

海藻糖载入红细胞及其冷冻干燥的实验研究

何 晖 刘宝林* 华泽钊 李 川 吴正贞

(上海理工大学低温医学技术研究所, 上海 200093)

摘要 冷冻干燥保存是长期保存人体红细胞的理想方案之一。冻干保护剂海藻糖渗入细胞内后, 对细胞膜和细胞内物质有保护作用, 其中的一个作用是增加细胞质的浓度, 使冻干过程容易形成稳定的玻璃态。应用高渗法处理红细胞, 通过考察胞内海藻糖含量、红细胞冻干后的存活率、腺苷三磷酸酶(ATPase)、超氧化物歧化酶(SOD)活力以及细胞形态变化, 研究胞内海藻糖含量对红细胞冻干后活性的影响。结果显示: 海藻糖对红细胞冻干具有明显的保护作用, 随胞内海藻糖浓度升高, 其保护性能逐渐增强; 43.8 mmol/L 的胞内海藻糖浓度对红细胞保护最好, 细胞存活率达到 53.6%, 形态保持良好, ATP 和 SOD 活力均在正常的范围内。

关键词 冷冻干燥; 红细胞; 胞内海藻糖; 载入

血库或血站的红细胞通常采用 4 °C 保存或低温保存(-80 °C 或 -196 °C)。4 °C 下红细胞保存时间不超过 6 周, 且易受到细菌、微生物的污染; 低温保存延长了红细胞的保存期(3~10 年), 但需要配置低温冰箱或容器等, 成本高昂且维护费用高, 既不经济又不便于携带运输。相对于 4 °C 保存和低温保存方法, 冻干保存红细胞由于具有不可比拟的优势——可以常温保存, 重量轻便于运输而受到人们广泛关注。但红细胞在体外容易因生理条件的改变而受到物理或化学损伤, 造成冻干后细胞的存活率极低。因此冻干保存红细胞一直是尚未解决的世界难题, 目前文献报道红细胞冻干后存活率普遍不超过 50%^[1~3], 细胞甚至于损失了某些功能。

海藻糖是非还原性二糖, 具有在冷冻和干燥脱水环境下稳定细胞膜和蛋白质结构的功能, 应用海藻糖作为生物活细胞的冻干保护剂成为近年来研究的热点。研究报道表明外源性的海藻糖在细胞内部能够提高细胞的热稳定性和冷冻耐受性, 并且海藻糖的含量与细胞对冻干等不利条件的耐受性有密切关系^[4,5]。由于海藻糖是非渗透型保护剂, 不能自由渗透进入细胞膜, 需要对细胞经过一定方法处理后海藻糖才能载入细胞内。关于海藻糖载入血小板 Wolkers 等^[6]进行了报道, 发现在培养条件下通过胞吞作用细胞可以高效地吸收海藻糖。目前, 有关海藻糖和红细胞相互作用的研究还不多见, 对其展开研究具有实际意义。高渗法是一种将小分子量物质载入红细胞的方法, 已有将吗啡成功载入红细胞的

报道^[7], 应用海藻糖载入红细胞具有操作简便、载入效果好的特点。本实验以高渗法将海藻糖载入红细胞, 通过红细胞冻干后的存活率变化、腺苷三磷酸酶(ATPase)、超氧化物歧化酶(SOD)活力以及细胞形态变化等 4 个方面研究了胞内海藻糖对红细胞冻干的影响, 并探索胞内海藻糖对红细胞的冻干保护机制, 为进一步研究冻干保存红细胞提供理论与实验基础。

1 材料与方法

1.1 红细胞的制备

全血取自健康志愿者静脉血(上海市血液中心提供, ACD 抗凝)。用 4 °C 的 0.9%NaCl 溶液洗涤 3 次, 收集红细胞置于 4 °C 冰箱保存备用。使用前用等渗 PBS 缓冲液(pH 7.2)配制红细胞悬液(压积比 40~50%), 遵守无菌操作规则。

1.2 主要仪器

冷冻干燥机(Freezezone 2.5 型, 最低冷阱温度 -84 °C, 美国 Labconco 公司), 自动血球分析仪(Coulter Ac.T 5diff, 美国 Beckman 公司), 全自动冰点渗透压计(FM-8P, 上海医科大学仪器厂), 差示扫描量热仪(DSC-Pyris Diamond 型, 美国 Perkin-Elmer 公司), 程序降温仪(上海理工大学低温医

收稿日期: 2006-02-24 接受日期: 2006-08-15

国家自然科学基金项目(No.50376040, No.50436030, No.50576059)、上海市重点学科建设项目(No.P0502)及上海市引进海外高层次留学人员专项、博士点资金(No.20050252002)资助

