

红细胞低温保存中海藻糖的加载方法

刘宝林¹, 赵子威²

(1. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093; 2. 上海理工大学 能源与动力工程学院, 上海 200093)

摘要: 在红细胞低温保存中, 海藻糖被认为是能够替代甘油的生物相容性保护剂, 而海藻糖难以进入红细胞内提供保护。归纳了使海藻糖加载至红细胞内的各种方法, 包括孵育法、渗透休克法、脂质体法等, 详细介绍了每种方法的原理、载入效果及优缺点。最后得出温和且不生成膜孔的加载方案具有一定的优越性, 也可以尝试多种方法联用以提高加载效率和保护效果, 并对未来红细胞低温保存的发展趋势进行了展望。

关键词: 红细胞; 海藻糖加载; 低温保存

中图分类号: R 318.52 **文献标志码:** A

Loading methods of trehalose in RBCs cryopreservation

LIU Baolin¹, ZHAO Ziwei²

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

2. School of Energy and Power Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Trehalose is considered to be a biocompatible CPA that can replace glycerol in red blood cells(RBCs) cryopreservation, but it is difficult to enter the RBCs to provide protection. Various methods of loading trehalose into RBCs were summarized, including thermal stress method, osmotic shock method, liposomes method, etc. The principles, loading effects, advantages and disadvantages of those methods were introduced in detail. The mild loading scheme without membrane pores had advantages. Also, multiple methods can be attempted to improve loading efficiency and protective effect. Finally, the development trend of RBCs cryopreservation in the future was prospected in this review.

Keywords: RBCs; loading trehalose; cryopreservation

红细胞是血液的重要组成部分, 是必不可少的医疗及军需物资。目前, 红细胞的常规保存方法是在 $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下冷藏保存, 此方法最多保存 5~7 周^[1-2], 无法长期大量储存, 仅用于满足各大血库的临时输血需求。因此, 人红细胞长期保存

是目前输血医学领域的重点研究方向。

生物材料在低温条件下可进行长期保存已被广泛熟知, 红细胞的长期保存方案分为冷冻保存和冻干保存两种, 而这两种方法都需要加入低温保护剂(CPA)来减少细胞在降温过程中受到的损

收稿日期: 2021-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51776130)

第一作者: 刘宝林(1968-), 男, 教授。研究方向: 低温生物医学。E-mail: bliiuk@163.com

伤。早在1950年,甘油(glycerol)就被发现能够作为红细胞的低温保护剂并成功将其冷冻保存^[3-4]。1972年,Meryman等^[5]优化了红细胞的保护剂配方,包含6.2 M甘油、0.14 M乳酸钠、5 mM氯化钾和5 mM磷酸二氢钠,冷冻保存1年后,红细胞恢复率可达80%~90%,该配方简单高效,人们在此基础上不断改良。

然而,甘油的毒性一直是个无法避免的话题,研究表明高浓度的甘油会造成卵母细胞DNA甲基化的改变^[6],影响精子的活性^[7],也会造成红细胞的溶血或变形^[8]等影响。所以,在临床输血前,必须对解冻的红细胞进行漫长且复杂的洗脱甘油过程^[9],这一过程不仅费时费力,也往往会损失约15%的红细胞^[10]。因此,红细胞保护剂的“无甘油化”显得尤为重要,找到一种具有生物相容性的低温保护剂并优化保存方法,不需要繁琐的加载、洗涤过程,能够在短时间内获得高质量的血液,是目前红细胞保存领域的发展趋势。

其中,海藻糖(trehalose)就是一种无毒、保护效果好的生物相容性保护剂^[11],在细胞处于冷冻、干燥、热休克、氧化和高渗透压等环境时能够起到较好的保护效果^[12-13]。海藻糖作为一种非渗透性保护剂,正常情况下对红细胞膜的渗透性非常低,但只有当海藻糖进入细胞时才能起到最大限度的保护效果^[14-15]。所以,如何将海藻糖成功加载至红细胞内是一个关键问题,许多学者也通过各种手段解决这一问题。本文就红细胞保存面临的保护剂毒性问题,分析了海藻糖的保护机理和应用领域,着重介绍了目前海藻糖进入红细胞的加载方案,对未来红细胞的低温保存进行了展望。

