

置核法冻存人 T 淋巴细胞的初步研究

刘威 黄智勇 宋作 刘宝林* 何晓文*
(上海理工大学生物系统热科学研究所 上海 200093)
(原能细胞科技集团有限公司 上海 201203)
(15921600594, 1f6428@163.com)

摘要: 胞外基质在降温的过程中普遍存在的过冷现象通常会影响细胞冻存的质量,而置核是抑制溶液在降温过程中过冷的有效办法,本实验利用置核成功地低温冻存了人 T 淋巴细胞。研究发现在降温过程中,置核能够有效增加细胞的失水时间,抑制胞内冰晶的产生。实验显示采用置核进行冻存的人 T 淋巴细胞复苏后 0h 和 24h 的存活率分别为 $80.55 \pm 0.45\%$ 和 $71.15 \pm 0.15\%$, 0h 以及 24h 回收率分别为 $89.91 \pm 1.7\%$ 和 $76.21 \pm 0.07\%$ 。复苏培养 24h 后的存活率以及回收率要显著高于传统的程序降温盒冻存 ($P < 0.05$)。置核这一技术有望被应用于传统的细胞慢速低温冻存,甚至组织和器官的长期保存当中。

关键词: 细胞冻存, 过冷, 置核, 人 T 淋巴细胞

The Preliminary Research of Ice-seeding on the Cryopreservation of Human T Lymphocytes

Abstract: The supercooling of freezing medium during freezing is a critical challenge for a successful cell cryopreservation, while ice seeding is an effective way to eliminate it. This research has proved that ice seeding is an implementable method for human T lymphocytes preservation. We found that cells dehydrated more during cooling with ice seeding, and the intracellular ice formation is effectively suppressed. The survival rates of human lymphocytes after 0h and 24h of warming are $80.55 \pm 0.45\%$ and $71.15 \pm 0.15\%$ respectively, while the recovery rates of it in 0h and 24h are $80.18 \pm 1.51\%$ and $64.31 \pm 2.11\%$ respectively. The survival and recovery rates after 24h of warming are significantly higher than using process cooling box ($P < 0.05$). This research consequently reveals ice seeding can be an effective way to improve the outcome of cell cryopreservation and may facilitate storage of tissues and organs.

Key words: Cell cryopreservation, Supercooling, Ice seeding, Human T lymphocyte

0 引言

随着再生医学、干细胞治疗,辅助生殖等医学技术的发展,基于细胞的药物开发逐渐成为热点。这些细胞药物制剂通常需要进行一定程度的保存和运输,低温保存是目前最有效的方法^[1]。细胞保存是利用冷冻技术将细胞降温至特定温度,在低温下抑制细胞内部的代谢,从而实现长期保存细胞的技术^[2]。细胞冻存往往需要加入一定种类的浓度的低温保护剂。根据降温的方式以及最终的保存状态,细胞的低温保存主要分为慢速冷却低温保存以及玻璃化低温保存。玻璃化低温保存由于要形成玻璃态往往要求较高的保护剂浓度和极快的降温速率,所以目前绝大多数成功的低温保存都是采用慢速冷却低温保存。目前在细胞慢速冷却低温保存领域的主要研究方向是针对不同细胞开发新的冻存液,减少 DMSO 的浓度以减少保护剂的毒性,然后利用程序降温盒以及程序降温仪进行细胞冻存。

降温过程中如何避免细胞的低温损伤是细胞冻存的主要挑战之一。经典低温生物理论“两因素”假说认为细胞在不同的降温速率下会经历不同程度的脱水,进而影响细胞内部冰

晶的形成,其中慢速降温会使细胞脱水严重,虽然胞内冰晶形成被抑制,但是会对细胞产生渗透损伤;快速降温会使细胞没有足够长的脱水时间造成细胞内部水分含量过高,形成胞内冰损伤^[3]。不同的细胞由于其体积,细胞膜的渗透性的不同存在一个最佳的降温速率,在该降温速率下进行细胞冻存,细胞会经历最佳的失水时间,使得胞内冰被抑制的同时也不会对细胞产生过高的渗透损伤。低温生物领域内部针对如何研究最优降温速率也开发出了许多实验方法。主要分为两类,一类是借助低温显微系统进行研究,通记录并分析降温过程中的细胞图像来得到降温速率和细胞体积之间的关系;另一类是利用差示扫描量热仪法^[4]。后者是由 Ramachandra 等人提出的,该方法能够有忽略细胞体积以及效消除低温显微镜法中图像分析技术产生的误差^[5]。但是在得出最优降温速率之后,在实际冻存过程中却由于溶液过冷的存在难以实现该速率。溶液的过冷一方面会使得冰晶的生长速率无法按照最佳的降温速率进行生长,另一方面一旦冰晶形成会因为潜热的释放和环境温度之间形成较大的温差,形成较快的降温速率,都不利于细胞的冻存。置核是目前消除溶液过冷,实现细胞的最佳冻存速率最有希望的解决方案。

