

糖与冷冻保存

王沛涛¹, 张丽娟², 于磊³

(青岛大学附属医院, 青岛, 266003)

(peitaowang@yeah.net)

摘要:糖在生命过程中发挥重要功能, 不仅因为其提供主要的生命能源, 糖类还具有广泛的生物学功能, 是细胞的主要构架成分, 参与包括精子卵子受精、细胞分化与增殖、免疫识别、肿瘤发生与转移、病原体的侵入与致病等过程。低温生物学是研究低温下生命活动特征的科学, 低温生物技术研究建立离不开对生物学理论与技术的掌握和了解。深低温保存技术已经广泛应用于生物医学领域, 取得较大成功, 但仍有许多理论与技术的瓶颈难以突破, 如卵子冷冻、组织器官冷冻等。本文拟从糖生物学层面解读深低温保存对细胞的保护和损伤机制, 提出研究方法和思路, 以期提高深低温保存效果。

关键词: 糖类, 深低温保存, 冷冻, 糖组学, 标志物

Saccharides and Freezing

Wang Peitao, Zhang Lijuan, Yu lei.

(The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003)

peitaowang@yeah.net

Abstract Saccharides play important roles in the life process. not only they are the main life energy, but possess various biological functions. Saccharides are the main structural elements of cells, participating in the fertilization of sperm and oocyte, cell differentiation and proliferation, immunological recognition, tumorigenesis and metastasis, pathogens invasion and the occurrence of diseases. Cryopreservation technology has been widely used in biomedical field and achieved great success. However, we still need great break though in many theoretical and technological difficulties of this field. For example, oocyte cryopreservation, tissue or organ cryopreservation. This lecture will summarize the glycobiology, and explore the possible relationship between glycobiology and cryobiology on order to find distinguished methods and ideas for improved cryopreservation.

Key words saccharides, cryopreservation, freezing, glycomics, biomarker

0 前言

糖类是在自然界存在最为丰富, 从植物到动物, 从原核到真核, 遍布自然界, 任何生命形式都离不开糖。糖类在很多生物学过程中起着关键性的作用, 但糖类在过去一直都没有受到科学研究机构的充分重视, 较之于基因和蛋白质的研究, 糖类研究较少。

基因组学(genomics)阐明整个基因组的结构、结构与功能的关系以及基因之间相互作用的科学。蛋白质组学本质上指的是在大规模水平上研究蛋白质的特征, 包括蛋白质的表达水平, 翻译后的修饰, 蛋白与蛋白相互作用等, 由此获得蛋白质水平上的关于疾病发生, 细胞代谢等过程的整体而全面的认识基因相同, 器官不同, 表达不同, 即以活性基因来表达一种生物体。而糖组学(glycomics), 糖组学是研究蛋白质糖链组成及功能的一门学科蛋白质实际活性的调控, 翻译后修饰, 如糖基化(glycosylation)和磷酸化(phosphorylation)

生物体系中, 糖类是一种信息分子, 生物体内的信息分子并不只有核酸和蛋白质。糖类携带了大量的不同信息, 这些信息在不同分子之间、不同细胞之间或分子中传递, 发挥各自不同的生物学功能, 保证了生命活动的维持进行。低温生物学是研究低温状态下生命活动的

特点和规律，不难推断，相关的糖类研究对低温生物学具有特别重要的理论和技术价值。本文分别从糖生物学和糖组学层面，尝试探讨低温生物学中有关深低温保存理论与技术，特别是与生殖细胞相关的低温保存问题。

