

海藻酸钠水溶液和海藻酸钙水凝胶冻结行为的低温显微研究

向兴雪¹, 刘志峰¹, 赵刚²

(1.中国科学技术大学热科学和能源工程系, 合肥市 230027; 2.中国科学技术大学电子科学与技术系, 合肥市 230027)

(Tel: 0551-63601810, Email: lzf123@ustc.edu.cn or zhaog@ustc.edu.cn)

摘要: 海藻酸钙水凝胶微球封存是细胞低温保存中的一种新型方法。海藻酸钙水凝胶微球由海藻酸钠水溶液和氯化钙溶液交联形成, 在低温保存过程中冰晶的生成会造成极大的细胞损伤, 研究不同影响因素对海藻酸钠水溶液及海藻酸钙水凝胶的冻结行为的影响十分必要。本实验借助低温显微镜, 对不同浓度、添加0.05%质量分数氧化石墨烯的海藻酸钠水溶液及海藻酸钙水凝胶的冻结行为进行观察。实验表明: 0.05%质量分数氧化石墨烯的加入使得海藻酸钠水溶液的冰晶起始温度提高; 随着海藻酸钠水溶液浓度的提高, 冰晶起始生长温度降低, 冰晶面积随浓度变化关系非单调, 浓度 2.0% (w/v) 时冰晶面积最小, 为 $23.5\mu\text{m}^2$; 相应的, 海藻酸钙水凝胶的冰晶起始生长温度也降低, 且冰晶面积单调减小, 冰晶数量增多。因此, 在细胞低温保存中应用2.0w/v%的海藻酸钠水溶液及相应的水凝胶, 可减少对细胞的冰晶损伤。

关键词: 冰晶; 海藻酸钠浓度; 交联状态; 氧化石墨烯

Low-Temperature Microscopy of Freezing Behavior of Alginate Aqueous Solution and Calcium Alginate Hydrogel

Xiang Xingxue¹ Liu Zhifeng¹ Zhao Gang²

(1.Department of Thermal Science and Energy Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230027;

2.Department of Electronic Science and Technology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

Abstract Storing the cell via microspheres of calcium alginate hydrogel is a novel cryopreservation method for organisms stowing. The microspheres of calcium alginate hydrogel are obtained by cross-linking an aqueous sodium alginate solution with a calcium chloride solution. During the cryopreservation, the formation of ice crystals will cause significant damage to the cells. Therefore, it is essential to evaluate the ice formation behavior of sodium alginate aqueous solutions and calcium alginate hydrogels during cooling. In this experiment, the freezing behavior of sodium alginate aqueous solution and calcium alginate hydrogel with different concentrations and the sodium alginate aqueous solution with addition of 0.05wt% graphene oxide was observed by means of cryomicroscopy. Results indicated that, the addition of 0.05wt% graphene oxide made the initial temperature of ice crystals of sodium alginate aqueous solution increased. And with the increased concentration of sodium alginate aqueous solution, the initial growth temperature of ice crystals will decrease, and the ice crystal area will change non-monotonically. The ice crystal area is small at 2.0% (w/v), which is $23.5\mu\text{m}^2$; correspondingly, the ice crystal initial growth temperature of the calcium alginate hydrogel was also decrease, and the ice crystal area also reduced uneventfully, and the number of ice crystals was increased. Therefore, the application of a 2.0w/v% sodium alginate solution and the corresponding hydrogel in the cryopreservation of cells can reduce the ice crystal damage to the cells.

Keywords Ice crystal, Sodium alginate concentration, Cross-linked state, Graphene oxide

0 前言

低温医学主要研究低温对人体的影响,以及低温技术在医疗中的应用。主要是人体重要细胞、组织、器官的低温保存、低温手术及其他临床应用等。近年来发展的对胚胎、干细胞等的低温保存及成功移植、利用低温损伤发展的液氮冷刀、利用人体在低温下的低代谢创办的低温麻醉等,在带来巨大经济效益的同时低温生物学也蓬勃发展。

