 是最大聚集时距 PRP 基线的高度, h_0 是 PRP 基线与 PPP 基线之间的高度, 此值反映聚集程度的大小。坡度是沿聚集曲线下降时最陡峭部分作一切线, 以记录仪 2 min 所走的距离作为底边, 由底边至切线的垂直高度, 此值反映聚集速度的快慢。

2 结果

2.1 冷却速率与冰晶的形成

三种冻结方法得到的降温过程曲线如图 1 所示。可以看出液氮冻结得到最快的冻结速率, 完全检测不到冻结的相变阶段, 说明它提供了足够快的冷却速率, 相变潜热一产生就立刻被除去。梯度降温是最慢的冻结方式, 产生很大的过冷度。三种冻结方法之间的差别非常明显, 这就使比较冻结速率

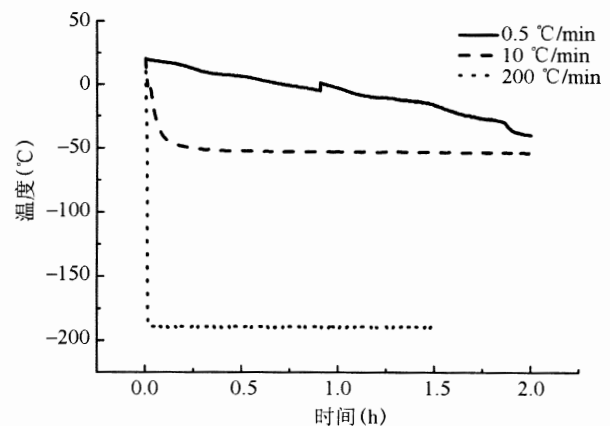


图 1 三种冻结方式的降温曲线图

对血小板冻干保存的影响成为可能。

血小板冻干悬液在冻结固化后，冰晶通常镶嵌在蛋白质和糖类形成的保护剂浓缩基质中，干燥过程中冰晶完全升华，原来被冰晶占据的位置就成了孔状结构，而蛋白质和糖类形成的保护剂浓缩基质就成了网状结构，血小板细胞包裹在保护剂浓缩基质中。因此，冻干样品横截面上孔的大小，可以间接反映出冻结过程中形成冰晶的大小。为了研究冻结速率对细胞外形形成冰晶大小的影响，用放大500倍的扫描电镜观察冻干样品的横截面，如图2所示。保护剂浓缩基质的成分是1%牛血清白蛋白(BSA)和20%海藻糖，且 0.2×10^9 个/ml血小板的加入不会影响冻干后保护剂基质的结构。图2a显示梯度降温的样品形成约50 μm 的冰晶，冰晶的大小和形状不均匀且生长方向杂乱；图2b显示搁板预冷的样品形成约20 μm 的冰晶，冰晶的大小和形状比较均匀且生长方向一致；图2c显示液氮冻结的样品形成约10 μm 的冰晶，冰晶大小和形状均匀且生长方向一致。

2.2 冻结速率对血小板冻干恢复率的影响

三种冻结速率下冻干的血小板在室温保存30天后复水，冻干复水后的恢复率如图3所示。搁板预冷得到的恢复率最高为(93.0 \pm 5.2)%，其次是液氮冻结的恢复率为(83.5 \pm 1.9)%，梯度降温的恢复率最低为(73.7 \pm 1.6)%。

2.3 冻干复水后血小板的扫描电镜照片

为了检验冻干保存方法对维持血小板形态的有效性，选取用恢复率最高的搁板预冷方式冻结并干燥的样本，将其在室温保存30天后复水，复水后血小板的形态用扫描电镜进行观察并与新鲜血小板对照，如图4所示。新鲜血小板呈扁平的圆盘状(图4a)，复水后的血小板保持了完整的细胞结构，但在形态上有膨胀的趋势略呈球形，有些相邻的细胞出现相互融合的现象(4b)，这说明冻干保存使血小板的形态发生了一定的改变。

2.4 冻干保存血小板的聚集曲线

为了检验冻干保存方法对维持血小板聚集功能的有效性，选取用恢复率最高的搁板预冷方式冻结并干燥的样本，将其在室温保存30天后复水，复水后血小板的聚集功能用其对1 U/ml凝血酶的聚集曲线进行评价，如图5所示。新鲜血小板的最大聚集率为62%，坡度为158(图5a)，冻干复水后血小板的最大聚集率为52%，坡度为68(图5b)。这说

