

# 电渗透法载入海藻糖可以提高红细胞冻干效果

周新丽\* 刘建峰 袁 骥 周国燕

(上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093)

**摘要** 冷冻干燥法是保存红细胞的新方法, 具有常温下长期保存、便于运输等优势。目前红细胞的冻干回收率较低, 研究表明将海藻糖载入细胞内可以提高细胞冻干的回收率。本文首先采用电渗透法将海藻糖载入红细胞, 细胞内海藻糖浓度达到 $(63.68 \pm 2.14)$  mmol/L。然后将载入海藻糖的红细胞冻干、复水, 冻干复水后红细胞平均数目回收率达到 $(65.9 \pm 2.3)\%$ , 扫描电镜观察显示复水后的红细胞保持了完整的细胞形态。这些数据表明利用电渗透法载入海藻糖后将红细胞冻干, 可以提高红细胞冻干后的回收率。

**关键词** 电渗透; 红细胞; 冷冻干燥; 海藻糖

冷冻干燥法是一种新的红细胞保存方法, 与常规的 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 深低温保存方法相比, 冻干的红细胞能在室温下长期保存且使用时复水容易, 大大减少了储存、运输、细胞处理过程中的困难。近年来, 利用冷冻干燥法保存红细胞已经成为低温生物学的研究热点之一。但是, 该方法至今无法解决冻干过程中红细胞膜破损、血红蛋白外漏、溶血率较高的难题。

生物学家发现在自然界中, 很多生物体在完全脱水条件下仍然能够存活, 是由于它们体内聚集了高浓度的海藻糖(约占20%的干物质), 海藻糖对于在干燥条件下保护生物材料表现得特别有效。目前, 海藻糖已被广泛应用于生物材料的冻干保存领域, 如精子<sup>[1]</sup>、血小板<sup>[2]</sup>、组织和器官等的冻干保存。但是海藻糖为非渗透性的二糖, 无法自由进入细胞内部起到应有的保护作用, 将海藻糖载入红细胞内部并达到一定的浓度, 是成功冷冻干燥保存红细胞的关键问题。文献报道的海藻糖载入方法主要有热孵化法、微注射法、成孔蛋白法、基因修改法<sup>[3]</sup>等, 尽管这些方法都在一定程度上提高了细胞内海藻糖的浓度, 但是由于细胞特异性、操作繁琐、载入效率低等限制条件, 这些方法不适用于大批量地将海藻糖载入红细胞并进行冻干保存。

电渗透法作为一种物理作用, 可以将外源性的物质载入细胞内, 具有操作简单、损伤小、载入效果明显的特点<sup>[4]</sup>。此方法已经在遗传物质的转移和DNA的导入、细胞的电融合、膜蛋白的电嵌入等领域得到广泛的应用<sup>[5]</sup>。其基本原理是在短时间内外加高强度的场脉冲(脉动电场), 产生可逆的细胞膜

电击穿, 使细胞膜渗透性暂时增加, 使外源性的物质进入细胞内。

目前, 国内外科科研人员有利用高渗法将海藻糖载入红细胞的研究, 有用电渗透法将海藻糖载入其他类型细胞的研究, 但是关于电渗透法将海藻糖载入红细胞并进行冻干的研究还未见报道。本文首先尝试用电渗透方法将海藻糖载入红细胞内, 测定电渗透参数对红细胞内海藻糖浓度的影响; 然后将载有海藻糖的红细胞冻干、复水, 测定复水后的红细胞个数(RBC)的回收率, 利用扫描电镜观察复水后红细胞的形态; 探索采用电渗透技术强化海藻糖载入红细胞, 并将红细胞冻干这一综合技术的可行性和有效性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Megafuge 2.0型离心机(贺力氏, 德国), BC 2800血细胞分析仪(迈瑞生物医疗电子股份有限公司, 中国), Advantage 2.0型冰冻干燥机(Virtis, 美国)。S-520扫描电镜(Hitachi, 日本)。

电渗透溶液的配制: 用双蒸水配制KCl浓度为5 mmol/L、海藻糖浓度分别为800 mmol/L、600 mmol/L、290 mmol/L的电渗透溶液。冻干保护液的配制: 用双蒸水配制组成为24 mmol/L葡萄糖、0.43 mmol/L腺嘌呤、33 mmol/L NaCl、8.9 mmol/L甘露醇、6.6 mmol/L KCl、15%葡聚糖、2.5%牛血清白蛋白、3%柠檬酸钠的冻干保护剂。复水液的

收稿日期: 2009-03-12 接受日期: 2009-06-24

上海市晨光计划资助项目(No.2008CG54)

