

海藻糖载入血小板的研究

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 将不可渗透型的保护剂海藻糖有效地载入血小板内部是用冷冻干燥法保存血小板重要的第一步。研究血小板对海藻糖的载入量随外部海藻糖浓度、孵化时间、孵化温度改变的变化规律, 发现在细胞外海藻糖浓度为 50 mmol/L、孵化温度 37 °C、孵化时间 4 h 的条件下, 血小板能有效地吸收海藻糖, 细胞内海藻糖浓度达到 15 mmol/L 以上。对孵化后的血小板进行形态观察、血液学分析和膜联蛋白(annexin)V 结合活化分析, 结果表明孵化后的血小板保持了正常血小板的形态和功能。

关键词 血小板; 海藻糖; 载入; 冷冻干燥

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患者的治疗过程中, 需要进行血小板输注。目前的血站主要采用 22 °C 震荡保存浓缩血小板, 此条件下保存的血小板由于活性的丧失和微生物的污染, 按照国家标准最多只能保存 5 天, 这在临床应用会产生供应不足和浪费的问题。用 DMSO 溶液做低温保护剂, 在 -80 °C 或 -196 °C 低温保存血小板可以延长保存期限, 但它在储存和运输过程中需要特殊的低温设备。冷冻干燥法为血小板的长期保存提供了一种理想的方法。它是将浓缩血小板在低温下冻结, 然后在真空条件下使其中的水分升华、解吸而获得干燥血小板的一种技术。与低温保存方法相比, 经冷冻干燥的血小板能够在环境温度下长时间稳定储存, 并且在使用时能够直接复水而恢复活性, 在临床上有巨大的应用潜力。

关于血液细胞冷冻干燥保存的研究已经进行了半个世纪之久, 但是细胞冻干复水后很低的存活率使这项技术一直无法应用于临床。直到最近几年, 随着生物学家对细胞在冷冻和干燥状态下存活机制研究的深入, 这个领域展现出了新的曙光, 他们发现细胞内部的海藻糖具有替代水分子以及形成玻璃态的能力, 能够阻止冻结和脱水对细胞造成的损伤, 从而大大提高细胞的存活率^[1-4]。因此, 将海藻糖应用于细胞的冷冻干燥过程成为这一领域的研究热点。然而, 用海藻糖作为细胞的冻干保护剂所面临的困难是克服细胞膜对双糖的不可渗透性, 将海藻糖引入细胞内部并达到一定的浓度。作

为用冻干法保存血小板的第一步, 本文利用 Wolkers 等^[5,6]和 Oliver 等^[7]提出的液相内吞作用将海藻糖载入血小板, 研究血小板对海藻糖的载入量与细胞外海藻糖浓度、孵化时间、孵化温度之间的依赖关系, 确定海藻糖载入血小板的优化条件, 并通过形态观察、血液学分析、膜联蛋白(annexin)V 结合活化分析 3 种方法, 对孵化后血小板的状态进行评价。我们的目标是在不破坏血小板细胞形态和功能的前提下, 通过改变海藻糖载入血小板的条件, 使细胞内部的海藻糖达到一定的浓度。

1 材料与方法

1.1 血小板的洗涤

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, 打碎块使之悬浮, 在 480 g 离心 10 min 收集血小板, 重复此操作两次。最后用含不同浓度海藻糖的缓冲液 A (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L EGTA, 10 mmol/L 咪唑)使之重悬, 制成浓度约 1×10^9 个/ml 的血小板孵化悬液备用。

1.2 海藻糖的载入与检测

收稿日期: 2005-05-09 接受日期: 2005-07-22

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: lovehome@zju.edu.cn

本文进行了3组实验分别研究血小板对海藻糖的载量与细胞外海藻糖浓度、孵化时间、孵化温度之间的依赖关系。浓度组:细胞在37℃孵化4h,外部海藻糖浓度分别为10、30、50、70、100 mmol/L。时间组:细胞在外部海藻糖浓度为50 mmol/L,孵化温度为37℃条件下分别孵化1、2、3、4 h。温度组:细胞在外部海藻糖浓度为50 mmol/L条件下孵化4 h,孵化温度分别为23、30、37、40℃。每组实验重复3次,每次实验不同的孵化条件平行处理3个样本。