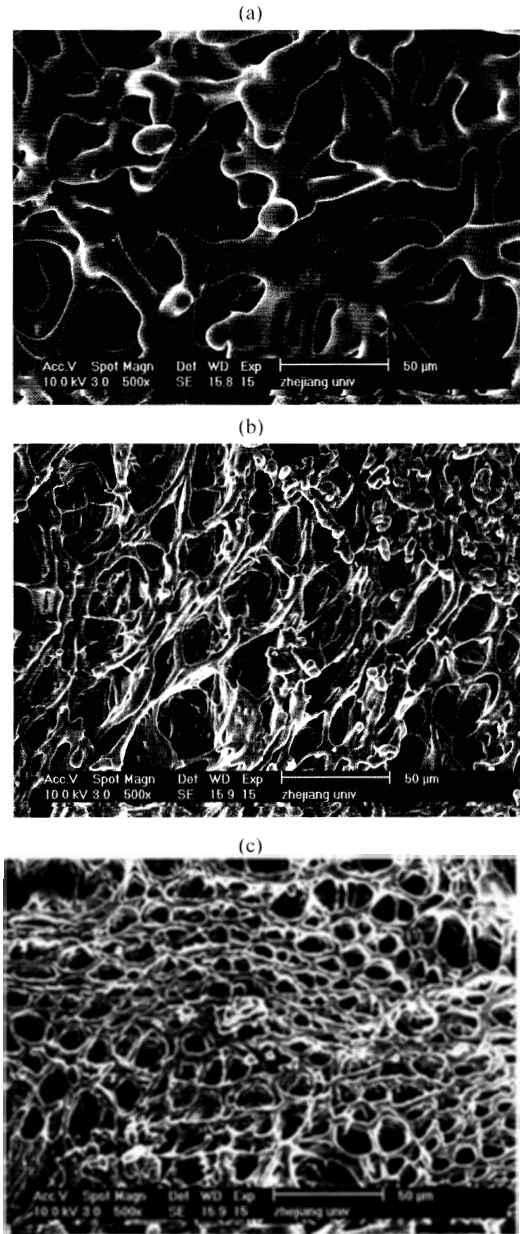


图2 冻干样品横截面的扫描电镜照片(500 \times)
(a)梯度降温；(b)搁板预冷；(c)液氮冻结。

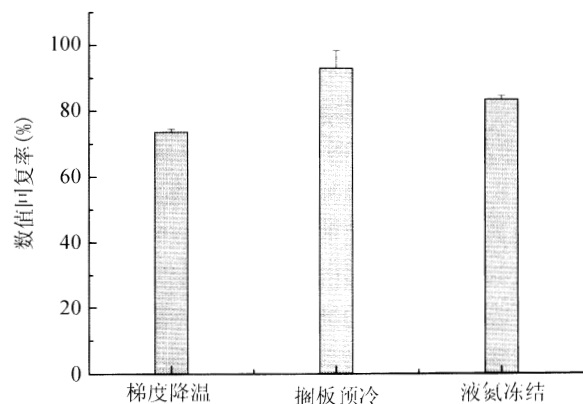


图3 冻结速率对血小板冻干复水后恢复率的影响($n=6$)

