

文章编号: 0253-4339(2012)04-0066-04

doi: 10.3969/j.issn.0253-4339.2012.04.066

差示扫描量热法确定红细胞的渗透参数及最佳冷却速率

周新丽 袁 骥 王海松 李维杰

(上海理工大学 生物热科学研究所 上海 200093)

摘要 了解细胞膜的水分渗透性质对优化红细胞低温保存方案具有指导意义。采用差示扫描量热技术得到红细胞在特定低温保护剂中在降温过程的体积变化,将实验得到的差示扫描量热数据代入水分传递模型拟合,确定红细胞在生理盐水、20% 二甲基亚砜、10%甘油及20%甘油中对水的渗透率和水分渗透过程的表观活化能。将以上参数用于模拟红细胞在0.5~50°C/min间以恒定速率冷却时的水分传递状况,由此预测红细胞在20%二甲基亚砜中最佳降温速度为5.2°C/min,在10%甘油及20%甘油中则分别为5.5°C/min和4.6°C/min。

关键词 热工学; 渗透参数; 最佳冷却速率; DSC; 红细胞

中图分类号: TB66

文献标识码: A

Determination of Water Permeability Parameters and Optimal Freezing Rates of Human Red Blood Cells by Differential Scanning Calorimeter

Zhou Xinli Yuan Ji Wang Haisong Li Weijie

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

Abstract Optimization of human red blood cells (RBCs) cryopreservation protocols requires an understanding of the water permeability characteristics. Volume shrinkage during freezing of RBCs can be obtained by using a shape-independent differential scanning calorimeter (DSC) technique. By fitting the water transport model to the experimentally obtained DSC data, the best-fit membrane permeability parameters (reference membrane permeability to water and the activation energy) in normal saline, 20% dimethyl sulfoxide (Me₂SO), 10% glycerol and 20% glycerol were determined. These parameters were then used to simulate water transport of RBCs at constant cooling rates between 0.5~50°C/min. The simulation results showed “optimal cooling rate” for erythrocytes were 5.2°C/min, 5.5°C/min and 4.6°C/min in 20% Me₂SO, 10% and 20% glycerol respectively.

Keywords Pyrology; Permeability parameters; Optimal cooling rate; DSC; Red blood cell

低温保存是延长红细胞保存期限的有效方法,但是冻结和复温过程会造成红细胞的损伤甚至死亡,影响红细胞保存的回收率。为了优化红细胞的低温保存方案,研究人员常改变保存液成分、降温速度、冷冻温度等因素进行重复实验,借助生化检测筛选出回收率最高的方案,过程耗时又繁琐。另一方面,理论研究表明了解细胞膜的渗透性质,掌握胞内水分跨膜迁移过程对细胞低温保存方案的设计和 optimization 有指导意义。

确定细胞膜渗透性质的常用方法是低温显微镜,但是此方法不适用于形状不规则/非球形的细胞,如红细胞、血小板等。Devireddy等^[1]提出了用差示扫描量热法(Differential scanning calorimetry, DSC)来确定细胞膜的渗透性质,已经在猴^[2]、马

^[3]、犬^[4]、牛^[5]、猪^[6]、鱼^[7]的精子悬浮液中得到很好的验证。采用差示扫描量热技术,根据红细胞在降温过程中的放热量来评估其在特定低温保护剂中的体积变化,确定红细胞在不同溶液中对水的渗透参数,随后根据水分跨膜转运模型推算细胞失水状况,由此预测红细胞在特定保存液中的最佳降温速度,优化红细胞的低温保存方案,大幅减少了工作量。

1 材料与方法

1.1 制备红细胞悬液

新鲜血液来自健康无偿献血者,由第二军医大学附属长海医院输血科提供。将新鲜血液以2500 r/min离心5min,弃去血浆及白膜,用0.9%NaCl溶

基金项目: 国家自然科学基金(50906057)资助项目。(The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.50906057).)

