

文章编号:0253 – 4339(2015) 03 – 0097 – 05
doi:10. 3969/j. issn. 0253 – 4339. 2015. 03. 097

醇类保护剂对猪软骨低温膨胀过程的 DSC 研究

余华星 李代禧 胥义 周国燕 刘立 翟振 张燕

(上海理工大学医疗器械与食品学院 上海 200093)

摘 要 在对关节软骨进行低温保存时,由于冰晶的生长而造成的热膨胀效应是其低温断裂的主要原因。本论文采用非等温热分析仪和修正的 Avrami 动力学方程,考察了分别添加不同浓度的四种醇类低温保护剂时,猪关节软骨低温保存过程中热力学及结晶动力学参数的变化。研究表明,软骨结晶峰随降温速率的增大而变宽,从而导致结晶越不完善;在 -60 ~ 0 ℃ 温度范围,只有添加 4.5 mol/L 1, 2-丙二醇时,其 Avrami 指数为 4.156,冰晶以均相三维球晶方式生长。且与其他保护剂相比,1, 2-丙二醇保护效果最好。同时降温速率对结晶及热膨胀不同的影响结果也说明,低温损伤并不完全是由冰晶生长所决定,还与其胞外基质的缓冲作用有关。

关键词 关节软骨;DSC 热分析;低温保护剂;结晶动力学
中图分类号:TB69; TQ025.3; R318.01 **文献标识码**:A

Effects of Cryoprotectant on Thermal Expansion of Articular Cartilage during Freezing Process by DSC Method

Yu Huaxing Li Daixi Xu Yi Zhou Guoyan Liu Li Zhai Zhen Zhang Yan

(Institute of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China)

Abstract The thermal expansion caused by the growth of ice crystals is the main reason for low-temperature fracture of articular cartilage. With non-isothermal DSC method, this article investigated the thermodynamics and crystallization kinetics parameters of the pig cartilage. The results for four kinds of cryoprotectants were analyzed by the modified Avrami kinetic equations. It shows that the crystallization peak of the cartilage becomes wider with increasing cooling rate which lead to an incomplete crystallization; freezing from 0 ℃ to -60 ℃, the value of Avrami is 4.156 when only 4.5 mol/L 1, 2-propanedio is added. The crystallization would exhibit three-dimensional spherical growth on heterogeneous nuclei and contribute best protective effect compared to other cryoprotectants. While different effects of cooling rate on crystallization and thermal expansion also suggest that low temperature injury is not only determined by the growth of ice crystals, but also affected by the buffering of extracellular matrix.

Keywords articular cartilage; DSC thermo analysis; cryoprotectant; crystallization kinetics

随着人口老龄化的逐渐加剧,骨关节疾病已越来越多地威胁着人类身心健康,关节软骨移植是治疗骨关节疾病的重要手段之一^[1]。然而,在对关节软骨进行低温保存时,常常会观察到低温断裂现象^[2-4],并且对其低温损伤机理至今仍不甚明确^[5]。之前的研究利用热机械分析仪^[6-7],研究了降温速率和低温保护剂对软骨在冻结过程热膨胀行为的影响情况,系统讨论了软骨低温保存过程中发生的生物力学性能变化。实验结果与传统的热力学研究手段得到的结论存在差异,这可能和关节软骨细胞外存在大量的胶原类成分,对结晶过程的

力学环境造成的影响有关。
为了验证上述推论,本文采用降温速率分别为 1 ℃/min、3 ℃/min、5 ℃/min 的慢速降温方式,以四种醇类物质为低温保护剂,利用差示扫描仪(Differential Scanning Calorimeter, DSC)和修正的 Avrami 动力学方程^[8],分别考察软骨低温保存过程中热流值及结晶动力学参数的变化,研究了软骨结晶过程的动力学特性。此方法排除了软骨细胞外基质的影响,从热力学和动力学角度研究了关节软骨在低温保存过程中的结晶机制,为软骨保存时的生物力学损伤机理探究提供了有效实验依据。