置核是指在溶液降温的过程中,通过人为的操作在溶液内部形成小范围低温区,引发晶核的形成的技术。置核一直以来都是低温生物学的研究对象之一。有许多文章以及专利报道了置核的有关应用以及机理。目前主要的置核方法分为以下五种:1)通过在容器外面形成局部的冷点来诱发成核;Huang 等通过该方法进行置核并结合提前脱水在保护剂仅为海藻糖的情况下对 NIH 3T3 小鼠成纤维细胞和 C3H10T1/2 小鼠间充质干细胞实现了成功的低温保存^[1];2)通过一些化学以及生物成核剂在溶液内部进行置核,Teixeira 等通过在冻存液中添加成核介质 Snomax 实现了小鼠胚胎的低温保存^[6];3)Petersen 等开发了一款能够高效诱导晶核产生的电极头^[7],通过该装置能够在溶液内部进行置核,该装置已经被应用于人肺内皮细胞的低温保存^[8];4)通过机械的方法,比如摇晃,震动超声等来进行置核,Passot 等在研究蛋白质冻干的过程中使用了超声波来进行置核^[9];5)通过在降温过程中改变降温速率在溶液内部进行置核,该方法通常以慢速降温开始,然后突然提高降温速率,造成溶液外部的局部过冷促进成核,该方法已经被应用于肝细胞的低温保存^[10];6)通过改变压力在溶液内部进行置核,该方法经常应用在冻干研究中,通过降低体系的压力来催化溶液内部成核^[11]。关于置核机理的研究,Nakamura 等研究了置核温度对酿酒酵母细胞低温保存存活率的影响,其发现过低的置核温度会使酿酒酵母细胞的冻存存活率显著下降^[12]。Zhang 等研究了置核温度和人卵巢组织低温保存的关系,发现人卵巢组织最佳的置核温度为-5℃^[13]。采用置核法能够减少冻存液在降温过程中给的过冷度,控制细胞的最佳失水时间,从而在降温过程中让细胞以最佳的含水量进行冻存,在避免胞内冰的同时使细胞经历最小的渗透损伤,从而提高冻存细胞的存活率。

本实验选取人 T 淋巴细胞为研究材料,人 T 淋巴细胞是目前肿瘤免疫治疗技术的主要功能细胞。细胞免疫疗法的一般操作是提取患者外周血、肿瘤组织、胸腹水等组织中的淋巴细胞,用不同的培养方法和工艺在短时间内培养出以 T 淋巴细胞为主的对肿瘤具有杀伤作用并且不损伤自身的健康细胞的效应细胞^[14]。该细胞往往需要进行低温保存,运输再回输人体进行治疗。目前有关人外周血 T 淋巴细胞的低温保存的研究还较少,本实验意图通过置核的方法来对人 T 淋巴细胞进行成功的低温保存,同时探索置核保存的相关机理及其实际操作的可行性。

1. 材料和方法

1.1 实验材料

人 T 淋巴细胞由原能细胞科技集团有限公司提供;丁香假单胞菌(ATCC)。

1.2 试剂

勃脉力 A，海藻糖（国药集团化学试剂有限公司），DMSO（Sigma-Aldrich），人血清白蛋白(Grifols)，1640 培养基（Gibco），AOPI 荧光染料（Nexcelom Bioscience）。本实验使用的冻存液参考 Hughes 等人的研究^[15]，具体配方为 5%DMSO,4% 乙二醇以及 0.2M 海藻糖。

1.3 仪器设备

低温显微系统分为以下几个部分：冷台（FDCS196，英国 Linkman 公司），温度控制台（T95，英国 Linkman 公司），显微镜（LNP95，英国 Linkman 公司），摄像机（Flea3，美国 FLIR Systems 公司）。

