· 实验研究 ·

淋巴细胞低温冷冻保存技术优化及评价

周雪萍[1,2]，林晨[2]，李文清[1,2]，赖善榕[2,3]，陈金烟[4]，袁平[2,3]

1. 福建医科大学公共卫生学院，福州 350122；
2. 福建省疾病预防控制中心，福州 350012；
3. 福建医科大学公共卫生学院专业教学实习基地，福州 350012；
4. 福建省医学科学研究院，福州 350001
通信作者：袁平，E-mail：yunping1448@sina.com

【摘　要】目的 比较淋巴细胞不同的冻存方式组合，探讨一种保存质量更为优化的技术。**方法** 以淋巴细胞为研究对象，首先通过多组保护剂组合［含不同浓度二甲基亚砜（DMSO）、胎牛血清（FBS）、聚乙二醇（PEG）、牛血清白蛋白（BSA）］进行筛选；确定 2 个优化配方：实验组 1（C11）[7.5%DMSO+10%FBS+2.5%PEG+2%BSA] 和实验组 2（C21）[7.5%DMSO+2.5%PEG+2%BSA]；在此基础上，比较 2 种优化后的保护剂组合配合其各自筛选出的最佳降温速率（C11：−3 ℃/min；C21：−1 ℃/min）以及传统的冻存方式［对照组（C0）][10%DMSO+90% FBS 和梯度降温盒降温］的保存效果。冻存 5 d 后复苏细胞，评价不同组别的保存质量指标，比较细胞活性和功能。**结果** 对照组（C0）解冻 0 h 细胞回收率（65.70±1.06）% 明显低于实验组 1（C11）（82.45%±3.27%，t=−8.44，P<0.05）和实验组 2（C21）[（83.96%±0.81）%，t=−23.72，P<0.05]，对照组（C0）解冻 0 h 的凋亡率（6.93±0.55）% 显著高于实验组 1（C11）[（5.30±0.56）%，t=3.61，P<0.05] 和实验组 2（C21）[（4.93±0.45）%，t=4.87，P<0.05]，且组间比较差异均有统计学意义。**结论** 基于多因素筛选和优化，实验组 2（C21）为无血清低温保护剂以−1 ℃/min 的降温速率保存后的细胞质量优于传统冻存方法，该技术为淋巴细胞的低温冷冻保存提供科学参考。

【关键词】 淋巴细胞；低温保存；冷冻技术；细胞质量；优化；评价

Optimization and evaluation of cryopreservation technology for lymphocytes

ZHOU Xueping[1,2], LIN Chen[2], LI Wenqing[1,2], LAI Shanrong[2,3], CHEN Jinyan[4], YUAN Ping[2,3] (*1. Public Health School of Fujian Medical University*, *Fuzhou* 350122, *China*; *2. Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention*, *Fuzhou* 350012, *China*; *3. Teaching Internship Base of the Public Health School of Fujian Medical University*, *Fuzhou* 350012, *China*; *4. Fujian Academy of Medical Sciences*, *Fuzhou* 350001, *China*)
Corresponding author: YUAN Ping, E-mail: yunping1448@sina.com

【Abstract】 Objective To compare different cryopreservation methods for lymphocytes and explore an optimized preservation protocol. **Methods** Cryoprotectant formulations [containing different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO), fetal bovine serum (FBS), polyethylene glycol (PEG), and bovine serum albumin (BSA)] were screened for lymphocytes to identify two optimized formulations: experimental group 1 (C11): (7.5% DMSO + 10% FBS + 2.5% PEG + 2% BSA) and experimental group 2 (C21): (7.5% DMSO + 2.5% PEG + 2% BSA). On this basis, cryopreservation performance was compared between the two optimized cryoprotectant formulations paired with their respective optimal cooling rates (C11: −3 °C/min; C21: −1 °C/min) and the conventional cryopreservation method [control group (C0)]: (10% DMSO + 90% FBS) with gradient cooling. After 5 days of cryopreservation, cells were thawed to assess preservation quality indicators in terms of cell viability and functionality across groups. **Results** The cell recovery rate at 0 h post-thawing in the control group (C0) (65.70 ± 1.06)% was lower than that in the experimental group 1 (C11) [(82.45 ± 3.27)%, t = −8.44, P < 0.05] and experimental group 2 (C21) [(83.96 ± 0.81)%, t = −23.72, P < 0.05]. The apoptosis rate at 0 h post-thawing in the control group (C0) (6.93 ± 0.55)% was higher than that in the experimental group 1 (C11) [(5.30% ± 0.56)%, t = 3.61, P < 0.05] and experimental group 2 (C21) [(4.93 ± 0.45)%, t = 4.87, P < 0.05]. Moreover, the differences between groups were statistically significant. **Conclusions** Based on multifactorial screening and optimization, the experimental group 2 using a serum-free cryoprotectant with a cooling rate of −1 °C/min outperforms the conventional cryopreservation method in terms of cell quality. This preservation protocol provides a scientific reference for the cryopreservation of lymphocytes.

