

平衡冷冻过程中细胞体积的确定

赵刚^① 何立群^① 王沛涛^② 丁卫平^① 解晓健^① 刘忠^③
张海峰^① 舒志全^① 罗大为^{①④} 高大勇^{①④}

(^①中国科技大学热科学和能源工程系, 低温生物医学工程研究所, 合肥 230027; ^②中国科技大学生命科学学院, 合肥 230027; ^③合肥红十字会输血中心, 合肥 230022; ^④ Department of Mechanical Engineering and Center for Biomedical Engineering, University of Kentucky, Lexington, KY40506, USA. E-mail: cooky@mail.ustc.edu.cn)

摘要 使用新型的电子粒子计数器(EPC)(Electronic Particle Counter, MultisizerTM 3, Beckman Coulter Inc., USA)测定了人 RBC(红细胞)在不同渗透压的 NaCl 溶液中的体积, 并使用冷冻过程细胞模型预测了 RBC 在生理盐水(0.9% NaCl 溶液)中平衡冷冻的体积变化. 假定温度对 RBC 的体积的影响相对渗透压而言可以忽略, 则通过 NaCl-H₂O 二元溶液的相图可获得不同温度下 NaCl 溶液的渗透压值(通过质量百分比浓度换算得到), 从而将计算的体积值与以上测量值相互验证.

关键词 EPC 渗透压 RBC Van't Hoff 细胞体积

定量测定细胞在冷冻过程中的生物物理反应对于优化低温冷冻保存或低温外科手术均有极其重要的意义^[1]. Mazur 的两因素假说指出: (i) 慢速冷冻过程中, 胞外溶液的结冰导致溶液的浓度增加, 从而引起细胞的收缩和脱水, 对细胞产生“溶液损伤”; (ii) 快速冷冻过程中, 胞内水来不及透过细胞膜渗出, 胞内溶液因过冷而结冰, 对细胞产生“胞内冰损伤”^[2,3]. 因此, 最优化的降温速率应该足够慢, 可以避免胞内冰的形成(IIF), 并且足够快, 可以避免细胞的严重脱水. 尽管一些物理模型和数学方程已经建立并且被用来预测细胞的体积的收缩与降温速率以及温度的关系^[4-6], 但是却缺乏可行的实验方案来测定冷冻过程中细胞的体积变化进而验证这类模型的准确性, 特别是对于较小的不规则形状 of 细胞(比如人红细胞和血小板), 这一困难更加突出. 虽然近年来随着低温显微镜技术的发展, 冷冻过程中单个球形细胞膜内外水的输运已被广泛研究^[7-10], 但是由于低温显微镜技术测定细胞体积变化过程的基本假定是细胞的二维面积可以转化为相应的球形三维体积, 对非球形细胞, 这一假定不成立, 因此不能获得非球形细胞在冷冻过程中的定量的体积变化信息.

Bischof 等发明了一种差示扫描量热仪 (DSC)方法, 可以间接测定冷冻过程中细胞的体积变化. 该方法利用 DSC 得到降温冷冻过程中溶液的放热曲线, 通过积分处理可以获得该过程中水的输运以及细胞的体积变化数据. 然而该方法本身并不能区分放热究竟是细胞外溶液的结冰还是细胞内溶液的结冰所

导致, 需要同时进行低温显微镜实验验证^[11]. 在本研究中, 我们利用新型的 EPC(电子粒子计数器, MultisizerTM 3, Beckman Coulter Inc., USA)测定了人 RBC(红细胞)在不同渗透压下的平衡体积, 假定相对渗透压而言温度对细胞的体积影响可以忽略, 则通过 NaCl-H₂O 二元溶液的相图, 可确定相应渗透压下二元溶液的平衡凝固点, 从而将体积值与温度值对应, 间接地验证了以上物理模型, 同时也说明了我们实验方案的可行性.