1.4 实验步骤

1.4.1 低温显微观察置核法冷冻细胞

（1）样品处理

保证 T 淋巴细胞悬液的浓度为 1×10^7 cells/mL，实验前用 AOPI 染料检测 T 淋巴细胞活性，保证细胞的活率在 90% 以上。在低温下进行保护剂加载，将细胞离心去除培养基后，用等体积冻存液重悬。实验分为实验组和对照组，实验组使用冰核细菌进行置核，空白组不进行置核。置核组用微量移液器吸取 $1 \mu\text{L}$ T 淋巴细胞悬液置于低温显微镜样品台的中央，另吸取 $0.5 \mu\text{L}$ 冰核细菌悬液滴于细胞悬液中央，盖上盖玻片进行观察；空白组吸取 $1.5 \mu\text{L}$ T 淋巴细胞悬液至于样品台中央进行观察。

（2）低温显微的温度程序

设定样品的初始温度为 10°C ，以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 降温至 -40°C ，后以复 $100^\circ\text{C}/\text{min}$ 复温至 10°C 。观察细胞在降温过程中的失水情况，胞内冰形成情况以及复温后的细胞膜完整性。

1.4.2 置核法冻存细胞

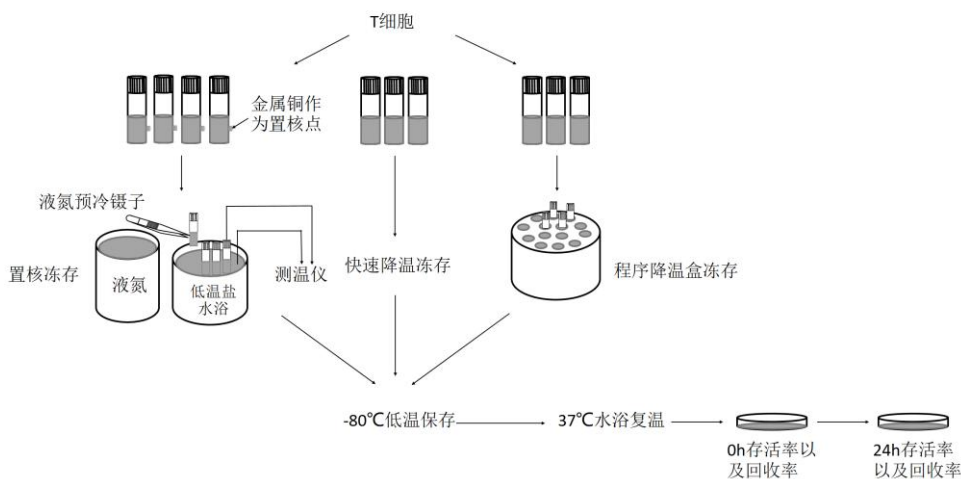


图 1：实验设计框架

本实验采用利用液氮预冷管壁制造局部冷点的方法来进行置核。为了提高置核的效率

以及重复性，本实验在冻存管上进行了优化，在冻存管的下方 0.5cm 处插入一根铜芯，在冻存的过程中用液氮预冷的镊子接触铜芯，利用金属铜的快速导热在溶液内部形成局部冷点来诱发晶核的产生。

进行冻存实验的人 T 淋巴细胞初始存活率为 92.6%，细胞冻存实验变量为降温方式，分别采用置核冻存，快速降温冻存以及常规的程序降温盒慢速冻存，每组设置三个平行。置核冻存的操作如图 1 所示：提前准备低温盐水浴，氯化钠的浓度为 10%，采用热电偶监测水浴的温度为-5℃。置核组将 T 淋巴细胞离心用保护剂重悬后，分装到三支准备好的置核冻存管中，每支体积为 1mL，剩余一支装有 1mL 冻存液作为温度监测管。将四支冻存管同时置于 15%冰盐水浴中，并通过温度监测管检测实时温度。当管内温度稳定在-9℃时将其稍微拿出液面，用提前在液氮中预冷的镊子接触管壁上的铜芯置核点，发现有冰晶在置核点附近形成后立即放回水域中平衡 5min 使冰晶生长完全，平衡结束之后直接转移置-80℃冰箱进行低温保存。快速降温冻存组将细胞离心用冻存液重悬后分装至三支冻存管内，直接置于-80℃冰箱中。程序降温盒慢速冻存组将细胞离心用冻存液重悬后分装到 3 支冻存管内，置于程序降温盒内转移置-80℃冰箱内进行低温保存。24h 后将置核组和空白组的细胞在 37℃水浴中进行复温，因 AOPI 染料相比台盼蓝染料精确度更高，故本实验采取 AOPI 染料检测 0h 和 24h 的细胞存活率以及活细胞浓度。