孵化结束后,血小板用适量生理盐水洗涤两次,在20℃左右的室温下480 g离心3 min收集。此温度不在血小板膜的相转变温度范围,洗涤过程不会造成海藻糖从血小板中渗出。将离心收集的血小板重悬于生理盐水,用CELL-DYN1700型血球计数仪(雅培,美国)进行血小板计数及血小板平均体积的计算。血小板细胞内的海藻糖用80%的甲醇萃取,即将1 ml血小板悬液与4 ml甲醇混合,密封试管后将混合物在80℃孵化1 h,海藻糖进入上清液,480 g离心5 min收集上清液。上清液蒸发后,将干燥残余溶解在3 ml蒸馏水中。根据Umbreit等^[8]提出的蒽酮硫酸法进行海藻糖的定量测定,即将3 ml待测液与6 ml蒽酮试剂(2%蒽酮-浓硫酸溶液)混合,在100℃加热3 min后立即在冰浴中冷却至室温,用722型分光光度计读取反应后溶液在620 nm处的吸收值,与海藻糖标准曲线比较得到待测液中海藻糖的浓度。海藻糖标准曲线在每次实验中绘制。由于蒽酮硫酸法可以检测所有糖,因此每次实验平行处理未经海藻糖孵化的血小板,将其值从中减去,避免血小板内生糖的干扰。

1.3 血小板内海藻糖浓度的计算

假设血小板内细胞液占血小板总体积的50%^[5],根据待测液中海藻糖的浓度和被测血小板的总体积,由下式可以计算出血小板内海藻糖的浓度:

C : 血小板内海藻糖的浓度, mmol/L;

$$C = \frac{3X/M}{\nu pV/2} \times 10^3$$

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;

ν : 测细胞内海藻糖浓度所取的血小板悬液的体积, ml;

ρ : 由血球计数仪得到的血小板悬液的浓度, 个/ml;

V : 由血球计数仪得到的血小板平均体积, fl。

1.4 形态观察

孵化后血小板的形态用Nikon TE2000-U型光学显微镜(尼康,日本)放大600倍观察,并用连接在显微镜图像输出接口的Nikon DXM1200F数码显微成像系统及其附带的图像采集软件Nikon ACT-1拍摄血小板形态的显微照片。同时拍摄新鲜分离的血小板形态的显微照片进行对照。

1.5 血液学分析

用CELL-DYN1700型血球计数仪测定孵化前、后血小板数(platelet, PLT)、血小板平均体积(mean platelet volume, MPV),计算细胞数量及平均体积的变化率。

1.6 流式细胞术分析

血小板是一种极其敏感的细胞,在受到外界环境的刺激后,很容易从静息状态转变成活化状态,活化状态的血小板不能正常参与止血,它的一个重要特征是磷脂酰丝氨酸(PS)分子从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的外侧。膜联蛋白V是一种在 Ca^{2+} 存在条件下能与PS结合的蛋白质,常用于检测活化血小板中PS外翻的现象。本文用FACSCalibur型流式细胞仪(Becton Dickinson, USA)分析孵化后血小板与膜联蛋白V结合的比例,以此确定孵化后血小板的活化情况。在流式专用试管中加入30 μl 血小板悬液,然后加入3 μl CD41-FITC, 3 μl 膜联蛋白V-PE以及30 μl 含2.7 mmol/L CaCl_2 的Tyrode缓冲液(TB溶液),TB溶液:137 mmol/L NaCl, 2.8 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl_2 , 12 mmol/L NaHCO_3 , 0.4 mmol/L Na_2HPO_4 , 10 mmol/L HEPES, 5.5 mmol/L D-葡萄糖, pH=7.4。将样本充分混合后,在25℃避光放置15 min,然后加入240 μl 含2.7 mmol/L CaCl_2 的TB溶液稀释,用流式细胞仪进行分析。每个样本计数 10^4 个微粒,用前向角(FSC)、侧向角(SSC)以及CD41-FITC染色区分血小板和碎片,用膜联蛋白V-PE染色区分活化血小板与非活化血小板。数据结果用CellQuest软件进行分析。

2 结果

2.1 海藻糖载量与外部海藻糖浓度的关系

图1表示在37℃孵化4 h,血小板对海藻糖的载量随细胞外海藻糖浓度的变化关系。细胞外海

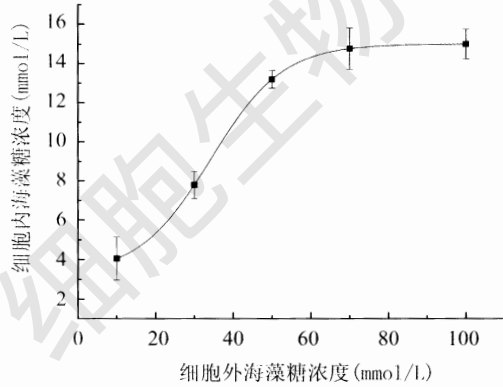


图1 血小板对海藻糖的载入量与细胞外海藻糖浓度的关系 ($n=3$)