* 通讯作者。Tel: 021-65688765, E-mail: bliuk@163.com

学与食品冷冻研究所研制)。

1.3 海藻糖载入处理

向红细胞分别加入不同浓度的葡萄糖(20 ℃), 静置 20 min 后离心, 测量上清液渗透压(作为胞内渗透压), 向获得的浓集红细胞加入终浓度为 4% 的海藻糖, 静置 30 min, 计数和计算细胞平均体积, 离心后测量溶液渗透压(作为胞外渗透压), 检测海藻糖含量及用于冻干实验。

1.4 胞内海藻糖的提取和测定

取适量经葡萄糖和海藻糖处理的红细胞离心, 测量上清液渗透压, 并将所得浓集红细胞用与其上清液渗透压相近的 PBS 缓冲液(pH 7.2)(不影响胞内海藻糖含量)洗涤 3 次; 然后用 10% 三氯乙酸在常温下抽提 3 次, 合并 3 次的抽提液, 用硫酸-蒽酮法测定其中的海藻糖含量, 按公式计算得到胞内海藻糖浓度: $C = \frac{T}{M \times N \times (V - V_0)}$, C 为胞内海藻糖的浓度, mmol/L; T 为抽提液中海藻糖的浓度, $\mu\text{g/ml}$; M 为海藻糖的分子量, 378.33 g/mol; N 为红细胞计数, 个/L; V 为红细胞平均体积, μm^3 ; V_0 细胞不可渗体积, 取 53% V_0 (V_0 为红细胞等渗体积)^[8], μm^3 。

1.5 冻干实验

1.5.1 冻干保护液的配制 通过前期的实验探索, 选用 30% 聚乙烯吡咯烷酮、5% 胎牛血清、7% 柠檬酸钠以及 15% 海藻糖作为红细胞的保护液, 将红细胞配制成冻干溶液, 采用差示扫描量热仪(DSC)测定冻干溶液的玻璃化转变温度(T_g)。

1.5.2 冻干过程 取混匀的冻干悬液 1 ml 加入安瓿瓶中, 在 4 ℃ 下平衡 20 min; 以 10 K/min 的降温速率降温至 -60 ℃, 恒温 2 h 后快速置入冻干机。升华干燥过程样品的温度低于 -40 ℃, 持续 30 h; 解析干燥过程样品的温度低于 20 ℃, 持续 10 h; 干燥箱内的真空度低于 10 Pa。冻干过程结束后, 样品放入真空密封袋, 并保存于 4 ℃ 冰箱中待测。

1.5.3 复水 采用递减 NaCl 浓度的梯度溶液对各个样品复水洗涤。用含有 0.014% 腺嘌呤、0.721% 葡萄糖、1.457% 甘露醇、0.176% 柠檬酸钠的 4.5% NaCl、3% NaCl、0.8% NaCl 分别洗涤 1 次, 重新定量至初始体积, 在 37 ℃, 5% CO_2 中培养 4 h, 计数并测定各项指标。

1.6 冻干溶液的玻璃化转变温度(T_g)测定

为了考察冻干溶液形成玻璃态能力的情况, 使用差示量热扫描仪对冻干溶液的玻璃态形成能力进

行了检测, 降温速率是 150 ℃/min, 升温过程中的扫描速率为 20 ℃/min。

1.7 细胞存活率的测定

冻干红细胞经复水后, 使用自动血球分析仪计数, 计算冻干后细胞的存活率:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{复水后细胞数}}{\text{冻干前细胞数}} \times 100\%$$

1.8 酶活力的测定

1.8.1 SOD 活力的测定 用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活力, 按试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)的说明书操作, 酶活力单位用 U/g 血色素(hemoglobin, Hb)表示。

1.8.2 ATPase 活力的测定^[9] 红细胞膜按低渗溶血法处理, 用钼铵酸法测磷(Pi)的含量, 计算 ATPase 活力, 酶活力的单位用 $\mu\text{mol Pi}/(\text{g} \cdot \text{Hb})$ 表示。