1 模型及数值模拟

1963 年, Peter Mazur 依据热力学基本原理导出了冷冻过程中细胞体积随温度变化的数学模型^[4], 1976 年, Levin 等改进了该模型并且成功地将其应用到人类红细胞的研究中^[11]. 在细胞悬浮液的冷冻过程中, 胞外溶液首先结冰, 这是由于细胞膜阻碍了冰晶向胞内的生长^[12], 胞外冰的出现导致了细胞膜内外水的化学势的差别, 促使胞内水透过细胞膜外流. 描述细胞体积减少的热力学模型如下^[11,12]:

$$\frac{dV}{dT} = \frac{L_p A_c R T}{B v_w} \left[\ln \frac{V - V_b}{V - V_b + \phi_s n_s v_w} - \frac{\Delta H_J}{R} \left(\frac{1}{T_{m0}} - \frac{1}{T} \right) \right], \tag{1}$$

$$L_p = L_{pg} \exp \left[- \frac{E_{L_p}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right], \tag{2}$$

其中 V 是细胞的体积, T 是绝对温度, L_{pg} 是细胞膜在参考温度 T_R 下对水的通透系数, E_{L_p} 是该渗透过程所需的表观活化能, R 是气体常数, B 是降温速率, A_c 是

对水的输运而言有效的细胞表面积, v_w 是水的偏摩尔体积, n_s 是细胞内溶质的总的物质的量, V_b 是细胞内非渗透性体积, $\phi_s = 2$ 是 NaCl 在水中的离解常数, ΔH_f 是冰的融解热(为与文献[1]一致, 在 $0 \sim -20^\circ\text{C}$ 温度范围内取为 335 mJ/mg), T_{m0} 为冰的熔点 273.15 K .

为了使用以上模型, 需要作以下假定^[1]: 胞外溶液相对细胞而言无限大, 忽略其浓度梯度; 对水的输运有效的细胞膜表面积可认为是常数 $A_c = A_0$; 胞内溶液为理想稀溶液; 细胞膜对水的通透系数随温度的变化符合 Arrhenius 关系(即(2)式); 冰的融解热在实验范围内可认为是常数(为与文献[1]一致); 忽略细胞膜内外的静压差.

为了充分满足平衡冷冻这一条件, 方程(1)左边取零, 其余参数的取值如表 1. 可计算得到不同温度 T 下, 细胞的体积值.

表 1 红细胞在平衡冷冻过程中的参数取值 ^[13]		
符号	数值	单位
V_0	74.42*	μm^3
V_b	40.34*	μm^3
n_s	1.08×10^{-14}	mol
L_{pg}	$17.3 \times 10^{-5} / (1.01325 \times 10^5)$	$\text{m/s} \cdot \text{Pa}^{-1}$
E_{L_p}	16.34×10^3	J/mol

* 数据取自本次实验结果

2 材料和方法

(i) RBCs 的获取及处理. 从合肥红十字会输血中心获取健康人红细胞, 在 24 h 内做 EPC 分析. 实验前将血浆除去, 重悬于经超滤(PALL-Gelman Laboratory, Super-200, $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜)的生理盐水中. 细胞洗涤的方法: 在 2000 g 将红细胞悬液离心 2 min (Hettich ZENTRIFUGEN, MIKRO 22 离心机), 除去上清液, 重悬于生理盐水中. 洗涤 2~3 次(最终细胞浓度约等于 3×10^8 个/mL).

(ii) 不同渗透压的 NaCl 溶液的制备. 将不同质量的 NaCl 溶解于去离子水(使用 KFLOW-R050ACB 水净化系统制备, KFLOW water system CO, LTD)中, 超滤(使用 PALL-Gelman Laboratory, Super-200, $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜), 制备出渗透压分别为 118, 185, 260, 302, 670, 863, 1349, 1583, 1741, 2252, 2682, 2800, 3186 mOsm 的 NaCl 溶液, 渗透压使用冰点渗透压计(Osmomat 030 cryoscopic osmometer, 误差 $\pm 5 \text{ mOsm}$, German)测量, 测量前分

别使用去离子水和 300 mOsm/kg 的标准 NaCl 水溶液校准.

(iii) 不同渗透压下, 人 RBCs 体积的测定. 本实验中使用 MultisizerTM 3 型 EPC(Beckman Coulter 公司全自动颗粒粒度分析仪, 又称电子粒子计数器, 简称 EPC)测定人 RBCs 的平均体积. 仪器工作过程中, 可将颗粒或细胞的电解液悬液自一口径已定的小孔抽引入小孔管(Aperture Tube), 因小孔管内外各有一电极, 当颗粒通过小孔进入管内时, 每一颗粒均会取代与其相等体积的电解液, 导致两电极间电阻呈现暂时性改变. 由于系统是恒电流设计, 故电位差亦暂时性改变, 造成脉冲讯号(Pulse Signal), 由脉冲的数目可测量颗粒的绝对数目, 电位差变化的幅度则与颗粒体积大小成正比例, 而与颗粒形状无关. 配合仪器专用软件(MultisizerTM 3 V3.33), 颗粒所产生的脉冲经放大、记录从而可得到颗粒数目和粒度结果, 这一结果可表示为颗粒的数目、体积、表面积百分比分布或累积分布(详见 MultisizerTM 3 Operator's Manual, PN 8321681 Rev. A).