1 海藻糖与红细胞低温保存

海藻糖是一种天然的非还原性双糖,由两个葡萄糖分子通过半缩醛羟基结合而成,广泛分布于细菌、真菌和动植物的体内,由于其抗低温、耐干燥和稳定的化学性质,作为保护剂被应用于各种生物材料的低温保存^[16-19]。研究显示,在对人体注射高达30 g海藻糖后的一个小时内,各项生理指标均正常,身体无明显不良反应^[20],充分说明海藻糖作为一种生物相容性保护剂值得被关注。

1.1 海藻糖的保护机理

海藻糖对维持细胞膜的稳定早有定论,但对

其保护机理的研究还停留在探索层面,目前主要存在“水替代”和“玻璃化”2种假说。

a. 水替代假说。

冷冻、干燥状态下,海藻糖可以代替水分子与细胞膜和蛋白质上的亲水基团形成水合键,避免细胞膜和蛋白质分子结构改变,保持其结构和功能的稳定^[21],而细胞膜物理状态的改变和蛋白质的变性是造成细胞死亡的直接原因^[22]。李文慧等^[23]发现海藻糖的负载浓度与冻干红细胞后的残余含水量呈负相关,且残余水分布只在细胞膜中,进一步证实了此假说的正确性。

b. 玻璃化假说。

高浓度海藻糖可以提高细胞悬液的玻璃化转变温度^[24],而玻璃态的高黏度性质能够降低分子之间作用力,更容易形成这种稳定的状态,减少细胞在降温过程中受到的冰晶损伤。Liu等^[25]发现在降温过程中,海藻糖能抑制溶液共晶的形成,而共晶往往与低温细胞的低温损伤有关,且随着海藻糖浓度的提高,溶液玻璃化转变温度也升高。

探索海藻糖对红细胞的保护机理,不仅需要实验层面的观察,也需结合分子动力学对其微观机理进行深入探究,如Kumar等^[26]通过分子动力学模拟分析了海藻糖与磷脂双分子层的相互作用机理,成功证实了以上两种假说。实现红细胞的高质量保存也不能只关注细胞膜完整性,同样要关注其变形程度、携氧功能等更多特异性指标。

1.2 海藻糖在红细胞保存中的应用

将海藻糖应用于红细胞低温保存主要有冷冻保存和冻干保存两种方法。冷冻保存是目前临床上低温保存红细胞最常用的方法,大多使用甘油或二甲基亚砜作为冷冻保护剂,但它们对红细胞的毒性问题也导致冻存结束后需要花费大量时间洗涤去除,这一过程红细胞损失较大。因此,无毒无害的海藻糖有望在未来取代甘油成为红细胞保存主要的保护剂。冷冻保存由于其特定的保存条件(-196℃液氮或-80℃冰箱),往往需要额外的保存成本和占地空间,也难以在特殊的环境下(长途运输或战争期间)保证使用条件。因此,保存温度限制小、运输方便、成本更低的冻干保存逐渐被研究者重视起来^[27]。但由于冻干保存相对较低的红细胞和血红蛋白恢复率,及复水后的红细胞活性问题,一直无法真正应用于临床,若这种技术能够获得突破,将具有十分广泛的应用前景。

2 海藻糖的加载方法

由于海藻糖对细胞膜的不可渗透性^[28],研究者们尝试使用各种方法将海藻糖载入哺乳动物细胞。包括修改基因表达法^[29]、蛋白成孔法^[30]、显微注射法^[31]、液相内吞法^[32]等,以实现成纤维细胞、角质细胞、卵母细胞和血小板等有核细胞的海藻糖加载。而成熟的红细胞由于缺少细胞核且体积较小,无法应用以上技术。因此,本文列举一系列将海藻糖加载至红细胞,并最终成功实现冷冻保存或冻干保存的方法。