1 原理与方法

1.1 实验原理

一般的液-固相变过程在微观上表现为结晶成核过程和晶体生长过程^[9],为了从热力学和动力学角度研究关节软骨在低温保存过程中的结晶机制,对于等温结晶过程,我们利用修正的 Avrami 动力学方程^[8],来考察软骨低温保存过程中热焓值及结晶动力学参数的变化。Avrami 一般方程如下:

$$1 - X_t = \exp(-Z_t t^n)$$
 (1)

对式(1)进行变换可得:

$$\ln(-\ln(1 - X_t)) = \ln(Z_t) + n\ln(t)$$
 (2)

考虑到非等温结晶过程中,温度是以一定的速率变化的,Jeziorny A^[8]将 Avrami 等温动力学方程推广到非等温过程,并将非等温结晶速率的方程表示:

$$1 - X_t = \exp(-Z_c t^n)$$
 (3)

非等温结晶过程的速率常数 Z_c 的修正如下式:

$$\ln(Z_c) = \ln(Z_t)/D$$
 (4)

式中: X_t 为结晶时间 t 时刻的相对结晶度; n 为 Avrami 指数,与成核机理和晶体生长方式有关,且等于晶体生长的空间维数与成核过程的时间维数之和; Z_t 为结晶速率常数,包含成核和结晶两方面,并与结晶温度有关, D 为降温速率。

1.2 实验方法

选取上海本地成年猪,取整根有两瓣半月板覆盖的白色软骨的猪大骨。用手术剪将半月板剪去,选取受力负荷相对集中的中央软骨,并用专用采样工具制备直径为 5 mm,厚度为 3~4 mm 的软骨测试样品。实验采用较小摩尔浓度(1.5 mol/L 和 4.5 mol/L)的乙醇、乙二醇、1, 2-丙二醇、甘油(四种试剂均为分析纯,购置于上海国药集团化学试剂有限公司)做低温保护剂,分别进行 2.5 h 的充分渗透并贮存于 4 ℃ 冰箱备用。

用差示扫描量热仪(DSC-Pyris Diamond,购置于美国 Perkin-Elmer 公司)作为测试仪器。测试方法如下:取出样品,吸干表面水分,置于坩锅中密封,采用差示扫描量热仪测定。每一条件下,重复三次进行测定。本实验选择分别以 1 ℃/min、3 ℃/min、5 ℃/min 的降温速率从 0 ℃ 程序降温至 -60 ℃,并记录整个过程样品的热流曲线。通过热流分析软件 Pyris Series(美国 Perkin-Elmer 公司,5.0 版本)最终分析该热流曲线,研究关节软骨冻结过程的热流值及结晶动力学参数的变化,进而分析软骨低温损伤机理和低温保护剂对关节软骨的低温保护机理。

2 实验结果与分析

2.1 降温速率对猪软骨热流值的影响

不同降温速率和保护剂作用下猪软骨的低温热流曲线如图 1 所示,其曲线相对应的热焓值测定结果列于表 1 和表 2 中。

表 1 在不同降温速率下,分别添加不同浓度的乙醇和乙二醇时的 DSC 热流值和结晶动力学参数

Tab.1 Heat flow and crystallization kinetics parameters of cartilage protected by ethanol and glycol at different concentrations and cooling rate respectively				
乙醇浓度/ (mol/L)	降温速率/ (℃/min)	ΔH / (J/g)	n	Z_t
1.5	1	-233.771 ± 0.003	1.849	15.305
1.5	3	-165.907 ± 0.005	1.617	2.280
1.5	5	-172.094 ± 0.002	1.741	1.531
4.5	1	-189.354 ± 0.006	1.885	11.784
4.5	3	-142.372 ± 0.003	1.620	1.886
4.5	5	-149.677 ± 0.005	1.762	1.680
乙二醇浓度/ (mol/L)	降温速率/ (℃/min)	ΔH / (J/g)	n	Z_t
1.5	1	-172.951 ± 0.004	1.680	11.801
1.5	3	-156.062 ± 0.002	1.505	1.985
1.5	5	-144.547 ± 0.004	1.574	1.566
4.5	1	-69.793 ± 0.003	1.270	11.036
4.5	3	-96.931 ± 0.004	2.948	2.129
4.5	5	-69.432 ± 0.002	1.436	1.497