低温保存使得生物体的保存时间更长久,生物体内的生化活动大部分由酶催化反应,低温可降低酶活性和代谢活动,使得生物体氧耗量减少、代谢率降低,对体内循环暂定的忍耐时间加长。理论上,在 -79°C 时生物体内酶的活性近乎停止,而在 -196°C (液氮温度)中保存的生物体新陈代谢和生长活动几乎完全停止^[1],而细胞活力和形态发生的潜能仍保留,可长期保存。黄友章等人对在液氮中保存了 21-25 年的细胞进行试验,发现回收后细胞形态和回收活力良好^[2]。证明细胞经长期冷冻保存后是具有实际意义的。在保存过程中生物体主要经历了从生理温度降至低温保存温度,保存一定时间后再复温至生理温度,进而投入使用的过程。保存中难免会带来一系列的损伤,细胞在降温过程中因为冰晶会遭受两大主要损伤:即因细胞缩水与胞内冰形成的溶质损伤与溶液损伤^[3],而在复温过程也会经历再结晶与重结晶等,给细胞带来不可逆转的伤害。因此如何避免或减轻这些冰晶带来的不利损伤是细胞保存中重要的问题。

水凝胶由其良好的生物相容性、生物降解性等优点被广泛应用在多个领域^[4],新型水凝胶可具备高强度, pH、温度、湿度等响应的优点,在生物医学中也可用于组织工程、器官修复、药物释放等^[5-6]。目前最新发展的低温保存生物样本的方法之一即是用水凝胶微球对细胞与保护剂进行封装^[7-9],使细胞处于保护剂中,水凝胶微球的负载可保护细胞免受外界冰晶等因素的破坏。

海藻酸钠是由褐藻中获得的一种天然多糖,由 $\beta\text{-D}$ -甘露糖醛酸(M)和 $\alpha\text{-L}$ -古罗糖醛酸(G)构成。作为一种天然高分子材料,海藻酸钠具有良好的生物相容性,原料丰富、易得且价格低廉,广泛应用于组织工程及载药释药等领域。当海藻酸钠遇见二价阳离子,如 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 等,会发生离子移变,转变为既具有强度性又具有弹性的凝胶(一种介于固态和液态之间的状态),海藻酸钠溶液通常与二价钙离子交联形成“蛋盒状”的海藻酸钙水凝胶,具有性质稳定、无毒无刺激、有一定强度和可塑性等特点^[10],海藻酸钙凝胶微球是海藻酸钙凝胶的特殊形式,是海藻酸钙凝胶的一种重要的应用形态。

此外,海藻酸钠持水性强,可一定程度减少冰晶形成,将海藻酸钠应用于细胞低温保存,用海藻酸钙水凝胶微球封装细胞可减少降温过程中冰晶的形成对细胞造成的损伤^[11]。进一步探索最优的海藻酸钙水凝胶微球原料配比,比如海藻酸钠浓度等是有必要的。

氧化石墨烯是一种性能优异的新型碳材料,由石墨粉经强氧化再加水分解得到的,是石墨烯重要衍生物之一。具有较高的比表面积和表面丰富的官能团。其新颖的物理化学特性,使得氧化石墨烯在多个领域都有广泛的应用^[12-13],因此基于氧化石墨烯的各方面探索也成为研究热点。在低温保存领域,有研究者发现,氧化石墨烯具有抑制冰晶形成的作用^[14],保护剂溶液中氧化石墨烯的存在使得冰晶形成受阻,减少冰晶产生,进而提高细胞保存活性。

因此本文将研究不同影响因素如海藻酸钠浓度、氧化石墨烯的加入对低温环境中海藻酸钠水溶液的冻结行为影响,同时研究交联后海藻酸钙水凝胶的冻结行为。借助低温显微镜观察其结晶情况,得出一定规律,为低温保存后续探索实验的选择及优化提供一定基础。

1 实验准备

1.1 实验材料

海藻酸钠、氧化石墨烯、D-甘露醇、 CaCl_2 、HEPES 缓冲液、过滤水、200nm 硅胶垫片。

使用海藻酸钠、D-甘露醇与过滤水制备海藻酸钠浓度为 1.0 w/v %、1.5 w/v %、2 w/v % 和 2.5 w/v % 的水溶液。其中 D-甘露醇作用为调节渗透压。