2.1 孵育法

当红细胞长时间置于高浓度海藻糖、高温环境时,细胞膜会发生渗透失衡和磷脂相变,使得胞外海藻糖进入胞内。孵育法是最早出现,也是操作最简单的方法,Satpathy等^[33]将红细胞置于含有海藻糖的磷酸缓冲溶液中,以观察加载效率与胞外海藻糖浓度、加载时间与加载温度之间的关系。研究发现最佳的孵育条件为胞外海藻糖浓度 800 mM,在 37℃ 下孵育 7 h,胞内海藻糖浓度可达 40 mM,不过由于红细胞长期暴露在高渗溶液中,也导致细胞形态出现异常。在何晖等^[34]的研究中,该方法使冻干恢复率最高达 53.6%,较未孵育海藻糖提高了 22%。Wolkers等^[32]曾将此方法应用于血小板的冻干保存中,却发现胞外海藻糖浓度 35 mM 是血小板最佳的孵育环境;而在 Satpathy 的实验中,胞外海藻糖浓度在超过 600 mM 才会显著提升加载效率。这也进一步说明,红细胞不同于有核的血小板以胞吞的方式加载海藻糖,只能通过细胞内外巨大的渗透压差提供加载动力。

2.2 渗透休克法

渗透休克法是对细胞内外渗透压差进行控制,刺激细胞膜上通道开启与闭合,从而促进海藻糖载入细胞内的速度和数量。Zhou等^[35]将红细胞先后置于高渗葡萄糖溶液(28% w/v)中失水皱缩、低渗海藻糖溶液(4% w/v)中吸水重胀,在此过程中,借助红细胞内外的渗透压梯度变化促进了海藻糖的加载。相较于单一步骤的孵育法,整个过程加载时间大幅缩短,仅需 50 min,胞内海藻糖浓度可达 43.2 mM,冻干后红细胞恢复率由对照组的 31.6% 提升至 53.6%,形态学和生化指标良好。但正是因为过程中膜上通道的开放,也导致

胞内一些物质(如血红蛋白)的泄露,红细胞质量略有下降。

渗透休克法的操作流程比较复杂,需要多次离心洗涤,人工操作量大、红细胞浪费严重。Shen等^[36]将此方法与微流控技术相结合,充分利用微流控芯片精准化、自动化、标准化的特点,以一种更自动、高效的方法加载海藻糖。在该研究中,红细胞悬液在微流控芯片中先后流经低渗包载区、高渗封装区和膜交换区。红细胞在低渗海藻糖溶液中吸水膨胀,细胞膜上开孔,海藻糖渗入胞内;在高渗海藻糖溶液中失水皱缩,恢复等渗状态,并封闭开孔;接着在等渗氯化钠溶液中清除多余的游离血红蛋白、细胞碎片;最后经芯片出口流出,以达到海藻糖的自动加载效果。这种方法在 2 min 内即可达到 21 mM 的海藻糖负载量,但由于芯片体积的限制,不足的海藻糖负载量在冷冻和冻干实验中,并没有得到理想的细胞恢复率,若能进一步控制海藻糖在芯片内的流速或开发更大体积的芯片,或许能有更好的效果。

2.3 脂质体法

脂质体法通过人工合成一种包裹着海藻糖的双层脂质体微囊,脂质体膜与细胞膜结构相似,具有可相容性,因此与细胞一同培育,可将海藻糖递送至细胞内。该方法也被广泛用于生物学、医学等领域,以将各种药物和小分子物质加载至哺乳动物细胞内。Holovati等^[37]用二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine),和胆固醇合成了这种脂质体微囊,不仅成功将海藻糖加载至红细胞内,冷冻存活率由 29% 提升至 66%,且显著改善了冻融结束后细胞膜的完整性。

