

一种新型冷冻保护剂冻存组织和细胞的效果

王清芳, 张芬, 昌广萍, 李子晗, 邢岚, 彭浩, 曾秀萍, 钟桂强, 陈辉, 刘波, 刘振宇, 梁晓

<https://doi.org/10.12307/2025.534>

投稿日期: 2024-05-20

采用日期: 2024-07-15

修回日期: 2024-08-26

在线日期: 2024-09-10

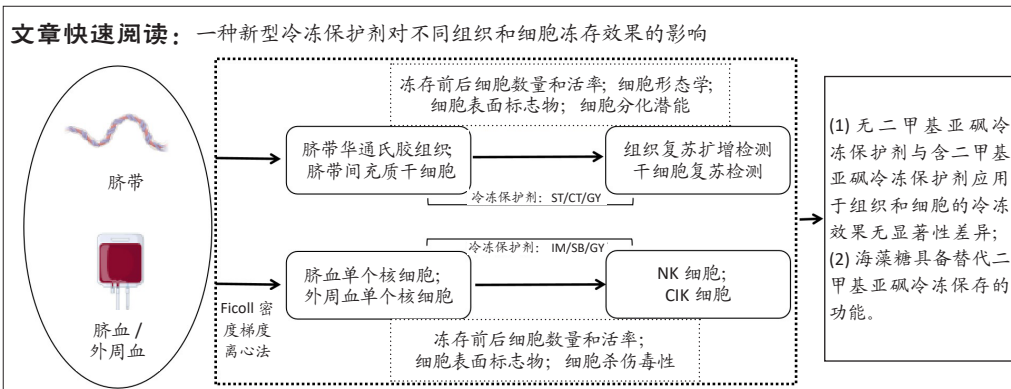
中图分类号:

R459.9; R318.52; Q813.1

文章编号:

2095-4344(2025)36-07816-11

文献标识码: B



文题释义:

冷冻保护剂: 是指在细胞冷冻过程中添加的化合物, 可以给细胞提供稳定的环境, 在降温过程中减少冰晶的形成, 维持细胞膜内外渗透压平衡, 降低细胞受到的溶质损伤, 从而保持其生理功能和完整性。

冻存: 是将生物材料(包括细胞、组织、器官、微生物、生殖细胞、胚胎等)放置在低温环境下(通常为 -80°C 以下, 常见的是液氮 -196°C), 以减缓甚至停止生物代谢过程, 从而达到长期维持生物活性、形态结构和功能的目的。

摘要

背景: 冷冻保存技术能够使组织/细胞于低温环境中长久贮存并维持活性与功能的完整性, 这对细胞治疗、组织工程及生物样本库的构建有重大意义。冷冻保护剂常含二甲亚砜和血清, 为规避二甲亚砜的毒副作用、血清成分的复杂性以及免疫反应等问题, 部分成品冷冻保护剂虽已上市, 但面临着成本高、应用受限等诸多难题, 因此, 迫切需要研发出一种成分明晰且能够解决上述问题的冷冻保护剂。

目的: 旨在评估一种新型冷冻保护剂对不同来源组织和细胞冻存效果的影响。

方法: 将新型冷冻保护剂作为实验组, 市售及广泛使用的冷冻保护剂作为对照组, 分别应用于脐带华通氏胶组织、脐带间充质干细胞、脐血/外周血单个核细胞、NK细胞及CIK细胞冻存, 从冻存前和复苏后的细胞形态、数量、活率、表面标志物、分化潜能、细胞杀伤毒性等多方面进行对比分析, 确认新型冷冻保护剂的冻存效果及潜在的应用价值。