使用海藻酸钠、氧化石墨烯、D-甘露醇与过滤水制备加入 0.05% (质量分数) 的海藻酸钠浓度为 1.0 w/v %、1.5 w/v %、2 w/v % 和 2.5 w/v % 的溶液。

使用 CaCl_2 、HEPES 缓冲液、过滤水制备 0.12M 的 CaCl_2 溶液。

1.2 主要仪器

低温显微镜: 实验所用的低温显微系统如图 1, 包括 Olympus BX53 低温显微镜, 高速 CCD, 程序降

温仪，其中对生物样本实施冷热传导的为冷热台，相当于一个换热腔，对样本进行降复温处理。其中，冷源来自于液氮，通过控制液氮流量来调控降温速率及温度，低温液氮通入冷热台中，使得冷热台上方的生物样本冷却；而热源来自冷热台内部的电加热丝，通过控制电加热功率控制升温，使生物样本得到热量。



图 1 低温显微镜系统结构

1.3 降温程序

利用低温显微镜调控样本温度，控温程序如表 1，快速降温前在 -1°C 平衡 2 分钟，消除热历史的影响。

表 1 低温显微镜降温程序

命令	参数 1	参数 2
保持	20°C	—
保持	-1°C	—
等待	2 min	—
降温	-120°C	$50^{\circ}\text{C}/\text{min}$
升温	20°C	$100^{\circ}\text{C}/\text{min}$

1.4 实验方法

海藻酸钠水溶液/海藻酸钠-氧化石墨烯水溶液处置方法: 将 200nm 厚的硅胶垫片剪出直径 2cm 的圆孔，置于载玻片上，取 8 μL 海藻酸钠水溶液滴于硅胶垫片圆孔中央的载玻片上，盖上盖玻片，被压扁的液滴直径约 7mm，远小于硅胶垫片圆孔大小，使液滴边缘不接触硅胶垫片，避免液滴厚度对实验观测带来的影响。

海藻酸钙水凝胶处置方法: 将 200nm 厚的硅胶垫片剪出直径 2cm 的圆孔，置于载玻片上，取 150 μL 海藻酸钠水溶液均匀填入硅片圆孔中，盖上盖玻片，放置在氯化钙溶液中，交联 12h。交联后得到直径 2cm 的水凝胶，取中间直径 1cm 部分进行实验观察，以避免硅胶垫片造成的边缘效应，同时避免水凝胶厚度对实验观测带来的影响。

