

# 纳米海藻糖在细胞冷冻过程中的传热传质特性研究

姚思远<sup>1</sup>, 饶伟<sup>1\*</sup>, 刘静<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院理化技术研究所, 北京, 100190 2. 清华大学医学院生物医学工程系, 北京, 100084)

(Tel:010-82543719, Email:weirao@mail.ipc.ac.cn)

**摘要:** 为研究绿色无毒的纳米海藻糖冷冻保护剂的传热传质特性, 通过实验手段制备纳米海藻糖的胞内输运体系, 使用差示扫描量热法 (Differential Scanning Calorimeter) 测量不同浓度保护剂对应冷冻过程中降温段的扫描量热曲线, 分析对比浓度差异对热物性参数的影响。利用拉曼光谱分析技术 (Raman Spectra Analysis), 分别以纳米海藻糖孵育的 3T3 细胞和对照组 3T3 细胞为研究对象, 同时提取孵育 3h 后各组的细胞悬液, 使用标准化分析方法量化海藻糖在细胞内的富集情况。实验结果显示, 样品的冻结温度、相变潜热均随着纳米海藻糖浓度的提高而降低, 表明冷冻保护剂的抗冻性能有所提升; 此外, 细胞内有机物含量的增长反映了海藻糖成功的胞内加载。根据研究中得到传热传质特性数据, 有望揭示纳米海藻糖用量与冷冻保护效果之间的定量关系, 为优化细胞冷冻方案提供技术支持。

**关键词:** 冷冻保存; 纳米海藻糖; 差示扫描量热法; 拉曼光谱分析

## Study on the Heat and Mass Transfer Characteristics of Nanotrehalose During Cell Freezing

Yao Siyuan<sup>1</sup> Rao Wei<sup>1</sup> Liu Jing<sup>1,2</sup>

(1. Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

2. Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract** In order to investigate the heat and mass transfer performance of green non-toxic nanotrehalose cryoprotective agent, intracellular delivery system of nanotrehalose was prepared by experimental means. Differential scanning calorimeter (DSC) was used to measure the scanning calorimetry curves of different concentrations of cryoprotectants during the freezing procedure, also the effects of concentration changes on the thermal properties parameters and ice crystal formation process were compared and analyzed. Using Raman spectroscopy, 3T3 cells incubated with nanotrehalose and 3T3 cells of the control groups were used as the study subjects, and the cell suspensions of each group were extracted after 3 hours of incubation, and the intracellular trehalose was quantified using a standardized analytical method. The experimental results were given that with the increase of nanotrehalose concentration, the freezing temperature and latent heat of phase change of the sample were reduced correspondingly, which indicated the antifreeze capability could be improved by trehalose delivery; in addition, the remarkable increase of the organic components in the cells proved the successful accumulation of intracellular trehalose. According to the data obtained from the study on heat and mass transfer characteristics, it is expected that a model of heat and mass exchange of trehalose between both sides of cells will be developed, and technical support will be proposed for optimizing the cell cryopreservation scheme.

**Key Words** cryopreservation nanotrehalose differential scanning calorimetry Raman spectra analysis

## 0 前言

低温可以大大降低生物体的新陈代谢速率, 有效抑制外界环境的干扰, 因此低温冷冻保存能使生物材料得以长期安全保存<sup>[1]</sup>。然而, 当前的冻存技术仍面临着冷冻复温过程产生的冰晶带来的不可逆创伤严重、

\* 基金项目: 国家自然科学基金 No. 51605472

作者简介: 姚思远, (1996-), 男, 大四本科生 (推荐免试硕士研究生), 制冷与低温工程专业, 研究方向为微纳材料在低温冷冻保存中的应用。

功能受损、存活率低等挑战。目前，低温冷冻保存已成为世界各国研究人员密切关注的前沿热课题，科学界一直在寻求材料和技术上的突破，以期将冷冻过程中的损伤降到最低。细胞作为构成生物体的基本单位，研究细胞尺度上冰晶的生长和调控机制对于发展组织、器官及活体生物冷冻保存的技术手段起着至关重要的作用。为了提高细胞的冷冻存活率，研究人员在发展高效、绿色、无毒的新型冷冻保护剂上进行了大量的探索。海藻糖，一种非还原性的天然二糖，被发现能在一些生活在极端环境条件下的耐寒抗冻、抗高渗透压的生物细胞（如水熊虫和酵母）中自发合成。受此启发，将海藻糖用作细胞低温保存中的冷冻保护剂引起了国内外研究人员的广泛关注。海藻糖是一种非渗透性的冷冻保护剂，无法自由通过细胞膜起到冷冻保护作用。为了将冷冻细胞的损伤降到最低，海藻糖需要同时存在于在细胞膜内外两侧<sup>[2]</sup>。目前常用于海藻糖的输送方法包括微注射<sup>[3]</sup>、电穿孔<sup>[4]</sup>等。不容忽视的是，上述方法都有一定的技术局限，例如微注射不适用小尺寸细胞、电穿孔可能对细胞膜造成不可逆损伤等。因此，发展一种高效、无毒、无创的全新的绿色海藻糖运送体系，对降低冷冻损伤，提高细胞存活率十分关键。

