

差示扫描量热法在红细胞研究中的应用

袁 骥 周新丽* 王海松

(上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093)

摘要 差示扫描量热法(DSC)是在程序控制温度下, 测量试样和参比物能量差随温度(时间)的变化关系的一种技术。它通过捕捉细胞升降温过程中的吸放热现象, 利用热学参数(焓变、比热、相变温度)来表征其间细胞结构的变化情况。量热方法与结构分析方法相结合, 有助于深入剖析细胞的生理变化。本文从预测低温保存过程中最佳降温速度及分析细胞膜损伤机理两方面探讨差示扫描量热法在红细胞研究中的应用。

关键词 差示扫描量热法; 红细胞; 最佳冷冻速度; 细胞膜损伤

红细胞是血液中数量最多的一种血细胞, 成熟红细胞内含有大量的血红蛋白, 能供给全身组织和细胞所需的 O_2 , 带走所产生的部分 CO_2 。随着现代临床医学对红细胞需求的增多, 关于红细胞的保存技术和红细胞疾病的研究也日益深入, 一些关键问题, 如红细胞膜的组成、老化损伤机理等, 亟待解答。现在普遍采用光谱分析法鉴定红细胞的组分, 例如紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、红外光谱法(IR)、分子荧光光谱法(MFS), 但是完整细胞结构复杂、光散射率高, 会影响其分析的准确性。

差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)是在程序控制温度下, 测量试样和参比物能量差随温度(时间)的变化关系的一种技术^[1]。DSC 热分析法从热学角度解决了上述问题, 通过捕捉细胞升降温过程中的吸放热现象, 利用热学参数(焓变、比热、相变温度)来表征其间细胞结构的变化情况。量热方法与结构分析方法相结合, 有助于深入剖析细胞生理变化, 并可推广成为疾病诊断手段付诸于临床治疗中去。本文将从预测低温保存过程中最佳降温速度及分析细胞膜损伤机理两方面探讨差示扫描量热法在红细胞研究中的应用。

1 预测最佳降温速度

低温保存是延长细胞保存期限的一种基本技术, 但是低温保存对细胞膜的力学性质及相稳定性的破坏是无法避免的。为了减少细胞膜在降温过程中受到的溶质损伤及胞内冰损伤, 研究人员通常采用不同的保存液配方, 在不同降温速度下, 通过多次重复试验和繁琐的生化指标检测, 筛选出效果最佳的冷冻方案。而 DSC 热分析技术恰恰能摆脱这一模式, 借助

细胞降温过程中的放热量评估细胞在固定低温保护剂(cpa)中的体积变化, 依托水分迁移模型理论进行推算, 获得合适的降温速度范围, 使原本工作量大为降低。

在确定细胞悬液放热量与细胞体积间关系前需要作出以下假设^[2]: (1)慢速冷冻不出现胞内冰现象; (2)冷冻时, 胞内水分扩散至细胞外立即结冰; (3)细胞悬液内所有组分(包括溶液和细胞本身)具有相等的密度。随后即可使用 DSC 捕捉单位质量细胞悬液从某个起始温度冷冻至任意终结温度 T 时的放热量 $q(T)_{ec+cw}$ 。如式[1]所示, 这一热量值由两部分组成, 即从细胞内扩散至胞外的这一部分水及原本胞外悬液在冷冻时产生的热量之和。

$$q(T)_{ec+cw} = \alpha \left[\frac{V_0 - V(T)}{V_0} \right] g \Delta H_f + (1 - \alpha) g q(T)_{ec} \quad [1]$$

其中, α 是细胞悬液的压积; V_0 是初始温度下的等渗细胞体积; $V(T)$ 是温度降至 T 时的细胞体积; ΔH_f 是单位质量纯冰的融解热; $q(T)_{ec}$ 是细胞外悬浮液在温度降至 T 时的放热量(不包括细胞内的水扩散至细胞外后结冰产生的热量释放)。

随后将细胞全部灭活, 重现先前降温方案并测定其放热量 $q_{ec+cw+cd}$, 并与 $q(T)_{ec+cw}$ 相比较得到 $\Delta q(T)_{dsc}$, 即

$$\Delta q(T)_{dsc} = \left(\alpha \left[\frac{V_0 - V(T)}{V_0} \right] g \Delta H_f + [1 - \alpha] g q(T)_{ec} \right) - q(T)_{ec+cw+cd} \quad [2]$$