分别取离心及洗涤过的红细胞加入到 50 mL 不同渗透压的 NaCl 溶液, 置于 50 mL 的烧杯中, 标号 1-13, 在室温下平衡 15 min. 使用 EPC, 分别测定以上样品中 RBCs 的平衡体积. 通过软件设定每次测量抽取 30000 个粒子, 每个样品重复 5 次测定(实验选用 EPC 专用的 $70 \mu\text{m}$ 小孔管, 实验前使用标准粒子 CC Size Standard L10 对仪器进行校正), 每次测定结束可使用软件统计功能模块, 得出 30000 个 RBCs 的平均体积, 作为这次测定的 RBC 体积数值, 最终取 5 次测量结果的平均值作为该渗透压下 RBC 的平衡体积.

3 结果与分析

3.1 NaCl 溶液的渗透压与凝固点的关系

渗透压分别为 118, 185, 260, 302, 670, 863, 1349, 1583, 1741, 2252, 2682, 2800, 3186 mOsm 的 NaCl 溶液, 其质量百分比浓度分别为 0.34, 0.54, 0.75, 0.88, 1.92, 2.46, 3.80, 4.43, 4.85, 6.18, 7.27, 7.57, 8.52%. 图 1 为根据文献[14]的数据得出的 NaCl 溶液的凝固点与质量百分比浓度之间的二次曲线关系, 根据拟合公式可以得到以上百分比浓度下 NaCl 溶液的凝固点分别为 $-0.26, -0.36, -0.47, -0.54, -1.11, -1.42, -2.23, -2.64, -2.92, -3.88, -4.70, -4.93, -5.70^\circ\text{C}$.

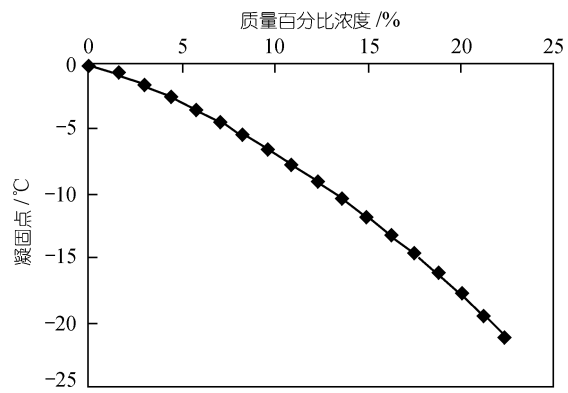


图 1 NaCl 溶液的凝固点与质量百分比浓度的关系
 $y = -0.0199x^2 - 0.4877x - 0.0945, R^2 = 0.9998$

3.2 红细胞 V_b 的获得

图 2 表明实验中所得到的无量纲化红细胞体积 (与等渗体积相比) 与无量纲化渗透压 (与等渗渗透压值 302 mOsm 相比) 的倒数具有很好的线性关系. 根据文献 [3] (P34) 中所述, Van't-Haff 方程可写为 $\overline{V}_c = (1 - \overline{V}_b) / \overline{\Pi} + \overline{V}_b$, 其中 $\overline{V}_c$ 为无量纲化细胞体积, $\overline{V}_b$ 为无量纲化细胞的非渗透性体积, $\overline{\Pi}$ 为无量纲化渗透压. 将图中直线延长至渗透压无穷大处, 可得 $V_b = 54.2\%V_0$.