【Keywords】 lymphocyte; cryopreservation; freezing technology; cell quality; optimization; evaluation

开放获取：CC BY-NC-ND 4.0　DOI：10.11847/zgggws1147016
基金项目：福建省社会发展引导性（重点）项目（2021Y0046）
第一作者：周雪萍（1998—），硕士在读，研究方向：疾病预防与控制。
收稿日期：2025-02-27　修回日期：2025-05-23　录用日期：2025-09-15
利益冲突：不存在　伦理审查：免除审查　出版授权：全体作者已与编辑部签署作者贡献声明及版权转让协议

淋巴细胞对细胞疗法[1]、传染病疫苗研究[2]和疾病研究[3]至关重要。低温保存是所有细胞从制造点到实验室研究和应用的常规操作，通过低温暂停细胞代谢活动并在解冻后保持其功能，从而实现生物样本的长期储存和物流运输。优化低温保存条件可提高细胞活力和功能，这对建立大型生物样本库和多中心研究也具有重要意义。目前，免疫细胞的低温保护主要依赖二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO），其中 10% 的浓度是维持细胞生存力的关键因素[4–5]。但 DMSO 可能导致细胞死亡、细胞膜损伤[6]及神经毒性，而胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）存在污染风险和批次差异，且成本高昂。因此，降低 DMSO 浓度或寻找更安全的保护剂替代 DMSO 和 FBS，对提高免疫细胞应用安全性至关重要。高分子聚合物聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）能与水分子结合，降低自由水含量，减少冰晶形成，并通过降低电解质浓度和渗透性保护剂需求来减轻毒性[7]。有研究显示，冷冻过程中的降温速率对细胞质量不可忽视，每种细胞类型都有其特定的最佳速率，但尚无统一标准的低温保存策略[8]。因此，系统探究特定细胞类型（如淋巴细胞）的最佳降温速率，并结合保护剂配方进行综合优化，是提升冻存效果的关键环节。本研究以人白血病 T 淋巴细胞（Jurkat）为实验样本，系统评估了不同保护剂组合、降温速率、储存温度和复温方式等多因素组合对细胞存活率、回收率和凋亡率的影响，旨在确定其最佳低温保存条件组合，为优化细胞低温保存技术提供重要参考。

1　材料与方法

1.1　主要材料、试剂与仪器　DMSO（中国索莱宝公司），PEG（中国国药公司），FBS（美国 Thermo Fisher Scientific 公司），牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）（美国 Sigma 公司），RPMI1640 培养基（美国 ThermoFisher 公司），磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffered Saline, PBS）（美国 Cytiva 公司），增强型 ATP 检测试剂盒（中国碧云天公司），Annexin-FITC 细胞凋亡检测试剂盒（中国碧云天公司），CCK8（江苏凯基生物公司），Jurkat 细胞（中国科学院细胞库），一次性细胞计数芯片（中国瑞沃德公司），酶标仪（美国 ThermoFisher 公司），梯度降温盒（中国 Biosharp 公司），程序降温仪（德国 GoldSim 公司），CO_2 培养箱（美国 ThermoFisher 公司），细胞计数仪（中国瑞沃德公司），流式细胞仪（美国 BD 公司），多功能荧光/化学发光监测系统（美国 Spectramax®iD5 公司），高速冷冻离心机（德国 eppendorf 公司）。