\* 通讯作者。Tel: 021-55271167, E-mail: zjulily@163.com

配制: 用双蒸水配制组成为 141 mmol/L 海藻糖、5 mmol/L 抗坏血酸、38.5 mmol/L NaCl、0.265 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.4 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、12.5% 葡聚糖、1.9% 牛血清白蛋白、90 mmol/L KCl、100 mmol/L 肌苷、5 mmol/L 腺嘌呤的复水溶液。

### 1.2 红细胞的制备

新鲜血液由长海医院输血科提供, 2 500 r/min 离心 5 min, 弃去血浆及白膜, 收集红细胞。将红细胞用等渗 PBS (pH=7.4) 溶液洗涤, 以 2 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 反复 3 次备用。将洗涤红细胞与 3 种配制好的电渗透溶液按照体积比 1:1.5 混合均匀, 得到待渗透的红细胞溶液, 压积(HCT)约为 35%。

### 1.3 电渗透载入海藻糖

分别取电压 300 V、200 V、100 V, 脉宽 1 ms、100  $\mu\text{s}$ 、10  $\mu\text{s}$ , 频率 4 次/1 min、4 次/4 min、4 次/15 min, 胞外海藻糖浓度 800 mmol/L、600 mmol/L、290 mmol/L, 四因素三水平进行电渗透实验, 正交实验设计如表 1 所示。取待渗透的红细胞悬液 400  $\mu\text{l}$  放入电击杯, 将电击杯放入操作池中, 在不同参数下进行电脉冲。之后将电击杯内的溶液取出, 放入 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中温育 1 h。向电渗透后的细胞中加入等渗 PBS (pH=7.4) 以 2 500 r/min 离心 5 min, 去上清液, 如此洗涤 3 次。用血细胞分析仪对洗涤后的红细胞溶液进行 RBC 计数和细胞体积测定。

### 1.4 细胞内海藻糖的提取和浓度测定

洗涤后的红细胞加入 10% 三氯乙酸混合均匀, 密封试管并在 80  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中加热 1 h, 使胞内海藻糖充分溶解到溶液中, 再以 3 500 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 按此方法提取 3 次, 将 3 次提取的上清液收集在一起测定海藻糖浓度。

海藻糖浓度的测定采用硫酸蒽酮法, 取三氯乙酸提取的 1 ml 待测液, 加入 4 ml 蒽酮含量为 0.2% 的硫酸蒽酮溶液, 冰水浴中摇匀、冷却, 然后放入沸水精确煮沸 10 min, 随后立即放入冰水浴 10 min。在 625 nm 处以标准曲线的首管作为空白, 测定各待测溶液的吸光度, 按照文献<sup>[6]</sup>的计算公式计算出红细胞内海藻糖的浓度。

### 1.5 冻干与复水

将冻干保护剂溶液与经过电渗透的红细胞悬液按照体积 4:1 配制成冻干红细胞悬液。取 1 ml 冻干红细胞悬液放入安培瓶中, 将安培瓶放入冷冻干燥机中预冻结, 预冻结的降温速率约为 8 K/min, 冻结

终温为 -60  $^{\circ}\text{C}$ , 在此温度下保持 2 h; 一次干燥样品温度为 -45  $^{\circ}\text{C}$ , 真空度 1 Pa, 持续 15 h; 二次干燥样品温度 15  $^{\circ}\text{C}$ , 真空度 1 Pa, 持续 10 h。冻干过程结束后, 将样品取出密封保存。复水时, 在冻干样品中加入 2 ml 复水溶液, 轻轻振荡直到样品完全溶解于复水溶液中。

### 1.6 扫描电镜

将冻干复水后的红细胞用 1.5% 戊二醛溶液按 1:9 (V/V) 混合, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗 3 次, 每次 15 min, 后用 1% 锇酸固定 2 h; 然后在浓度为 50%、70%、80%、90% 和 95% 乙醇溶液中各脱水 15 min, 用 100% 乙醇处理两次共 40 min。最后用乙醇与醋酸异戊酯的混合液 (V/V=1/1) 处理 30 min, 并用纯醋酸异戊酯处理样品, 临界点干燥 2 h 后喷金, 结束后用扫描电镜观察细胞形态。

### 1.7 细胞回收率的计算

用血细胞计数仪测定冻干前和复水后的 RBC 数量, RBC 回收率  $R_f$  的计算公式如下:

$$R_f(\%) = \frac{R_1}{R_0} \times 100\%$$

式中:  $R_0$ 、 $R_1$  分别为冻干处理前、后红细胞个数。

### 1.8 统计分析

所得数据用数据分析软件 origin 7.0 进行统计分析, 所有的实验数据重复 3 次, 以平均数  $\pm$  标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 电渗透载入海藻糖的浓度