图 1 完整记录下细胞悬液及失活细胞溶液在同一 DSC 降温条件下的热流曲线, 曲线交叠部分形成

收稿日期: 2009-12-14 接受日期: 2010-08-26

上海市晨光计划(No.2008CG54), 国家自然科学基金(No.50906057)和上海市重点学科(No.S30503)资助项目

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

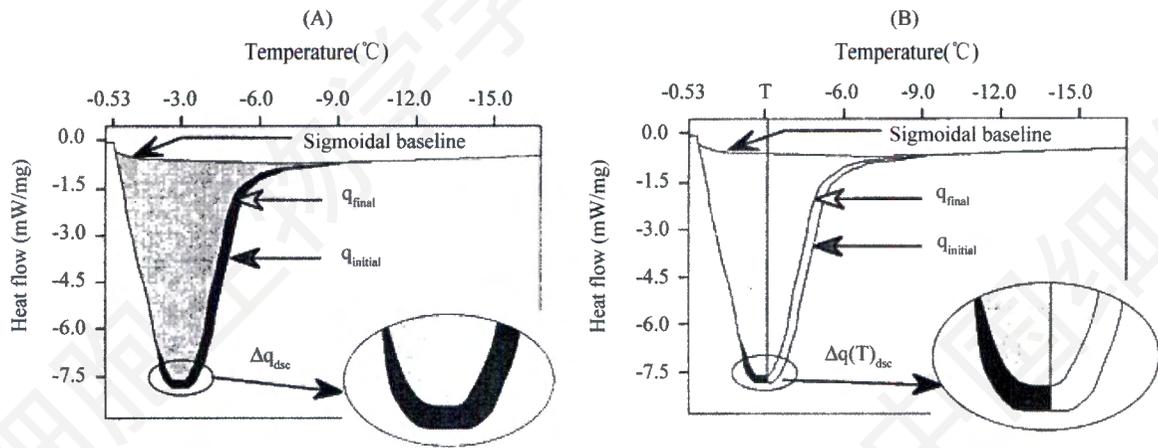


Fig.1 Heat flow thermograms obtained between the initial and final steps of the DSC cooling protocol for equine sperm at the rate of 5°C/min in the Kenney extender^[3]

A: total difference between the two cooling runs; B: fractional difference between the two cooling runs down to a subzero temperature (T).

热量差 Δq_{dsc} ，并对某一温度 T 的热量差进行局部积分，即得 $\Delta q(T)_{dsc}$ 。实验前已知细胞压积 α ，便可对式[2]进行重排整理，即能掌握溶液降温到任意温度下细胞体积变化动态(如式[3]所示)，其中 V_b 是细胞非渗透性体积。

$$V(T) = V_0 - \frac{\Delta q(T)_{dsc}}{\Delta q_{dsc}} (V_0 - V_b) \quad [3]$$

将细胞体积变化情况代入 Mazur^[4] 描述冷冻过程中细胞体积变化的数学模型中(式[4], [5])，求解出 $L_{pg}[\text{cpa}]$ 及 $E_{Lp}[\text{cpa}]$ ，随后模拟细胞不同降温速度下的水分流失状况，再根据最佳降温速度的推荐指标(即细胞液温度降至 -30°C 时，胞内细胞液含量占初始细胞液总量的 5%) 确定最佳降温速度的理论值。

$$\frac{dV}{dT} = -\frac{L_p A_c R T}{B} (C_i - C_o) \quad [4]$$

$$L_p = L_{pg} [\text{cpa}] \exp \left[-\frac{E_{Lp} [\text{cpa}]}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right] \quad [5]$$

其中， V 是细胞体积， T 是绝对温度， $L_{pg}[\text{cpa}]$ 是细胞膜在参考温度 ($T_R = 273.15 \text{ K}$) 下的渗透率， $E_{Lp}[\text{cpa}]$ 是这一渗透过程的表现活化能， R 是气体常数， B 是恒定降温速度， A_c 是水分转运的细胞膜有效面积， C_i 及 C_o 分别表示细胞内外溶液浓度。

该方法借助细胞悬液放热量与胞内水分变化之间的联系，理论推算出最佳降温速度，目前研究人员主要对各种动物细胞进行了相关研究，并取得了良好效果(表 1)^[2,3,5-12]。DSC 热分析法同样可以推广到结