1.2　细胞的培养　Jurkat 细胞以（2～10）×10^5/mL 密度接种于含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基中常规培养，培养条件为 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度。24 h 更换一次培养液，2 d 后即可传代，细胞传代 3 或 4 次后即可进行试验。细胞冻存前用台盼蓝鉴定细胞活性在 95% 以上。

1.3　细胞保护剂组合及实验分组（表 1）　本研究保护剂的配制以不含胎牛血清的 RPMI1640 培养基为基础冻存液，保持除血清和白蛋白外，各成分总浓度为 10%，其中添加的渗透保护剂为 DMSO 按体积比（*v*/*v*）加入；大分子非渗透性保护剂为 PEG，按质量比（*w*/*v*）加入；FBS 按（*v*/*v*）加入，然后在加入细胞培养级 DMSO 前用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后，保存在 4 ℃ 冰箱中。由于目前各实验室采用的保护剂一般为 10%DMSO 和 90%FBS 的组合，因此，本研究选取 10%DMSO 和 90%FBS 的组合为冻存对照组，其余为实验组。

表 1　细胞保护剂的组成
Table 1　Composition of cell cryoprotectants

保护剂代号	DMSO（%, *v*/*v*）	FBS（%, *v*/*v*）	PEG（%, *w*/*v*）	BSA（%, *w*/*v*）	RPMI1640培养基（%, *v*/*v*）
C0	10.0	90	0.0	0	0.0
C11	7.5	10	2.5	2	82.5
C12	5.0	10	5.0	2	85.0
C13	2.5	10	7.5	2	87.5
C21	7.5	0	2.5	2	92.5
C22	5.0	0	5.0	2	95.0
C23	2.5	0	7.5	2	97.5
C31	7.5	10	2.5	0	82.5
C32	5.0	10	5.0	0	85.0
C33	2.5	10	7.5	0	87.5

1.4 降温程序设置

1.4.1 主动程序降温组(controlled rate cooling, CR) 使用程序降温仪设计降温程序：(1)降温速率–1 ℃/min 组：在 4 ℃ 稳定 10 min，以稳定温度，然后以–1 ℃/min 降到–90 ℃，稳定 10 min 后转移进–80 ℃ 超低温冰箱。(2)降温速率–2 ℃/min 组：在 4 ℃ 稳定 10 min，以稳定温度，然后以–2 ℃/min 降到–90 ℃，稳定 10 min 后转移进–80 ℃ 超低温冰箱。(3)降温速率–3 ℃/min 组：在 4 ℃ 稳定 10 min，以稳定温度，然后以–3 ℃/min 降到–90 ℃，稳定 10 min 后转移进–80 ℃ 超低温冰箱。(4)降温速率–5 ℃/min 组：在 4 ℃ 稳定 10 min，以稳定温度，然后以–5 ℃/min 降到–90 ℃，稳定 10 min 后转移进–80 ℃ 超低温冰箱。(5)降温速率–10 ℃/min 组：在 4 ℃ 稳定 10 min，以稳定温度，然后以–10 ℃/min 降到–90 ℃，稳定 10 min 后转移进–80 ℃ 超低温冰箱。

1.4.2 被动慢冷组(the passive slow cooling, PSC) 将冻存管直接置于梯度降温盒降温转移进–80 ℃ 超低温冰箱。24 h 后转移出来或置于液氮中储存，以达到≈–1 ℃/min[9]。

1.5 储存温度设置 储存温度分别设置–80 ℃ 超低温保存和–196 ℃ 深超低温保存。

1.6 细胞复温过程 (1)水浴复温：取出冻存管迅速置于 37 ℃ 水浴中，2 min 震荡直至细胞悬液完全融化，转移到装有 5 mL RPMI1640 培养基的离心管中，1 000 r/min 离心 5 min 后去上清，再次加 3 mL PBS 清洗第 2 遍，加入新鲜培养基将细胞重悬后进行检测。(2)空气复温：取出冻存管放置于桌面，暴露空气中 10 min，待冰晶全部融化后转移到离心管中，其余步骤不变。