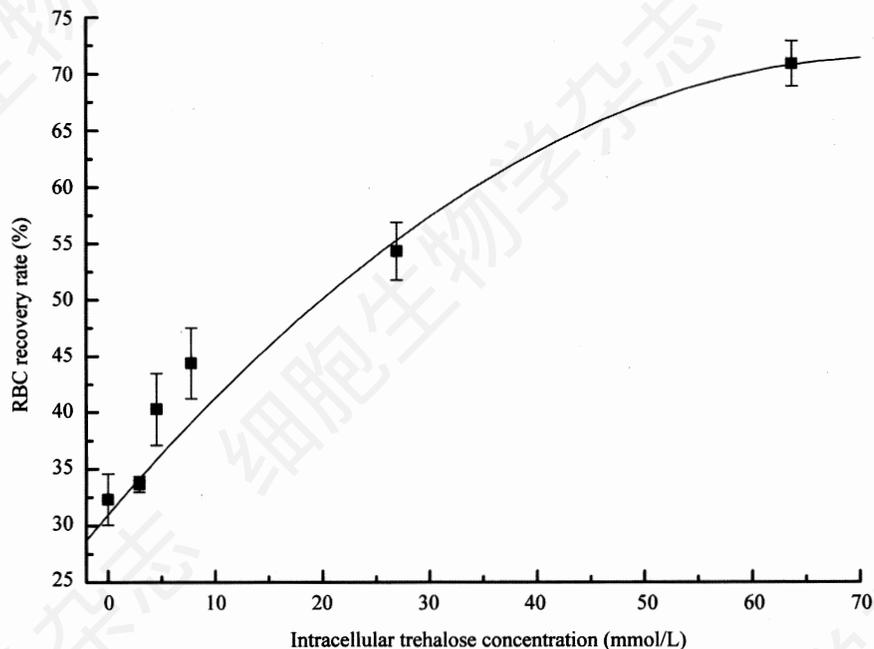
在电压分别是 300 V、200 V、100 V, 脉宽为 1 ms、100  $\mu\text{s}$ 、10  $\mu\text{s}$ , 频率为 4 次/1 min、4 次/4 min、4 次/15 min, 胞外海藻糖浓度为 800 mmol/L、600 mmol/L、290 mmol/L 条件下进行电渗透正交实验, 得到细胞内的海藻糖浓度如表 1 所示。

从表 1 中可以看出, 细胞内海藻糖浓度的最大值达到 (63.68 $\pm$ 2.14) mmol/L, 此时的条件为电压 300 V、脉宽 1 ms、频率 4 次/1 min, 胞外海藻糖浓度为 800 mmol/L。细胞外海藻糖浓度 800 mmol/L 的实验组, 载入效果要明显好于其他组 ( $P < 0.05$ )。此外, 由正交实验表的极差(均值 K1、均值 K2、均值 K3 之间的绝对值之差)可以看出, 胞外海藻糖浓度对载入效果的影响高于电渗透的电压、脉宽、频率这 3 个电渗透参数。

### 2.2 冻干红细胞的回收率

**Table1 The orthogonal analysis of loading trehalose into RBC by electroporation**

	Extracellular trehalose concentration (mmol/L)	Voltage (V)	Width (ms)	Frequency (min/4 pulses)	Intracellular trehalose concentration (mmol/L)
1	800	300	1	1	63.68±2.14
2	800	200	0.1	4	26.92±1.86
3	800	100	0.01	15	12.42±1.98
4	600	300	0.1	15	4.53±1.02
5	600	200	0.01	1	5.90±0.97
6	600	100	1	4	2.94±0.87
7	290	300	0.01	4	5.97±0.54
8	290	200	1	15	7.78±1.14
9	290	100	0.1	1	7.55±1.48
Mean K <sub>1</sub>	34.340	24.727	24.800	25.710	
Mean K <sub>2</sub>	4.457	13.533	13.000	11.943	
Mean K <sub>3</sub>	7.100	7.637	8.097	8.243	

**Fig.1 Recovery rates of freeze-dried RBC at different intracellular trehalose concentrations**

将正交实验中细胞内海藻糖浓度有显著差异的1、2、4、6、8号样品和没有载入海藻糖的样品(浓度为0),按照冻干过程中提到的程序进行冻干、复水,并测定复水后红细胞的RBC回收率,图1为红细胞回收率与细胞内海藻糖浓度的关系。