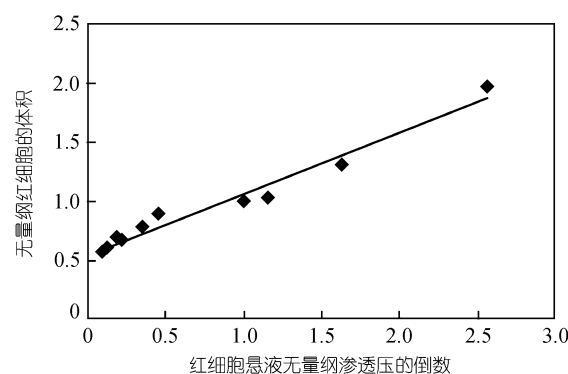


图 2 EPC 方法测得不同渗透压下红细胞体积
 $y = 0.5225x + 0.5417, R^2 = 0.9713$

3.3 冷冻过程中红细胞体积随温度的变化

图 3 为冷冻过程中红细胞体积随温度的变化关系, 其中实线为根据模型计算所得, 数据点为 EPC 方法间接测得. 从图中结果可以看出, 两者符合的很好. 根据 EPC 结果, 当溶液的渗透压大于 2500 mOsm 时, 红细胞的体积基本不再收缩, 与文献 [15] 一致. 最终红细胞的体积为等渗体积的 57% 左右, 与本课题组

使用 DSC 方法测定的结果相当 (约为 52%, 未发表). 从图中结果还可看出, 平衡冷冻过程中红细胞胞内水向外的输运过程主要集中在 0 ~ -4℃ 范围.

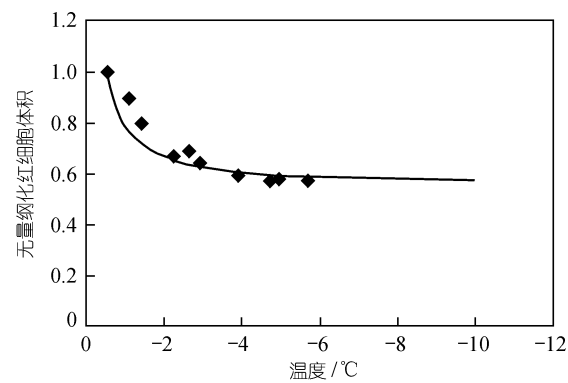


图 3 冷冻过程中红细胞体积随温度的变化

3.4 实验误差分析

根据实验方案, 本实验的准确性取决于溶液渗透压和 RBC 体积的测量. 渗透压计和 EPC 在每次测量前均使用标准样品进行校正, 同时 EPC 方法测量的 RBC 体积又是 30000 个左右红细胞体积的平均值 (由于人体内红细胞形态和大小之间本身就存在差异, 因而这一测量值更有代表性), 能反映平均效应. 通过以上方法可以最大限度保证测量结果的准确性.

4 结论

(i) 使用新型的电子粒子计数仪 (EPC) 测定了人红细胞 (RBC) 在不同渗透压下的体积, 根据食盐-水二元溶液的相图得到平衡冷冻生理盐水至该渗透压下的温度, 从而将常温体积数据与描述平衡冷冻过程的细胞体积响应的模型计算结果进行了比较, 两者符合的很好. 给出了常温下间接测定平衡冷冻过程中细胞体积变化的一种方法. 该方法的最大优点是不受细胞本身大小及形状的限制, 相对相应的低温实验而言更简单、快捷. 应该指出, 对于具有较大 L_p 值的细胞 (比如人红细胞和血小板等), 只要冷冻过程的降温速率不是很大, 可以保证细胞能够及时脱水而与胞外溶液始终处于渗透平衡的条件, 这一方法总是适用的. 亦即该方法不仅适用于平衡冷冻, 同时也有条件适用于准平衡冷冻过程细胞体积响应的间接预测. 只是对后者而言, 应针对不同的细胞先进行粗略的实验评估, 定性了解该细胞的细胞膜特定的渗透性参数 (测定细胞膜渗透性参数的方法见文

献[16~18]), 才能准确量化对于该细胞的准平衡降温过程降温速率的上限, 超出这一上限, 本文的研究方法将不再适用.

(ii) 本文采用 EPC 方法, 通过常温实验间接验证了平衡冷冻过程中模型对于非标准形状(非球形或近似球形)细胞的适用性. 在生物细胞、组织或器官的低温保存过程中, 不仅存在平衡冷冻和准平衡冷冻, 非平衡冷冻亦有广泛应用, 这正是进一步的研究方向. 非平衡冷冻过程中, 细胞内水分未能及时透过细胞膜渗出, 随着进一步的降温, 这些被束缚在细胞内的水分将可能部分或全部结冰(取决于降温速率以及低温保护剂的种类和浓度), 细胞可能经历“胞内冰损伤”, 这是该过程与平衡冷冻过程的本质区别, 这一过程将不能直接使用本文的方法进行研究. 非平衡冷冻过程是一细胞外环境连续变化的过程, 这一过程中细胞外溶液将随着温度的降低, 结冰量不断增加, 溶液的渗透压也不断的增加, 同时细胞膜对水的渗透性参数发生变化(不考虑溶液中含低温保护剂的情况), 因而即使能够在常温下依靠 EPC 动态模拟细胞外环境中渗透压改变的过程, 由于细胞膜的渗透性参数的改变不能动态模拟, 本文的方法也不能完全描述这一条件下冷冻过程中细胞的体积响应.