1.7 细胞质量评价指标 (1)细胞回收率：将细胞以 1×10^6 重悬于 PBS 中，1 000 r/min 离心，弃上清，使用增强型 ATP 检测试剂盒检测，通过总 ATP 含量评估细胞恢复情况。细胞回收率=(冷冻后细胞总 ATP 含量平均值/冷冻前总 ATP 含量平均值)×100%。(2)细胞存活率：以细胞数为 1×10^5/孔接种于 96 孔板，37 ℃ 培养，在细胞孔周围内加入 100 μL 无菌 PBS；在规定时间内，每孔加入 10 μL CCK8，37 ℃ 培养 2.5 h，酶标仪测定各孔 450 nm 处光密度值。细胞存活率=(不同冻存条件的细胞吸光度的平均值–空白孔吸光度的平均值)/(未冻存细胞吸光度–空白孔吸光度的平均值)×100%。(3)细胞凋亡率：取 1×10^5 个细胞用 PBS 轻轻重悬细胞，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，用 PBS 清洗 2 遍；使用细胞凋亡检测试剂盒进行检测。

1.8 统计分析 采用 SPSS 26 软件包对实验结果进行正态性检验，满足正态分布采用两独立样本 t 检验，不满足正态分布采用非参数检验；实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 冷冻保护剂初步筛选及关键组确定(表 2) 冻存 1 d 后，相较于传统保护剂对照组 C0 回收率(63.98±2.15)%，实验组 C11(75.89±4.17)% 和 C21(75.27±3.09)% 的细胞回收率显著提高(均 P<0.05)。而其他组别，如 C13、C23(DMSO 浓度降至 2.5%)以及无 BSA 组(C31、C32、C33)的回收率显著降低。基于此初步筛选结果，选择保护效果较优且代表不同血清策略(C11 含 10%FBS，C21 无 FBS)的 C11 和 C21 组合，作为后续降温速率等参数优化的研究对象。

表 2 不同保护剂对 Jurkat 细胞回收率的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effects of different cell cryoprotectants on the recovery rate of Jurkat cells (n = 3, $\bar{x}\pm s$)

保护剂代号	细胞回收率/%	t值	P值
C0	63.98±2.15		
C11	75.89±4.17	–4.40	0.01
C12	50.09±2.16	7.90	0.00
C13	2.97±1.22	42.82	0.00
C21	75.27±3.09	–5.20	0.01
C22	36.27±4.90	8.97	0.00
C23	3.10±1.83	37.37	0.00
C31	64.17±1.13	–0.14	0.90
C32	58.76±2.12	2.99	0.04
C33	6.40±3.09	26.49	0.00

注：各组保护剂的配制方法见表1。

2.2 降温速率筛选

2.2.1 C11 保护剂降温速率的筛选(表 3) 在保护剂初步筛选中确定的优化组合 C11 和 C21 基础上，进一步评估不同降温速率对其冻存效果的影响。细胞在低温保存 1 d 后复苏，所有不同的降温速率均在解冻 24 h 后显示出最佳存活率。对于 C11 保护剂，–3 ℃/min，解冻 0 h 细胞活力要高于其他组别(t = –15.08，P<0.05)。随着细胞降温速率的升高，解冻后存活率都明显降低，符合细胞低温保存慢降骤复的原则。

表 3　不同降温速率对 C11 保护剂细胞存活率的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)
Table 3　Effects of different cooling rates on the survival rate of Jurkat cells treated with C11 (n = 3, $\bar{x}\pm s$)

降温速率/(℃/min)	0 h细胞存活率/%	t值	P值	24 h细胞存活率/%	t值	P值	48 h细胞存活率/%	t值	P值
对照组	74.96±1.06			80.88±1.24			73.26±5.12		
–1	72.14±1.57	2.58	0.06	81.98±5.19	–0.36	0.74	74.13±3.68	–0.24	0.82
–2	70.19±9.44	0.87	0.43	75.96±5.90	1.41	0.23	67.34±2.23	1.84	0.14
–3	93.35±1.83	–15.08	0.00	82.19±0.97	–1.43	0.23	76.98±3.01	–1.08	0.34
–5	65.41±9.74	1.69	0.23	73.86±3.67	3.14	0.03	70.00±2.42	1.00	0.38
–10	57.47±3.93	7.44	0.00	70.58±3.04	5.43	0.01	72.17±0.15	0.37	0.73