在文献[5]中，Rao 等<sup>[5]</sup>利用普朗尼克（Pluronic F127）交联壳聚糖（Chitosan）的方法制备的纳米海藻糖成功实现了在人脂肪干细胞中的无创递送，证实了其对于提高冷冻保存成活率的效果。尽管如此，纳米海藻糖冷冻保护剂的热动力学机制和影响冰晶生长的作用机制仍不明确。本研究使用差示扫描量热仪和拉曼光谱，旨在测量纳米海藻糖在低温冷冻过程中的热物性曲线和细胞内外海藻糖的浓度差异的基础上，分析得到该保护剂的传热传质特性数据，并以此为依据发展相应的水分运输、冰晶成核及与生长模型，优化细胞冷冻方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

用于纳米海藻糖的制备与表征：海藻糖（Trehalose）（美国 Sigma-Aldrich 公司），普朗尼克（Pluronic F-127）（美国 Sigma-Aldrich 公司），壳聚糖（Chitosan）（合肥博美生物科技有限公司），对硝基氯甲酸苄酯（4-NPC）（上海 Macklin 公司），二氯甲烷（ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ）（北京化工厂），乙醚（ $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ）（北京化工厂），海藻糖试剂盒（爱尔兰 Megazyme 公司）。

用于细胞培养：DMEM Basic 培养基（美国 Gibco 公司），胎牛血清（FBS）（美国 Gibco 公司），青霉素链霉素混合液（PS）（美国 Gibco 公司），磷酸盐缓冲液（PBS）（美国 Gibco 公司），胰蛋白酶（美国 Gibco 公司）。

### 1.2 实验仪器

用于纳米海藻糖的制备：R100 型旋转蒸发器（瑞士 Buchi 公司），S-450D 型超声波破碎仪（美国 Branson 公司），Advantage Wizard 2.0 型冷冻干燥机（美国 SP Scientific 公司）。

用于纳米海藻糖的表征：S-4800 型扫描电子显微镜（日本 HITACHI 公司），JEM-2100 透射电子显微镜（日本电子株式会社），NanoStar 型动态光散射仪（美国 Wyatt Technology 公司），Cary 500 型紫外-可见分光光度计（美国 Varian 公司）。

用于细胞培养：二氧化碳细胞培养箱（日本 Sanyo 公司），HWS-12 型电热恒温水浴锅（上海一恒科技有限公司），超净工作台（苏州净化设备公司），倒置荧光显微镜（日本 Nikon 公司），微量电子天平（瑞士梅利托公司）。

用于传热传质特性的测定：DSC 200 F3 差示扫描量热仪（德国 Netzsch Technical Instrument 公司），inVia-Reflex 型显微共聚焦激光拉曼光谱（英国 Renishaw 公司）。

### 1.3 不同浓度纳米海藻糖的配制

使用微量电子天平称量确定质量的海藻糖，分别以 10%、20%、30% 的质量分数溶解于 PBS 溶液中，充分振荡 2-3 min 后得到不同浓度的海藻糖样品，用于冷冻过程的扫描量热实验。

### 1.4 3T3 细胞的复苏、培养、传代和孵育

从液氮罐中取出冷冻的 3T3 细胞迅速放在 37℃ 水浴锅中快速解冻，同时伴以轻微搅拌加快内含物融化，在无菌的环境下将细胞逐滴加入预热的细胞培养基中。细胞液以 1000 r/min 离心 5 min，去上清液，吹打重悬浮，转移至 T75 培养瓶中。每 2 天更换新鲜的细胞培养基，用倒置荧光显微镜观察，当细胞融合

达到 80% ~ 90% 时，加入 0.25% 的胰酶进行传代。

分别配制质量分数为 10%、0.5%、9.5% 的纳米海藻糖、自由海藻糖、聚合物纳米颗粒的完全培养基溶液。因由于纳米颗粒在水相的培养基中溶解度较差，为保证纳米海藻糖完全溶解，需要充分振荡使溶液均一，配制上述样品后待孵育 3T3 细胞时使用。

取 1 ml 扩增至第 3 代的 3T3 细胞悬浮液，以  $1 \times 10^5$  个/ml 的密度接种到六孔板中，在二氧化碳培养箱中继续培养 24 h 至细胞完全贴壁。将预先制备的细胞孵化液分别加入已贴壁的细胞中继续培养 3 h。漂洗次去除残留的血清蛋白，用胰酶分散贴壁的细胞，离心，重新吹打悬浮成单细胞悬液。上述步骤与传代相同，不再赘述。值得注意的是，离心和吹打的步骤需要重复两次，先加入完全培养液解除胰酶对消化作用，再次离心，第二次离心后换用无色透明 PBS 溶液重新悬浮细胞，这么做是因为完全培养基本身的荧光较强会干扰相对微弱的拉曼散射的测量结果。此外，为保证细胞的活性，使用 PBS 悬浮的细胞应在 30 min 内进行测试。