结果与结论: ①采用新型冷冻保护剂能够实现冻存脐带华通氏胶组织复苏后间充质干细胞形态正常, 在细胞复苏回收率、表面标志物、分化潜能方面, 实验组与对照组均无显著性差异; ②实验组和对照组脐血/外周血单个核细胞冷冻复苏后的细胞数量和活率无显著性差异, 且实验组和对照组NK细胞/CIK细胞冷冻复苏后的细胞数量和活率同样无显著性差异; ③对于脐血/外周血单个核细胞衍生分化的NK细胞, 实验组和对照组CD56⁺CD16⁺细胞亚群比例无显著差异, 对于脐血/外周血单个核细胞衍生分化的CIK细胞, 实验组和对照组CD3⁺CD8⁺和CD3⁺CD56⁺细胞亚群比例无显著差异; ④在细胞杀伤毒性方面, 当免疫细胞和黑色素瘤细胞系Mel624效靶比为20:1时, 无论是脐血还是外周血单个核细胞衍生分化的NK细胞/CIK细胞, 实验组和对照组细胞杀伤活性无显著差异。结果表明: 新型冷冻保护剂能够替代现有的市售和广泛使用的冷冻保护剂, 且对于脐带华通氏胶组织、脐带间充质干细胞、脐血/外周血单个核细胞、NK细胞及CIK细胞均适用, 为通用冷冻保护剂的规模化、标准化、市场化提供了良好的技术基础。

关键词: 冷冻保护剂; 脐带华通氏胶组织; 脐带间充质干细胞; 脐血单个核细胞; 外周血单个核细胞; NK细胞; CIK细胞

Effect of a novel cryoprotectant in tissues and cells

Wang Qingfang, Zhang Fen, Chang Guangping, Li Zihan, Xing Lan, Peng Hao, Zeng Xiuping, Zhong Guiqiang, Chen Hui, Liu Bo, Liu Zhenyu, Liang Xiao

Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 5180601, Guangdong Province, China

Wang Qingfang, Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 5180601, Guangdong Province, China

Zhang Fen, Master candidate, Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 5180601, Guangdong Province, China

Wang Qingfang and Zhang Fen contributed equally to this article.

Corresponding author: Liang Xiao, MS, Senior engineer, Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 5180601, Guangdong Province, China

深圳市北科生物科技有限公司, 广东省深圳市 518061

第一作者: 王清芳, 女, 1989年生, 河南省人, 汉族, 2011年河南科技大学毕业, 细胞制备工程师, 主要从事细胞培养研究工作。

共同第一作者: 张芬, 女, 1986年生, 湖北省汉川市人, 汉族, 深圳大学在读硕士, 细胞制备工程师, 主要从事细胞生物学、细胞质量研究、细胞产业化应用、动植物外囊泡等方面的研究。

通讯作者: 梁晓, 硕士, 高级工程师, 深圳市北科生物科技有限公司, 广东省深圳市 518061

<https://orcid.org/0009-0009-0075-8659> (王清芳); <https://orcid.org/0009-0005-9073-0713> (张芬)

引用本文: 王清芳, 张芬, 昌广萍, 李子晗, 邢岚, 彭浩, 曾秀萍, 钟桂强, 陈辉, 刘波, 刘振宇, 梁晓. 一种新型冷冻保护剂冻存组织和细胞的效果 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7816-7826.



Abstract

BACKGROUND: The cryopreservation technology enables tissues/cells to be stored for a long time in a low-temperature environment while maintaining the integrity of their activity and function, which is of great significance for the construction of cell therapy, tissue engineering and biological sample banks. Cryoprotective agents often contain dimethyl sulfoxide and serum. To avoid the toxic side effects of dimethyl sulfoxide, the complexity of serum components and immune responses, although some finished cryoprotective agents have been marketed, they are faced with many difficulties such as high cost and limited application. Therefore, there is an urgent need to develop a cryoprotective agent with clear components and the ability to solve the above problems.

OBJECTIVE: To evaluate the effects of a novel cryoprotectant on cryopreservation efficiency of different tissue and cell sources.