回收率的计算公式如下：

$$\text{细胞回收率}(\%) = \frac{\text{冻存后活细胞总数}}{\text{冻存前活细胞总数}} \times 100\%$$

2. 结果与讨论

2.1 置核过程的胞内冰显微观察

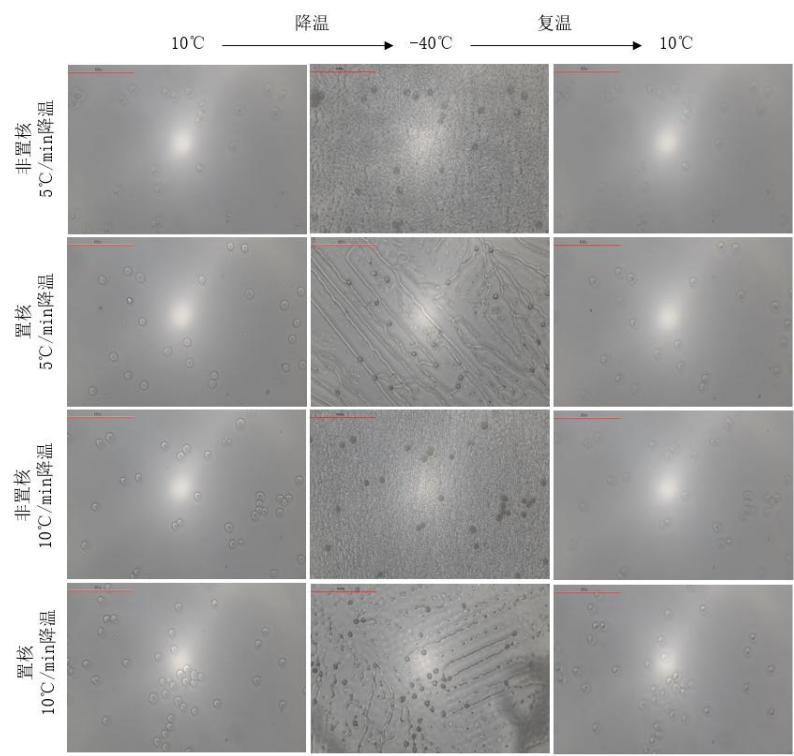
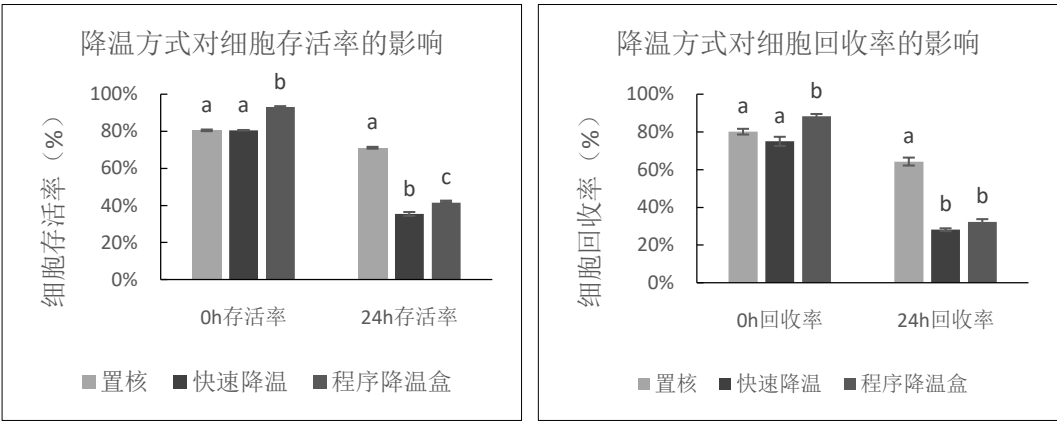