## 2 实验设计

### 2.1 制备纳米海藻糖

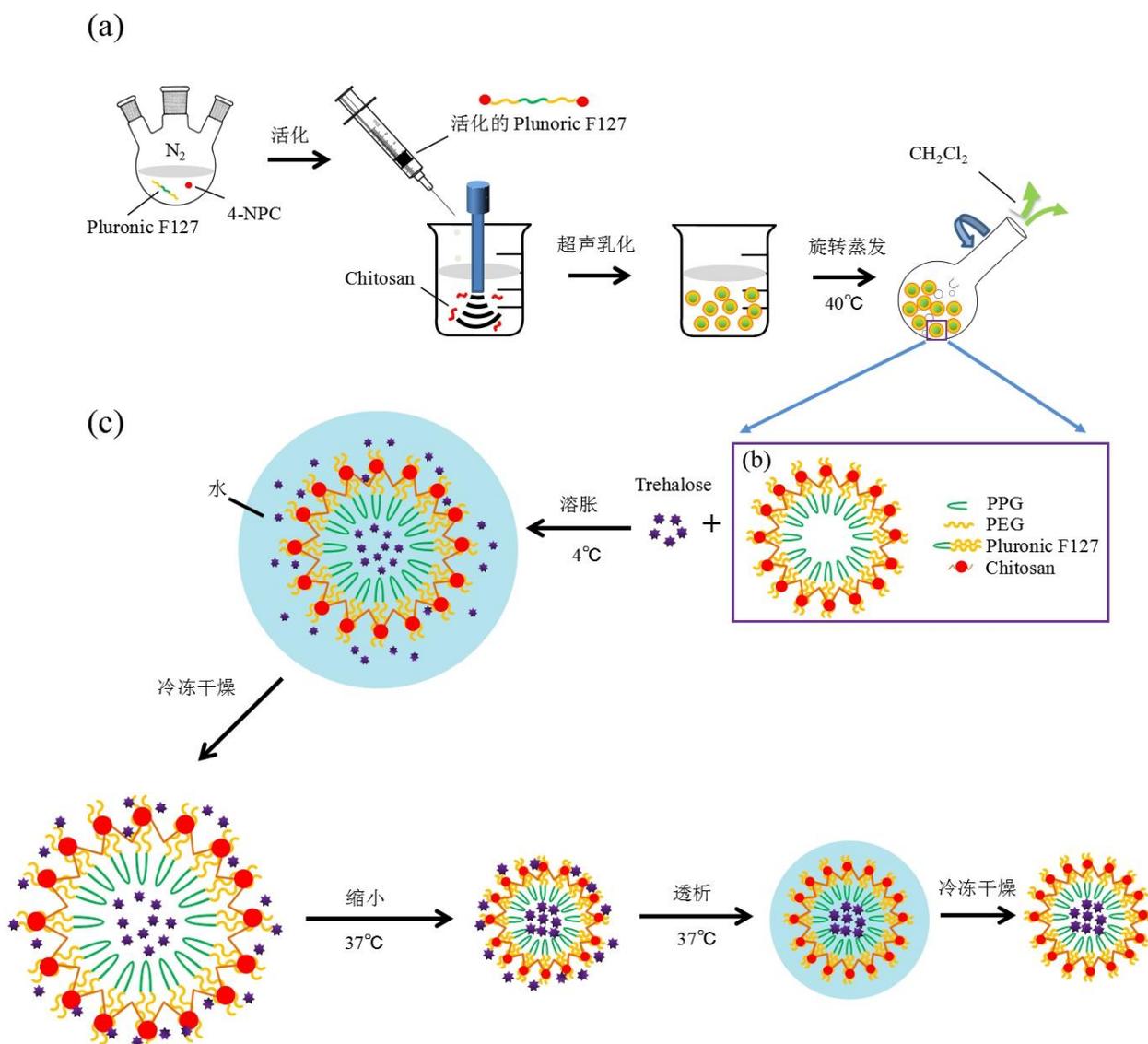


图 1 制备纳米海藻糖的原理图：(a) 合成普明尼克-壳聚糖交联的纳米颗粒载体；(b) 聚合物纳米颗粒的结构示意图；(c) 使用纳米颗粒包封海藻糖。

制备纳米海藻糖分为两步，首先是制备纳米颗粒，然后将海藻糖加载到纳米颗粒载体中。构建纳米海藻糖体系的具体流程如图 1 所示：

首先在二氯甲烷中使用对硝基氯甲酸苄酯取代普朗尼克（Pluronic F-127）两端的氢，形成两端带有胺特殊活性官能团的多嵌段聚合物。将活化后的聚合物逐滴加入壳聚糖的碱性溶液中，超声乳化 5 min，旋转蒸发去除二氯甲烷，得到纯化的纳米颗粒，制备纳米颗粒载体的流程见图 1（a）。纳米颗粒结构的原理图如图 1（b）所示。

将海藻糖和纳米颗粒以一定的质量比混合均匀后溶解在 4℃ 的去离子水中。纳米载体的负膨胀效应为海藻糖通过渗透作用进入载体内部提供了一个理想的条件。冷冻干燥除去内外的水分，得到纳米海藻糖，储存在-20℃的环境中以备后续实验使用，封装海藻糖的步骤如图 1（c）。

## 2.2 冷冻过程扫描量热实验

本研究选取不同浓度的纳米海藻糖的 PBS 溶液作为研究对象来比较浓度差异对冷冻保护剂冻结特性的影响。实验中，以 10℃/min 的降温速率使样品的温度从室温降至-100℃并在-100℃恒温 2 min，然后再以 10℃/min 的升温速率使样品的温度升至 20℃，测试过程中始终以高于设置的最高温度 10℃（即 30℃）为临界安全温度。反复循环 3 次，监视样品与参比之间的热流随时间或温度的变化，实验结束后，得到冷冻过程中的扫描量热曲线。