表 2 不同降温速率下添加不同浓度 1, 2-丙二醇、甘油时的热流值和结晶动力学参数

Tab.2 Heat flow and kinetics parameters of crystallization of cartilage protected by 1, 2-propanediol and glycerin at different concentrations and cooling rate				
1,2-丙二醇浓 度/(mol/L)	降温速率/ (℃/min)	ΔH / (J/g)	n	Z_t
1.5	1	-181.726 ± 0.003	1.409	5.200
1.5	3	-178.166 ± 0.002	1.598	2.277
1.5	5	-192.027 ± 0.002	1.370	1.542
4.5	1	-87.151 ± 0.006	1.702	3.877
4.5	3	-108.988 ± 0.005	1.308	1.639
4.5	5	-105.758 ± 0.001	0.989	1.301
甘油浓度/ (mol/L)	降温速率/ (℃/min)	ΔH / (J/g)	n	Z_t
1.5	1	-152.791 ± 0.004	1.434	14.011
1.5	3	-125.572 ± 0.003	1.614	2.626
1.5	5	-146.558 ± 0.003	1.700	1.943
4.5	1	-57.975 ± 0.002	3.352	4.314
4.5	3	-71.54 ± 0.002	4.156	1.896
4.5	5	-56.957 ± 0.005	2.949	1.155

结晶焓反映了物质的结晶能力,由表 1 和表 2 可以看出,结晶焓 ΔH 的大小随结晶速率 Z_t 的变化不大,然而浓度以及保护剂种类的对其大小影响较明显,其主要原因是结晶焓的大小主要受未冻水含量影响:保护剂浓度增大,直接改变了未冻水的多少,而不同保护剂则是通过结合水能力的不同来影响未冻水含量。

由热流曲线图 1 中可以看出,结晶峰随降温速率的增大而变宽。这是由于在较高的降温速率下,组分分子于较低温度下扩散到晶相的部分增加,但是由于低温下分子的活动性较差,部分进入晶相结构的分子还来不及结晶或结晶不完善就被冷却下来,使形成的晶体完善性较差,从而造成结晶范围变大,结晶峰变宽。因此,降温速率越大,总结晶时间越短,结晶也越不完善^[9]。

2.2 降温速率对猪软骨结晶动力学参数的影响

将 DSC 曲线转化为相应的相对结晶度-时间关系曲线,这一系列曲线呈 S 型,图 2 是根据式(2)经线性拟合得到的 $\ln(-\ln(1-X_t))$ 与 $\ln(t)$ 的直线关系图。直线的斜率和截距分别为 n 和 $\ln(Z_t)$, Z_t 为结晶速率常数,用(4)式进行转化可得非等温结晶过程的速率常数 Z_c ,结果也列于表 1 和表 2 中。

由图 2 可以看出,这一系列曲线呈 S 型,在结晶后期,曲线转变为较为平坦的平台。这是由于经过短暂的成核过程后,冰晶进入快速的生长期;到达结晶

后期,晶体边界的互相碰撞、挤压,使结晶速率有所变慢。结合表 1 和表 2 可以发现,降温速率的增加,进入冰晶生长期的时间变短,溶液快速成核,同时也会导致结晶速率 Z_t 显著降低。然而过冷度(主要影响的是冰晶的成核速度以及冰晶生长过程水分子的迁移速度)并没有因为降温速率的改变而出现明显的变化。这说明,此时降温速率主要是通过影响冰晶的生长速率而非成核速率来影响结晶速率的:快速降温会造成结晶的不完善,冰晶在生长过程中,会存在空间位阻,这也可能是最终导致结晶速率整体较低的原因^[10]。