收稿日期: 2011年9月29日

液以同一条件反复洗涤3次, 弃去上清液, 得到红细胞浓缩液备用。

1.2 DSC实验

将红细胞浓缩液用0.9%NaCl, 20%二甲基亚砷(Me_2SO), 10%甘油, 20%甘油, 稀释为压积为0.4的细胞悬液, 其中渗透性低温保护剂(甘油及 Me_2SO)按四步等体积法添加到红细胞浓缩液中, 使 Me_2SO 终浓度为20%, 甘油终浓度分别为10%、20%, 在两次添加间隙需将试样在室温下静置5min防止渗透压损伤^[8]。在不同细胞悬液中加入0.5~1mg丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*), 混匀, 滴加到标准铝皿中, 称重密封。

第1步: 细胞悬浮液以5°C/min冷却至细胞外溶液形成冰晶, 在DSC曲线上出现明显的放热峰。第2步: 样品以10°C/min的速率升温达到(但不要超越)相转变温度(T_{ph})并维持5min, 细胞外冰晶维持稳定状态。经测定0.9%NaCl, 20% Me_2SO , 10%甘油, 20%甘油的相转变温度分别为271.5K, 260.8K, 268.2K, 263.2K。第3步: 样品从 T_{ph} 以5°C/min降温至-50°C使红细胞脱水, 测量具有渗透活性的红细胞的初始放热量(q_{initial}), 图1中的下面一条曲线对应此热量释放。第4步: 样品以100°C/min的速率升温至 T_{ph} 并平衡5min, 细胞外冰晶维持稳定状态。第5步: 样品以200°C/min降温至-150°C, 使细胞由于冻结损伤而溶解或失去渗透活性。第6步: 重复第4步。第7步: 样品从 T_{ph} 以5°C/min降温至-50°C, 测量溶解或没有渗透活性的红细胞的最终放热量(q_{final})。图1中的上面一条曲线对应此热量释放。

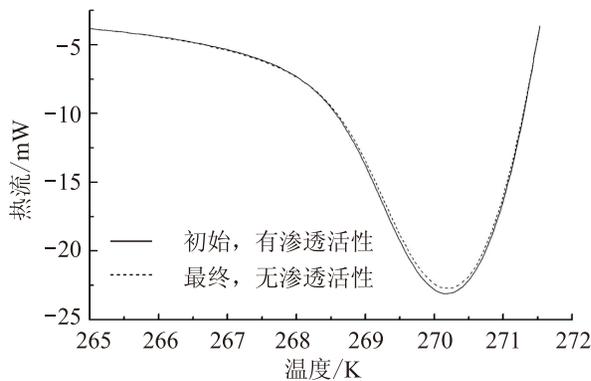


图1 红细胞在0.9%NaCl溶液中按照DSC方案以5°C/min冷却时, 初始和最终放热过程叠加的热流曲线

Fig.1 Superimposed heat flow thermograms measured in the initial and the final steps of the DSC cooling protocol for human erythrocytes are shown at a cooling rate of 5°C/min in 0.9% NaCl solution.

1.3 放热量转化为细胞体积

实验证明细胞在冷冻过程中的体积变化符合以下方程^[4]:

$$V(T) = V_0 - \frac{\Delta q(T)_{\text{dsc}}}{\Delta q_{\text{dsc}}} (V_0 - V_b) \quad (1)$$

DSC实验记录下细胞悬液(第3步)及失活细胞溶液(第7步)在同一DSC降温条件下的热流曲线, 用Origin 7.0软件对热流曲线交叠部分进行积分, 得到细胞悬液的总热量差 Δq_{dsc} , 对高于温度 T 的热流曲线交叠部分进行积分, 得到细胞悬液降至某一温度 T 时的热量差 $\Delta q(T)_{\text{dsc}}$ 。红细胞的初始体积(V_0)由BC 2800全自动三分群血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)测定, 约为 $95\mu\text{m}^3$ 。红细胞的非渗透性体积(V_b)由Boyle Van't Hoff关系式推算, 细胞在不同溶液中的体积与溶液的渗透压倒数呈线性关系, 通过延长直线使溶液渗透压达到无限大时, 即可求得红细胞的非渗透性体积(V_b)约为47.2%的 V_0 。