2 实验结果

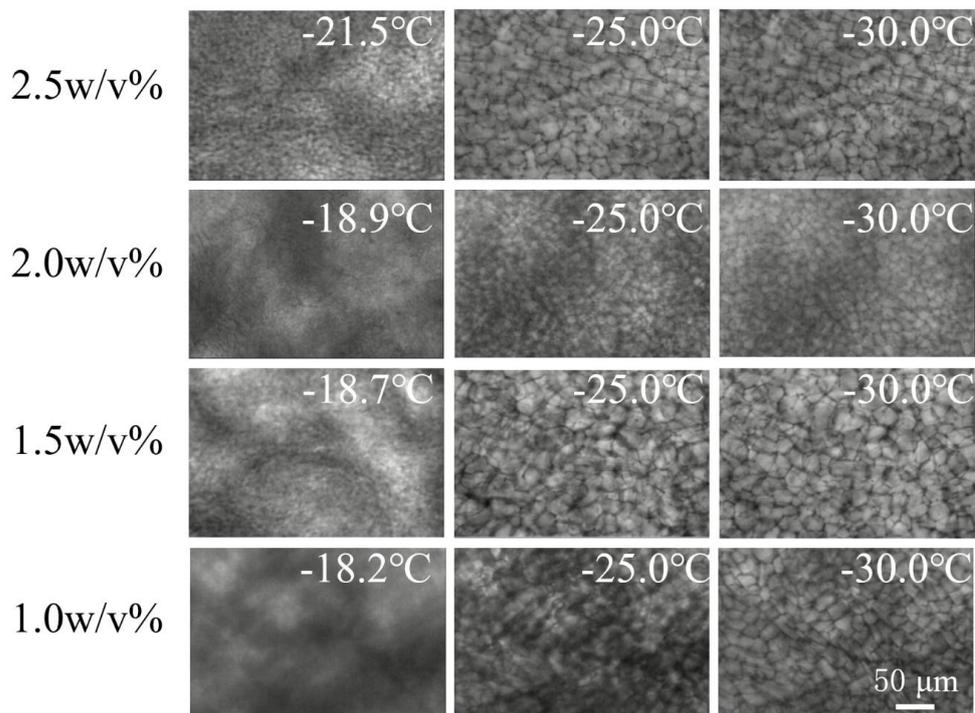


图 2 不同浓度海藻酸钠水溶液的冻结显微镜图像

图 2 是不同浓度海藻酸钠水溶液在不同温度下的 20 倍放大显微图像，图中第一列显示了溶液中冰晶起始生长温度及相应图像，第二列和第三列显示了冰晶逐渐生长至稳定的图像。由图 2 可看出，随着海藻酸钠水溶液浓度递增，溶液的起始冻结温度逐渐降低。原因可能是随着浓度的增加，海藻酸钠分子之间的接触、链段之间的缠结更加紧密^[15]，阻碍了冰晶的生长，从而需要更高的过冷度驱动才能使晶核超过晶核临界尺寸进而迅速生长。

表 2 冰晶平均尺寸

序号	海藻酸钠浓度/ (w/v)	面积/ μm^2
1	1.0%	37.8
2	1.5%	50.2
3	2.0%	23.5
4	2.5%	38.5

表 2 给出了冰晶完全生长稳定后，对其面积进行测量的结果。可看出冰晶面积随海藻酸钠浓度变化关系复杂，呈非单调特性。当海藻酸钠浓度为 2.0% (w/v) 时，冰晶面积为 $23.5 \mu\text{m}^2$ ，小于其它浓度组。由此，当水凝胶封装细胞时，内部可能残留的未交联的 2.0% (w/v) 海藻酸钠水溶液会形成较小面积的冰晶，从而对细胞伤害也较小。