METHODS: By applying the novel cryoprotectant as an experimental group with the commercially available and widely used cryoprotectant (control group) to umbilical cord Wharton's jelly tissue, umbilical cord mesenchymal stem cells, umbilical cord blood/peripheral blood mononuclear cells, NK and CIK cells, comparative analyses were conducted in terms of cell morphology, number, viability, surface markers, differentiation potential, and cell-killing toxicity assay before cryopreservation and after resuscitation thawing. We confirmed the cryopreservation effect of the new cryoprotectant and its potential application value.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The novel cryoprotectant facilitated the normal growth of cryopreserved Wharton's jelly tissue upon recovery, exhibiting mesenchymal stem cell morphology. No significant differences were observed between the experimental and control groups in terms of cell recovery rate, surface markers, and differentiation potential. (2) There was no significant difference in the number and viability of cells between the experimental group and the control group after cryopreservation of cord blood/peripheral blood mononuclear cells, and the cryo-resuscitated cell numbers and viability of derived NK cells/CIK cells did not show significant difference between the experimental and control groups. (3) For NK cells derived and differentiated from cord blood/peripheral blood mononuclear cells, there was no significant difference in the proportion of CD56⁺CD16⁺ cell subpopulations between the experimental group and the control group. For CIK cells derived and differentiated from cord blood/peripheral blood mononuclear cells, there was no significant difference in the proportions of CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD56⁺ cell subpopulations between the experimental group and the control group. (4) In terms of cytotoxicity testing, when the effective-target ratio of immune cells and melanoma cell line Mel624 was 20:1, whether it was NK cells/CIK cells derived from cord blood or peripheral blood mononuclear cells, there was no significant difference in the tumoricidal activity of cells between the experimental group and the control group. These findings suggest that the novel cryoprotectant can replace existing commercially available and widely used cryoprotectants, and is applicable to Wharton's jelly tissue, umbilical cord mesenchymal stem cells, umbilical cord blood/peripheral blood mononuclear cells, as well as NK and CIK cells, providing a solid technical foundation for the scaling, standardization, and commercialization of universal cryoprotectants.

Key words: cryoprotectant; Wharton's jelly tissue; umbilical cord mesenchymal stem cell; umbilical cord blood mononuclear cell; peripheral blood mononuclear cell; NK cell; CIK cell

How to cite this article: WANG QF, ZHANG F, CHANG GP, LI ZH, XING L, PENG H, ZENG XP, ZHONG GQ, CHEN H, LIU B, LIU ZY, LIANG X. Effect of a novel cryoprotectant in tissues and cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7816-7826.

0 引言 Introduction

近年来,细胞研究成为生物医学领域的焦点,特别是在干细胞和免疫细胞领域,具有重要的社会效益和巨大的市场潜力。继2017年FDA批准诺华和凯特的两款CAR-T细胞治疗产品上市以来,细胞类创新药品的注册申报和临床研究项目明显增加,同时细胞种类的范围也不断扩大。为了最大限度地发挥细胞产品的疗效,并考虑从实验室到患者的时间和距离,对于现货型细胞产品而言,细胞冻存技术面临着新的挑战。良好的细胞冷冻保存技术可以确保细胞在长期冷冻过程中的存活率和功能完整性,也是保障细胞治疗产品临床应用质量的关键。因此,细胞冻存技术的进步对于推动细胞治疗产品的临床应用具有重要意义。

细胞冷冻过程中,若在未添加任何保护剂的情况下直接冷冻,细胞内外环境形成的冰晶会导致细胞机械损伤、电解质升高、渗透压改变、脱水、pH值变化、蛋白质变性等,进而引起细胞死亡。因此,适当添加冷冻保护剂有助于细胞抵御低温环境带来的损伤,保持细胞完整性和生理功能^[1]。早在1947年,英国科学家POLGE发现10%甘油对人类精子的低温冷冻有保护作用。1959年,LOVELOCK提出二甲基亚砜作为有效冷冻保护剂,至今广泛应用^[2]。

常用的冷冻保护剂包括血清和二甲基亚砜,通常以5%–10%的浓度添加到基础培养基中^[3]。然而,研究表明二甲基亚砜在某些情况下可能对细胞产生毒性或不良反

应^[4-6]。为了减轻二甲基亚砜的不利影响,有研究表明可通过添加糖类或高分子聚合物等来部分或完全替代二甲基亚砜,同样实现冷冻过程中的保护效果并减少潜在伤害^[7-10]。海藻糖被认为是在糖类替代中最有效的选择之一^[11-12],高分子聚合物也被广泛应用,常见方法是将基础培养基与含有血清的冷冻保护剂按比例混合,因血清中含白蛋白,对细胞有保护作用。然而,血清成分复杂且不确定,不同批次存在差异。根据FDA对干细胞疗法的监管规定^[13],异种来源血清被禁止使用,推动了无血清培养基和无血清冷冻保护剂方案的发展^[14-15]。