2 结果

2.1 冻干溶液的玻璃化转变温度

冻干过程包括冷冻、升华和解析干燥几个关键环节, 细胞及其保护剂溶液在冷冻过程应当形成玻璃态, 以避免冰晶生长对细胞的机械损伤、溶液损伤和渗透损伤等。图 1 是冻干溶液的差示量热扫描热流曲线, 溶液的玻璃化转变温度 T_g 为 -28.18 ℃。冻结过程溶液以足够快的降温速率冷却至 -60 ℃, 固化形成稳定的玻璃态, 但胞内可能由于细胞膜热阻的作用, 在相同条件下难以形成玻璃态, 细胞内部的冰晶生长对细胞膜造成损伤。与其他糖类相比, 相同条件下海藻糖具有最高的玻璃化转变温度, 因此海藻糖在胞内容易形成玻璃态。在冷冻条件下, 海藻糖对细胞的保护作用可能基于这种玻璃

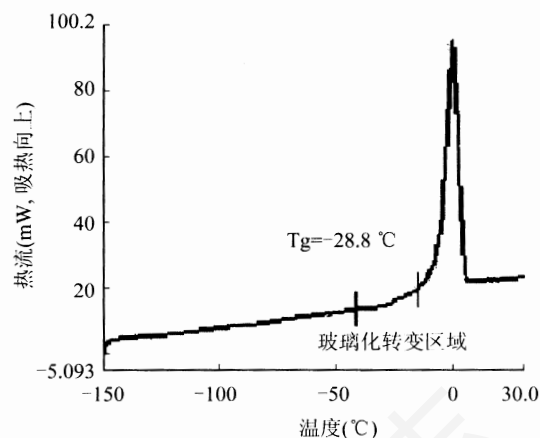


图 1 差示量热扫描热流曲线

加入 30% 聚乙烯吡咯烷酮、5% 胎牛血清、7% 柠檬酸钠、15% 海藻糖的细胞溶液。

态假说^[10]。

2.2 渗透压差对海藻糖载入红细胞的影响

葡萄糖可以渗透进入细胞，红细胞在葡萄糖液中平衡后，胞内的渗透压溶液的渗透压相当，离心后在4%的海藻糖中平衡30 min。测量胞内、外的渗透压及胞内海藻糖的浓度，结果如表1所示。

从表中可看出，胞内海藻糖的浓度取决于胞内外之间渗透压差。当胞内外之间渗透压差为295.8 mmol/L或443.1 mmol/L时，胞内海藻糖浓度均低于15 mmol/L；当渗透压差为1 369.8 mmol/L时，胞内海藻糖增加到43.2 mmol/L。继续增加渗透压差，胞内海藻糖浓度达到43.8 mmol/L，可见渗透压差对胞内海藻糖浓度的增强作用并不十分明显，表明海藻糖水平已达到饱和态势。海藻糖进入细胞内部的机制尚不十分清楚，我们认为高渗的葡萄糖使胞内的渗透压增加，细胞被压缩；当与低渗的海藻糖混合时，细胞在溶液重新达到平衡的过程中体积膨胀，并借助胞内外的渗透压差促使海藻糖渗透入胞内，这种现象与高渗情况下膜通透性变化有密切关系。

2.3 胞内海藻糖对冻干红细胞存活率的影响

对不同胞内海藻糖浓度红细胞冻干，检测其存活率，结果如图2所示。胞内不添加海藻糖时，细胞的存活率为31.6%；当胞内海藻糖浓度增大到

8.5 mmol/L时，细胞的存活率没有明显变化，说明胞内海藻糖浓度过低或仅有胞外海藻糖对细胞的保护作用有限。当海藻糖浓度为43.2 mmol/L时，细胞的存活率增加到53.6%，与不添加海藻糖相比，细胞的存活率提高了22%。

细胞的存活率不同可以用胞内海藻糖浓度的不同来解释，细胞的存活率的升高说明胞内海藻糖浓度同细胞在冻干不利条件下的抗逆耐力呈正相关关系。当胞内海藻糖浓度为43.8 mmol/L时，细胞的存活率增加却不明显，说明胞内海藻糖达到一定的浓度后对细胞的保护作用有限。考虑到胞内海藻糖浓度继续升高的幅度有限，认为43.8 mmol/L为较佳的添加浓度。

2.4 酶活力分析

SOD可催化超氧化物自由基发生歧化反应，防御自由基对细胞的氧化损伤。对冻干前后红细胞的SOD活力测定，结果如图3所示。从图中可以见出，胞内不添加海藻糖时，SOD活力只有新鲜对照的70%；胞内海藻糖浓度为43.8 mmol/L时，SOD活力与新鲜对照比较差别不明显，其他浓度的保护效果相对较差，这可能与不同胞内海藻糖浓度对红细胞SOD活力的保护作用大小不一样有关。

