

超声波用于海藻糖载入血小板

张绍志¹ 朱发明² 范菊莉¹ 吴丹红¹ 陈光明^{1*}¹浙江大学制冷与低温研究所低温生物实验室, 杭州 310027; ²浙江省血液中心, 杭州 310006)

摘要 研究超声波对海藻糖载入人血小板过程的影响。将浓度约 1×10^9 个/ml 的人血小板在含 50 mmol/L 海藻糖、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L KCl、10 mmol/L EGTA、10 mmol/L 咪唑的溶液中孵化, 温度为 37 °C, 持续时间 4 h。孵化期间对各试样分别施加 800 kHz、不同强度和不同时间的超声波辐射, 以不施加超声波辐射的血小板样品为对照组。采用蒽酮硫酸法和分光光度计测量糖含量, 并据此计算渗入血小板的海藻糖浓度。结果表明, 在超声波辐射强度 $I=0.8 \text{ W/cm}^2$ 、辐射时间 1 h 时海藻糖载入血小板的浓度最高, 达 $(17.40 \pm 2.90) \text{ mmol/L}$, 比对照组 $(11.27 \pm 2.53) \text{ mmol/L}$ 高 54.3%。在光学显微镜下观察经超声波法载入海藻糖后的血小板, 发现形态保持完好, 与新鲜血小板形态几乎无差别, 合适的超声波辐射能够有效强化海藻糖载入人血小板的过程, 同时为进一步的血小板冻干研究提供了基础。

关键词 血小板; 超声波; 海藻糖; 液相内吞

在生物材料低温保存和冻干保存的研究中, 保护剂系统的研究一直备受关注。近几年, 根据生物学研究的发现, 人们采用海藻糖作为冻干保护剂, 使哺乳动物细胞冻干取得了令人兴奋的进展^[1]。

1999年, Rindler等^[2]将海藻糖应用于红细胞的冻干保护; 2001年 Wolkers等^[3]利用海藻糖的保护作用将人血小板成功冻干。研究发现, 海藻糖在细胞内外都存在的情况下保护作用较好^[3]。但是, 海藻糖是非渗透性保护剂, 不能自由穿过细胞膜进入细胞内, 因此, 对海藻糖载入细胞方法的研究成为一个新的课题和难点。目前已经提出的将海藻糖引入哺乳动物细胞的实验方法有: 热孵化、利用化学物质改变膜渗透性、基因法、电穿孔、显微注射等^[4]。

自 1955 年, Lota 等^[5]采用 1 MHz、(0.5~3.0) W/cm² 的超声波辐射成功提高了人类红血球细胞膜对钾离子的渗透性之后, 利用超声波将大分子物质渗入细胞的研究进展迅速, 2002 年, Tang 等^[6]应用超声波实现了皮肤对甘露醇和蔗糖的渗透。超声波法^[7]是一种物理的而非化学的、非滤过性病毒的、非侵入性的、非扩散性的方法, 适用于药物和细胞。由此, 本文以人血小板为模型, 提出将超声波用于海藻糖载入血小板的研究中, 在 37 °C 通过液相内吞作用成功将海藻糖载入血小板的实验基础上^[3], 施加超声波进行实验, 初步揭示了超声波法用于海藻糖载入血小板的一些规律。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

CELL-DYN1700 型血球计数仪(雅培, 美国), 37 °C 的恒温水浴(Julaba), KA-1000 型离心机, 722 型可见分光光度计, CSL1 型超声波治疗仪(上海大沪医疗设备厂), Nikon TE2000-U 型光学显微镜(尼康, 日本)。

1.2 血小板预处理

实验用新鲜浓缩血小板 [$(1 \sim 1.5) \times 10^9$ 个/ml] 来自健康无偿献血者; 由浙江省血液中心提供。首先将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重悬, 再 480 g 离心 10 min 收集血小板, 重复此操作三次。

1.3 孵化液

孵化缓冲液含 50 mmol/L 海藻糖, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L EGTA, 10 mmol/L 咪唑。

用该孵化液将预处理后的血小板配制成浓度约 1×10^9 个/ml 的血小板孵化悬液备用。

1.4 实验装置

收稿日期: 2007-08-13 接受日期: 2007-10-11

国家卫生部科学研究基金(No.WKJ2005-2-037)、国家留学回国人员基金和浙江省留学回国人员基金(张绍志)

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

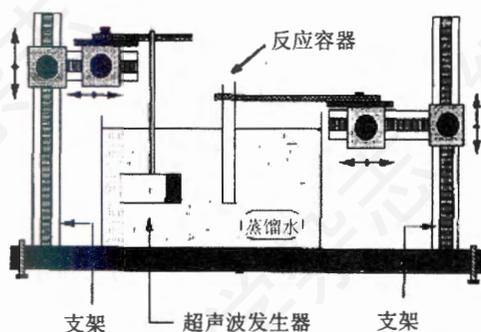


图1 实验装置图



图2 载样品玻璃容器示意图

图1为实验的装置图。其中,超声波治疗仪发出的超声波强度为 0.5 W/cm^2 到 3 W/cm^2 间分11档可选,工作频率 800 kHz ,换能器材质为锆钛酸铅,辐射面积 7 cm^2 ,由其性能参数认为发出的超声波为平面纵波。实验采用连续正弦波,并利用特制的玻璃容器,其与普通试管不同是其底部做成直径为 3 cm (小于超声波探头截面直径)、厚度 0.8 cm 的圆柱形,可装约 4 ml 样品溶液,出于方便固定考虑,上部加长 10 cm ,如图2。容器底部圆柱形截面与超声波传播方向垂直,样品溶液充满特制容器圆柱形空间,从而使在超声波传播方向上样品受到的辐射保持稳定一致。