图 2 置核与非置核下的胞内冰显微观察

图 2 比较了在置核和非置核的情况下，细胞冻存的实际效果。低温显微发现，在不采

取置核的条件下胞外基质会过冷到-20℃以上，形成的冰晶较密，没有分支，无论 5℃/min，还是 10℃/min 的降温速率，其胞内冰的形成概率都是 100%；在采用冰核细菌进行置核的情况下，胞外基质的结晶时间大大提前，一般在-7℃左右，胞外基质结晶形成的冰晶呈明显分支状，细胞有不同程度的皱缩，5℃/min 和 10℃/min 的降温速率下都没有观察到明显的胞内冰产生。在快速复温过后，非置核组的细胞膜受损严重，边界模糊；而置核组的细胞状态较好，边界清晰。低温显微实验发现在晶核存在情况下慢速冷冻能使细胞经历足够长时间的脱水，从而极大程度地抑制胞内冰的产生，减小细胞在降温阶段的损伤。根据两因素假说，对于特定的细胞存在最佳的降温速率，但是实际操作过程中由于过冷的存在，无法实现最佳的降温速率。结合 Mazur 的孔理论^[16]以及经典成核理论^[2]，过冷使得溶液极短的时间内形成密集的小冰晶，小的冰晶通过细胞膜表面的微孔进入细胞内部因引发胞内冰的形成；另一方面根据 Toner 的表面催化成核 SCN 理论^[17]，过冷使得冰晶在短时间内快速形成，对细胞膜形成更大的渗透冲击，同样也能引起胞内冰的形成。关于胞内冰的形成机理还需要设计更多实验进行证明。本研究发现细胞体积或者细胞内的水分含量似乎是决定胞内冰形成更加关键的因素，在细胞失水的情况下几乎没有胞内冰形成，不管是 5℃/min 还是 10℃/min，实验进一步可以进一步提高降温速率以探究胞内冰的形成机理。

2.2 置核法实际冻存细胞



注：用 Duncan 法进多重比较，同一组中不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)，相同小写字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 3 不同降温方式对人 T 淋巴细胞冻存存活率以及回收率的影响

根据经典成核理论，水及水溶液中的原子和分子在降温的过程中会不断聚集为固相的胚芽，而该胚芽能否成为有效晶核取决于其大小是否超过晶核的临界尺寸。晶核的临界尺寸是指能够稳定存在于液相中的最小晶核尺寸。当液相中的固相胚芽尺寸小于临界晶核尺寸时，该胚芽不能成为稳定的晶核，这类胚芽通常会瞬时形成又瞬时消失；当胚芽的尺寸等于临界晶核尺寸时，该胚芽既可能消失，也可能进一步生长成为稳定的晶核；当胚芽的尺寸大于临界尺寸时，胚芽可以稳定存在并自发生长。而晶核的临界尺寸与体系的过冷度相关，过冷度越高，晶核临界尺寸越小，溶液内部会形成更多的稳定晶核^[2]。

本实验采用预冷的镊子接触管壁造成接触面的局部过冷，因而能有效在接触面形成稳定的晶核。此外由于本实验所用冻存管材质的导热性能较差，镊子的冷量往往不能及时传递到液体内部，大部分被周围的空气所吸收。直接用液氮预冷的镊子接触管壁的置核效率并不高，往往需要进行多次接触。因此本实验在冻存管底部加入铜芯导热装置。铜芯能够快速地将液氮预冷镊子上的冷量传导至液体内部，极大地缩短了置核时间，提高了置核稳定性和可重复性。经优化后，冻存管的置核效率大大提升，置核完成时间不超过 5s。

图 3 为采用不同降温方式对人 T 淋巴细胞进行冻存的结果。结果显示采用置核对人 T 淋巴细胞进行冻存, 其复苏后 0h 和 24h 的存活率分别为 $80.55 \pm 0.45\%$ 和 $71.15 \pm 0.15\%$, 0h 以及 24h 的细胞回收率分别为 $89.91 \pm 1.70\%$ 和 76.21 ± 0.07 ; 快速降温冻存人 T 淋巴细胞复苏后 0h 和 24h 的存活率分别为 $80.60 \pm 0.5\%$ 和 $35.40 \pm 1.05\%$, 0h 以及 24h 的细胞回收率分别为 $84.14 \pm 2.71\%$ 和 $33.31 \pm 0.05\%$; 采用程序降温盒进行冻存的人 T 淋巴细胞复苏后 0h 和 24h 的存活率分别为 $93.10 \pm 0.5\%$ 和 $41.55 \pm 1.05\%$, 0h 以及 24h 的细胞回收率分别为 $99.07 \pm 2.42\%$ 和 38.26 ± 0.74 。实验结果显示对于冻存后复苏的人 T 淋巴细胞, 三种降温方式冻存的细胞存活率和回收率都较高, 但其中采用程序降温盒进行冻存的存活率与回收率均显著高于其他两组 ($P < 0.05$); 在复苏培养 24h 期间, 细胞损伤逐渐显现, 快速降温和程序降温盒组的细胞死亡严重, 采用置核冻存的存活率与回收率均显著高于其他两组 ($P < 0.05$)。实验结果显示在冻存人 T 淋巴细胞过程中置核能够显著 ($P < 0.05$) 提高冻存后细胞 24h 的存活率与回收率, 实际冻存的结果与低温显微观察的结论相符。但是, 本实验中并没有精确控制置核下的降温速率以及冰晶生长速率。此外 T 淋巴细胞的置核冻存还需要更加系统的研究, 比如研究 T 淋巴细胞的最佳置核温度, 最佳降温速率, 以及如何用置核的方法实现最佳的降温速率等。