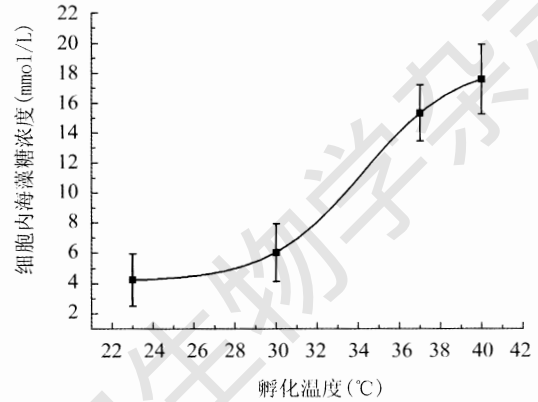


图3 血小板对海藻糖的载入量与孵化温度的关系 ($n=3$)

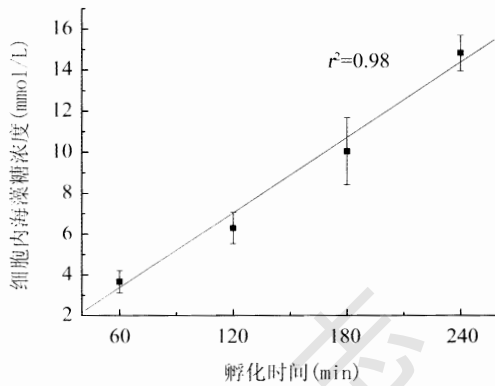


图2 血小板对海藻糖的载入量与孵化时间的关系 ($n=3$)

藻糖浓度在 0~50 mmol/L 范围增加时, 血小板对海藻糖的载入量随之呈线性增加。此后继续增加细胞外海藻糖的浓度, 细胞内海藻糖浓度没有很大增加, 在外部海藻糖浓度为 70 mmol/L 和 100 mmol/L 处形成了一个平台, 这说明血小板对外部海藻糖的吸收已经达到了饱和。

2.2 海藻糖载入量与孵化时间的关系

图2表示外部海藻糖浓度为 50 mmol/L, 孵化温度为 37 °C 条件下, 血小板对海藻糖载入量随孵化时间的变化关系。细胞内海藻糖浓度随孵化时间在 0~4 h 范围内呈良好的线性增加($r^2=0.98$), 以每小时 3.66 mmol/L 的速度接近外部海藻糖浓度。孵化 4 h 后, 血小板内海藻糖浓度已达到 15 mmol/L。

2.3 海藻糖载入量与孵化温度的关系

温度对海藻糖的吸收起着关键性的作用。图3表示细胞外海藻糖浓度为 50 mmol/L, 孵化 4 h, 血小板对海藻糖的载入量随孵化温度的变化关系。在 23 °C 和 30 °C 时, 血小板对海藻糖的吸收量很低, 细胞内海藻糖浓度只有约 4~5 mmol/L; 而在 37 °C 时, 吸收量有显著地增加, 细胞内海藻糖浓度达到 15 mmol/L。继续升高温度到 40 °C, 细胞内海藻糖浓度进一步增加到 17 mmol/L。这与 Tsvetkova 等^[1]报道的血小板在 30 °C 和 37 °C 之间会发生高温膜相转变有很大的相关性。因为细胞膜发生相转变时, 其通透性会暂时性地增加, 使细胞外海藻糖加速进入细胞内部。

2.4 形态观察

新鲜分离血小板与 50 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h 后血小板的显微照片如图4所示。由图中可以看出孵化后的血小板保持了正常的圆盘形态, 与新鲜分离血小板的形态没有差异。这说明孵化过程可以使海藻糖有效地载入血小板细胞内而不破坏血小板的形态。

2.5 血液学分析

对 3 种孵化条件——50 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h, 100 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h, 100 mmol/L 外部海藻糖 40 °C 孵化 4 h——处理前、后的血小板进行计数和平均体积的测定, 结果

表1 3种孵化条件下血小板计数与平均细胞体积的变化 ($n=5$)

孵化条件	孵化前		孵化 4 h 后		PLT 减少率	MPV 增加率
	PLT	MPV	PLT	MPV		
50 mmol/L, 37 °C, 4 h	983 ± 8	9.28 ± 0.13	916 ± 12	9.52 ± 0.15	6.82%	2.59%
100 mmol/L, 37 °C, 4 h	940 ± 13	8.92 ± 0.08	840 ± 13	9.08 ± 0.16	10.64%	1.79%
50 mmol/L, 40 °C, 4 h	947 ± 11	9.02 ± 0.13	847 ± 19	9.3 ± 0.16	10.56%	3.1%