Table 1 Summary of the selected studies on the predicted subzero membrane permeability parameters and the optimal rates of freezing for sperm cells

Experimental system	Freezing media	$L_{pg}(\mu\text{m}/\text{min}\cdot\text{atm})$	$E_{Lp}(\text{kcal}/\text{mol})$	Predicted optimal cool rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
Equine	Kenney extender	0.0200	32.7	29.0
	Lactose-EDTA extender	0.0080	12.1	60.0
Xiphophorus maculatus	HBSS	0.0093	29.0	28.0
	14% glycerol	0.0050	9.8	47.0
	10% DMSO	0.0060	16.1	36.0
White bass	Ca-free HBSS	0.0080	31.4	21.4
	5% DMSO	0.0040	20.6	22.0
Rhesus monkey	Egg yolk diluent	0.0025	16.4	29.0
	6% glycerol	0.0023	10.6	29.0
Bovine	Egg yolk-based Tris extender	0.0380	41.1	52.0
	6% glycerol	0.0210	27.8	56.0

Note that all values have a goodness of fit parameter of $R^2 \geq 0.96$.

构相对简单的红细胞中去, 确定不同保存液中红细胞的 最佳降温速度范围, 这不但能够大大减轻工作量, 而且还可从机理上深入探究生物材料的低温应激反应, 显著提高冷冻红细胞的存活率, 缓解临床使用中容易出现 的血量、配型缺口。

2 分析细胞膜损伤机理

在用差示扫描量热法得到的热流图谱上, 相变峰 最高点所对应的温度为相变温度, 相变曲线之下所包 围的面积积分为相变焓(图 2)。记录细胞膜在升温过 程中的热流曲线, 通过分析曲线上相变温度和相变焓 的变化, 可以直接或间接地推断细胞膜的结构变化。

2.1 分析红细胞膜膜脂的结构变化

研究者通常利用二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC) 及二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)模拟红细胞膜内外 层膜脂的结构, 借助扫描电镜检查或 X 光衍射技术 从分子层面上分析不同药物、化学物质对红细胞膜 膜脂结构的影响^[13,14], DSC 热分析技术则可借助热学 参数变化来分析红细胞膜膜脂结构变化。例如 Suwalsky^[15]采用相同方式模拟红细胞膜膜脂结构, 并用 DSC 记录其在添加砷化物(NaAsO_2)后的热流曲线 变化, 从而剖析砷化物的致病机理。如图 2A 所示, 将 DMPC 在 $10^\circ\text{C}\sim 40^\circ\text{C}$ 范围内进行扫描, 热流曲线显 示未添加砷化物前, DMPC 在 24.3°C 时会由凝胶态转 变为液晶态(焓值为 18.8 kJ/mol), 曲线波形基本对称, 添加不同浓度砷化物后曲线形状未发生显著变化。 如图 2B 所示, 将 DMPE 在 $25^\circ\text{C}\sim 80^\circ\text{C}$ 范围内进行扫 描, 曲线则显示其在 50.2°C 时经历相同的相变过程(焓 值为 26.0 kJ/mol), 砷化物的添加导致其相变波形明 显变宽, 相转变温度几乎呈线性下降, 这表明砷化物

已影响到脂质酰基链协同作用, 高浓度 NaAsO_2 ($\geq 5\text{ mmol/L}$) 会使其热流曲线向低温偏移, 这表示 DMPE 液晶态部分与砷化物会优先结合, 当 NaAsO_2 量达 到最大(20 mmol/L) 时, 曲线上出现一个平台, 这表示此 时 DMPE 相数增多。根据上述热学现象可认为 DMPC 分子间作用力未受砷化物影响; 而 DMPE 出现的变化 不仅与 Hofmeister 效应相关^[16,17], 砷化物减少其首基接 触面积, 降低脂质酰基链间的协同作用, 也是破坏 DMPE 结构的原因。此外, Farkas^[18] 及 Castelli^[19] 借 助相似方式也完成了多环芳烃(PAHs)引起膜脂结构 变化的类似研究。由此可见, 借助相变温度、比热 等热学参数对于研究细胞膜损伤是可行的。