由于结晶速率由成核速率和晶粒生长速率决定,可以认为其与最终冰晶的形成直接相关,也可能是影响软骨低温保存过程中的热膨胀效应(即由于瞬间形成的大量冰晶而来不及释放的应力造成的低温断裂)的主要因素。利用热机械分析仪研究的结果显示,降温速率对热应变的影响并非是严格单调的,而是存在最佳降温速率,这与本实验对于降温速率对冰晶成核速率影响的实验结果并非完全一致。这也间接表明,细胞受到的低温损伤并不完全是由冰晶动力学生长所决定,胞外基质的环境对其最终承受的机械损伤也至关重要。软骨胞外基质中存在大量的胶原和蛋白多糖,对冰晶的膨胀效应具有缓冲效应;伴随着降温速率的增加,虽然冰晶的形成速率有所降低,然而此时,胞外基质在短时间以来不及调整形态,导致由于膨胀所产生的应力来不及释放,二者的拮抗作

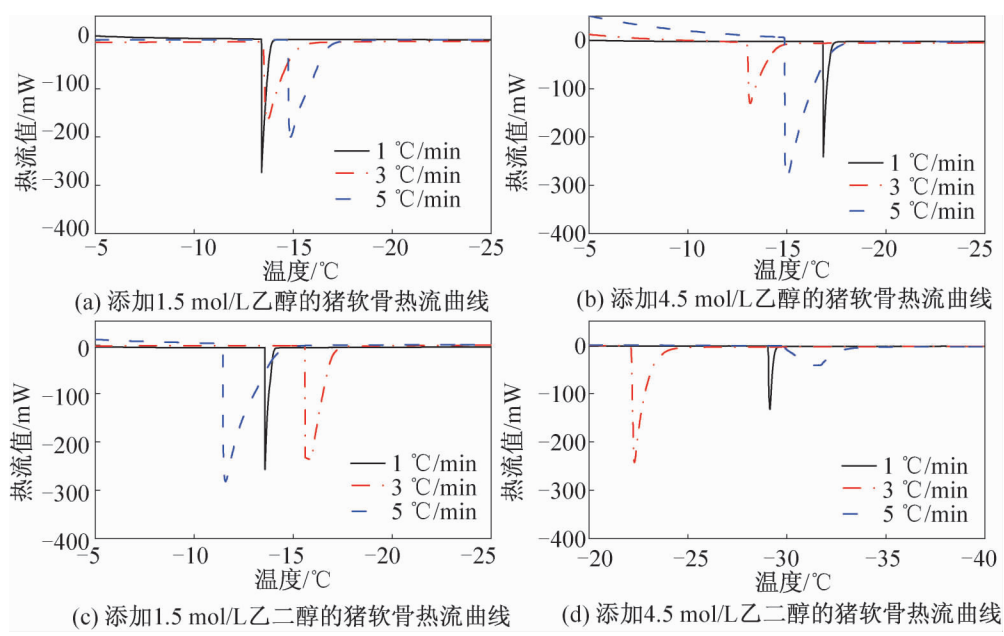


图 1 乙醇和乙二醇保护下的猪软骨的热流曲线

Fig. 1 Heat flow curves of articular cartilage protected by alcohol and ethylene glycol determined at different molar concentrations and cooling rates