## 2.3 分组孵育拉曼光谱实验

拉曼光谱可以根据物质分子由于振动形式和转动形式的差异对相同波长入射光的散射强度不同来确定物质的种类、浓度等参数<sup>[6]</sup>。本研究利用海藻糖在拉曼光谱中的特征谱峰，借助标准化分析方法定量测算细胞内外海藻糖的分布情况。实验中，将 3T3 细胞分成对照组和实验组。其中，对照组为在不加任何样品的只用细胞培养液中孵育的 3T3 细胞；实验组分别为使用纳米海藻糖、纳米颗粒和自由海藻糖孵育 3h 的 3T3 细胞。测量前，用微量移液器吸取 10-20 μl 的样品加入石英玻璃坩埚，移动样品至物镜正下方进行对焦，在视野中选择合适的测量点打开激光光源开始测试。测量中，为了排除系统误差的干扰，需要保持一致的参量包括：激光波长为 532 nm，曝光时间为 10 s，循环次数为 1 次，激光的强度为 100 mW、动态取谱的范围为 2500 ~ 4000 cm<sup>-1</sup>。扫描过程中监视样品的拉曼偏移。每个样品测试结束后，立即关闭激光以防对细胞造成辐照损伤并迅速更换样品。实验结束后，汇总各组细胞的拉曼光谱数据。

# 3 结果与分析

## 3.1 纳米海藻糖的表征

实验中使用动态光散射仪（DLS）、电子显微镜（SEM、TEM）表征聚合物纳米颗粒的形貌、尺寸；使用紫外-可见分光光度计对海藻糖的加载量进行了测定。不同温度下纳米颗粒的粒度分布情况如图 2 所示，37℃下样品的平均粒径为 37.0±1.16 nm，22℃下样品的平均粒径为 240.8±0.14 nm，纳米颗粒的直径变化了约 6 倍，反映了通过纳米颗粒的负膨胀温度响应特性加载海藻糖的可行性。此外，使用电子显微镜表征了纳米海藻糖的尺寸和形貌，见图 2（c），其中 SEM 图像呈现四周亮中间暗的颜色分布，对应了利用普朗尼克独特的自组装特性得到的壳-核结构的纳米粒子，TEM 观察到的纳米粒子紧密排列在碳膜上。

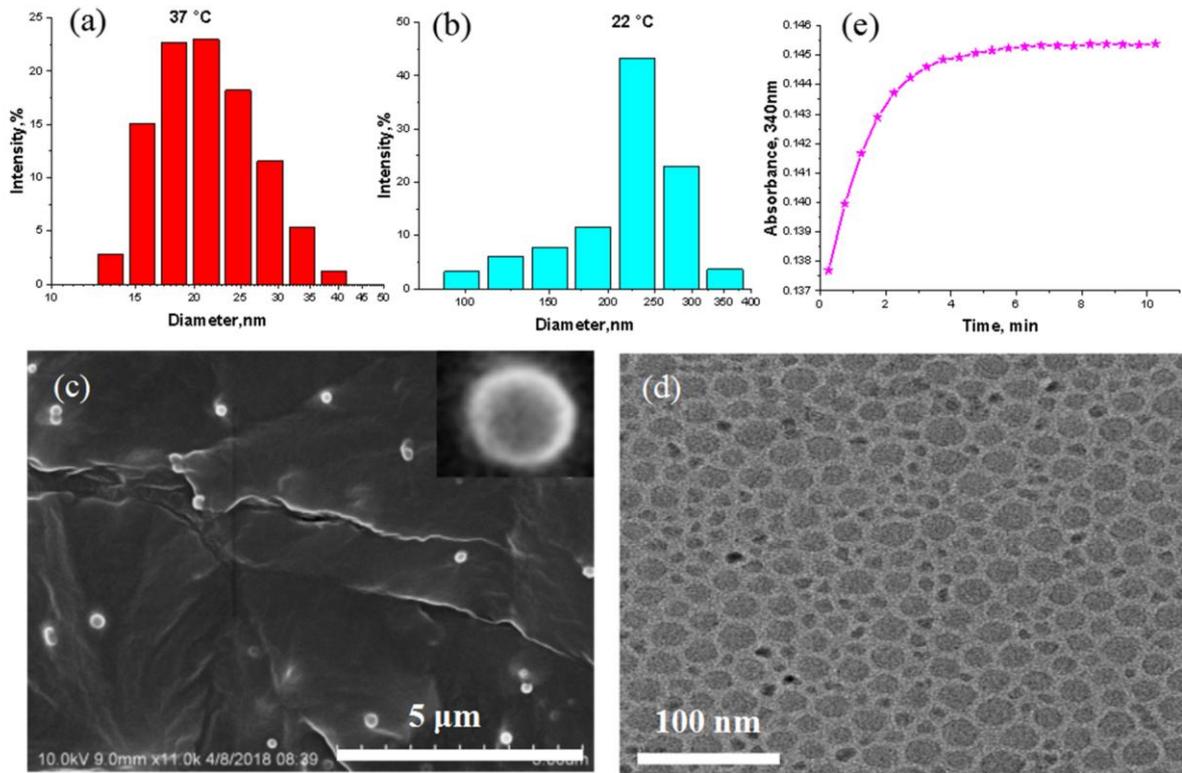


图 2 纳米海藻糖的表征：（a）37℃时纳米颗粒的粒径分布；（b）22℃时纳米颗粒的粒径分布；（c）纳米海藻糖的 SEM 图像；（d）纳米海藻糖的 TEM 图像；（e）反应产物的吸光度随时间的变化曲线。