注：对照组采用C0保护剂，梯度降温盒降温，C0、C11保护剂配制见表1 。

2.2.2　C21 保护剂降温速率的筛选(表 4)　–1 ℃/min 的降温速率组别细胞在解冻后 0 和 24 h 细胞活力均高于其他组别，差异均有统计学意义(均 P<0.05)。

表 4　不同降温速率对 C21 保护剂细胞存活率的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)
Table 4　Effects of different cooling rates on the survival rate of Jurkat cells treated with C21 (n = 3, $\bar{x}\pm s$)

降温速率/(℃/min)	0 h 存活率/%	t值	P值	24 h 存活率/%	t值	P值	48 h存活率/%	t值	P值
对照组	74.96±1.06			80.88±1.24			73.26±5.12		
–1	82.59±4.03	–3.17	0.03	88.61±2.84	–4.32	0.01	75.52±1.06	–0.75	0.50
–2	74.53±1.42	0.42	0.70	77.31±3.59	1.63	0.18	69.67±6.50	0.75	0.49
–3	80.28±4.21	–2.12	0.10	79.39±2.51	0.93	0.41	68.47±2.96	1.40	0.23
–5	67.75±4.96	2.46	0.07	68.98±5.20	3.86	0.02	65.05±1.82	2.62	0.06
–10	60.12±7.93	3.21	0.03	63.04±3.93	7.50	0.00	52.53±3.17	5.96	0.00

注：对照组采用C0保护剂，梯度降温盒降温，C0、C21保护剂配制见表1 。

2.3　储存温度筛选(表 5)　细胞冷冻保存 1 d 后水浴解冻，0、24、48 h 细胞活性在–80 ℃ 和–196 ℃ 下并无明显差别(均 P>0.05)。可见在短期储存，深低温–80 ℃ 和–196 ℃ 对细胞活性影响较小。将 C21 保护剂以–1 ℃/min 冻存细胞保存时间延长至 30 和 60 d 后，观察不同储存温度下的细胞解冻后活性。结果显示，延长储存时间，–196 ℃ 更有利于细胞的保存和解冻后恢复。

表 5　不同储存温度对 Jurkat 细胞储存 30 d 和 60 d 复温后存活率的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)
Table 5　Effects of different storage temperatures on the survival rate of Jurkat cells rewarmed after 30-day and 60-day cryopreservation (n = 3, $\bar{x}\pm s$)

储存温度/℃	储存时间/d	0 h存活率/%	t值	P值	24 h存活率/%	t值	P值	48 h存活率/%	t值	P值
–80	1	90.22±4.00			91.08±5.04			91.54±1.09		
–196		86.30±1.94	1.52	0.20	93.07±4.48	0.51	0.64	95.02±2.21	2.44	0.07
–80	30	64.91±9.59			76.13±7.96			69.10±4.20		
–196		80.21±2.42	2.25	0.10	93.86±4.16	3.42	0.04	90.05±3.30	6.80	0.00
–80	60	52.72±2.88			66.33±2.54			52.61±0.91		
–196		67.00±3.35	5.60	0.00	69.52±3.21	1.35	0.25	66.64±1.05	17.44	0.00

2.4　复温方式筛选(表 6)　将细胞分别采用 C0 CPA，以 PSC 降温；C11 CPA，以–3 ℃/min 降温；C21 CPA，以–1 ℃/min 降温；均储存于–196 ℃ 下，分别采用水浴复温和空气复温。结果显示，空气复温后细胞的存活率在解冻后 0、24 和 48 h 均低于水浴复温方式，差异均有统计学意义(均 P<0.05)。

表 6 不同复温方式对 Jurkat 细胞存活率的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)
Table 6 Effects of different rewarming methods on the survival rate of Jurkat cells (n = 3, $\bar{x}\pm s$)