(iii) 迄今为止, 除了最简单的细菌、微生物等之外, 绝大多数细胞的低温保存过程中, 溶液中都需要添加一定浓度的低温保护剂(CPA)^[3], 胞外溶液由食盐-水二元系统变为食盐-水-CPA 三元系统. 对于三元细胞悬浮液平衡、准平衡冷冻过程, 本文的方法依然适用, 只需将文中实验部分的二元溶液换成相应的三元溶液, 重复以上实验, 测定细胞在不同渗透压的三元溶液中的平衡体积. 值得注意的是, 对渗透性和非渗透性 CPA 处理方法不同, 细胞在三元系统中平衡之后, 渗透性 CPA 由于能够渗透细胞膜, 在细胞内外没有浓度差; 而对于非渗透性 CPA 而言, 由于其本身不能透过细胞膜, 所以在细胞内外存在确定的且维持不变的浓度差, 这一浓度差所产生的渗透压差需要依靠细胞的进一步失水增加细胞内食盐的浓度来消除. 平衡之后, 渗透性 CPA 与水的效果类似, 仅仅相当于置换了细胞内一定量的水; 非渗透性 CPA 与细胞外食盐的效果类似, 相当于增加了细胞外食盐的浓度. 无论前者, 还是后者, 我们只需根据三元溶液的相图, 使用 EPC 方法模拟出平衡或准平衡冷冻至某一温度时细胞所处的溶液环境, 即可

完成细胞体积变化的间接测定.

致谢 本工作为中国科学院“百人计划”(2000~2003)、国家自然科学基金(批准号: 50106016)和安徽省自然科学基金(批准号: 00047520, 03043717)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Ramachandra V D, Debopam R, Bischof J C. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. *Cryobiology*, 1998, 36: 124~155
- 2 Mazur P. *Cryobiology: The freezing of biological systems*. Science, 1970, 168: 939~949
- 3 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994, 16
- 4 Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*, 1963, 47: 347~369
- 5 Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, 1990, 17: 53~92
- 6 Toner M, Cravalho E G, Karel M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. *J Biomech Eng*, 1993, 115: 169~174
- 7 Cosman M D, Toner M, Kandel J, et al. An integrated cryomicroscopy system. *Cryo-Letters*, 1989, 10: 17~38
- 8 Diller K R, Cravalho E G. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing process in biological systems. *Cryobiology*, 1970, 7: 191~199
- 9 Diller K R. Quantitative low temperature optical microscopy of biological systems. *J Microsc*, 1982, 126: 9~28
- 10 郭申义, 姚柯敏, 华泽钊. 大型低温生物显微镜系统的研制. *仪器仪表学报*, 1988, 9(1): 90~93
- 11 Levin R L, Cravalho E G, Huggins C G. A membrane model describing the effect of temperature on the water conductivity of erythrocyte membranes at subzero temperatures. *Cryobiology*, 1976, 13: 415~429
- 12 Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 1984, 143: C125~142
- 13 David S, Victor W S, Solomon A K. Osmotic properties of human red cells. *J Gen Physiol*, 1964, 48: 79~86
- 14 马庆芳, 方荣生, 项立成, 等. 实用热物性性质手册. 北京: 中国农业机械出版社, 1986, 868~869
- 15 John F, Woolgar A E. Human red Cells under hypertonic Conditions: a model system for investigating freezing damage. *Cryobiology*, 1972, 9: 9~15
- 16 Woods E J, Liu J, Gilmore J A. Determination of human platelet membrane permeability coefficients using the kedem-matchalsky formalism: estimates from two-vs three-parameter fits. *Cryobiology*, 1999, 38: 200~208
- 17 Gao D Y, Benson C T, Liu C. Development of a novel microperfusion chamber for determination of cell membrane transport properties. *Biophysical Journal*, 1996, 71: 443~450
- 18 Liu C, Benson C T, Gao D Y. Water permeability and its activation energy for individual hamster pancreatic islet cells. *Cryobiology*, 1995, 32: 493~502

(2002-11-22 收稿, 2003-01-28 收修改稿)