由于海藻糖在光谱范围内对于特定波长的光没有明显的吸收峰，所以对海藻糖的测定通常采用间接的酶分析法。在这里，联合使用海藻糖试剂盒和紫外-可见分光光度计的方法测定海藻糖在纳米颗粒中的加载量。反应中，每隔 30s 测定反应产物在 340nm 的吸光度，记录吸光度随时间的变化情况如图 2（e）。

实验中，为了换算出海藻糖的实际浓度，还需要测量已知不同浓度的海藻糖标样在 340nm 的吸光度，见表 1，根据浓度与吸光度的拟合曲线得到纳米颗粒中海藻糖的实际加载量。

表 1 海藻糖浓度与吸光度的对应关系

样品浓度, mg / ml	吸光度
0.1	0.28094
0.2	0.57329
0.3	0.88387
0.4	1.18180

海藻糖浓度与吸光度的拟合公式如下：

$$Abs = 3.01316 \times C - 0.02332, R^2 = 0.9988 \quad (1)$$

其中， $C$  表示样品中海藻糖的浓度， $Abs$  表示样品反应产物在 340nm 的吸光度， $R^2$  指的是回归曲线对观测值的拟合程度。由式（1）计算得到样品中海藻糖浓度为 0.14536mg/ml。

纳米颗粒中海藻糖的实际加载量（Loading Content, LC）为：

$$LC = \frac{\text{海藻糖的质量}}{\text{海藻糖与纳米颗粒的总质量}} \times 100\% \quad (2)$$

根据式（2）和之前的计算结果可以得出海藻糖在纳米颗粒中的实际加载量为 5.60%。

### 3.2 扫描量热结果分析

实验共观测了 4 组不同的质量分数的纳米海藻糖的 PBS 溶液的低温冷冻过程, 它们的扫描冻结量热曲线如图 3 所示。为了便于观察浓度差异对冻结特性的影响, 将 4 条曲线汇总到同一个坐标系中。曲线在非相变区的信号接近, 没有明显的差异。PBS 溶液、10%的纳米海藻糖-PBS 溶液、20%的纳米海藻糖-PBS 溶液、30%的纳米海藻糖-PBS 溶液, 四种样品的相变开始温度分别为-13.6℃、-17.0℃、-19.8℃、-21.5℃。

根据冷冻过程扫描量热曲线的相变峰, 由式 (3) 可以计算出样品对应的相变潜热。

$$L = \int_{T_1}^{T_2} \Delta P_c dT \quad (3)$$

其中,  $T_1$  和  $T_2$  分别为相变的起始和终止温度,  $\Delta P_c$  是相变前后的 DSC 信号之差, 相当于相变引起的放热功率,  $L$  的物理意义整个相变过程中的相变潜热, 在曲线中表示为相变峰与相变前后曲线切线所围成的面积。由式 (3) 计算 4 种样品的相变潜热分别为-198.6 J/g、-190 J/g、-174 J/g、-158 J/g。

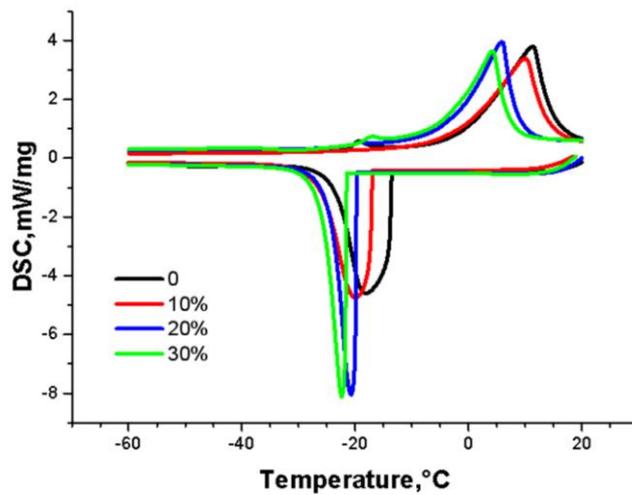


图 3 不同质量分数的纳米海藻糖-PBS 溶液的低温扫描量热曲线

不同样品对应的冻结开始温度和相变潜热如表 2 所示, 可见, PBS 溶液的相变开始 (冻结) 温度随着纳米海藻糖浓度的增加而降低, 相变潜热也随着浓度的增加而降低。

表 2 纳米海藻糖的热物性参数

样品质量浓度, %	结晶温度, °C	相变潜热, J/g
0	-13.6	-198.6
10	-17.0	-190.0
20	-19.8	-174.0
30	-21.5	-158.0