1.4 水分传递模型

Mazur等建立了细胞在冻结过程中水分运输的热力学模型, 细胞体积的变化由下式描述^[9-10]:

$$\frac{dV}{dT} = - \frac{L_p A_c R T}{B v_w} \times \quad (2)$$

$$\left[\ln \frac{(V - V_b - n_{\text{cpa}} v_{\text{cpa}}) / v_w}{(V - V_b - n_{\text{cpa}} v_{\text{cpa}}) / v_w + (\phi_s n_s + n_{\text{cpa}})} - \frac{\Delta H_f v_w \rho}{R} \left(\frac{1}{T_R} - \frac{1}{T} \right) \right]$$

$$L_p = L_{\text{pg}} [\text{cpa}] \times \exp \left[- \frac{E_{Lp} [\text{cpa}]}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right] \quad (3)$$

式中: V —细胞体积, μm^3 ; T —绝对温度, K; L_p —细胞膜对水的渗透率, $\text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$; $L_{\text{pg}}[\text{cpa}]$ —细胞膜在参考温度 T_R (273.15K)时对水的渗透率, $\text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$; $E_{Lp}[\text{cpa}]$ —水分渗透过程的表观活化能, kJ/mol; R —理想气体常数, 8.314 J/(mol·K); A_c —膜上水分运输的有效面积, μm^2 ; B —冷冻速度, K/min; v_w —水的偏摩尔体积, $18 \times 1012\mu\text{m}^3/\text{mol}$; V_b —细胞非渗透性体积, μm^3 ; n_{cpa} —细胞内的低温保护剂摩尔数, mol; v_{cpa} —低温保护剂的偏摩尔体积, $\mu\text{m}^3/\text{mol}$; ϕ_s —盐的溶解常数, 2; n_s —细胞内的溶质摩尔数, mol; 这可由初始细胞渗透率 C_i 及细胞中参与渗透过程的水分总体积($V_0 - V_b$)的乘积求得, ΔH_f —水的融化潜热, 333.88J/g; ρ —纯水密度, $1000\text{kg}/\text{m}^3$ 。

1.5 预测最佳冷却速率

最佳降温速度与细胞在某一温度下的含水量存在直接关系。由于细胞降温至 -30°C 时,胞内水分发生均相成核形成胞内冰,可认为细胞已停止渗透现象,因此实验选用 -30°C 作为参考温度,细胞在 -30°C 时束缚水含量可用下式计算:

$$W_{-30} = \frac{V_{-30} - V_b}{V_0 - V_b} \quad (4)$$

式中: V_{-30} — -30°C 时的细胞体积; W_{-30} — -30°C 时的细胞束缚水含量。

Mazur^[11]指出细胞束缚水含量超过细胞总含水量的10%~15%,胞内冰便会破坏细胞。这里将细胞冷冻到 -30°C ,按式(4)计算束缚水含量未超过细胞含水量的5%时的降温速度认定为细胞在特定保存液中的最佳降温速度。

1.6 数值方法和计算机模拟

将DSC实验得到的细胞体积变化数据代入方程(2)(3),运用MatLab软件中的Lsqnonlin函数(非线性最小二乘法)进行曲线拟合,可求解出红细胞在正常生理状态下及不同低温保护剂下的渗透性质($L_{pg}/L_{pg}[\text{cpa}]$ 及 $E_{Lp}/E_{Lp}[\text{cpa}]$)。

将红细胞在不同保存液中的渗透参数($L_{pg}[\text{cpa}]$ 及 $E_{Lp}[\text{cpa}]$)代入方程(2)(3),用MatLab软件中四阶Runge-Kutta法模拟细胞不同降温速度下(0.5~50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)的胞内水分流失状况。

2 结果

2.1 红细胞膜的渗透参数

红细胞在0.9%NaCl, 20%Me₂SO, 10%甘油, 20%甘油中以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率冷却时,体积随温度的变化曲线如图2所示。DSC实验得出的体积变化数据用最小二乘法进行曲线拟合,实验数据与拟合曲线的拟合度 $R^2 \geq 0.90$ 。