1.5 实验

将上述预处理后的血小板孵化悬浮液置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温水浴中孵化 4 h ,并在孵化期间对各试样分别施加超声波辐射,按强度 $I=0.4 \text{ W/cm}^2$ 、 $I=0.8 \text{ W/cm}^2$ 、 $I=1.2 \text{ W/cm}^2$,各强度下辐射时间 15 min 、 30 min 、 1 h 、 2 h 不同共分成12组。以不施加超声波辐射,直接进行 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵化 4 h 的血小板样品为对照组,进行海藻糖载入血小板量的对比实验。

1.6 海藻糖的检测

血小板样品孵化 4 h 后,用适量生理盐水洗涤3次,洗去细胞外残留未被吸收的海藻糖,并在 480 g 离心 10 min 收集后,重悬于生理盐水,用CELL-

DYN1700型血球计数仪进行血小板计数及血小板平均体积的计算。血小板细胞内海藻糖用 80% 的甲醇萃取,即将 1 ml 血小板悬液与 4 ml 甲醇混合,严格密封试管后将混合物在 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中孵化 1 h ,海藻糖进入上清液, 480 g 离心 10 min 收集上清液,并将其置于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴蒸发 12 h ,将干燥残余溶解在 3 ml 蒸馏水中。同时,测量 1 ml 未加孵化液的血小板溶液含糖量,并将该值扣除,从而排除血小板自身内部的含糖的影响。根据Umbreit等^[9]提出的蒽酮硫酸法,利用722型分光光度计进行海藻糖的定量测定。

血小板内海藻糖浓度的计算方法如下:假设血小板内细胞液占血小板总体积的 50% ^[9],根据待测液中海藻糖的浓度和被测血小板的总体积,由下式计算血小板内海藻糖的浓度:

$$C = \frac{AX/M}{vNV/2}$$

C: 血小板内海藻糖的浓度, mmol/L ;

A: 待测液体积, $A=3 \text{ ml}$;

X: 由海藻糖标准曲线得到的待测液中海藻糖的浓度, $\mu\text{g/ml}$;

M: 海藻糖分子量, g/mol ;

v: 测细胞内海藻糖浓度所取的血小板悬液的体积, $v=1 \text{ ml}$;

N: 由血球计数仪得到的血小板浓度, 个/ L ;

V: 由血球计数仪得到的血小板平均体积 fl 。

1.7 血小板形态检测

用Nikon TE2000-U型光学显微镜观察经超声波法载入海藻糖后的血小板形态,如图3和图4,发现超声波辐射法载入海藻糖后的血小板保持形态完好,与新鲜血小板形态几乎无差别。这表明超声波辐射对血小板细胞伤害极小,利用超声波法将冻干保护剂海藻糖载入血小板不造成细胞破坏。

1.8 数据统计及误差分析

将多次重复实验并计算得到的细胞内海藻糖含量(mmol)数据按 t 检验^[10]准则剔除粗大误差,取显著度 $\alpha=0.05$,结果见表1。对其进行两个样本方差的同质性 F 检验和成组数据平均数比较的假设检验^[11]分析,得出实验结论。

2 结果与讨论

根据以上检验分析,在所研究的范围内,超声波辐射强度 $I=0.8 \text{ W/cm}^2$ 时海藻糖载入血小板的效果普遍比其他强度下好,在此基础上,超声波辐射的时间

表1 超声孵化与不加超声孵化后血小板内海藻糖含量比较($\bar{x}\pm s$, $n\geq 3$)

辐射强度	辐射 15 min	辐射 30 min	辐射 1 h	辐射 2 h
I=0.4 W/cm ²	12.48±3.67	11.70±4.93	11.15±5.09	10.79±3.91
I=0.8 W/cm ²	16.73±5.64	16.10±4.77	17.40±2.90	19.11±9.60
I=1.2 W/cm ²	13.15±4.04	13.13±2.91	13.40±7.86	16.44±7.97
对照组(未加超声)	11.27±2.53			