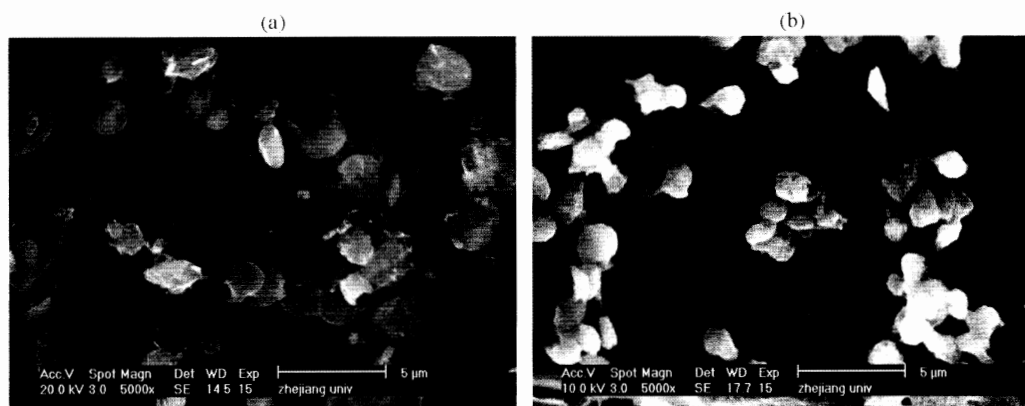


图4 新鲜血小板(a)和冻干复水后血小板(b)的扫描电镜照片(5 000 ×, 比例标尺=5 μm)

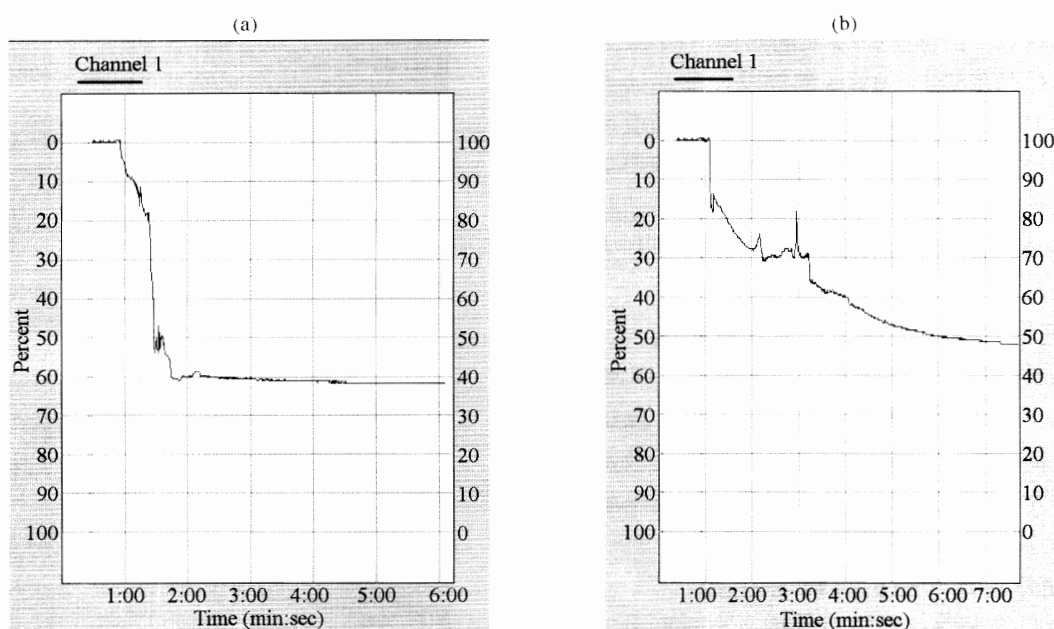


图5 新鲜血小板(a)和冻干复水后血小板(b)对1 U/ml 凝血酶的聚集曲线

明冻干复水后的血小板维持了较好的聚集功能, 但是其聚集速度比新鲜血小板慢。

3 讨论

影响血小板冻干保存效果的因素很多, 例如保护剂系统、冻干过程参数(冻结速率、干燥温度和压力)、复水条件等。除了保护剂系统对血小板冻干保存效果的影响较为突出外, 冻结速率也是影响血小板冻干保存有效性的关键因素。一般认为慢速冻结产生过大的细胞外冰晶, 容易对细胞造成伤害; 而快速冻结产生的冰晶较小, 能够减少细胞外冰晶对细胞的损伤, 是保存完整细胞的理想方法。本文的实验结果表明, 梯度降温的冻结方式产生的细胞外冰晶最大, 得到冻干血小板的恢复率最低;