之所以脂质体能够起到这种保护效果,可能符合“脂质体修复”假说^[38]:“外源性”的磷脂可以修复细胞冻融过程中导致的细胞膜局部损伤,进一步增强对细胞的保护作用。Holovati等^[39]也对这一假说进行了证明,利用疏水性的 R18 标记进行荧光实验,发现在脂质体-红细胞的相互作用中,脂质体的磷脂会转移到红细胞膜上,并随着脂质相容,脂质体的磷脂会不断向红细胞膜上扩散。基于这一结果,也许可以将脂质体看作一种独特的低温保护剂,不同于传统的渗透与非渗透保护剂的作用机理,在低温保存领域有很好的应用前景。

2.4 聚合法

由 Lynch 团队合成的一种基于 pH 响应的聚合

物 PP-50 目前为止能使海藻糖的载入量达到最高^[40-41], 该聚合物主链为聚 L-赖氨酸间苯二甲酰胺 (PLP), 侧链的羧基被 L-苯丙氨酸取代。当环境处于低 pH 时, PP-50 能够向疏水性结构变化, 以增强与磷脂双分子层的相互作用, 实现了细胞膜的可渗透性^[42]。在对人红细胞的冻干实验中^[41], 最高能将 251 mM 的海藻糖载入胞内, 也使细胞膜完整性较对照组提高了 9 倍, 改善血红蛋白的被氧化程度, 极大地促进了海藻糖的保护效果, 冷冻存活率由 62.2% 提高到 86.6%, 但此方法长时间的孵育时间也会导致溶血的发生。所以, 可以在保证保护效果的前提下, 适当降低海藻糖的载入量, 以找到最佳的孵育条件。此外, 聚合物的复杂制备工艺与洗涤环节也限制了该方法的临床使用, 且低 pH 环境及聚合物本身对红细胞的影响仍有待研究。Zhang 等^[43] 也尝试对 γ -聚谷氨酸的侧链进行接枝以制备另一种聚合物, 其保护机理与 PP-50 增加海藻糖对细胞膜可渗透性类似, 但海藻糖载入量却远低于 PP-50 的表现。

2.5 电穿孔法

电穿孔法主要通过对细胞悬液施加短时间的电场脉冲来增大细胞膜的渗透性。当细胞膜处于外加电场时, 膜两边的电解质离子会发生极化, 导致膜内外形成电位差, 进而击穿细胞膜形成小孔, 且离子在膜上运动产生的局部焦耳热也进一步增强了孔的形成, 胞外物质得以进入胞内。而当电场脉冲消失后, 小孔在细胞弛豫现象后重新闭合^[44]。在实际操作中, 可以针对不同细胞, 设置不同的电场参数, 以达到最佳的载入条件。

Zhou 等^[45] 研究了胞外海藻糖浓度、电场强度、脉宽和脉冲频率这 4 种因素对海藻糖加载效率的影响, 最终发现当胞外海藻糖浓度为 800 mM、电场强度为 1.5 kV/cm、脉宽为 1 ms、频率为 4 次/min 时, 细胞可加载 63.7 mM 海藻糖, 同时红细胞冻干恢复率达 70.9%。但高的恢复率并不意味着高的质量, 研究结果表明, 使用电穿孔法会造成更为严重的溶血, 也未进一步检测细胞膜质量、红细胞生化活性等指标。有学者认为, 这种电穿孔现象会对细胞造成严重的不可逆损伤^[46], 所以此方法能否得到广泛应用仍有待考量。