3. 结论

- (1) 本研究通过在冻存管壁上插入铜芯提高了置核的效率和稳定性, 置核时间不超过 5S。
- (2) 低温显微以及冻存实验表明置核是一种有效的低温保存技术, 能够降低冻存液的过冷, 使细胞在冻存过程中有效地失水, 抑制胞内冰的产生。相比使用程序降温盒, 置核法冻存能够显著提高人 T 淋巴细胞冻存复苏的 24h 存活率以及 24h 回收率。

参考文献

- [1] Huang Haishui, Zhao Gang, Zhang Yuntian et al. Predehydration and Ice Seeding in the Presence of Trehalose Enable Cell Cryopreservation. [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2017, 3(8): 1758-1768.
- [2] 华泽钊, 低温生物医学技术. [M]. 1994.
- [3] Mazur P, Leibo S P, Chu E H. A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. [J]. Experimental Cell Research, 1972, 71(2): 345-355.
- [4] 王欣, 程启康, 高才, 等. 降温过程中组织工程用真皮成纤维细胞膜水分渗透特性的实验研究. [J]. 中国科学, 2005, 35(9): 946-953.
- [5] Devireddy R V, Raha D, Bischof J C. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. [J]. Cryobiology, 1998, 36(2): 124-155.
- [6] Teixeira Magda, Buff Samuel, Desnos Hugo et al. Ice nucleating agents allow embryo freezing without manual seeding. [J]. Theriogenology, 2017, 104: 173-178.
- [7] Petersen Ansgar, Schneider Hendrik, Rau Guenter et al. A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature. [J]. Cryobiology, 2006, 53(2): 248-257.
- [8] Spindler R, Rosenhahn B, Glasmacher B. Controlled nucleation and reduced CPA-concentration during freezing. [J]. Cryobiology, 2011, 63(3): 318-318.
- [9] Passot S, Trédac I C, Marin M, et al. Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified freeze-dryer. [J]. Journal of Biomechanical Engineering, 2009, 131(7): 074511.
- [10] Diener B, Utesch D, Beer N et al. A method for the cryopreservation of liver parenchymal

- cells for studies of xenobiotics. [J]. *Cryobiology*,1993, 30(2): 116-127.
- [11] Konstantinidis Alex K, Kuu Wei, Otten Lori et al. Controlled nucleation in freeze-drying: effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate. [J]. *J Pharm Sci*,2011, 100(8): 3453-3470.
- [12] Nakamura Toshihide, Takagi Hiroshi, Shima Jun. Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* cells. [J]. *Cryobiology*,2009, 58(2): 170-174.
- [13] Zhang Jian Min, Sheng Yan, Cao Yong-Zhi et al. Effects of cooling rates and ice-seeding temperatures on the cryopreservation of whole ovaries. [J]. *J Assist Reprod Genet*,2011, 28(7): 627-633.
- [14] 陈复兴, 李玺. 肿瘤的细胞免疫治疗. [J]. *国际免疫学杂志*,2004, 27(4): 197-202.
- [15] Hughes Sean M, Shu Zhiquan, Levy Claire N et al. Cryopreservation of Human Mucosal Leukocytes. [J]. *PLoS One*,2016, 11(5): e0156293.
- [16] Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells.[J] .*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965, 125(2): 658-76.
- [17] Toner M, Cravalho E G, Karel M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. [J]. *Journal of Applied Physics*, 1990, 67(3):1582-1593.