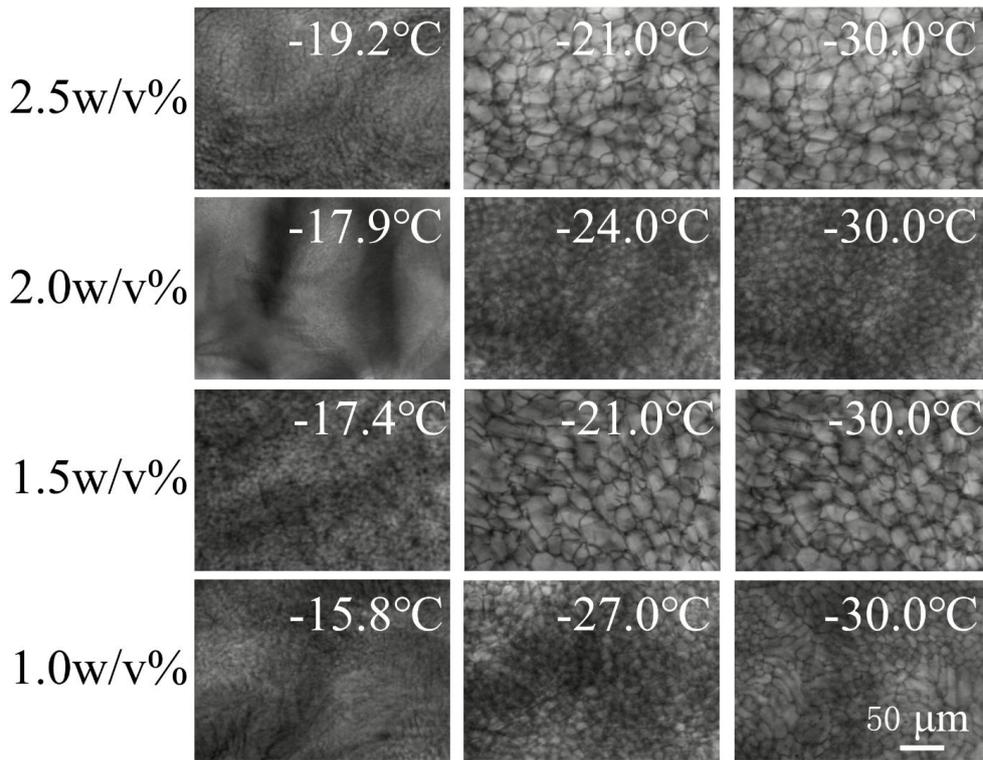


图3 不同浓度海藻酸钠+氧化石墨烯水溶液的冻结显微镜图像

图3为混合溶液，即不同浓度的海藻酸钠水溶液中加入0.05%质量分数氧化石墨烯溶液的冻结显微图像，与图2对比冰晶起始温度，如表2，可以看出每个浓度组的冰晶起始生长温度均提高，说明0.05%质量分数氧化石墨烯的存在促进了冰晶的生长，与文献中抑制冰晶的结论不符，原因可能是当氧化石墨烯与海藻酸钠水溶液混合时，其最佳冰晶抑制浓度并非0.05%质量分数，当加入的氧化石墨烯浓度不适宜时，氧化石墨烯的存在反而会成为溶液中多余的“杂志”，为冰晶生长提供更多成核点，增加冰晶成核机会，降低冰晶成核势垒，因此在降温过程中冰晶生长提前，起始温度增加。

表2 不加/加氧化石墨烯的海藻酸钠水溶液冻结冰晶起始温度对比

浓度 参数	1.0w/v%	1.5 w/v %	2.0 w/v %	2.5 w/v %
不加氧化石墨烯	-18.2	-18.7	-18.9	-21.5
加入氧化石墨烯	-15.8	-17.4	-17.9	-19.2
变量	+2.4	+1.3	+1.0	+2.3

对稳定生长后的冰晶面积进行测量，结果如表3，可以看出，冰晶面积随海藻酸钠浓度变化关系复杂，呈非单调特性。当海藻酸钠浓度为2.0% (w/v) 时，冰晶面积为 $19.8\mu\text{m}^2$ ，小于其它浓度组。由此可见，加入0.05%质量分数氧化石墨烯后，冰晶尺寸最小的浓度组与不加氧化石墨烯的海藻酸钠水溶液结论一致，均为2.0% (w/v)，因此更加证明2.0% (w/v) 浓度的海藻酸钠水溶液是比较适宜的选择，可以形成较小面积的冰晶，从而对细胞伤害也较小。