为降低或消除二甲基亚砜和血清的影响,市场上已推出多种冷冻保护剂^[16-21],例如CryoSO free DMSO-free (Sigma)、CryoStor CS10 (STEMCELL)、STEM-CELLBANKER系列(ZENOAQ),这些冷冻保护剂不含血清,适用于干细胞类和免疫细胞应用。其中,CryoStor CS10是目前CAR-T产品中使用的冷冻保护剂,但含有10%二甲基亚砜。部分STEM-CELLBANKER系列产品也含二甲基亚砜,具体添加浓度未披露。研究显示,STEM-CELLBANKER系列中的Stem-Cellbanker DMSO Free相较于CryoStor CS10,细胞存活率和细胞活性更高^[16]。然而,这些产品需进口,成本较高,限制了市场普及度。这些产品建议的细胞冻存浓度范围为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ – $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。细胞冻存浓度越高,所需冷冻保护剂越少,使临床应用清洗过程更简单,成本更低。近年来,国产冷冻保护剂研究取得进展,如赛存生物的干细胞冻存液、外周血单个核细胞冻存液、细胞冻存液,

部分产品细胞浓度可达到 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ ，但应用范围受限；治疗用冷冻保护剂亘诺（三生生物）在相关专利中表现一般，难以满足免疫细胞高活性和高活率的要求（专利申请号 CN202211699150.7）。鉴于上述情况，为了降低二甲基亚砷毒性，实现不同类型细胞的通用性，且在成本方面具有市场竞争力，作者所在团队开发了一种适用于脐带华通氏胶组织、间充质干细胞和免疫细胞的新型冷冻保护剂。该保护剂的成分明确，无血清、无动物源成分，包括复方电解质注射液、人血白蛋白、右旋糖酐 40 氯化钠注射液和海藻糖^[22-24]，其中复方电解质注射液和右旋糖酐 40 氯化钠注射液主要提供稳定的渗透压。该冷冻保护剂适用于非程序性降温，按比例配制后可在 2-8 °C 条件下存放。使用时，与组织或细胞混匀后，可直接将样本放入 -80 °C 条件下冷冻 12 h，然后转移至液氮罐中长期保存。

为了验证新开发的冷冻保护剂的有效性，该研究使用了 5 种不同配方的冷冻保护剂，分别为 ST、CT、IM、Stem-Cell banker DMSO Free（以下简称 SB）和 GY。其中，GY 是作者所在团队新开发的通用型冷冻保护剂，适用于脐带华通氏胶组织、间充质干细胞以及免疫细胞的冻存。为了研究 GY 冷冻保护剂的效果，将 5 种不同冷冻保护剂用于对应的脐带华通氏胶组织、间充质干细胞和免疫细胞的冷冻操作中，其中 ST、CT 冻存脐带华通氏胶组织和间充质干细胞^[25]；IM、SB 冻存脐血 / 外周血来源单个核细胞以及衍生的 CIK 细胞和 NK 细胞，GY 冻存上述所有样本类型。在液氮罐中储存 2 周后，取出组织和细胞进行复苏培养，通过观察细胞形态、细胞数量及活率、细胞表面标志物、分化能力以及细胞杀伤毒性等多维度评价指标^[26]，评估 GY 冷冻保护剂的冻存效果是否达到或优于现有冷冻保护剂。这项研究为选择一种安全、有效的冷冻保护剂，并实现标准化、规模化冷冻保存组织和细胞技术提供更优的解决方案。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 12 月至 2023 年 12 月在深圳市北科生物科技有限公司中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 样本的获取 实验样本均来自于经过健康供者知情同意后采集的脐带、脐血和外周血。供者的年龄范围在 20-35 岁，其中脐带和脐血采集自足月分娩的供者，并已通过深圳市北科生物科技有限公司伦理委员会批准（BK-SL-20220115-01）。

1.3.2 冷冻保护剂制备 共测试了 5 种冷冻保护剂（表 1）：① CT 由基础培养基（UltraCULTURE 无血清培养基，LONZA，美国）、体积分数 5% 胎牛血清（LONZA，美国）