1. 糖类及糖生物学

1.1 分类

糖类是多羟基醛、多羟基酮以及能水解而生成多羟基醛或多羟基酮的有机化合物，广布自然界，也称碳水化合物。

根据碳原子数目，糖类大致可以分为以下几类：

单糖：一般指含有 3~7 个碳原子的多羟基醛或多羟基酮，结构最简单的一类，含有许多亲水基团，易溶于水，不溶于乙醚、丙酮等有机溶剂。如：葡萄糖、果糖、半乳糖。

低聚糖（寡糖）：2~9 个单糖分子聚合而成，水解后可生成单糖。

二糖：两个单糖分子缩水而成的糖苷，水解后生成两个单糖分子。如：乳糖、蔗糖、麦芽糖。

多糖：水解后生成三分子及以上的单糖，如棉子糖（三糖）

多聚糖：10 个以上单糖分子聚合而成。根据水解后生成单糖的组成是否相同，又可以分为同聚多糖、杂聚多糖。同聚多糖由同一种单糖组成，水解后生成同种单糖，如阿拉伯胶、糖元、淀粉、纤维素；杂聚多糖有不同的多种单糖组成，水解后生成不同种类的单糖，如粘多糖、半纤维素等。

1.2 功能

1.2.1 供给能量：蛋白质、脂肪和糖类是生命活动三大主要物质。糖类最主要的功能是提供各种生命活动所需能源，通过体内代谢产生细胞需要的ATP，支持各种生命活动。

1.2.2 保护作用：植物细胞壁、细菌荚膜、动物细胞间基质和粘膜等，含有大量的糖类，提供对细胞的机械性和支持保护作用。如海藻糖在一些真菌干重的含量达40%，甚至更高。如此高的海藻糖含量，也使一些真菌即使在较长时期失水后，仍不干涸死亡，一旦给予足够的水份，还能恢复生长。

1.2.3 免疫功能：糖类参与细胞免疫系统构成和功能，各种凝集素、针对糖类抗原的抗体。如血细胞表面抗原一血型，不同血型细胞的糖链结构不同；人对细菌的易感性和免疫杀菌作用，也是由免疫细胞糖链特性决定。另外，获得性免疫记忆、肝素的抗凝作用等均由糖链特性决定。

1.2.4 保护作用：很多蛋白质表面覆有糖链，发挥保护作用；某些肽链的一些活性位点，也因有糖链的存在，可以为小分子底物所接近，而排斥大的蛋白酶分子，避免蛋白质失活。

1.2.5 提高多类分子水溶性：机体中存在亲水和疏水的平衡，对细胞生命至关重要。细胞表面存在着结构和功能各异的糖蛋白和糖脂，其糖链都在细胞的表面，维持细胞与环境的水平衡作用。

1.2.6 信息传递

生物体内的信息分子不只是核酸和蛋白质，糖类也是一种信息分子。糖类携带了许多不同的信息。这些信息不仅在不同分子之间传递，或在不同细胞之间传递，甚至还在同一分子中传递。参与蛋白质的折叠和定位、细胞以及分子间识别、信息传递与调控等。以糖类为底物的酶，包括糖基转移酶和糖苷水解酶等，与糖类结合形成复合物。

1.3 糖生物学及糖组学

以糖链为生物信息分子，阐明生物系统中生命活动现象及其规律的科学。

糖链的结构远比核酸和蛋白质复杂。在各种糖复合物中,包括糖蛋白、糖脂,糖基化的位点和数目各不相同,糖链中糖基组成的不同,糖基之间糖苷键的连接也存在多种方式,这些差异性导致了糖链的结构具有复杂性和多样性,因此相关的复合物结构和功能必然不同。

由此可见,与核酸和蛋白质相比,糖链本身储存的信息量更大,因而更适宜作为信息分子展开研究,糖链作为第三种生命信息分子,应是破解生命信息与奥秘的第三条途径。

糖组学是研究糖链的表达、调控及生物学功能的学科。任何生物体的遗传及功能信息都是由DNA-RNA-蛋白质-糖链传递完成,约50%的蛋白质都受糖链的修饰,因此,要彻底阐明基因组的功能,既需要功能基因组和功能蛋白质组的研究,也需要功能糖组的研究。糖链是在糖基转移酶和糖苷酶等酶的催化下合成的,而酶是在基因的调控下合成的。

2. 糖生物学与低温保存

2.1 精子糖生物学

糖类的参与伴随精子分化、增殖和成熟分化的全过程。成熟精子表面覆盖着一层糖被,是精子在穿过、驻留附睾过程中,其膜表面蛋白和脂质发生各种糖基化修饰而成,20~60 nm厚。主要由三百多种不同的糖蛋白和糖脂组成,是精子与外界环境相互作用的主要界面。