PLT (platelet) 表示血小板数, MPV (mean platelet volume) 表示血小板平均体积。

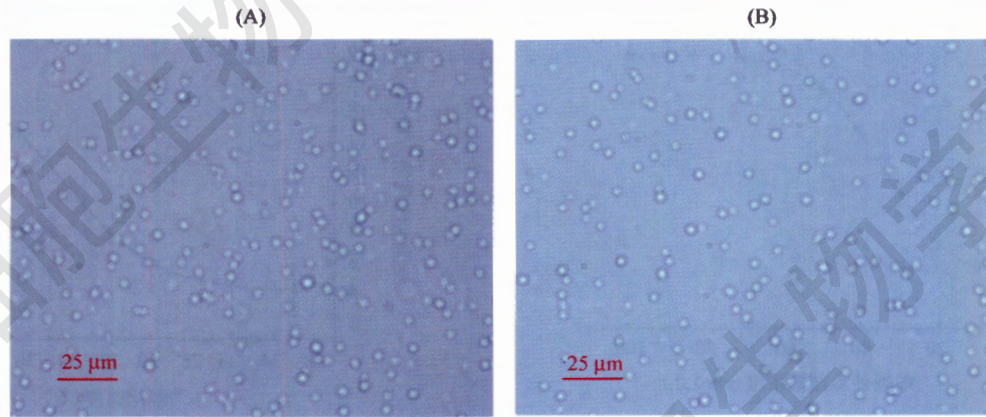


图4 新鲜分离(A)与 50 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h (B) 血小板的显微照片

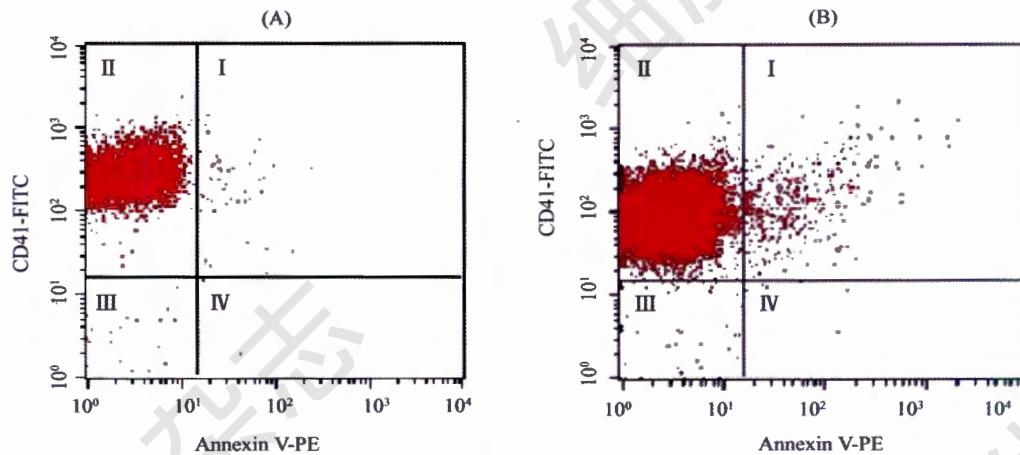


图5 新鲜分离(A)和 50 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h (B) 血小板的流式细胞术分析

见表 1。随着细胞外海藻糖浓度的增加和孵化温度的升高,血小板细胞数量减少率增加:50 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h, PLT 的减少率为 6.82%, 100 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h, PLT 减少率为 10.64%, 50 mmol/L 外部海藻糖 40 °C 孵化 4 h, PLT 减少率为 10.56%。而 3 种条件下血小板的平均体积变化不大,体积膨胀率在 4% 以内。

2.6 流式细胞术分析

图 5 表示由流式细胞术分析得到的两种血小板与膜联蛋白 V 和 CD41 抗体结合的荧光密度点图。图中第一象限和第二象限的点分别表示膜联蛋白 V 阳性(活化)和阴性(非活化)血小板,第三象限和第四象限的点表示 CD41 阴性的粒子(污染物)。CellQuest 软件分析结果显示新鲜分离的血小板样本位于第二象限内的点数占总点数的 98.85%, 50 mmol/L 外部海藻糖 37 °C 孵化 4 h 后的血小板样本位于第二象限内的点数占总点数的 97.94%。这表明孵化后的血