得到最小二乘法拟合曲线时的最佳匹配细胞膜渗透参数如表1所示。在生理条件下红细胞膜对水的渗透参数, L_{pg} 为 $1.69 \times 10^{-14} \text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$ ($T_R=273.15\text{K}$), E_{Lp} 为 345.72kJ/mol ($R^2=0.936$),此结果与Han等^[12]报道的生理条件下红细胞膜对水的渗透参数($L_{pg}=1.64 \times 10^{-14} \text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$ ($T_R=273.15\text{K}$), $E_{Lp}=279.25 \text{kJ/mol}$)相近。细胞膜渗透参数随着低温保护剂的加入而减少。在20%Me₂SO中, $L_{pg}[\text{cpa}]$ 为 $0.28 \times 10^{-14} \text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$ ($T_R=273.15\text{K}$), $E_{Lp}[\text{cpa}]$ 为 69.03kJ/mol ($R^2=0.913$); 在10%甘油中 $L_{pg}[\text{cpa}]$ 为 $0.18 \times 10^{-14} \text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$ ($T_R=273.15\text{K}$), $E_{Lp}[\text{cpa}]$ 为

83.68kJ/mol ($R^2=0.960$); 在20%甘油中 $L_{pg}[\text{cpa}]$ 为 $0.30 \times 10^{-14} \text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$ ($T_R=273.15\text{K}$), $E_{Lp}[\text{cpa}]$ 为 96.36kJ/mol ($R^2=0.987$)。这解释了渗透性低温保护剂如Me₂SO、甘油的保护机理,保护剂与水分子之间形成相互作用力,增进了细胞在低温环境中的持水能力,有效地遏制细胞在温度急剧下降时胞内水分的流失速率。

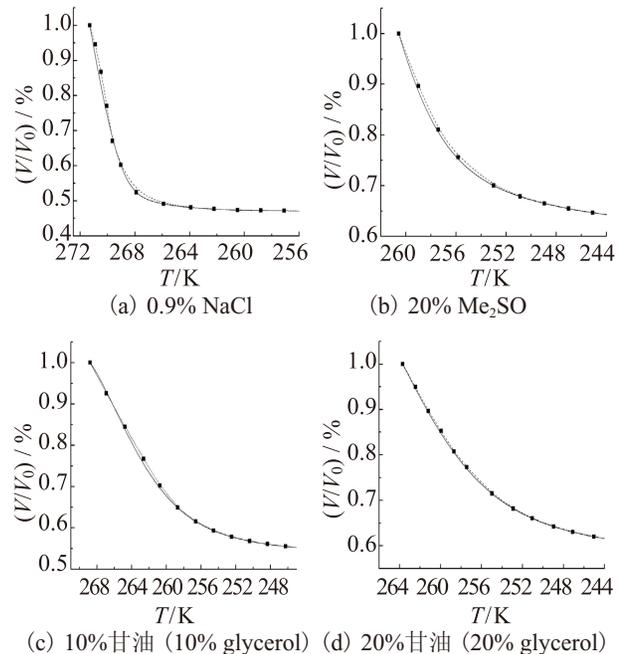


图2 红细胞在不同溶液中以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 冷却时体积随温度的变化曲线

Fig. 2 Volumetric response of human erythrocytes as a function of subzero temperatures in different media

表1 红细胞在特定溶液中细胞膜渗透参数的拟合值
Tab. 1 Fitted membrane permeability parameters for human RBCs in a given media

溶液	$L_{pg}/L_{pg}[\text{cpa}] \times 10^{14}$ / $(\text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s}))$	$E_{Lp}/E_{Lp}[\text{cpa}]$ / (kJ/mol)	R^2
0.9% NaCl	1.69	345.72	0.936
20% Me ₂ SO	0.28	69.03	0.913
10% 甘油	0.18	83.68	0.960
20% 甘油	0.30	96.36	0.987

2.2 红细胞的最优冷却速率

将表1中的渗透参数代入水分传递模型,红细胞在20%Me₂SO, 10%甘油, 20%甘油中以0.5, 1, 2, 5, 10, 20和50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 冷却至 -30°C 时束缚水的含量 W_{-30} 如表2所示。在20%Me₂SO中,降温速率为0.5, 1, 2, 5, 10, 20和50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时,束缚水含量为初始水分含量的0.25, 0.70, 1.59, 4.73, 20.83, 52.03, 79.27%。根据 W_{-30} 不超过细胞含水量的5%来确定最佳降温速度范围在5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 之间,再