由图1可以看出,通过电渗透方法载入海藻糖后,随着细胞内海藻糖浓度的增加,红细胞的RBC回收率呈明显增加的趋势,当细胞内的海藻糖浓度达到(63.68±2.14) mmol/L时,红细胞RBC的回收率达到(68.9±2.3)%,比本实验中没有电渗透载糖的回收率(32.4±2.1)%提高了36.5%。

### 2.3 冻干复水后红细胞的扫描电镜观察

将正交实验设计表中的1号样品进行电渗透实验,然后将其冻干、复水,复水后红细胞的扫描电镜照片如图2所示。

从图2中可以看出,载入海藻糖并冻干复水后的红细胞,处于由冻干保护剂和复水保护剂组成的聚合物网状结构中(图2a、图2b、图2c),这些保护剂的存在减缓了冻干和复水等过程中引起的剧烈应力变化。经电渗透载入海藻糖,并冻干复水后的红细胞保持了完整的细胞形态,与正常的红细胞相似,呈现两面凹的圆饼状(图2b、图2c),但也有少量的细

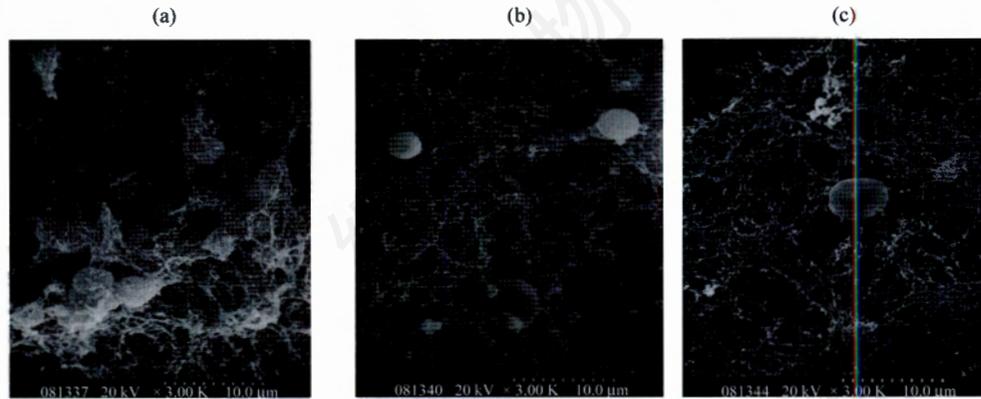


Fig.2 Scanning electron microscopy of freeze-dried and rehydrated RBC (3 000×)

a: round shape; b, c: biconcave shape.

胞有膨胀的趋势略呈球形(图 2a)。

### 3 讨论

随着对冻干机制研究的深入,研究者发现在干燥情况下,糖类可以调节渗透压,有助于维持生物细胞膜的完整性和蛋白质的稳定性。当细胞内缺少这些糖类时,冻干过程中蛋白质将失去活性,其中海藻糖的保护效果最为显著<sup>[7]</sup>。Leslie 等<sup>[8]</sup>报道,在海藻糖存在的条件下冰冻干燥保存细菌可以获得较高的存活率。Wolkers 等<sup>[2]</sup>将海藻糖载入血小板,冻干复水后回收率高于 85%。

但是,细胞膜对于海藻糖是不可渗透的,即海藻糖不能在渗透压的作用下自由进出细胞,需要采用特殊的技术。文献报道的海藻糖载入方法主要有:利用内吞作用将海藻糖引入人间充质干细胞和血小板<sup>[9]</sup>; Satpathy 等<sup>[10]</sup>采用热孵化法将海藻糖载入红细胞内;何晖等<sup>[6]</sup>利用热孵化法进行红细胞载糖的实验,当细胞外的海藻糖浓度为 1 000 mmol/L 时,载入了 35 mmol/L 海藻糖。但是上述方法存在细胞特异性、载量不高、操作复杂、得到的样品量较少等缺点。

细胞电渗透的研究始于 20 世纪 70 年代,1979 年首次实现了细胞的电融合,1982 年又成功地应用于导入质粒,实现细胞的转化。细胞电渗透的主要特点在于它是一种物理技术,具有普适性,可用于动物、植物和微生物等各类细胞;而且还具有效率高、参数容易控制等特点。本文提出利用电渗透的方法将海藻糖载入细胞内,在细胞外海藻糖浓度为 800 mmol/L、电压为 300 V、脉宽为 1 ms 时,海藻糖载量为(63.68±2.14) mmol/L。Satpathy 等<sup>[10]</sup>在同海藻糖浓度下采用热孵化法孵化 7 h,红细胞内的海