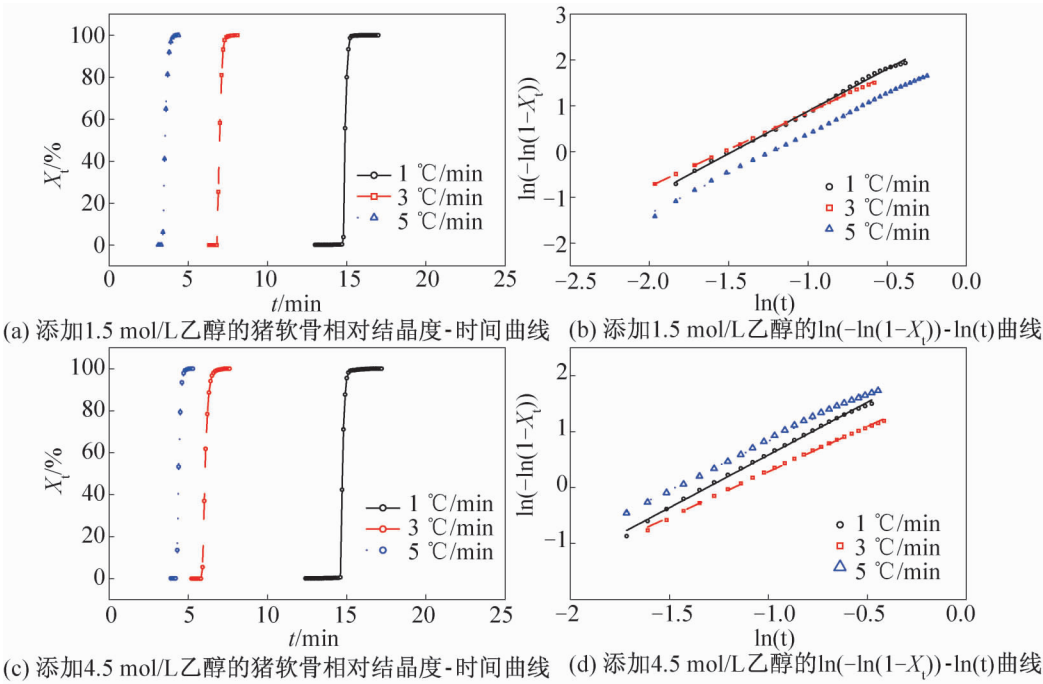


图 2 添加乙醇时不同降温速率和浓度的猪软骨相对结晶度-时间曲线

Fig. 2 Curves of crystallization fraction vs temperature with alcohol at different concentrations and cooling rate

用也导致了软骨低温保存中最佳降温速率的存在。

同时,根据表 1 和表 2 中的数据和 Avrami 指数的值域范围可知,添加乙醇、乙二醇、甘油的软骨在 $-60 \sim 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围的非等温结晶过程以异相二维方式成核;然而添加 4.5 mol/L 1, 2-丙二醇时,其 Avrami 可达到 4.156,晶体可能是以三维球晶方式生长,这也可能是其保护效果较好的原因之一。

2.3 不同浓度保护剂在不同降温速率下的结晶焓

图 3 结合表 1 和表 2 可以看出,添加 4.5 mol/L 的保护剂,猪关节软骨的结晶焓要小于添加保护剂浓度为 1.5 mol/L 时的结晶焓。结晶焓的降低表明,伴随着浓度的增加,低温保护剂对成核过程以及冰晶生长过程的抑止增强。同时随着浓度的增加,1, 2-丙

二醇的过冷度增加最大,可达到 $-18.7\text{ }^{\circ}\text{C}$,其结晶焓比浓度为 1.5 mol/L 时减少了 62%;乙二醇也存在明显的过冷现象,结晶焓减小了 59.6%。可以推测,1, 2-丙二醇以及乙二醇结晶焓减小的原因是由于浓度增大,高浓度低温保护剂(溶质)占据了本该参与相变的纯水份额较多,且有一部分水与低温保护剂之间以氢键的形式相联系,成为不冻水^[11]。可冻水含量的降低直接造成的过冷现象,其带来的低温结晶环境影响了最终冰晶的形成。然而对于添加甘油的样品,并不存在明显的过冷度变化,其结晶焓却比浓度为 1.5 mol/L 时减少了 52%。这说明此时影响甘油结晶焓变化的因素,并不是由于浓度升高造成的低温对最终冰晶形成带来的抑制作用,而可能是高浓度的甘油中存在更多的羟基,与水分子之间形成了氢键作