### 3.3 拉曼光谱结果分析

实验中, 首先对浓度分别为 0%、10%、20%、30%的海藻糖-PBS 溶液的拉曼光谱进行了测量。利用式 (4) 对原始的拉曼数据进行标准化处理后得到样品的相对拉曼偏移强度。

$$I = \left( \frac{I_0 - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

其中,  $I_0$  为光谱仪实测的原始强度值,  $I_{\max}$  和  $I_{\min}$  分别为测试拉曼偏移区间内的光谱强度数据中的最大值和最小值。如图 4 (a), 在  $2900\text{cm}^{-1}$  和  $2950\text{cm}^{-1}$  附近分别出现光谱强度随着浓度的增加显著增强的海藻糖的拉曼特征峰。图 4 (b) 是使用纳米海藻糖处理的 3T3 细胞的光学影像图, 细胞没有在渗透压作用

下产生显著差异，说明纳米海藻糖的浓度适宜，没有对细胞造成溶液损伤。

实验组和对照组细胞内海藻糖的点扫描结果如图 4 (c) 所示，可以看出在  $2800 \sim 3000\text{cm}^{-1}$  范围内 3T3 细胞内出现了拉曼特征谱峰。根据分子振动与转动和拉曼偏移的关系，可以认为  $2800 \sim 3000\text{cm}^{-1}$  出现的特征峰代表了细胞内有机物的浓度。实验组和对照组的特征峰面积对比表明使用纳米海藻糖处理细胞内有机物的含量要大于用纳米颗粒和自由海藻糖处理过的的实验组以及空白对照组。

根据式 (5) 对上述样品在  $2800 \sim 3000\text{cm}^{-1}$  范围的拉曼特征谱峰进行了积分处理：

$$P = \int_{2800}^{3000} I(\lambda)d\lambda \quad (5)$$

其中，其中， $P$  表示样品拉曼偏移为  $2800 \sim 3000\text{cm}^{-1}$  范围内拉曼散射相对强度的积分值， $\lambda$  表示拉曼偏移的大小， $I(\lambda)$  表示相应的拉曼散射的相对强度（按式 (4) 归一化计算求得）。由式 (5) 计算得到的各样品对应的拉曼散射相对强度的积分值由图 4 (d) 所示。经过纳米海藻糖处理后的 3T3 细胞内的有机物浓度明显高于对照组和其他实验组。

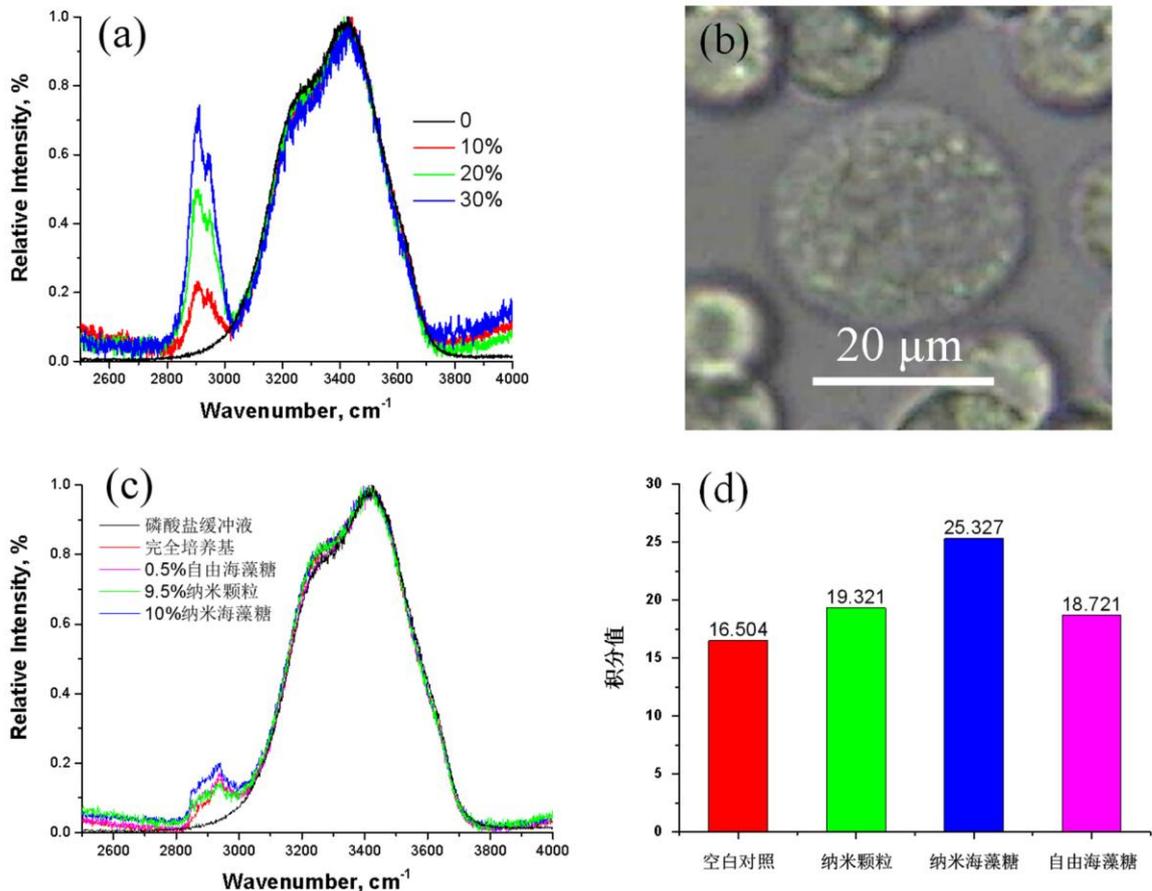


图 4 纳米海藻糖传质特性的拉曼测试：（a）海藻糖的拉曼特征谱峰；（b）纳米海藻糖孵育的 3T3 细胞的光学影像图；（c）不同样品孵育的 3T3 细胞内的点扫描拉曼光谱；（d）特征峰在有机物拉曼偏移范围内的积分值。