2.6 超声波法

与电穿孔法类似, 超声波法也是通过外加物理场来改变细胞膜通透性, 当细胞周围充斥着微

小气泡时, 超声波的能量会使微泡振荡和破裂以诱导细胞膜上形成暂时性的孔隙, 同时在孔隙周围形成扰流, 促使胞外物质向胞内传递。Centner 等^[47] 首次利用这种“声孔效应”, 往含有海藻糖和红细胞的缓冲溶液中充入脂质包裹的十氟丁烷微气泡^[48], 在外界超声的作用下成功将海藻糖加载到红细胞中, 并在冷冻和冻干状态下长期保存。Janis 等^[49] 还将这种“声孔效应”与自动射流装置相结合, 在流动的红细胞悬液外部施加超声波, 以一种更高效、均匀的方式完成海藻糖载入过程。结果显示, 自动射流装置仅需 1 min 即可使胞内海藻糖浓度达 150 mM, 且胞内海藻糖浓度和红细胞质量随着微泡数量的增多而提高, 同时也不用考虑十氟丁烷这种生物相容物质的浓度对红细胞的影响。然而在 Janis 的实验中, 高效的海藻糖载入虽然得到了较高的冷冻恢复率(约 95%), 而没有带来良好的冻干恢复率(约 25%), 也缺少其他因素对红细胞的影响实验(如细胞流过时设备的温度、超声波频率和压力、细胞流速和浓度等), 超声对红细胞是否存在潜在威胁也尚未清楚。

2.7 纳米粒子法

利用各种各样的材料和制备工艺, 许多纳米粒子已被成功开发并应用于低温保存领域。各种研究表明, 纳米粒子在调节细胞膜渗透性^[50]、改善溶液热力学性质^[51]、强化升降温速率^[52] 等环节都有着显著效果, 为细胞、组织和器官的冻存开辟了一条新途径。利用纳米粒子调节细胞膜渗透机制可用于强化海藻糖载入红细胞, Stefanic 等^[53] 在磷灰石纳米粒子周围覆盖带正电的 2-氨基乙基磷酸离子 (2-aminoethylphosphate, AEP) 及带负电的六偏磷酸离子 (hexametaphosphate, HMP), 以形成具有胶体性质的悬浮液。这种带电的磷灰石纳米颗粒可以通过局部地、可逆地、瞬时地改变磷脂双分子层的性质, 来促进海藻糖的渗透。该纳米粒子具有 pH 响应机制, 在胞外海藻糖浓度为 350 mM 和 37 °C 条件下, pH=6.5 时可载入 51 mM 海藻糖进入红细胞, 而 pH=7.4 时海藻糖的载入量只有 31 mM, 且在低 pH 环境下达到 91% 的红细胞冻融存活率(相较对照组提高了 42%)。该研究还通过荧光显微观察到纳米粒子只在细胞膜上参与调节机制, 并不会进入红细胞内造成影响。同时也证明了纳米粒子与细胞膜的相互作用并不是通过生成膜孔, 而是通过局部修饰磷脂双分子层的三维结构

来增加渗透效果。

本文对这些海藻糖加载方法进行了总结, 如表 1 所示, 不难看出每种方法都各有优缺点。笔者认为可以将几种方法联合使用, 例如在电穿孔时考虑加入脂质体以修复细胞膜受到的损伤, 也同时保证了高效的海藻糖载入量。

表 1 红细胞中海藻糖加载方法对比
Tab.1 Comparison of loading methods of trehalose in RBC

加载方法	时间	载入量/ mM	优点	缺点
热渗透法 ^[33]	7 h	40	操作简单	时间长; 渗透损伤大
渗透休克法 ^[35]	50 min	42	时间较短; 渗透损伤可逆	流程复杂; 造成细胞浪费
微流控法 ^[36]	2 min	21	时间短; 自动化	芯片制备工艺复杂
脂质体法 ^[37]	4 h	15	改善细胞膜	载入量低; 脂质体制备复杂 要洗涤; 时间长;
聚合物法 ^[40, 41]	9 h	251	载入量高	制备成本高
电穿孔法 ^[45]	1 min	64	时间短; 参数可控	溶血率高
超声波法 ^[49]	1 min	150	时间短; 载入量高	恢复率低
纳米粒子法 ^[53]	7 h	51	不生成膜孔; 纳米粒子不进入细胞	载入时间长