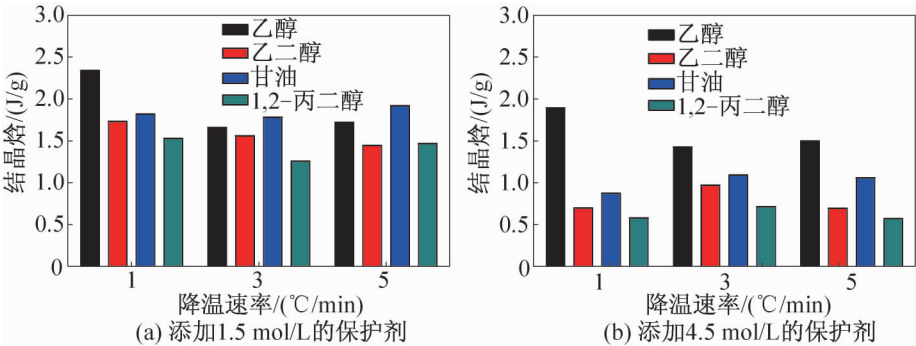


图 3 添加四种醇类保护剂下的猪软骨结晶焓

Fig. 3 Crystallization enthalpies of cartilage with four kinds of alcohol protectants

用,阻碍了水分子的迁移,进而影响了冰晶的生长过程。对于添加了乙醇的样品,既不存在明显的过冷现象,结晶焓也未见显著降低。这说明,乙醇对于水分子冻结过程的影响是微弱的,这可能与其分子量较小,以及极性较弱的性质有关。

通过图3还可以看出,与甘油相比,1,2-丙二醇的结晶焓较小,水合性更优,主要原因可以用“甲基化效应”来解释:即1,2-丙二醇中存在的甲基切断了1,2-丙二醇分子间羟基之间键合,增大了与水分子之间键合可能性^[12]。这样,由于1,2-丙二醇的影响,形成的冰晶少或者是形成了无定型的冰晶,对生物组织的破坏程度小,对于猪软骨低温保存的保护作用较好,这与猪软骨在冻结过程热膨胀行为的研究结果一致。

3 结论

1)添加保护剂的软骨结晶峰随降温速率的增大而变宽,总结晶时间越短,结晶越不完善;添加4.5 mol/L的保护剂,软骨的结晶焓要小于添加保护剂浓度为1.5 mol/L时的结晶焓,更利于抑制结晶;与乙醇、乙二醇、甘油相比,1,2-丙二醇的结晶焓更小,水合性最优,更利于猪软骨的低温保存。

2)在-60~0℃温度范围,软骨结晶过程的Avrami指数基本上介于0.989~1.885之间,结晶为异相成核的一维方式;然而添加4.5 mol/L 1,2-丙二醇时,其Avrami指数可达到4.156,推断其冰晶三维球晶方式生长,这也可能是保护效果好的原因之一。

3)随着降温速率的增加,过冷度增加,易于成核;然而结晶速率随降温速率的升高而降低也说明,此时降温速率对于冰晶生长的抑制对于最终冰晶的形成起主导作用。这与热应变中存在最佳降温速率的实验结果并不一致,也间接表明细胞受到的低温损伤并不完全是由冰晶动力学生长所决定,胞外基质的环境对其最终承受的机械损伤也至关重要。

本文受上海市“创新行动计划”国际科技合作(12430702000),上海市重点学科(T0503和P0502),上海市自然科学基金(12ZR1420400),上海市教委科研创新项目(14YZ092)和上海市联盟计划项目资助。(The project was supported by the Innovation Foundation for International Cooperation of Shanghai Committee of Science and Technology (No. 12430702000), Key Disciplines Program of Shanghai (No. T0503 & No. P0502), the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 12ZR1420400), the Innovation Foundation from the Education Commission of Shanghai City (No. 14YZ092) and Alliance Program in Shanghai.)