## 4 讨论

细胞的低温冷冻保存很大程度上依赖于冷冻保护剂的作用，迄今为止，最常用的冷冻保护剂仍然是二甲亚砜 (DMSO) [7]，但鉴于 DMSO 的毒性，研究人员在不断寻找 DMSO 的替代物。冷冻保护剂根据对细胞膜的透过性差异分为渗透性和非渗透性两种。其中，渗透性保护剂能通过细胞膜自由进入细胞内部，

代替水和生物大分子结合从而维持细胞内外渗透压平衡，同时增加细胞质黏度抑制胞内冰晶形成；非渗透性的保护剂能在细胞膜外表面形成玻璃态基质来稳定细胞。天然无毒的海藻糖具有优异的冷冻保护性能，它能形成氢键促进生物大分子的水合作用，在降温过程中表现为促进细胞脱水减少胞内冰晶的形成；此外，海藻糖还能形成稳定的玻璃态基质，对细胞膜和蛋白质起稳定和支撑的作用<sup>[8]</sup>。

由于海藻糖的非渗透性，在现有的冷冻方案中，海藻糖通常与 DMSO 联合使用，哺乳动物只能通过细胞运输的方法实现海藻糖的胞内加载，这些因素无形中增加了大规模应用该保护剂的阻力。然而，纳米技术的出现为发展高效、无毒、无创的海藻糖输送体系提供了一条简便易行的新思路。Holovati 等<sup>[9]</sup>利用脂质体将多糖导入红细胞中，提高冷冻保存后的复活率。Zhang 等<sup>[10]</sup>利用聚乙烯亚胺和普朗尼克合成的纳米颗粒成功将海藻糖运送至小鼠成纤维细胞中。考虑到脂质体的稳定性较差，聚乙烯亚胺有一定的细胞毒性，越来越多的研究从稳定性好、高生物相容性的聚合物纳米颗粒入手。其中，Rao 等<sup>[5]</sup>利用由普朗尼克和壳聚糖制备的纳米海藻糖做唯一的冷冻保护剂成功实现了在人脂肪干细胞的冷冻保存，获得了与 DMSO 相当的冷冻保存效果。

尽管纳米海藻糖的冷冻保护功效已经得到证实，图 5，但目前基于纳米海藻糖的低温冷冻保存研究尚处于开端，基本传热传质实验和对冰晶生长行为的刻画尚未开展，这些工作对于建立海藻糖运输剂量与冷冻保护效果之间的定量关系，协调调控冷冻方案，乃至全面推广纳米海藻糖的应用至关重要。本文的主要目的就是研究纳米海藻糖在细胞冷冻过程中传热传质特性，为进一步发展冷冻保存技术提供数据上的支持。