2.2 与其它分析方法结合研究红细胞膜的结构变化

DSC 曲线中的热学现象可以研究细胞膜膜脂及 膜蛋白热学性质, 从而深入探讨化学损伤、疾病等外 在因素对细胞膜的影响。然而, 热学参数单纯是从相 态变化及分子运动为着眼点, 无法从微观角度确切证 实细胞组分发生何种变化, 因此细胞膜热学性质研究 常需要与 SDS-PAGE 电泳技术、荧光检测技术、蛋 白质印迹法等技术结合使用。Hernández-Hernández^[20] 根据焓变值及最大相变温度研究晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者红细胞膜蛋白变化, 其中 A-相变表示收 缩蛋白发生变性; B1-相变证明 2.1 蛋白、4.1 蛋白、 4.2 蛋白及血型糖蛋白发生变性; B2-相变、C-相变 分别对应带 3 蛋白胞浆区及 55 kDa 阴离子转运域热 解旋现象。如表 2 所示, A-相变参数、最大相变温 度基本一致, B1-相变焓变值与正常值相差近 13%, 与 膜组分的热学参数相对照, 发现患者收缩蛋白正常, 但 其血型糖蛋白含量较低。B2-相变、C-相变情况则 证实了病人带 3 蛋白发生变性, 作者利用免疫印迹法

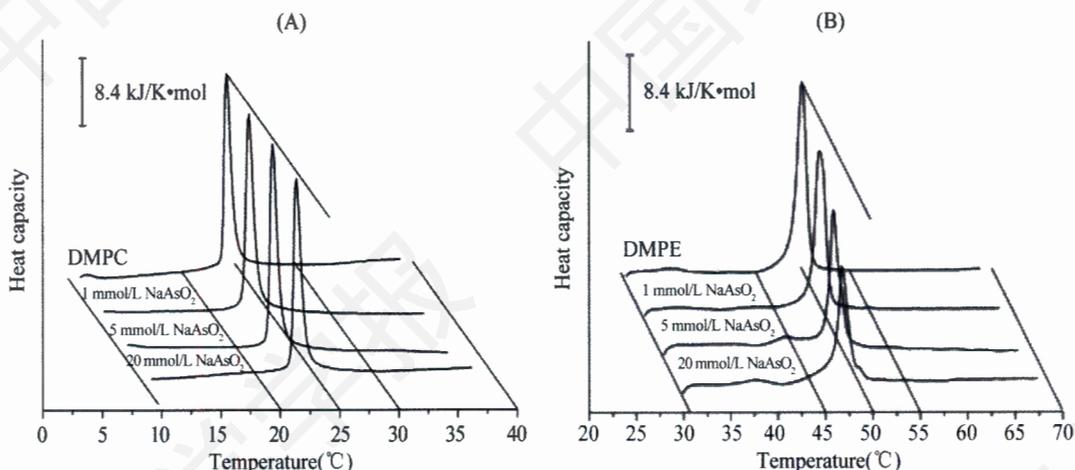


Fig.2 DSC heating curves obtained for multilamellar DMPC (A) and DMPE (B) liposomes with different concentrations of NaAsO_2 at a scanning rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ^[15]

Table 2 Parameters of elemental thermal transitions of erythrocyte ghosts from 6 control subjects (Con) and 6 NSCLC patients (Pat) at pH7.4

Parameters	A		B1		B2		C		D	
	Con	Pat								
T _m (°C)	50.4	50.3	56.1	55.1	64.1	63.5	67.1	66.4	80.9	81.1
ΔH (cal/g)	0.57	0.57	0.55	0.48	0.31	0.28	0.52	0.48	0.15	0.14

A: spectrin complex denaturation; B1: bands 2.1, 4.1, 4.2 and glycophorins denaturation; B2: unfolding of the cytoplasmic domain of band 3; C: thermal unfolding of the 55 kDa anion-transporting domain of band 3; D: unknown.