小板只有少量的激活现象,在血小板保存的可接受范围之内。

3 讨论

作为用冻干法保存血小板的第一步,将不可渗透型的保护剂海藻糖有效地载入血小板内部是至关重要的。Wolkers 等^[5]报道当细胞内部海藻糖浓度为 15~25 mmol/L 时,冻干后血小板的恢复率达 85% 以上。因此,本文的目标是在不破坏血小板形态和功能的前提下,通过改变海藻糖载入血小板的载入条件,使细胞内部的海藻糖达到一定的浓度,为下一步成功地冷冻干燥保存血小板提供基础。

实验数据显示血小板对海藻糖的载入量与外部海藻糖浓度、孵化时间、孵化温度等因素有很强的依赖关系。本文得出的结论与 Wolkers 等^[5]报道的结论对比有以下几点不同:(1)本文发现海藻糖的载入量随细胞外海藻糖浓度的增加在 0~50 mmol/L 范围

内呈线性增加,当细胞外海藻糖浓度大于 50 mmol/L 时出现饱和, Wolkers 等报道海藻糖的载入量随细胞外海藻糖浓度的增加在 0~30 mmol/L 范围内呈线性增加,在细胞外海藻糖浓度为 50 mmol/L 时达到最大,而细胞外海藻糖浓度大于 50 mmol/L 时又开始下降;(2)本文发现海藻糖的载入量随孵化时间在 0~4 h 范围内呈良好的线性增加, Wolkers 等报道海藻糖的载入量在 2 h 内较低,2 h 后开始快速线性增加;(3)本文在 Wolkers 等实验的基础上补充了孵化温度为 30 °C 和 40 °C 的实验数据,发现海藻糖的载入量随孵化温度的变化出现明显的两段现象,当孵化温度低于 30 °C,载入量很低,当孵化温度在 30 °C~40 °C 之间时,载入量增加很快。以上结论的偏差可能是由于血小板内海藻糖浓度测量方法本身存在的随机误差造成,可以采用更准确的定量测定微量糖的方法,如高效液相色谱法,对实验数据加以验证。

通过对孵化后的血小板进行形态观察、血液学分析和膜联蛋白 V 结合活化分析,发现孵化后的血小板保持了正常血小板的圆盘形态并且仍然处于静息状态,只是随着细胞外海藻糖浓度的增加和孵化

温度的升高,血小板细胞数量减少率增加,因此,海藻糖载入血小板不宜采用较高的细胞外海藻糖浓度和较高的孵化温度。综合考虑血小板对海藻糖的载入量与孵化对血小板的损伤,我们采用细胞外海藻糖浓度为 50 mmol/L,孵化温度 37 °C,孵化时间 4 h 作为血小板冷冻干燥前的孵化条件,这既能使血小板内部的海藻糖浓度达到 15 mmol/L,满足在冷冻干燥过程中对血小板的保护作用,又尽可能地降低了孵化对血小板形态和功能的损伤。

参考文献 (References)

- [1] Crowe JH *et al. Cryobiology*, 2001, **43**: 89
- [2] Beattie GM *et al. Diabetes*, 1997, **46**: 519
- [3] Eroglu A *et al. Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 163
- [4] Guo N *et al. Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 168
- [5] Wolkers WF *et al. Cryobiology*, 2001, **42**: 79
- [6] Wolkers WF *et al. Biochim Biophys Acta*, 2003, **1612**: 154
- [7] Oliver AE *et al. Cell Preserv Technol*, 2004, **2**: 35
- [8] Umbreit WW *et al. Manometric and Biochemical Techniques*, 5th ed., Edina, MN: Burgess, 1972, 261
- [9] Tsvetkova NM *et al. Mol Membr Biol*, 1999, **16**: 265

Study on Loading Platelets with Trehalose

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 Introducing the impermeable lyoprotectant trehalose into the cytoplasm is the first step toward preserving platelets by freeze-drying. We investigated the loading of the human platelets with trehalose. Trehalose uptake was measured as a function of extracellular trehalose concentration, incubation time and incubation temperature. We found an effective uptake of the trehalose at 37 °C in a time span of 4 h in the presence of 50 mmol/L external trehalose. The internal trehalose concentration reached above 15 mmol/L. Morphological study, hematology analysis and annexin V binding assay showed that trehalose loaded platelets maintain the normal morphology and function of platelets. These data provide the foundation in developing a protocol for freeze-drying platelets.

Key words platelets; trehalose; loading; freeze-drying

Received: May 9, 2005 Accepted: July 22, 2005

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

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