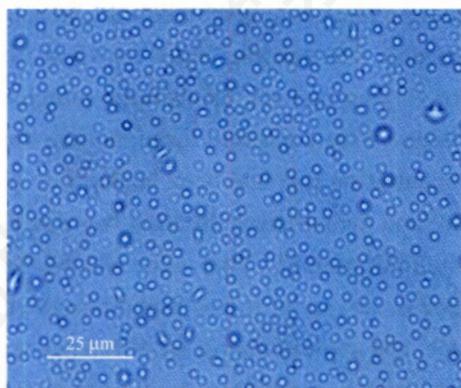
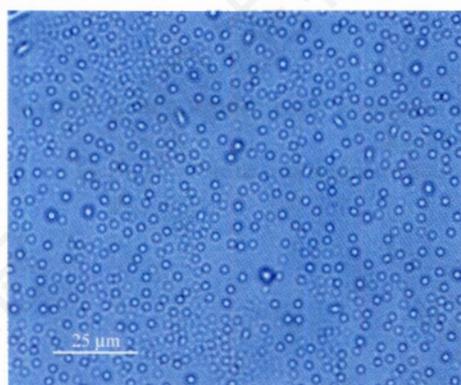


图3 经 37 °C 孵化 4 h 的血小板

图4 经 37 °C 孵化 4 h, 其间 0.8 W/cm² 超声 30 min 的血小板

为 30 min 和 1 h 的实验数据与直接孵化组对照具有生物统计学显著性差异, 且辐射时间 1 h 时的海藻糖载入量最大, 为(17.40±2.90) mmol/L。由光学显微镜图像显示, 经 2 h 超声孵化后的细胞已破坏, 因此,

经 2 h 超声孵化后(19.11±9.60) mmol/L 的数据实际上已没有意义。

普遍观点认为, 超声波的生物效应中最重要的就是超声空化效应^[12]。气穴的形成和破裂是超声波影响细胞膜渗透性的主要原因。超声波的空化作用可能导致空泡周围细胞的质膜击穿或透性改变, 这种改变如果可逆, 细胞自身能修复膜的破损, 便能提高细胞膜的通透性, 且不影响细胞的生物活性。而本研究将超声辐射时间延长为 2 h 时, 经此孵化后的细胞在光学显微镜下观察发现血小板已破碎, 可见, 超声波对细胞膜渗透性的影响作用是在一定条件范围内的。

我们实验表明: 在超声波的作用下, 血小板细胞膜的渗透性能发生改变, 利用这一改变能加速将海藻糖等非渗透性保护剂载入血小板细胞内部。

参考文献(References)

- [1] Crowe JH *et al. Cryobiology*, 2001, **43**: 89
- [2] Rindler V *et al. Cryobiology*, 1999, **38**: 2
- [3] Wolkers WF *et al. Cryobiology*, 2001, **42**: 79
- [4] Fuller BJ *et al. Life in the Frozen State*, Boca Raton, London, New York, Washington DC: CRC Press, 2004: 581
- [5] Lota MJ *et al. Arch Phys Med Rehabil*, 1955, **36**: 282
- [6] Tang H *et al. J Pharm Sci*, 2001, **90**: 545
- [7] Sundaram J *et al. Biophys J*, 2003, **84**: 3087
- [8] Umbreit WW *et al. Manometric and Biochemical Techniques*, 5th ed., Edina, MN: Burgess Publishing Company, 1972, 262
- [9] Oliver AE *et al. Cell Preserv Technol*, 2004, **2**: 35
- [10] 梁晋文等. *误差理论与数据处理(修订版)*, 北京: 中国计量出版社, 2001
- [11] 李春喜. *生物统计学*, 北京: 科学出版社, 2000
- [12] Lawrie A *et al. Gene Ther*, 2000, **7**: 2023

Loading Trehalose into Platelets by Ultrasound

Shao-Zhi Zhang¹, Fa-Ming Zhu², Ju-Li Fan¹, Dan-Hong Wu¹, Guang-Ming Chen^{1*}

¹*Cryobiology Laboratory, Institute of Refrigeration and Cryogenics, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;*

²*Blood Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310006, China)*

Abstract To investigate the influence of ultrasound on loading trehalose into human platelets, human platelets at concentration of about 1×10^9 cells/ml were hatched in solution that contained 50 mmol/L trehalose, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L EGTA and 10 mmol/L imidazole. The hatching lasted for 4 h at 37 °C. 800 kHz ultrasound with several intensities was added on the samples for varying periods. The platelet sample hatched without ultrasound was chosen as the reference. The quantities of sugar were measured through vitriol-authrone method with spectrophotometer and used to calculate trehalose concentration that had been loaded into platelets. Results demonstrated that when the ultrasound intensity $I=0.8 \text{ W/cm}^2$ and the radiation duration was one hour, the trehalose concentration loaded into platelets was the highest, $(17.40 \pm 2.90) \text{ mmol/L}$. This value was 54.3% higher than the reference group, $(11.27 \pm 2.53) \text{ mmol/L}$. Through microscope observation, it was found that the platelets after loading trehalose with ultrasound kept integrity and normal shape, and showed almost no difference with fresh platelets. Appropriate ultrasound radiation can effectively enhance the loading of trehalose into human platelets, and fundamental conditions for further research on freeze-drying of platelets.

Key words platelets; ultrasound; trehalose; fluid-phase endocytosis

Received: August 13, 2007 Accepted: October 11, 2007

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Health Ministry of China (No.WKJ2005-2-037), the Returnee Foundation of China and the Returnee Foundation of Zhejiang Province (Shao-Zhi Zhang)

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