对病人的细胞膜糖蛋白及带3蛋白做了相应检测,结果显示患者的GPAB、GPB、GPC、带3蛋白含量明显下降,证实NSCLC病人的血型糖蛋白、带3蛋白出现异常(图3),其他研究也同样证明带3蛋白的阴离子转运活性与非小细胞肺癌的发生、发展存在一定的关系^[21]。类似的,Akoev^[22]基于氧自由基与膜脂质过氧化及骨架蛋白变性密切相关,将DSC热分析技术与TBARS及SDS-PAGE联合共同解释氧化反应对细胞膜结构影响,结果证实氧化反应会改变收缩蛋白-肌动蛋白-带4.1蛋白、收缩蛋白-带4.2蛋白、收缩蛋白-锚蛋白-带3蛋白的相互作用,多不饱和脂肪酸也同时发生降解,这一结论与其他人的研究成果吻合^[23-26]。DSC热分析法从物性学角度进行分析,有利于加深人们对细胞膜组成结构的了解,这将大力推动红细胞生理学研究及临床治疗。

在不同外界因素下细胞膜的结构变化,很好地补充了结构分析技术在这方面的不足。但是DSC仍存在难点与不足,由于DSC热分析技术通过热学参数(如比热、焓变)来评估试样变化,使用前需要进行精确标定;细胞是由核酸、蛋白质等多组分构成,各成分都会随温度变化发生吸放热现象,借助热学参数变化来掌握细胞结构变化或代谢情况,往往只适用于结构相对简单的细胞,而且DSC是从物性角度上诠释细胞在不同条件下的性状变化,难以从反应机理等理论角度上深层次探讨,往往需要结合其他生化检测技术来加以分析,例如荧光检测、SDS-PAGE、扫描电镜,由此进一步明确细胞成分变化。尽管如此,随着热分析技术不断发展、研究成果不断积累,不难预料差示扫描量热法在红细胞乃至其他生物材料上将有广阔的应用前景,有利于更为深入全面地研究红细胞的生理特性、致畸致病机理。

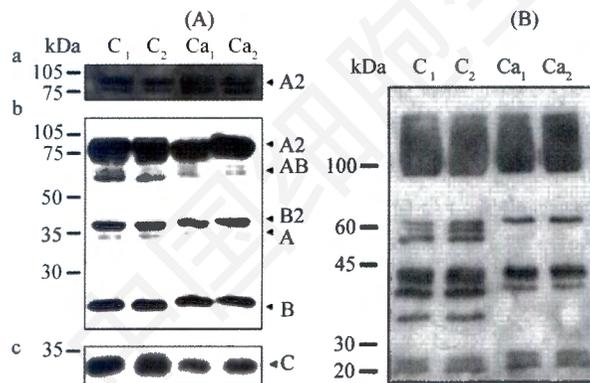


Fig.3 Western blot analysis of RBC membrane glycoproteins (A) and band 3 (B) from two representative NSCLC patients (Ca₁,Ca₂) and two representative controls (C₁,C₂)

A: immunoblots were probed with monoclonal anti-GPA (a), monoclonal anti-GPA and anti-GPB (b) and polyclonal anti-GPC (c) antibodies. Note that: A2, GPA dimer; B2, GPB dimer; AB, GPAB dimer; A, GPA monomer; B, GPB monomer; C, GPC monomer.

3 展望

差示扫描量热技术能够预测红细胞低温保存过程的最优冷却速率,该技术同样能够灵敏捕捉红细胞

参考文献(References)

- 1 童安琪, 何舒民. 冷冻干燥新技术. 北京: 科学出版社, 2006, 214-21.
- 2 Devireddy RV, Raha D, Bischof JC. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. *Cryobiol* 1998; 36(2): 124-55.
- 3 Devireddy RV, Swanlund DJ, Olin T, Vincente W, Troedsson MH, Bischof JC, *et al.* Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol Reprod* 2002; 66(1): 222-31.
- 4 Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247(3 Pt 1): C125-42.
- 5 Devireddy RV, Coad JE, Bischof JC. Microscopic and calorimetric assessment of freezing processes in uterine fibroid tumor tissue. *Cryobiol* 2001; 42(4): 225-43.
- 6 Thirumala S, Ferrer MS, Al-Jarrah A, Eilts BE, Paccamonti DL, Devireddy RV. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiol* 2003; 47(2): 109-24.
- 7 Pinisetty D, Huang C, Dong Q, Tiersch TR, Devireddy RV. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cryobiol* 2005; 50(3): 250-63.