3 海藻糖加载的安全问题

海藻糖加载量是发挥其保护效果的根本前提, 一般来说胞内海藻糖浓度达到 50 mM 才有较好的保护效果^[40], 低浓度加载量无法提供足够的保护, 高浓度加载量往往是由于细胞结构被破坏所导致, 所以应在保证适当加载量的前提下, 最大限度地保护细胞结构不受破坏。需要长时间孵育的加载方案不仅会对红细胞造成严重的渗透损伤, 高温环境下的细胞并未停止代谢活动, 也会进一步影响细胞质量; 外加物理场这种刺激性强的加载方案虽然能够快速地将载入足够浓度海藻糖, 但对细胞膜产生的不可逆损伤较大; 通过在细胞膜上开孔的方法对海藻糖的加载是非选择性的, 往往导致除海藻糖以外的物质交换, 如胞内离子及血红蛋白的逸出或不必要的胞外物质渗入。高载入量的海藻糖往往牺牲了原始红细胞为代价, 而这一点在许多文献中都被忽略, 从而导致真实红细胞损失率实际大于文献中给出的数据。

即使列举上述多种海藻糖载入方法, 但冻干红细胞所面临的低恢复率问题仍未得到根本解决, 不仅在于保护剂的突破, 更重要的是优化冻

干工艺的创新。因此, 从保护剂添加到干燥及复水各个环节均需要进一步探索最适合红细胞保存的独特工艺, 才有希望突破壁垒, 实现红细胞高质量的低温保存。

4 结 论

本文从海藻糖替代甘油作为红细胞低温保护剂的角度出发, 分析了海藻糖在红细胞低温保存中的保护机理与应用领域, 并对目前海藻糖进入红细胞的各种方法进行了详细介绍, 最终得出如下结论:

- a. 应尽量减少红细胞在海藻糖加载过程中导致的细胞损伤, 快速、温和、高效的加载方案能够最大化地保护细胞;
- b. 寻找对海藻糖具有选择性吸收的加载方案, 避免生成膜孔带来不必要的物质交换导致红细胞质量降低问题;
- c. 可以考虑将几种海藻糖加载方法联合使用, 在保证高效载入的同时, 达到对细胞膜的修复效果。
- d. 发展适用于临床批量使用的低温保护剂加载方案及红细胞保存方案, 推动未来红细胞低温保存实现标准化、规范化的临床应用。

参考文献:

[1] 魏蕾. 保存时间对库存去白细胞悬浮红细胞血液指标变化的影响 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(22): 15–17.

[2] 沈凌霄, 赵刚. 红细胞冷冻保存的历史、机理与研究进展 [J]. 临床输血与检验, 2021, 23(3): 273–293,394.

[3] SMITH A U. Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood-cells[J]. *Lancet*, 1950, 256(6644): 910–911.

[4] MOLLISON P L, SLOVITER H A. Successful transfusion of previously frozen human red cells[J]. *Lancet*, 1951, 258(6689): 862–864.

[5] MERYMAN H T, HORNBLOWER M. A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration[J]. *Transfusion*, 1972, 12(3): 145–156.

[6] GUTIERREZ E J, DIAZ F A, FOSTER B A, et al. 48 effect of dimethyl sulfoxide- or glycerol-based vitrification protocols on meiotic spindle of in vitro-matured bovine oocytes[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2018, 30(1): 163.