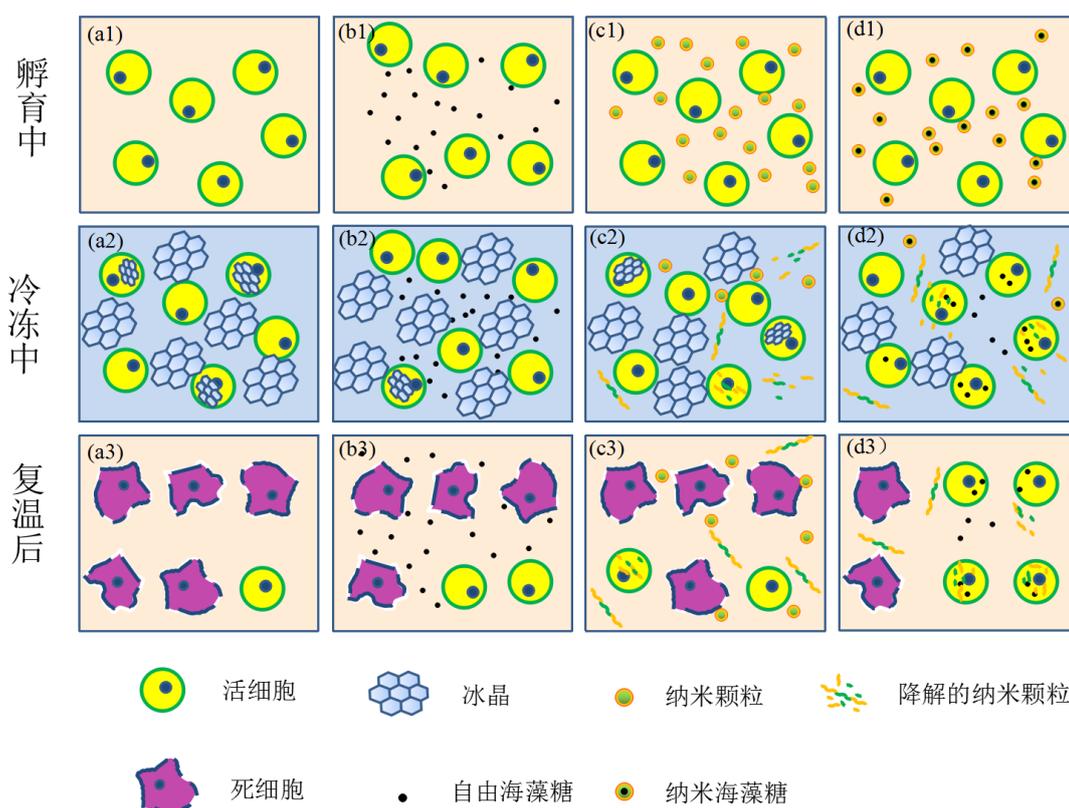


图 5 不同材料孵育的细胞的冷冻复温过程，每一行表示冷冻保存中的一个程序：（a1-d1）孵育过程；（a2-d2）冷冻过程；（a3-d3）冷冻复温后。每一列表示用特定材料处理后的细胞经过冷冻-复温后的存活情况：（a1-a3）空白对照；（b1-b3）自由海藻糖；（c1-c3）纳米颗粒载体；（d1-d3）纳米海藻糖。纳米海藻糖的引入能有效减少冷冻过程中胞内外冰晶的产生，起到降低冰晶损伤，提高冷冻-复温存活后存活率的作用。

本研究发现，差示扫描量热仪对不同质量分数的纳米海藻糖冻结特性的测试结果表明纳米海藻糖能够提高冷冻保护剂的抗冻性能。首先，样品冻结温度的降低可以在一定程度上说明冰晶成核的势垒提高了。然后，文中计算了样品冻结时相变峰的面积，峰面积随浓度的提高有所减小，说明结晶量的减少，结晶量的减少有利于降低细胞遭受胞内冰损伤的概率。相变峰的峰值的大小反映了结晶速度的高低，尽管加入高

质量分数的纳米海藻糖后溶液的结晶速率有所提高,这可能是由于纳米颗粒的加入促进了异相成核作用。总而言之,加入纳米海藻糖对于冻结过程中有明显的抑制作用,并且这种抑制作用随海藻糖浓度的升高而增强。

通过实验发现了海藻糖在拉曼光谱中的特征谱峰,实验组和对照组细胞内均出现了特征谱峰,而胞外的 PBS 溶液没有。实验中的特征峰代表的是细胞内的有机物含量,糖、蛋白质、核酸等生物大分子都被认为是细胞内的有机物成分。实验中使用的 3T3 为同时复苏、同时传代的同批次细胞,所以可以忽略个体差异的影响,认为初始的有机物含量相同。此外,通过观察用不同样品孵育细胞的外观形态发现用纳米海藻糖孵育的 3T3 细胞具有稳定的细胞形态,表明细胞内外的渗透压均衡,并没有因为渗透作用严重失水。对比实验组和对照组的特征峰面积,可以说明海藻糖成功进入了细胞内部,有机物含量的明显提高来源于胞内的海藻糖的富集。

## 5 结论

本研究以纳米海藻糖为研究对象,通过差示扫描量热法测得了不同质量浓度的纳米海藻糖在冻结过程中的热物性参数,发现结晶温度和相变潜热均随着浓度的提高而降低,加入纳米海藻糖起到了减缓冰晶形成,抑制冰晶生长,提升抗冻性能的作用。利用拉曼光谱分析法考察了海藻糖的拉曼特征谱峰,证实了纳米载体对于实现海藻糖胞内加载的关键作用。通过实验获得了一些基础的传热传质特性数据,这些数据对于进一步研究海藻糖在细胞内外运输的温度响应机制、定量刻画纳米海藻糖的结晶过程以及优化细胞冷冻方案提供了初步依据。

### 参考文献

- [1] 华泽钊. 低温生物医学与热物理[J]. 物理与工程, 2001, (06): 1-4,18.
- [2] Satpathy G R, Török Z, Bali R, et al. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization [J]. *Cryobiology*, 2004, 49(2): 123-136.
- [3] Eroglu A, Toth T L, Toner M. Small amounts of microinjected trehalose protect mouse and human oocytes during freeze-thaw[J]. *Fertility & Sterility*, 2001, 76(3): S78-S78.
- [4] Zhou X, Yuan J, Liu J, et al. Loading trehalose into red blood cells by electroporation and its application in freeze-drying[J]. *Cryo Letters*, 2010, 31(2): 147-156.
- [5] Rao W, Huang H, Wang H, et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(8): 5017-28.
- [6] 许永建, 罗荣辉, 郭茂田,等. 共聚焦显微拉曼光谱的应用和进展[J]. *激光杂志*, 2007, (02): 13-14.
- [7] Anchoroguy T J, Cecchini C A, Crowe J H, et al. Insights into the cryoprotective mechanisms of DMSO for phospholipid bilayers[J]. *Cryobiology*, 1991, 28(5): 467-473.
- [8] 聂凌鸿, 宁正祥. 海藻糖的生物保护作用[J]. *生命的化学*, 2001, 21(3): 206-209.
- [9] Holovati J, Gyongyossy-Issa M, Jp. Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality[J]. *Cryobiology*, 2009, 58(1): 75-83.
- [10] Zhang W, Rong J, Wang Q, et al. The encapsulation and intracellular delivery of trehalose using a thermally responsive nanocapsule[J]. *Nanotechnology*, 2009, 20(27): 275101.