藻糖浓度为 35 mmol/L。电渗透法比热孵化法细胞内的海藻糖浓度提高了 28.7 mmol/L,且耗时较短。经电渗透法载入海藻糖后,将红细胞冻干,冻干复水后 RBC 的回收率达到(65.9±2.3)%,比本实验中没有电渗透载糖的回收率(32.4±2.1)%提高了 36.5%,而比同样为 800 mmol/L 的细胞外海藻糖浓度的热孵化法载糖后冻干的回收率 55%<sup>[11]</sup>提高了 10%。并且由扫描电镜的形态观察可以看出,用电渗透方法载入了海藻糖的红细胞,在冻干复水后保持了完整的细胞形态,与正常的红细胞相似。这些结果表明,通过电渗透法得到细胞内海藻糖载量比目前载糖效率较高的热孵化法得到细胞内海藻糖载量 35 mmol/L 高,而细胞内海藻糖浓度提高能够进一步提高红细胞的冻干回复率,从而证明了细胞内海藻糖在冻干红细胞中的作用。

由上面的结论可以看出,采用电渗透技术强化海藻糖载入红细胞并将红细胞冻干的综合技术,与目前报道的其他红细胞冻干方法相比,冻干后红细胞的回收率得到了提高。将电渗透方法应用于红细胞的冻干保存中是红细胞冻干保存中一个创新,具有可行性和有效性。

### 参考文献(References)

- [1] 舒志全,张浩波,张宁,等.海藻糖和蛋黄在人类精子冻干保存中的保护作用,《中国生物医学工程学报》,2007,26(1): 121-125
- [2] Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, et al. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying, *Cryobiology*, 2001, 42 (2): 79-87
- [3] Acker JP, Chen T, Fowler A, et al. Engineering desiccation tolerance in mammalian cells: tools and techniques, In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, eds. *Life in the Frozen State*, Boca

- Raton, FL: CRC Press, 2004, 563-580
- [4] Zimmermann U, Friedrich U, Mussauer H, *et al.* Electromanipulation of mammalian cells: fundamentals and application, *IEEE Trans Plasma Sci*, 2000, 28(1):72-82
- [5] 汪和陆, 谢廷栋. 细胞电穿孔电融合刺激原理技术及应用, 天津: 天津科学技术出版, 2000
- [6] 何 晖, 刘宝林, 华泽钊, 等. 胞内海藻糖对红细胞冷冻干燥保存效果的影响, *制冷学报*, 2006, 27(3): 41-44
- [7] Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, *et al.* The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state, *Cryobiology*, 2001, 43(2): 89-105
- [8] Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, *et al.* Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying, *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(10): 3592-3597
- [9] Oliver AE, Jamil K, Crowe JH, *et al.* Loading human mesenchymal stem cells with trehalose by fluid-phase endocytosis, *Cell Preserv Technol*, 2004, 2(1): 35-49
- [10] Satpathy GR, Török Z, Bali R, *et al.* Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization, *Cryobiology*, 2004, 49(2):123-136
- [11] Török Z, Satpathy GR, Banerjee M, *et al.* Preservation of trehalose-loaded red blood cells by lyophilization, *Cell Preserv Technol*, 2005, 3(2): 96-111

## Loading Trehalose by Electroporation Increased the Survival of Freeze-dried Red Blood Cells

Xin-Li Zhou\*, Jian-Feng Liu, Ji Yuan, Guo-Yan Zhou

(Institute of Biothermal Science, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract** Freeze-drying is an ideal alternative for preservation of red blood cells, due to its advantages of room temperature storage, lower weight for transportation. However, the recovery rate of freeze-dried red blood cells is low until now. It has been reported that intracellular trehalose is beneficial for freeze-drying of cells. In this investigation, trehalose was loaded into red blood cells by electroporation first, intracellular trehalose concentration reached  $(63.68 \pm 2.14)$  mmol/L. Then trehalose-loaded red blood cells were freeze-dried and rehydrated, the recovery rate of red blood cells reached  $(65.9 \pm 2.3)\%$ . Scanning electron microscopy showed the morphology of freeze-dried and rehydrated red blood cells were intact and similar to the fresh ones. These results indicated loading trehalose by electroporation before freeze-drying could increase the recovery rate of freeze-dried red blood cells.

**Key words** electroporation; red blood cell; freeze-drying; trehalose

Received: March 12, 2009 Accepted: June 24, 2009

This work was supported by the Chengguang Plan of Shanghai (No.2008CG54)

\*Corresponding author. Tel: 86-021-55271167, E-mail: zjulily@163.com