在精子形成、成熟、获能以及顶体反应过程中,精子表面糖蛋白以及糖脂发生巨大重排,精子糖被的微妙变化对精子生育力具有重大影响。

精子糖被在精子保护、宫颈黏液的穿透、卵子的识别和结合过程中具有重要作用。受精过程中,精子表面的卵子结合蛋白识别卵子表面ZP3中的受体糖蛋白上O—连接的寡糖链,然后发出信号并引起顶体反应,使精卵结合而受精。伴随着受精卵的分裂和胚胎的生长发育,基因按特定的时空顺序选择表达,细胞合成生物大分子和糖链的种类与结构也发生了变化,使分裂分化的细胞按预定的时间进程保持合理的空间配置。

精子的冷冻保存技术已是辅助生殖技术以及精子库的重要组成部分,此技术水平的提高以及复苏率的稳定性都直接影响着最终受孕率。虽然冷冻方法一直在不断改良,但冷冻复苏对精子结构和功能均可能造成不可逆转的损伤。

研究证实,精子经冷冻复苏后,其活率、活力下降,DNA完整性、质膜组成、蛋白组成以及线粒体基质密度等都发生了不同程度的损伤,并且其宫颈黏液穿透力、穿卵能力等生育力显著降低。但到目前为止,精子冷冻损伤的机制依然不明,由于以往技术的局限性,尤其是冷冻复苏对精子表面糖被的损伤更鲜有报道。国内有研究团队,通过凝集素芯片比较精子冷冻前、后的凝集素结合谱观察到,在91种凝集素中,有33种发生了显著变化,其中,冷冻后显著下调的有9种,显著上调的有24种。结论认为,精子糖被在深低温冷冻之后发生了显著变化,对精子起保护作用的唾液酸大量丢失,同时也暴露糖链内部的糖基,因此精子糖被的冷冻损伤可能是由于低温冷冻引起精子生育力低下的原因之一。

2.2 糖类保护机制

动物精子实验发现,与单糖相比,二糖具有更大的冷冻保护作用,精子的复活率更好,特别是在慢速冷冻时,快速冷冻时差别无显著性。具体机制不清,但很多其他脊椎动物精子的研究中也发现二糖的保护作用。

二糖通过松散的、静电绑定糖OH基团与脂质膜上的磷酸基团,这样二糖较单糖更为有效,因为C:H比例低,每个分子有跟多数量的-OH基团。二糖中,与蔗糖相比,海藻糖被认为膜稳定作用更有效,因为其-OH与C比高。 Ca^{2+} 离子通过插入脂质头部余糖分子之间方式,显著降低糖类(特别是海藻糖)的稳定作用。糖类最佳的理论深低温保护效果浓度为细胞膜饱和摩尔浓度数情况时(如:200mM海藻糖)。高于此浓度可能不会进一步增加细胞膜稳定性。本研究中,CPAs中糖类浓度必须在饱和浓度水平。这说明,与糖类相关的恢复力

的进一步改善,可能只是由于阳离子浓度降低所致。海藻糖可以允许甘油作为一个脱水低温保护剂,在*B. marinus*精子的保存中发挥有利的细胞内效果,而抑制或逆转降温中膜分离的有害效应。

一般认为,二糖不能透入精子,但在某些鱼类,单糖果糖和葡萄糖可以进入精子,并作为能量底物,而蔗糖增加黄色河鲈(*Perca flava*)精子的运动速率。对于糖类在低温保护剂中的作用,以及与精子膜结构和构成的相关性,复温后精子活力和受精能力需要进一步的研究。

3. 研究前景

3.1 深低温保护剂及方案的改进

糖类是重要的深低温保护剂组成成分,不可缺少。对于大多数细胞,糖类不能自由透过细胞膜,因此糖类在深低温保存过程中在细胞外发挥作用,可能作用机制包括渗透压调节、能量供应、膜稳定作用等。