表3 冰晶平均尺寸

序号	海藻酸钠浓度/ (w/v)	面积/ μm^2
1	1.0%	34.0
2	1.5%	56.3
3	2.0%	19.8
4	2.5%	40.4

在后续研究中，将改变氧化石墨烯的添加浓度，得出氧化石墨烯浓度对海藻酸钠水溶液冻结过程的结

冰影响，得出抑制冰晶生长最佳的浓度配比。

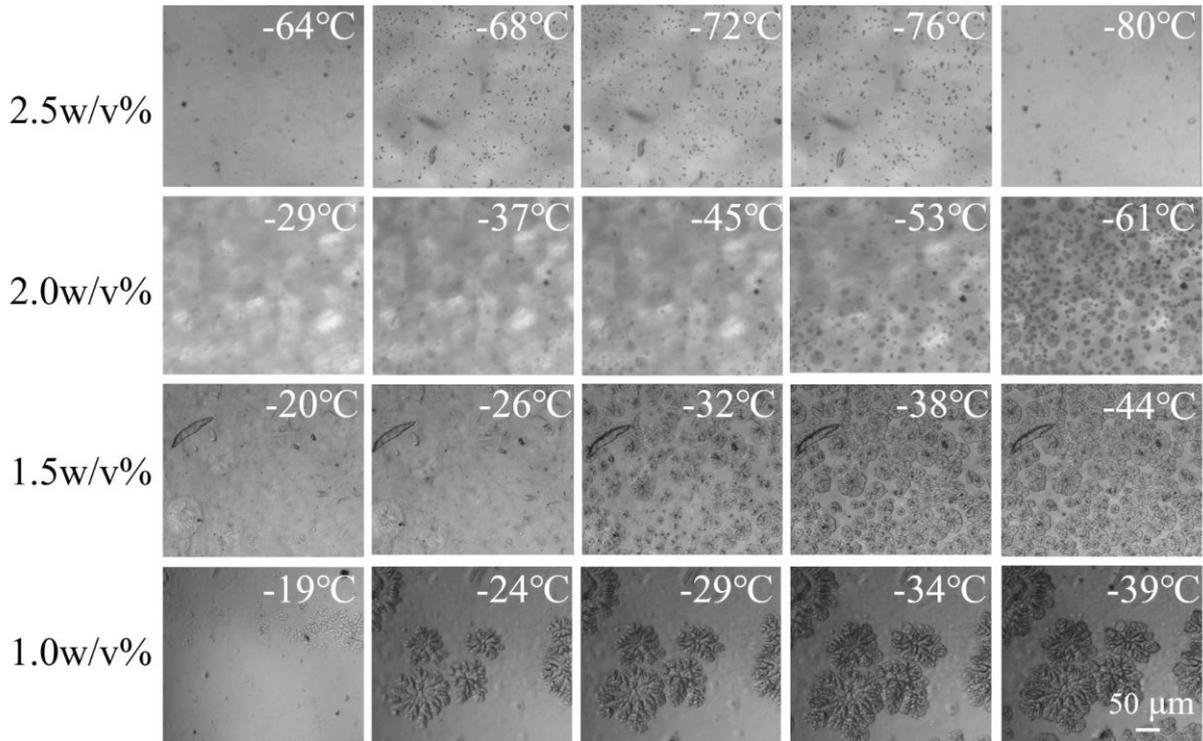


图 4 不同浓度海藻酸钠溶液交联后得到的凝胶冻结显微图像

海藻酸钠溶液与氯化钙溶液交联后形成海藻酸钙水凝胶。图 4 显示了由不同浓度海藻酸钠溶液交联后得到的凝胶冻结显微图像。从中可以看出，随着海藻酸钠浓度的增加，冰晶起始生长温度降低，整个冰晶生长过程所处的温度段下移，该现象与图 2 所显示的一致，浓度的增加使得海藻酸钠内部分子和链段的相互接触与缠结更加紧密，从而使得冰晶生长更加困难。

此外，从冰晶尺寸与数量上看，在海藻酸钠浓度为 1.0% (w/v) 时，单个冰晶尺寸最大并且数量最少。随着海藻酸钠浓度增加，形成的冰晶尺寸减小，同时冰晶数量增多。这是因为在海藻酸钠浓度低时，溶剂水的百分比大，溶液中钠离子少，因此与钙离子发生交换的数量也少，交联后形成的凝胶较为稀疏，凝胶中含水量大，因此形成的冰晶尺寸大，而大尺寸单个冰晶吸收的冷量大，由能量均分原理可知生成的冰晶数量少。当海藻酸钠浓度增加时，海藻酸钠内部链段彼此缠结更加紧密，溶胀后形成更为致密的网状结构，凝胶中含水量低，水分子在凝胶中的分布少，因此由水固化形成的冰晶尺寸小，而同时整个冰晶生长温度变低，更低的温度环境使得冰晶吸收总冷量变多，而单个冰晶尺寸小吸收冷量少，因此有更多数量的小冰晶形成。在海藻酸钠浓度为 2.5% (w/v) 时，冰晶的尺寸最小且数量最多。海藻酸钠浓度越高，其对应的凝胶所生成的冰晶尺寸越小，对细胞保存越有利，但是过高浓度会导致水凝胶出现拉伸强度低等问题。

综合以上实验结果，当海藻酸钠浓度为 2.0% (w/v) 时，在冻结过程中其形成的冰晶尺寸小，用该浓度溶液制备水凝胶微球封装细胞，对细胞的保护作用强。

3 结论

本文通过低温显微镜分别对海藻酸钠水溶液和海藻酸钙水凝胶的冻结行为进行观察。研究了不同浓度海藻酸钠与氧化石墨烯的加入对海藻酸钠水溶液的影响，结果发现 0.05% 质量分数氧化石墨烯的加入使得冰晶起始温度提高，促进了冰晶的生长。无论加入或不加入氧化石墨烯的海藻酸钠水溶液，随着海藻酸钠浓度的增加，水溶液的起始冻结温度都单调降低，所形成的冰晶尺寸并不单调变化，在浓度为 2.0% (w/v) 时，所形成的冰晶尺寸最小。对海藻酸钙水凝胶而言，随海藻酸钠浓度增加，所制备的水凝胶起始冻结温度单调降低，而所形成的冰晶尺寸也单调减小，数量单调增加。