[7] CRITSER J K, HUSE-BENDA A R, AAKER D V, et al. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of

- cryoprotectants on motility[J]. *Fertility and Sterility*, 1988, 50(2): 314–320.
- [8] BAKALTCHEVA I B, ODEYALE C O, SPARGO B J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1996, 1280(1): 73–80.
- [9] ASGHAR W, EL ASSAL R, SHAFIEE H, et al. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(7): 895–903.
- [10] PALLOTTA V, D'AMICI G M, D'ALESSANDRO A, et al. Red blood cell processing for cryopreservation: from fresh blood to deglycerolization[J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2012, 48(4): 226–232.
- [11] PELLERIN-MENDES C, MILLION L, MARCHAND-ARVIER M, et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen[J]. *Cryobiology*, 1997, 35(2): 173–186.
- [12] ELBEIN A D, PAN Y T, PASTUSZAK I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule[J]. *Glycobiology*, 2003, 13(4): 17R–27R.
- [13] CROWE J H, CROWE L M. Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 145–146.
- [14] HAN Y, QUAN G B, LIU X Z, et al. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization[J]. *Cryobiology*, 2005, 51(2): 152–164.
- [15] CROWE J H, CROWE L M, CHAPMAN D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose[J]. *Science*, 1984, 223(4637): 701–703.
- [16] Zhu W Q, Cai N N, Jiang Y, et al. Survivable potential of germ cells after trehalose cryopreservation of bovine testicular tissues[J]. *Cryobiology*, 2021, 101: 104–114.
- [17] PUHLEV I, GUO N, BROWN D R, et al. Desiccation tolerance in human cells[J]. *Cryobiology*, 2001, 42(3): 207–217.
- [18] ITO D, WAKAYAMA S, KAMADA Y, et al. Effect of trehalose on the preservation of freeze-dried mice spermatozoa at room temperature[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2019, 65(4): 353–359.
- [19] CHENG Y, YU Y R, ZHANG Y T, et al. Cold-responsive nanocapsules enable the sole-cryoprotectant-trehalose cryopreservation of β cell-laden hydrogels for diabetes treatment[J]. *Small*, 2019, 15(50): 1904290.
- [20] ARGOV Z, VORNOVITSKY H, BLUMEN S, et al. First human use of high dose IV trehalose: safety, tolerability and pharmacokinetic results from the oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) therapy trial (P7.068)[J]. *Neurology*, 2015, 84(S14): 7.
- [21] CROWE J H, CROWE L M, CARPENTER J F, et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars[J]. *The Biochemical Journal*, 1987, 242(1): 1–10.
- [22] LESLIE S B, ISRAELI E, LIGHTHART B, et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(10): 3592–3597.
- [23] 李文慧, 王珏, 李玲, 等. 海藻糖水替代机制对冻干红细胞保护作用的探讨 [J]. 中国输血杂志, 2018, 31(3): 240–243.
- [24] CROWE J H, CROWE L M, OLIVER A E, et al. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state[J]. *Cryobiology*, 2001, 43(2): 89–105.
- [25] LIU W, HUANG Z Y, HE X W, et al. Impacts of trehalose and L-proline on the thermodynamic nonequilibrium phase change and thermal properties of normal saline[J]. *Cryobiology*, 2020, 96: 92–98.
- [26] KUMAR A, CINCOTTI A, APARICIO S. Insights into the interaction between lipid bilayers and trehalose aqueous solutions[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 314: 113639.
- [27] 华泽钊. 冷冻干燥新技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 391–396.
- [28] STEWART S, HE X M. Intracellular delivery of trehalose for cell banking[J]. *Langmuir*, 2019, 35(23): 7414–7422.
- [29] GUO N, PUHLEV I, BROWN D R, et al. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 168–171.
- [30] EROGLU A, RUSSO M J, BIEGANSKI R, et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 163–167.
- [31] EROGLU A, TONER M, TOTH T L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes[J]. *Fertility and Sterility*, 2002, 77(1): 152–158.
- [32] WOLKERS W F, WALKER N J, TABLIN F, et al. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying[J]. *Cryobiology*, 2001, 42(2): 79–87.
- [33] 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.
- [34] 何晖, 刘宝林, 华泽钊, 等. 海藻糖载入红细胞及其冷冻干燥的实验研究 [J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(6): 907–911.
- [35] ZHOU X L, HE H, LIU B L, et al. Loading trehalose into red blood cells by improved hypotonic method[J]. *Cell Preservation Technology*, 2008, 6(2): 119–124.
- [36] SHEN Y R, DU K, ZOU L L, et al. Rapid and continuous