参考文献

- [1] 曹乐,何耀华,嵇伟平,等. 骨关节炎易感基因研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2008, 29(4): 262-263. (Cao Le, He Yaohua, Ji Weiping, et al. Progress on candidate genes of osteoarthritis[J]. International Journal of Orthopaedics, 2008, 29(4): 262-263.)
- [2] 胥义,周国燕,高才,等. 兔主动脉冻结膨胀行为及其影响因素的研究[J]. 工程热物理学报, 2005, 26(6): 1013-1015. (Xu Yi, Zhou Guoyan, Gao Cai, et al. Study on the thermal expansion behaviors of rabbit artery during freezing and affecting factors[J]. Journal of Engineering Thermophysics, 2005, 26(6): 1013-1015.)
- [3] Shi X L, Dalta A K. Thermal stresses from large volumetric expansion during freezing of biomaterials[J]. Transaction of the ASME, 1998, 120:720-726.
- [4] Xu Yi, Hua Zezhao, Sun Dawen, et al. Effects of freezing rates and dimethyl sulfoxide concentrations on thermal expansion of rabbit aorta during freezing phase change as measured by thermo mechanical analysis[J]. Journal of Biomech, 2007, 40: 3201-3206.
- [5] 黄勇,崔国文. 相图与相变[M]. 北京:清华大学出版社, 1987.
- [6] 胥义,孙慧君,吕娅. 关节软骨冻结过程中的热膨胀行为及其影响因素研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2012, 31(5): 742-748. (Xu Yi, Sun Huijun, Lü Ya. Thermal expansion behaviors of articular cartilage during freezing and affecting factors[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2012, 31(5): 742-748.)
- [7] 余华星,李代禧,胥义,等. 醇类保护剂对猪软骨低温膨胀过程的作用[J]. 制冷学报, 2014, 35(4): 113-118. (Yu Huaxing, Li Daixi, Xu Yi, et al. Effects of cryoprotectant on thermal expansion of articular cartilage during freezing process[J]. Journal of Refrigeration, 2014, 35(4): 113-118.)
- [8] Jeziorny A. Parameters characterizing the kinetics of the non-isothermal crystallization of poly (ethylene terephthalate) determined by DSC[J]. Polymer, 1978, 19(10): 1142-1144.
- [9] Ishine N, Rubinsky B, Lee C Y. A histological analysis of liver injury in freezing storage[J]. Cryobiology, 1999, 39(3): 271-277.
- [10] 李余增. 热分析[M]. 北京:清华大学出版社, 1987.
- [11] 杜雁霞,桂业伟,肖春华,等. 过冷水滴液-固相变动力学特性研究[J]. 制冷学报, 2008, 29(4): 30-33. (Du Yanxia, Gui Yewei, Xiao Chunhua, et al. Investigation on solid-liquid phase change kinetics of supercooled water droplets[J]. Journal of Refrigeration, 2008, 29(4): 30-33.)
- [12] De Visser C, Heuvelsland W J M, Dunn L A. Molar heat capacities of binary mixtures of water and some smides at 298.15 K[J]. Z. Phys. Chem. Neue Folge, 1974, 92: 159-170.

通信作者简介

李代禧,男,博士,副教授,硕士生导师,上海理工大学,(021) 55271117, E-mail: dxli75@126.com。研究方向:计算生物学和低温生物热科学。

About the corresponding author

Li Daixi, male, Ph. D., associate professor, master instructor, University of Shanghai for Science and Technology, +86 21-55271117, E-mail: dxli75@126.com. Research fields: computational biology and cryobiology thermal science.