- 8 Thirumala S, Huang C, Dong Q, Tiersch TR, Devireddy RV. A theoretically estimated optimal cooling rate for the cryopreservation of sperm cells from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Theriogenology*. 2005; 63(9): 2395-415.
- 9 Devireddy RV, Campbell WT, Buchanan JT, Tiersch TR. Freezing response of white bass (*Morone chrysops*) sperm cells. *Cryobiol* 2006; 52(3): 440-5.
- 10 Thirumala S, Campbell WT, Vicknair MR, Tiersch TR, Devireddy RV. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology* 2006; 66(4): 964-73.
- 11 Alapati R, Goff K, Kubisch HM, Devireddy RV. Water transport in epididymal and ejaculated rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm during freezing. *Cryobiol* 2008; 57(2): 182-5.
- 12 Alapati R, Stout M, Saenz J, Gentry GT Jr, Godke RA, Devireddy RV. Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. *Cryobiol* 2009; 59(2): 164-70.
- 13 Suwalsky M, Castro R, Villena F, Sotomayor CP. Cr(III) exerts stronger structural effects than Cr(VI) on the human erythrocyte membrane and molecular models. *J Inorg Biochem* 2008; 102(4): 842-9.
- 14 Suwalsky M, Schneider C, Villena F, Norris B, Cárdenas H, Cuevas F, et al. Effects of the local anesthetic benzocaine on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Biophys Chem* 2004; 109(1): 189-99.
- 15 Suwalsky M, Rivera C, Villena F, Sotomayor CP, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Arsenite interactions with phospholipid bilayers as molecular models for the human erythrocyte membrane. *Biophys Chem* 2007; 127(1-2): 28-35.
- 16 Cacace MG, Landau EM, Ramsden JJ. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev Biophys* 1997; 30(3): 241-77.
- 17 Sachs JN, Woolf TB. Understanding the Hofmeister effect in interactions between chaotropic anions and lipid bilayers: molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* 2003; 125(29): 8742-3.
- 18 Farkas N, Lőrinczy D, Dergez T, Kilár F, Belágyi J. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on erythrocyte membranes by DSC and EPR. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004; 16(3): 163-8.
- 19 Castelli F, Librando V, Sarpietro MG. A calorimetric evidence of the interaction and transport of environmentally carcinogenic compounds through biomembranes. *Thermochim Acta* 2001; 373(2): 133-40.
- 20 Hernández-Hernández A, Rodríguez MC, López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Shnyrov V, Llanillo M, et al. Alterations in erythrocyte membrane protein composition in advanced non-small cell lung cancer. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(3): 355-63.
- 21 刘晓滨, 白淑芝, 姜晓妹, 马艳伟, 邢丽娜. 非小细胞肺癌红细胞膜带3蛋白功能的观察. *哈尔滨医科大学学报* 2007; 41(6): 535-40.
- 22 Akoev VR, Matveev AV, Belyaeva TV, Kim YA. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1371(2): 284-94.
- 23 冯国基, 崔巧生. 红细胞脂质过氧化物的测定及其应用. *国外医学临床生物化学与检验分册* 1993; 14(1): 14-7.
- 24 Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* 2008; 390(1-2): 1-11.
- 25 符乃阳, 张尔贤, 林哲甫, 俞丽君. O_2^- 与红细胞膜阴离子转运蛋白相互关系的研究. *生物化学与生物物理学报* 1999; 31(3): 328-30.
- 26 阳冠明, 叶司原, 利基林. 活性氧对红细胞膜流动性影响的研究. *广西医科大学学报* 2001; 18(2): 184-6.

Application of DSC in Erythrocyte

Ji Yuan, Xin-Li Zhou*, Hai-Song Wang

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

Abstract Differential scanning calorimetry (DSC) measures the difference of heat flow rate between sample and reference sample under controlled temperature program. Thermal parameters (e.g., enthalpy, heat capacity and phase transition temperature) derived from thermogram can be used to access the structural changes in cell. The combination of thermoanalytical technique and structural analysis contributes significantly to interpreting physiological changes in cells. This paper introduced theoretical evaluation on optimal cooling rate and membrane damage, which shed lights on the application of DSC in erythrocyte.

Key words DSC; erythrocyte; optimal cooling rate; membrane damage

Received: December 14, 2009 Accepted: August 26, 2010

This work was supported by the Chenguang Plan of Shanghai (No.2008CG54), the National Nature Science Foundation of China (No.50906057) and Key Subject of Shanghai (No.S30503)

*Corresponding author. Tel: 86-21-55271167, E-mail: zjulily@163.com