应用浓度为 2.0w/v% 的海藻酸钠溶液制备水凝胶微球封装细胞，其交联与不交联形成的冰晶尺寸都较小，能减少水凝胶微球本身的结冰，从而可以减小冰晶对细胞的损伤，增强对细胞的保护作用，提高细胞低温保存中的存活率。

本实验只研究了单一成分的海藻酸钠溶液及片状海藻酸钙水凝胶的冻结现象,并由此得到了适合细胞低温保存的溶液参数。后续将就多组分溶液和水凝胶微球的冻结特性及在细胞低温保存中的应用开展深入的实验研究。且本文只探究了 0.05% 质量分数氧化石墨烯对海藻酸钠溶液的结晶影响,在后续实验中将改变氧化石墨烯浓度,并探究不同浓度氧化石墨烯添加在海藻酸钙水凝胶中对其的冻结影响。

当完成溶液的基础研究后,将进行细胞实验,在实际生物实验中检测其适用性。

参考文献:

- [1] 王华,杜立业,李华. 微生物液氮超低温保存研究进展. 食品与生物技术学报, 2011, 30 (1): 1-5
- [2] 黄友章,沈建良,宫立众,郑培浩,刘毅,尹文杰,岑坚,王宁,赵德峰. 骨髓细胞液氮保存 21-25 年后的细胞活力体外研究. 中国实验血液学杂志, 2010, 18 (1): 224-229
- [3] Mazur, P. A two-factor hypothesis of freezing injury. 1972
- [4] 李志勇. 改性海藻酸钠凝胶的制备及性能研究. 江南大学, 2008
- [5] 陈涛,姚康德. 可注射水凝胶在组织工程中应用进展. 化工进展, 2004, 23 (8): 827-831
- [6] 林浩,田华雨,孙敬茹,庄秀丽,陈学思,李悦生,景遐斌. 温度敏感的 PLGA-PEG-PLGA 水凝胶的合成、表征和药物释放. 高等学校化学学报, 2006, 27 (7): 1385-1388
- [7] 房坤. 磁响应 PLGA 载药微球的制备及其应用于肿瘤热化疗的基础研究. 东南大学, 2017
- [8] 李培培,李小芳,向志芸,周维,李平,林浩. 维海藻酸钠-魔芋葡甘聚糖结肠靶向凝胶微球制备及体外释药研究. 亚太传统医药, 2016, 12 (4): 21-25
- [9] 严丽华,郭圣荣. 海藻酸钠微球的制备及其应用进展. 绿色科技, 2017, (24): 144-147
- [10] 陈蕾,罗志刚,何小维. 海藻酸钠在医学工程上的应用研究进展. 医疗卫生装备, 2008, 29 (9): 33-35
- [11] Liu, X. L., Zhao, G., Chen, Z. R., Panhwar, F., He, X. M. Dual Suppression Effect of Magnetic Induction Heating and Microencapsulation on Ice Crystallization Enables Low-Cryoprotectant Vitrification of Stem Cell-Alginate Hydrogel Constructs. *Acs Appl Mater Inter*, 2018, 10 (19): 16822-16835
- [12] 傅强,包信和. 石墨烯的化学研究进展. 科学通报, 2009, 54 (18): 2657-2666
- [13] 匡达,胡文彬. 石墨烯复合材料的研究进展. 无机材料学报, 2013, 28 (3): 235-246
- [14] Huang, Y., Zeng, M., Ren, J., Wang, J., Fan, L., Xu, Q. Preparation and swelling properties of graphene oxide/poly(acrylic acid-co-acrylamide) super-absorbent hydrogel nanocomposites. *Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects*, 2012, 401 (401): 97-106
- [15] 陈明木,王春英,庞杰,郑明锋. 海藻酸钙凝胶特性影响因素的探讨. 现代食品科技, 2002, 18 (3): 4-6