分组	复温 方式	0 h细胞存活率/%	t值	P值	24 h细胞存活率 /%	t值	P值	48 h细胞存活率 /%	t值	P值
C0组	水浴	75.14±0.31	27.76	0.00	81.90±2.63	5.73	0.00	66.61±0.77	4.56	0.01
	空气	61.04±0.82			69.01±2.87			59.27±2.68		
C11组	水浴	76.05±1.42	–4.49	0.01	82.38±1.23	4.58	0.04	68.58±0.22	6.87	0.00
	空气	64.10±4.39			68.35±5.16			53.06±3.91		
C21组	水浴	73.26±0.94	11.37	0.00	88.69±1.61	3.53	0.02	74.14±0.33	7.96	0.00
	空气	61.00±1.62			77.17±0.62			51.91±4.83		

2.5 对不同细胞冻存方式的质量评价

2.5.1 细胞回收率(表 7) 基于前述保护剂筛选和降温速率优化结果(C11 最佳降温速率–3 ℃/min, C21 最佳降温速率–1 ℃/min),比较了传统冻存方式(C0 配合梯度降温盒降温)、优化含血清方案(C11 配合–3 ℃/min)及优化无血清方案(C21 配合–1 ℃/min)在–196 ℃ 冻存 5 d 后的细胞质量。结果表明,解冻 0 h,实验组 1(C11)和实验组 2(C21)优于对照组(C0),差异均有统计学意义(均 P<0.01);经过 24 h 培养后,与对照组(C0)比较,细胞回收率均上升,采用 C21 保护剂,–1 ℃/min 冻存的细胞解冻后表现出更高的回收率,差异有统计学意义(t=6.46, P<0.01)。

表 7 不同的低温保存技术对 Jurkat 细胞回收率的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)
Table 7 Effects of different cryopreservation methods on the recovery rate of Jurkat cells (n = 3, $\bar{x}\pm s$)

分组	0 h细胞存活率 /%	t值	P值	24 h细胞存活率/%	t值	P值
对照组(C0)	65.70±1.06			84.72±0.98		
实验组1(C11)	82.45±3.27	–8.44	0.00	91.27±4.11	–2.68	0.06
实验组2(C21)	83.96±0.81	–23.72	0.00	93.97±2.28	–6.46	0.00

2.5.2 细胞凋亡率 在观察到解冻后细胞恢复增加后,采用流式细胞术分析上述 3 种冻存方式冻存 5 d 后对解冻后细胞凋亡率的影响。结果显示,对照组、实验组 1、实验组 2 复温 0 h 的凋亡率分别为(6.93±0.55)%、(5.30±0.56)% 和(4.93±0.45)%,实验组 1(C11)和实验组 2(C21)均低于对照组(C0),差异均有统计学意义(t=3.61、4.87,均 P<0.05)。复温 24 h 后凋亡率分别为(3.40±0.26)%、(4.20±0.61)% 和(3.77±0.15)%,实验组与对照组比较差异均无统计学意义(t= –2.09, –2.08,均 P>0.05)。

3 讨 论

本研究采用分阶段策略优化淋巴细胞冻存方案。首先通过多组保护剂配方比较,筛选出效果优于传统保存方法(10%DMSO+90%FBS)且具有应用潜力的两个优化组合:含 10%FBS 的 C11(7.5%DMSO+2.5%PEG+2%BSA)和无 FBS 的 C21(7.5%DMSO+2.5%PEG+2%BSA)。随后,聚焦于这两个优化组合,系统评估了降温速率、储存温度和复温方式对其冻存效果的影响,最终确定了各自的最佳参数组合(C11:–3 ℃/min; C21:1 ℃/min),并与传统方法进行了综合质量评价。通过数据分析,本研究认为细胞只有在 7.5% DMSO 的浓度上才能保持细胞的大部分活性。低浓度的 DMSO 会显著破坏细胞完整性,导致回收率非常低[4, 10]。所以 DMSO 不能完全被其他非渗透性保护剂(PEG)所替代。

本研究减少了 FBS 的使用,以提高冷冻保存过程中的安全性和相容性,并降低保护剂成本,这对实际应用很有意义。本研究表明,BSA 能够有效提高细胞冻后的活率,这与其他研究结果相一致[11]。这可能与 BSA 在稳定细胞膜结构和降低冷休克和渗透损伤方面有重要作用有关,BSA 还是一种脂质氧化反应抑制剂[12]。