经过不断迭代最终确定细胞在特定保存液中的最佳降温速度, 结果为在20% Me₂SO中红细胞的最佳降温速度为5.2℃/min, 按照同样的方法, 预测出在10%甘油及20%甘油中红细胞的最佳降温速度分别为5.5℃/min及4.6℃/min。

表2 红细胞在不同冷却速率下到达-30℃时束缚水的含量
Tab.2 The percentage of trapped water at -30℃ for human RBCs at various cooling rates in a given media

冷却速率 /(℃/min)	W ₋₃₀ /%		
	20%Me ₂ SO	10%甘油	20%甘油
0.5	0.25	0.16	0.26
1	0.70	0.45	0.66
2	1.59	1.03	1.48
5	4.73	3.76	6.15
10	20.83	30.29	32.22
20	52.03	61.88	62.14
50	79.27	84.19	84.12

3 讨论

虽然采用DSC方法确定红细胞的渗透参数和最佳冷却速率取得相对满意的结果, 但是该方法仍存在一定的误差。DSC方法是基于假设: 第二次冷却过程有足够高冷却速率, 可以使所有细胞溶解/失去渗透活性。然而, 由于DSC设备的限制, 能够达到的最高冷却速率约为200℃/min, 此冷却速率不能使所有红细胞溶解。因此, 建议第二次冷却过程能够重复几次以确保所有红细胞溶解, 减少在第三次冷却过程中放热量测量的误差。

本文受上海市重点学科项目(S30503)资助。(The project was supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project (No.S30503).)

参考文献

- [1] Devireddy R V, Raha D, Bischof J C. Measurement of Water Transport during Freezing in Cell Suspensions Using a Differential Scanning Calorimeter[J]. *Cryobiology*, 1998, 36(2): 124-155.
- [2] Alapati R, Stout M, Kubisch H M, et al. Water transport in epididymal and ejaculated rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm during freezing[J]. *Cryobiology*, 2008, 57(2):182-185.
- [3] Devireddy R V, Swanlund D J, Olin T, et al. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using

differential scanning calorimetry[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 222-231.

- [4] Thirumala S, Ferrer M S, Al-Jarrah A, et al. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents[J]. *Cryobiology*, 2003, 47(2): 109-124.
- [5] Alapati R, Stout M, Saenz J, et al. Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa[J]. *Cryobiology*, 2009, 59(2): 164-170.
- [6] Devireddy R V, Fahrig B, Godke R A, et al. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates[J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 67(4): 446-457.
- [7] Pinisetty D, Huang C, Dong Q, et al. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus*[J]. *Cryobiology*, 2005, 50(3): 250-263.
- [8] Devireddy R V, Swanlund D J, Roberts K P, et al. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(3): 764-775.
- [9] Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing[J]. *J Gen Physiol*, 1963, 47(2): 347-369.
- [10] Levin R L, Cravalho E G, Huggins C E. A membrane model describing the effect of temperature on the water conductivity of erythrocyte membranes at subzero temperatures[J]. *Cryobiology*, 1976, 13(4): 415-429.
- [11] Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos[J]. *Cell Biophys*, 1990, 17(1): 53-92.
- [12] Han X, Luo D, Cui X, et al. A modified differential scanning calorimetry method for determining water transport properties in biological cells during the freezing process[J]. *Cell Preserv Technol*, 2007, 5(1): 25-32.

通讯作者简介

周新丽, 女(1979-), 工学博士, 副教授, 上海理工大学生物系统热科学研究所, 021-55271167, Email: zjulily@163.com。研究方向: 低温生物医学、生物材料的冷冻干燥。

About the corresponding author

Zhou Xinli (1979-), female, Dr., Associate professor, Institute of Biothermal Technology, University of Shanghai for Science and Technology, 021-55271167, E-mail: zjulily@163.com. Research fields: Cryobiology, freeze-drying of biomaterial.