搁板预冷的冻结方式产生的细胞外冰晶较小, 得到冻干血小板的恢复率最高; 进一步提高冻结速率, 液氮快速冻结反而会产生负面效应使冻干血小板恢复率下降。这可能是因为过快的冻结速率引起了细胞内冰晶的形成, 抵消了快速冻结所带来的优势。此外, 液氮冻结的样品在冻结结束后, 要经历从液氮温度加热到一次干燥操作温度的过程, 细胞外小冰晶在此过程中发生一定程度的再结晶, 也是冻干血小板恢复率降低的一个原因。因此, 正如低温保存存在最佳冻结速率一样, 冻干保存也存在最佳冻结速率, 过快或过慢的冷却速率都会导致细胞的损伤, 降低存活率。对血小板的冻干保存来说, 本研究得到的最佳冻结速度约为 10 °C/min。

目前用冷冻干燥法成功保存的细胞主要局限于

原核生物, 如乳酸菌、酵母、细菌等, 随着冻干对象在结构和功能上复杂性的增加, 能否用冷冻干燥成功保存哺乳动物细胞在过去十几年里一直是个很有争议的问题。本文选取用恢复率最高的搁板预冷方式冻结并干燥的样本, 检验冻干保存方法对维持血小板形态和聚集功能的有效性。实验结果表明: 冻干复水后的血小板保持了完整的细胞结构, 但与扁平圆盘状的新鲜血小板相比略呈球形, 有些相邻的细胞出现相互融合的现象; 冻干复水后的血小板对 1 U/ml 凝血酶有较好的聚集功能, 但是其聚集速度比新鲜血小板慢。此结论初步证明用冷冻干燥法长期保存血小板有一定的可行性, 但仍需在血小板耐冻耐干机制方面进行深入的研究, 同时进一步改进冻干保护剂的配方和优化冻干过程参数, 使

冻干血小板能够最大限度的保持新鲜血小板的生理功能, 从而具有更大的临床应用价值。

参考文献 (References)

- [1] Crowe JH *et al. Cryobiology*, 2001, **43**: 89
- [1] Crowe JH *et al. Cryobiology*, 1997, **35**: 20
- [2] Crowe JH *et al. Cryobiology*, 2001, **43**: 89
- [3] Rindler V *et al. Cryobiology*, 1999, **38**: 2
- [4] Wolkers WF *et al. Cryobiology*, 2001, **42**: 79
- [5] Wolkers WF *et al. Cell Preservation Technology*, 2003, **1**: 175
- [6] Xiao HH *et al. Cryo Lett*, 2004, **25**: 111
- [7] Zhai S *et al. Biotechnol Prog*, 2004, **20**: 1113
- [8] Aso Y *et al. Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2005, **53**: 301
- [9] van Winden EC *et al. Pharm Res*, 1997, **14**: 1151
- [10] Rindler V *et al. Cryobiology*, 1999, **39**: 228
- [11] 翁宇等. 深冷技术, 2004, (3): 12

Effect of Freezing Rates on the Freeze-drying of Human Platelets

Xin-Li Zhou, Hong Zhu¹, Shao-Zhi Zhang, Fa-Ming Zhu¹, Guang-Ming Chen*, Li-Xing Yan¹

(*Cryobiology Laboratory, Institute of Refrigeration and Cryogenic Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;*

¹Blood Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310006, China)

Abstract Freeze-drying is an ideal alternative for long-term preservation of platelets in blood banks. Freezing process is important for recovery of freeze-dried of platelets. In this study, the effect of freezing rates on the recovery of freeze-dried human platelets in the presence of 1% bovine serum albumin and 20% trehalose were investigated. Three cooling methods were employed, including gradient cooling, shelf cooling and plunging the sample into liquid nitrogen. The results show that shelf cooling was the best way to cool the sample, the highest recovery of freeze-dried and rehydrated platelets reached (93.0±5.2)%, the optimum rate of freezing is about 10 °C/min. Furthermore, SEM was employed to investigate the morphology of freeze-dried and rehydrated platelets but more rounder compared with fresh platelets. The maximum aggregation rate of these platelets to thrombin (1 U/ml) was close to that of fresh platelets, but aggregation speed was more slowly than the fresh ones.

Key words platelets; freeze-drying; freezing rate

Received: October 28, 2005 Accepted: February 6, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.50076039) and the Science Foundation of Ministry of Health (No.WKJ2005-2-037)

*Corresponding author. Tel: 86-571-87951680, Fax: 86-571-87952464, E-mail: gmchen@zju.edu.cn