- on-chip loading of trehalose into erythrocytes[J]. *Biomedical Microdevices*, 2019, 21(1): 5.
- [37] HOLOVATI J L, GYONGYOSSY-ISSA M I C, ACKER J P. Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality[J]. *Cryobiology*, 2009, 58(1): 75–83.
- [38] DE LEEUW F E, DE LEEUW A M, DEN DAAS J H G, et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing[J]. *Cryobiology*, 1993, 30(1): 32–44.
- [39] HOLOVATI J L, GYONGYOSSY-ISSA M I C, ACKER J P. Investigating interactions of trehalose-containing liposomes with human red blood cells[J]. *Cell Preservation Technology*, 2008, 6(2): 131–142.
- [40] LYNCH A L, CHEN R J, DOMINOWSKI P J, et al. Biopolymer mediated trehalose uptake for enhanced erythrocyte cryosurvival[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(23): 6096–6103.
- [41] LYNCH A L, CHEN R J, SLATER N K H. pH-responsive polymers for trehalose loading and desiccation protection of human red blood cells[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(19): 4443–4449.
- [42] CHEN R J, KHORMAEI S, ECCLESTON M E, et al. The role of hydrophobic amino acid grafts in the enhancement of membrane-disruptive activity of pH-responsive pseudo-peptides[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(10): 1954–1961.
- [43] ZHANG Q F, LIU B, CHONG J H, et al. Combination of hydrophobically modified γ -poly(glutamic acid) and trehalose achieving high cryosurvival of RBCs[J]. *Science China Technological Sciences*, 2021, 64(4): 806–816.
- [44] TEISSIE J, GOLZIO M, ROLS M P. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2005, 1724(3): 270–280.
- [45] ZHOU X L, YUAN J, LIU J F, et al. Loading trehalose into red blood cells by electroporation and its application in freeze-drying[J]. *Cryo Letters*, 2010, 31(2): 147–156.
- [46] RUBINSKY B. Irreversible electroporation in medicine[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2007, 6(4): 255–260.
- [47] CENTNER C S, MURPHY E M, PRIDDY M C, et al. Ultrasound-induced molecular delivery to erythrocytes using a microfluidic system[J]. *Biomicrofluidics*, 2020, 14(2): 024114.
- [48] KOPECHEK J A, CARSON A R, MCTIERNAN C F, et al. cardiac gene expression knockdown using small inhibitory RNA-loaded microbubbles and ultrasound[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159751.
- [49] JANIS B R, PRIDDY M C, OTTO M R, et al. Sonoporation enables high-throughput loading of trehalose into red blood cells[J]. *Cryobiology*, 2021, 98: 73–79.
- [50] WANG J Y, ZHAO G, SHU Z Q, et al. Effect of iron oxide nanoparticles on the permeability properties of Sf21 cells[J]. *Cryobiology*, 2016, 72(1): 21–26.
- [51] XU H F, HAO B T, LIU L J, et al. Calorimetric studies on thermal properties of nano-cryoprotectant solutions during vitrification[J]. *Cryo Letters*, 2016, 37(6): 406–410.
- [52] MANUCHEHRABADI N, GAO Z, ZHANG J J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(379): eaah4586.
- [53] STEFANIC M, WARD K, TAWFIK H, et al. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation[J]. *Biomaterials*, 2017, 140: 138–149.

(编辑: 丁红艺)