ATPase是维持细胞正常体积、血红蛋白功能、细胞膜脆性与变形能力所必需的，被认为是细胞保

表1 渗透压差对胞内海藻糖浓度的影响

葡萄糖的浓度 (%)	胞内的渗透压 (mmol/L)	胞外的渗透压 (mmol/L)	胞内外之间渗透压差 (mmol/L)	胞内海藻糖的浓度 (mmol/L)
8	392.5	96.7	295.8	8.5
10	541.2	98.1	443.1	13.6
15	832.7	95.6	737.1	26.9
20	1 149.8	90.4	1 059.4	34.6
25	1 462.4	92.6	1 369.8	43.2
28	1 526.1	97.4	1 428.7	43.8

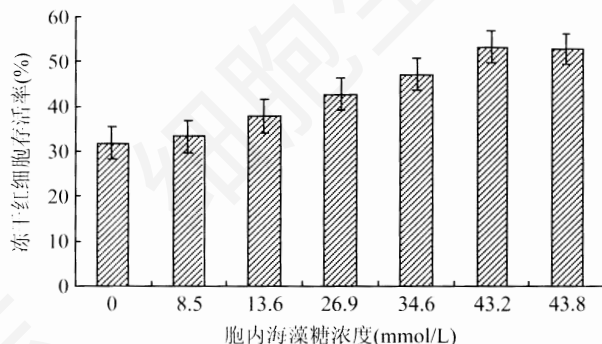


图2 胞内海藻糖浓度对复水冻干红细胞活性的影响

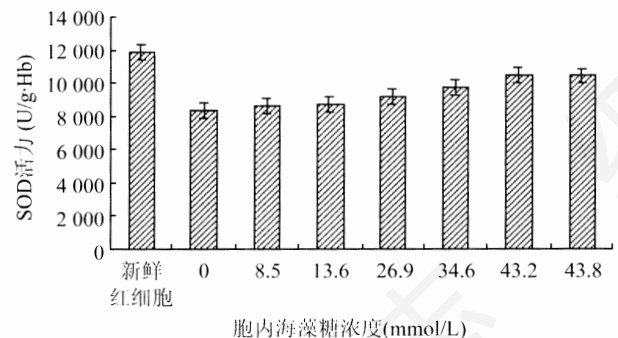


图3 胞内海藻糖浓度对复水冻干红细胞SOD活性的影响

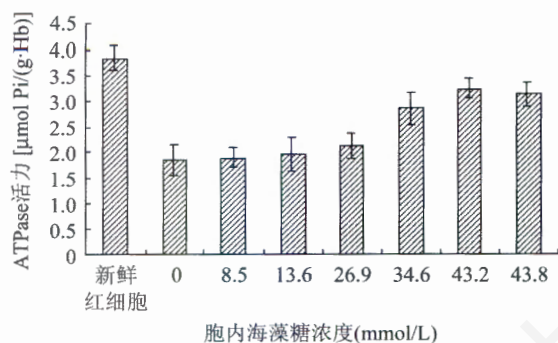


图4 胞内海藻糖浓度对复水冻干红细胞ATPase活性的影响

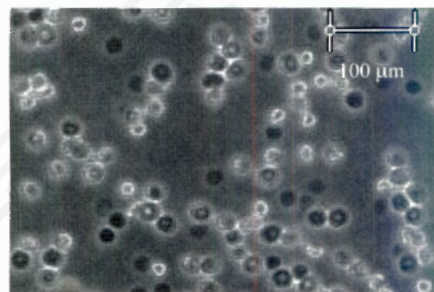


图5 红细胞冻干复水后的形态(200×)

持活性的指标^[11], 结果如图4所示。从图中可以见出, 胞内海藻糖浓度越高, ATPase活力越高。在胞内海藻糖浓度为43.2 mmol/L时, ATPase活力达到3.25 $\mu\text{mol Pi}/(\text{g}\cdot\text{Hb})$ 。有研究报道ATPase低于1.5 $\mu\text{mol Pi}/(\text{g}\cdot\text{Hb})$ 则表明红细胞活力受到明显损伤^[12]。实验的ATPase活力值明显高于1.5 $\mu\text{mol Pi}/(\text{g}\cdot\text{Hb})$, 说明红细胞冻干后仍然具有活性。

在冻干过程海藻糖保护细胞酶活性的确切机制尚未完全清楚。Crowe等^[13]认为海藻糖的羟基能替代水与酶形成氢键, 增强酶分子的热稳定性; 认为干燥情况下海藻糖会有玻璃态转变发生, 而通常情况下处于玻璃态物质的分子很稳定^[14]; 我们认为由于海藻糖分子较小, 因此可以包围在酶分子周围, 将酶分子包裹起来, 也可能进入酶分子的空间结构内部, 特别是在酶的活性中心附近, 这样海藻糖就会在酶分子内外形成玻璃态, 使得酶分子很难发生空间结构的变化。