不同细胞或组织类型的低温保护剂糖类不同,常用的包括多种单糖、双糖和多聚糖类,如葡萄糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖等。针对不同细胞种类、不同冷冻方式及保存目的,研究人员对各种糖类进行了较多系统研究。

通过不同糖类对甘蔗蟾蜍精子冷冻后存活率影响的研究发现,慢速冷冻时,二糖较单糖冷冻保存效果更好;复温后精子活动的百分率和活动力结果显示,二糖维持精子活力优于单糖效果。研究结论认为,二糖的主要作用是低温保护剂作用,并不是作为外源性能量底物。在一项对于不同种系鼠精子的冷冻保存研究中,研究人员采用不同浓度糖与脱脂牛奶的低温保护效果,并根据体外受精结果判定最佳浓度,发现最佳浓度为二糖12%,三糖18%,除C57BL/6J以外,鼠精子受精力均在麦芽糖、松三糖、棉子糖深低温保存效果最好。

卵子、胚胎必须耐受系列的细胞体积收缩与扩张才能在深低温保存后存活。这些结果也就是说,当一个卵子或一个胚胎暴露于渗透性低温保护剂,细胞外介质的渗透压会因为降温时水结冰而升高,然后复温时冰融化而降低,最后暴露在稀释的深低温保护剂溶液中,卵子或胚胎会发生这些变化。

鼠受精卵和人卵子显示有非常相似的渗透性反应,其渗透性收缩程度的测定可通过将细胞暴露于单糖或双糖溶液来完成。相关测定结果显示,它们的体积线性收缩,溶液函数 $1/V$ (渗透压),非渗透性体积约13~23%。鼠合子暴露于1.5M浓度的这些溶液10分钟,丢失掉其细胞水分的85%。但超过75%的处理后的合子发育进入孵化囊胚。活性染色分析显示,人类卵子也似乎能耐受如此极端脱水而存活。这些结果说明,不同的非渗透性糖类溶液能够作为深低温保存卵子、合子和胚胎复苏的渗透性缓冲液。

传统的深低温保护剂含有对细胞毒性的渗透性保护剂成分,如二甲基亚砜、甘油、乙酰胺等,特别是二甲基亚砜,但目前方案中尚无有效可靠方法替代。针对这一问题,研究人员采用海藻糖对细胞进行种冰温度(-10°C之上)前的预先脱水处理,最大限度降低渗透性活性水成分,从而降低冷冻过程中冰晶的形成度和量,降低冷冻损伤,大大提高了无保护剂(细胞毒性的渗透性保护剂)调价下成纤维细胞、成年干细胞和红细胞的活性或复苏率。

3.2 冷冻损伤机制及保护

3.2.1 低温保存对细胞糖的影响

糖生物学和糖组学的研究不仅具有重要的理论意义,而且也有潜在的应用价值。由于糖链参与了机体内众多的生理与病理过程,故通过糖类参与的细胞间的粘着和分子间的识别作用都可以设法利用相应的糖类分子加以阻断,使一些生理和病理过程不能发生。而深低温保存过程有可能对糖类这些功能产生影响。

精子糖被含有较多的高甘露糖型和复杂型的糖链结构,唾液酸一般修饰于精子糖被的最末端,起到“保护罩”作用,实验证明冷冻精子表面唾液酸的含量显著性降低,那么被唾液酸

覆盖的亚末端糖基就会因唾液酸的丢失而暴露出来,导致精子受精过程中与卵子识别、融合异常影响受精能力。这一结果不仅解释了冷冻复温后对精子受精能力减低的部分原因,同时,也为我们进一步优化精子冷冻保护剂及冷冻方案提供了实验和理论依据。

3.2.2 糖芯片及糖分析技术

糖芯片是生物芯片的一种,是继基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片等之后发展起来的一种很有前景的生物检测技术。随着糖生物学和糖组学的研究进展,糖芯片正逐步发展为该领域的新型研究手段。如: 艾滋病毒(HIV -1)是通过外壳糖蛋白gp120中的糖链与T 淋巴细胞表面膜糖蛋白的CD-4首先相互作用,再感染破坏T 细胞。