根据 Mazur P 等[13] 提出“两因素假说”,确定最佳降温速率需要结合理论预测和实验验证,因为这一速率取决于具体的细胞类型、CPA 种类和浓度等因素。本研究对不同降温速率细胞质量评估结果表明,Jurkat 细胞对于 C21 保护剂最佳冷却速度为–1 ℃/min, 这是类似细胞的典型情况。但所使用的不同低温保护剂之间也存在差异[14]。对于 C11 保护剂,–3 ℃/min 是其最佳

冷却速率。随着冷冻速率的增加，–5 ℃/min 和 –10 ℃/min 的冷冻效果较差，这可能是由于冷却过程中细胞内结冰造成的，但是对于 C11 保护剂，–3 ℃/min 显示细胞活性最好，这表明添加了 10%FBS 的 C11 保护剂低温保存的细胞可在冷却过程中更快地脱水，可能是通过使用细胞外溶质来提高脱水率[15]。允许更快的冷却速率在生产过程中非常有用，因为在不影响解冻后结果的情况下使用更快的冷却速率可以缩短冷冻保存时间，降低液氮的损耗，从而降低相关成本，或者允许在一定的时间范围内进行更多的冷冻保存操作[8]。

关于储存温度，文献报道存在差异，部分研究建议长期储存需低于–150 ℃，而其他研究报道表明，短期内在–80 ℃ 保存亦可维持细胞活性[16]。在低于–150 ℃ 下长期储存被认为是金标准，因为它低于水的玻璃化转变温度[17]，然而，由于资源限制，淋巴细胞通常短期储存在–80 ℃。Yang J 等[16] 认为细胞储存在低于–150 ℃ 时，PBMC 的回收率和活力更好 。与之相反的是，Weinberg A 等[18] 认为淋巴细胞在–70 ℃ 下和–196 ℃ 液氮下储存低于 21 d，细胞活性差异无统计学意义。另一项研究报道，在–70 ℃ 下储存 3～12 周后干冰运输细胞活性显著低于液氮储存[19]。本研究观察到，细胞在–80 ℃ 和–196 ℃ 下储存 1 d 对细胞活性影响不显著，当储存时间延长至 30 和 60 d 后，–196 ℃ 更有利于细胞低温保存。

细胞冷冻保存中的一个既定观点是，冷冻后细胞必须快速升温（≤5 min）以保持高生存力[20]。如果升温速率较慢，降温过程中形成的无害的微小冰晶在升温过程中极有可能会继续长大，发生形状和方位的变化或者融合成大的冰晶等，加重细胞的机械损伤。本研究认为，空气复温虽然避免了细胞额外污染的风险，但大大降低了细胞的存活率。

ATP 下降表明线粒体功能受损和下降，在细胞凋亡时 ATP 水平的下降通常和线粒体膜电位下降同时发生。使用总 ATP 含量来评估冷冻保存后细胞的恢复，可避免假阳性结果[21]。相对于传统冻存方式，本研究探索的无血清保护剂冻存方案在细胞在 24 h 后，细胞回收率比传统冻存方式上升 9.25%，且高于 Kenta K 等[21] 采用商业化冻存液对悬浮细胞冻存后 24 h 的回收率，因此，冷冻后细胞的代谢活性需要进一步培养后才能恢复。

细胞解冻后培养的评估也很关键。解冻后立即检测的细胞活力往往会人为地提高结果，因为细胞活力和功能会在解冻后 24～48 h 下降到最低点，细胞死亡通常是通过凋亡途径延迟发生的[22]，细胞凋亡被认为是淋巴细胞低温保存效果不佳的一个因素[23]。本研究观察到的现象与 Gonzalez-Martinez N 等[24] 的研究具有相似性。该研究报道，Jurkat 细胞在解冻后 4 h 约有 20% 的早期凋亡，24 h 后降至约 10%。本研究也观察到，在无血清冻存方式下解冻 24 h 后早期凋亡率表现出下降的趋势，为 3.77%，低于 10%，略高于刘洋[11] 采用该无血清保护剂冻存人骨髓间充质干细胞解冻后 2 h 的凋亡率。因此，本研究提出的无血清保护剂和降温速率组合的冻存方案能够有效优化解冻后细胞质量。

数据可用性声明 本研究的实验数据，包括细胞回收率、凋亡率、存活率等量化结果均已经整合至论文表中。原始数据集及统计分析记录可根据合理的学术需求，联系通信作者获取。

参考文献

[1] Xu Z H, Wang R Y, Xu Y J, et al. Comparative analysis and process optimization for manufacturing CAR-T using the PiggyBac system derived from cryopreserved versus fresh PBMCs[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 5023.