2.5 形态观察

在冻结过程和干燥脱水过程, 红细胞膜是受到损伤的主要部位, 复水后不能抵抗溶液渗透压急剧变化的冲击, 导致细胞膜破裂。前期的工作表明红细胞首先在其3~5倍生理渗透压的溶液中平衡, 逐渐过渡到等渗状态, 可以有效地减小渗透压对膜的冲击。染色后光镜观察其形态, 43.8 mmol/L的胞内海藻糖浓度的冻干红细胞复水后的形态如图5所示, 从图中可以看到, 细胞结构保持完整, 表面均呈凹状, 分布均匀。

3 讨论

海藻糖能保护生物细胞抵御冷冻、干燥脱水, 增强生存能力, 保护细胞活性和酶活性。本文探讨了海藻糖载入红细胞的过程中, 胞内外渗透压差对载入海藻糖的影响。结果显示, 随着渗透压差的增大, 胞内海藻糖浓度上升, 可达到43.8 mmol/L, 高于文献报道的40 mmol/L^[15], 与培养法比较具有操作简便, 载入效率高的优点。冻干结果表明, 随胞内海藻糖浓度的上升, 细胞的存活率增大, 并获得较高的细胞存活率, 达到53.6%, 形态保持良好且ATPase与SOD活性均在正常的范围内。今后的实验中仍需进一步研究海藻糖载入时渗透压变化对红细胞生理、生化功能的影响, 以及红细胞的冻干保存研究。

参考文献 (References)

- [1] Weinstein R et al. *Transfus Clin Biol*, 1995, 2: 427
- [2] Rindler V et al. *Cryobiology*, 1999, 38: 2
- [3] Rindler V et al. *Cryobiology*, 1999, 39: 228
- [4] Chen T et al. *Cryobiology*, 2001, 43: 168
- [5] Eroglu A et al. *Fertil Steril*, 2002, 77: 152
- [6] Willem WF et al. *Cryobiology*, 2001, 42: 79
- [7] 葛卫红等. *中国药科大学学报*, 2003, 34: 410
- [8] Luo DY et al. *Cryo Lett*, 2002, 23: 229
- [9] 徐淑云等. *药理实验方法学*, 第二版, 北京: 人民出版社, 1991, 499
- [10] 华泽钊等. *低温生物医学技术*, 北京: 科学出版社, 1994
- [11] 柏乃庆. *血液保存*, 上海: 上海科学技术出版社, 1981
- [12] Dern RJ et al. *J Lab Clin Med*, 1967, 69: 968
- [13] Crowe LM et al. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 769: 141
- [14] 华泽钊. *冷冻干燥新技术*, 北京: 科学出版社, 2005
- [15] Satpathy GR et al. *Cryobiology*, 2004, 49: 123

Effects of Intracellular Trehalose on the Freeze-Dried Red Blood Cells

Hui He, Bao-Lin Liu*, Ze-Zhao Hua, Chuan Li, Zheng-Zhen Wu

(*Institute of Cryogenic Engineering, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093, China*)

Abstract Freeze-drying is one potentially ideal technology for long-term preservation of living biological cells. To increase the survival and stability of human red blood cells (RBCs) after freeze-drying and rehydration, trehalose is introduced in RBCs using a hypertonic method before freeze-drying. The effects of intracellular trehalose concentration on RBCs after freeze-drying and rehydration are investigated. The results indicate that the survival of RBCs after freeze-drying and rehydration increases with the increment of intracellular trehalose concentration, the survival of RBCs after freeze-drying and rehydration is over 53.6% with 43.8 mmol/L of intracellular trehalose, the levels of ATPase and superoxide dismutase (SOD) are maintained close to the levels of fresh RBCs. Morphological study also confirms the results. It demonstrates that desiccation tolerance of RBCs increases along with the concentration of intracellular trehalose. Our study demonstrates that trehalose has protective effects on freeze-dried RBCs, the survival of freeze-dried RBCs depends on both extracellular and intracellular vitrification.

Key words freeze-drying; red blood cells; intracellular trehalose; loading

Received: February 24, 2006 Accepted: August 15, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.50376040, No.50436030, No.50576059), Shanghai Leading Academic Discipline Project (No.P0502), Funding for Scholars from Overseas of Shanghai and Funding for Doctoral Discipline (No.20050252002)

*Corresponding author: Tel: 86-21-65688765, E-mail: bliiuk@163.com