除了病毒以外,很多细菌和病毒感染吸附的位点是宿主细胞膜上糖复合物中的糖链。如果将这些糖复合物或寡糖片段以游离的形式引入体内,使其预先与病原体的黏附蛋白结合,病原体就不能再与宿主上的吸附受体结合,从而阻止病原体的感染。这类药物被人们称为抗病原体黏附药物,

糖信息技术已经应用多种临床疾病的诊疗技术中,通过对相关糖类型、糖含量的分析,利于对疾病的分类诊断,及疗效评价,我们课题组前期有关肺癌研究中取得良好效果,如图所示。深低温保存中细胞复温后功能的变化,也可反映在糖信息的变化中。我们可以借助于此技术,更加系统研究和发现冷冻保存相关损失特点及规律,并研究针对性保护方案,提高冷冻保存后细胞结构与功能恢复能力。

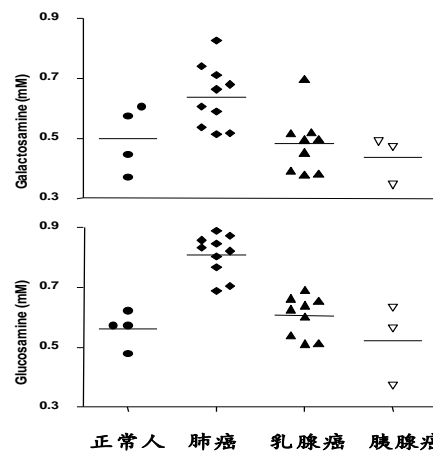


Fig. 1 肺癌病人血液中的葡萄糖胺与半乳糖胺含量明显升高

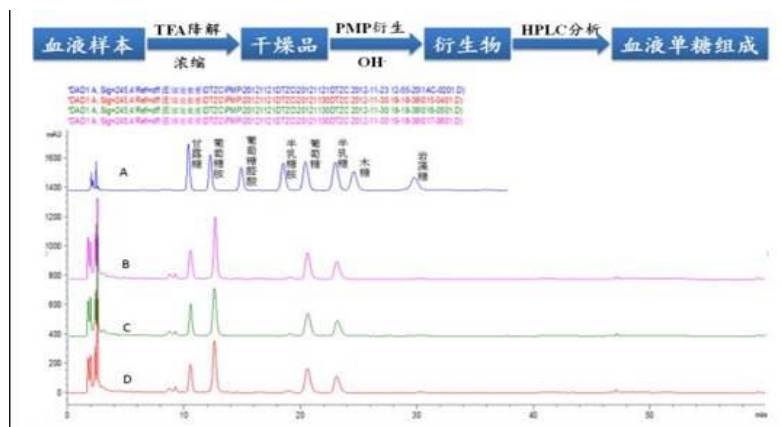


图 2: 结果显示了 8 种单糖标准品在 HPLC 柱出峰的 profile 及一个肿瘤病人降解后的血液单糖的三次平行分析结果。从图 5 看出, 8 种单糖用高效液相色谱处理均得到了全基线的分离, 因此, 单糖分析方法可以运用于正常人和病人血液与精液中的单糖的组成与含量分析。

3.2.3 糖修饰作用

糖类是生命体内的活性分子之一,通过多种生化途径,产生多种代谢产物,参与不同的生命过程。在深低温保护剂中,糖类属非渗透性 CPA,糖类在保存细胞及组织中作用关键且不可替代,其与水分子、蛋白质、核酸等相互作用是其发挥作用主要机制,通过抑制或防止冷冻过程中冰晶的形成及损伤、与蛋白质等大分子产生交联作用等途径防止细胞的冷冻损伤。

然而,但糖类不能透过细胞膜与细胞内的相关分子发生相互作用,而深低温保存、冷冻干燥中细胞内各亚细胞结构的破坏直接导致细胞的损伤和死亡,因此,如何提高和改变细胞对于糖类的渗透性对于细胞的存活至关重要。为了让糖类能够透过细胞膜,在膜内发挥冷冻保护作用,研究人员进行了较多的针对这一问题的研究,如为了提高 MII 卵子的冷冻保存复苏率,研究人员采用与糖类共培养、细胞内糖类注射、改变细胞膜结构及通透性等方法,但效果不肯定,未取得一致的认可。