[2] 龙露, 刘竹, 毛毅, 等. 成都市入境新冠病毒疫苗突破感染者特征分析 [J]. 中国公共卫生, 2022, 38(8): 990-995.

[3] 陈显兵, 管小琴, 吴小川, 等. HBV、HIV 及混合感染者 T 淋巴细胞水平分析 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(5): 523-524.

[4] Nazarpour R, Zabihi E, Alijanpour E, et al. Optimization of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cryopreservation[J]. International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 2012, 1(2): 88-93.

[5] Makino M, Baba M. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 1997, 45(6): 618-622.

[6] Notman R, Noro M, O′Malley B, et al. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(43): 13982-13983.

[7] Kuleshova L L, Shaw J M, Trounson A O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation[J]. Cryobiology, 2001, 43(1): 21-31.

[8] Lee S, Joo Y, Lee E J, et al. Successful expansion and cryopreservation of human natural killer cell line NK-92 for clinical manufacturing[J]. PLoS One, 2024, 19(2): e0294857.

[9] Pukazhenthi B S, Nagashima J, Travis A J, et al. Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123957.

[10] Murray K A, Tomás R M F, Gibson M I. Low DMSO cryopreservation of stem cells enabled by macromolecular cryoprotectants[J]. ACS

Applied Bio Materials, 2020, 3(9): 5627-5632.

[11] 刘洋. 骨髓间充质干细胞及成骨细胞低温保存的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2010.

[12] Alvarez J G, Storey B T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant[J]. Journal of Andrology, 1993, 14(3): 199-209.

[13] Mazur P, Leibo S P, Chu E H Y. A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from Chinese hamster tissue-culture cells[J]. Experimental Cell Research, 1972, 71(2): 345-355.

[14] Tiersch T R, Yang H P, Jenkins J A, et al. Sperm cryopreservation in fish and shellfish[J]. Society of Reproduction and Fertility Supplement, 2007, 65: 493-508.

[15] Hunt C J. Technical considerations in the freezing, low-temperature storage and thawing of stem cells for cellular therapies[J]. Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2019, 46(3): 134-150.

[16] Yang J, Diaz N, Adelsberger J, et al. The effects of storage temperature on PBMC gene expression[J]. BMC Immunol, 2016, 17: 6.

[17] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications[J]. Am J Physiol, 1984, 247(3 Pt 1): C125-142.

[18] Weinberg A, Song L Y, Wilkening C, et al. Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(8): 1176-1186.

[19] Weinberg A, Song L Y, Wilkening C L, et al. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays[J]. J Immunol Methods, 2010, 363(1): 42-50.

[20] Baboo J, Kilbride P, Delahaye M, et al. The impact of varying cooling and thawing rates on the quality of cryopreserved human peripheral blood T cells[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 3417.

[21] Morita K, Yashiro T, Aoi T, et al. Microplate-based cryopreservation of adherent-cultured human cell lines using amino acids and proteins[J]. ACS Biomaterials Science and Engineering, 2024, 10(4): 2442-2450.

[22] Murray K A, Gibson M I. Post-Thaw Culture and Measurement of Total Cell Recovery Is Crucial in the Evaluation of New Macromolecular Cryoprotectants[J]. Biomacromolecules, 2020, 21(7): 2864-2873.

[23] Sarkar S, Kalia V, Montelaro R C. Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque $CD4^{+}$ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing[J]. Cryobiology, 2003, 47(1): 44-58.

[24] Gonzalez-Martinez N, Gibson M I. Post-thaw application of ROCK-inhibitors increases cryopreserved T-cell yield[J]. RSC Medicinal Chemistry, 2023, 14(10): 2058-2067.