糖类可以进行乙酰化、甲基化等修饰作用,而改变其理化性质,其中对细胞膜的通透性改变则可以达到使糖类进入细胞内,与细胞内的其他分子发生相互作用而达到相应的效应。

4. 结论

低温保存理论与技术的研究已经成为基础医学及临床医学研究的一各重要领域,特别是生殖医学临床的巨大需求促进了相关理论与技术的发展。但目前的深低温保存技术面临较多发展瓶颈,如卵子保存、组织和器官保存,长期无突破新进展,归根结底是有关理论研究的局限和不足。基因组研究、蛋白质学研究一直是各种基础生物学与医学研究的热点方向,于此相比,糖研究明显未受重视,而糖类承载的生命信息远高于前两者。因此,从糖生物学和糖组学层面展开对低温生物学,包括深低温保存理论与技术的研究,无疑是值得探索的一个领域和方向。

参考文献

- [1] 王克夷。糖类的生物学意义,生命的化学,2009年29卷2期,162~168。
- [2] 王克夷。糖生物学和糖组学,生命的化学,2009年29卷3期,299-305。
- [3] TOSHIAKI HINO, MIHO TAKABE, RIKI SUZUKI-MIGISHIMA, MINESUKE YOKOYAMA. Cryoprotective effects of various saccharides on cryopreserved mouse sperm from various strains. *Reproductive Medicine and Biology*, 2007; 6: 229-233.
- [4] Kathryn Pollock, Rebekah M. Samsonraj, Amel Dudakovic, et al. Improved Post-Thaw Function and Epigenetic Changes in Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved Using Multicomponent Osmolyte Solutions. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*, 2017, 26(11): 828-842
- [5] R.B.McWilliams, W.E.Gibbons, S.P.Leibo. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Human Reproduction*, 1995;10(5):1163-1171.
- [6] R. K. Browne, J. Clulow, M. Mahony. THE EFFECT OF SACCHARIDES ON THE POST-THAW RECOVERY OF CANE TOAD (*Bufo marinus*) SPERMATOZOEA. *CryoLetters*, 2002; 23, 121-128
- [7] 吴延成, 辛爱洁, 卢慧, 刁华, 程莉, 顾一骅, 吴斌, 陶生策, 李铮, 施惠娟, 张永莲。超低温冷冻对人精子糖被的影响, 中华生殖与避孕杂志, 2017年4月第37卷第4期, 282-287。
- [8] 吴士良。糖组学—聚糖以及相关酶与其基因研究是生命科学研究的新热点。苏州大学学报(医学版), 2009; 29(5): 805。
- [9] 杨钊, 姜伟业, 陈闻天。糖生物信息学数据库, 中国生物化学与分子生物学报, 2015; 31(3): 257~263。
- [10] 龚方苑, 戴慧, 高晓明。糖结构特异性免疫识别及应答研究进展。现代免疫学, 2012年第32卷第4期, 265-269。
- [11] 刘夏薇, 安然, 于汉杰, 舒健, 秦鑫敏, 李铮。糖组学在乳腺癌中的研究进展。中国科学: 生命科学, 2016年第46卷第7期: 827~838。
- [12] Wenhui Zhang, Allen G. Oliver, Henry M. Vu, John G. Dumanb and Anthony S. Seriannia. Methyl 4-O-b-D-xylopyranosyl b-D-mannopyranoside, a core disaccharide of an antifreeze glycolipid. *Acta Cryst.* (2013). C69, 1047-1050
- [13] Haishui Huang, Gang Zhao, Yuntian Zhang, Jiangsheng Xu, Thomas L. Toth and Xiaoming He.

Prehydration and Ice Seeding in the Presence of Trehalose Enable Cell Cryopreservation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017, 3, 1758–1768.