和 5% 二甲基亚砷（WAK，德国）配制而成。② ST 是由基础培养基（UltraCULTURE 无血清培养基，LONZA，美国）、5% 血小板裂解物（BI，美国）和 5% 二甲基亚砷（WAK，德国）配制而成。③ IM 是由 94% RPMI 1640 培养基（Gibco，美国）、5% 二甲基亚砷（WAK，德国）和 1% 人血白蛋白（华兰生物，中国）配制而成，需配合使用程序性降温方式，将细胞放置于程序降温盒（Nalgene，美国）中，在 -80 °C 超低温冰箱中按照 1 °C /min 的速率程序性降温，冷冻超过 4 h 后，将细胞转移至液氮罐中可长期保存。④ SB 是从 ZENOAQ（日本）购得的符合 GMP 标准的现货型冷冻保护剂。⑤ GY 是作者所在团队新开发的冷冻保护剂，其成分包括 50% 复方电解质注射液（四川科伦，中国）、10% 人血白蛋白（华兰生物，中国）、40% 右旋糖酐 40 氯化钠注射液（四川科伦，中国）和 0.05 g/mL 海藻糖（艾维拓，中国）。配制完成后，在 2-8 °C 保存 1 年后应用。

表 1 | 冷冻保护剂的信息汇总

Table 1 | Compendium of cryoprotectant

冷冻保护剂	配制方法	使用方法	成本 (元/L)	适用范围
CT	含胎牛血清培养基：二甲基亚砷 = 19 : 1	程序降温	3 019.36	干细胞
ST	含血小板裂解物培养基：二甲基亚砷 = 19 : 1	程序降温	4 425.95	干细胞
IM	RPMI 1640 培养基：二甲基亚砷：人血白蛋白 = 94 : 5 : 1	程序降温	1 553.79	免疫细胞
SB	Stem-Cellbanker DMSO Free	直接冷冻	36 500.00	免疫细胞
GY	复方电解质：人血白蛋白：右旋糖酐 40 氯化钠注射 = 50 : 10 : 40；每 1 000 mL 溶液添加 50 g 海藻糖	直接冷冻	1 480.23	通用型

表注：程序降温是采用程序降温盒（Nalgene，美国）按照每分钟降低 1 °C 的冷冻方法，将装有细胞的程序降温盒放入到 -80 °C 的超低温冰箱中实现细胞 / 组织梯度降温，12 h 后再将细胞 / 组织转入液氮罐 -196 °C 长期储存。直接冷冻是将细胞或组织产品直接放置到 -80 °C 超低温冰箱中，12 h 后再将细胞 / 组织转入液氮罐 -196 °C 长期储存。

1.4 方法

1.4.1 脐带华通氏胶组织和间充质干细胞制备 将脐带样本先用 PBS(TBD，中国)清洗 2 遍，去除 2 条动脉、1 条静脉以及羊膜成分。剩余的华通氏胶组织剪成 1-4 mm² 小块，再使用 PBS 清洗 2 次。处理好的组织块平均分成 2 部分：一部分接种到 T75 培养瓶（NUNC，美国）内，每瓶接种 1 g 组织块，并添加 10 mL 无血清培养基（LONZA，美国），然后放置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养，每隔 3 d 换液，当细胞融合度达到 85% 时，进行传代（传代细胞密度为 5 000-6 000/cm²）。传代至第 2 代，收集细胞进行表面标志物鉴定（阳性指标 CD90、CD73、CD105、CD29；阴性指标 CD45、CD34、CD19、CD14、CD79a、HLA-DR），剩余细胞分别使用 ST、CT、CY 3 种冷冻保护剂按照冻存浓度分为 $4 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 和 $4 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 两个梯度进行冷冻，具体使用方法见表 1。另一部分组织块按照 0.5 g / 管的冻存密度，分别使用 ST、CT、CY 3 种冷冻保护

剂冷冻备用。脐带华通氏胶组织块冷冻 2 周后, 在 37 °C 水浴中快速复温复苏, 按照前述组织块的培养方法进行培养, 直至收获第 2 代细胞进行细胞数量和活率的检测。

1.4.2 脐血 / 外周血来源单个核细胞的制备 将获取的外周血和脐血经过初步消毒处理后, 转移至 50 mL 离心管中, 以 900×g 的离心力离心 15 min, 去除上层血浆之后, 用 PBS 以 1 : 1 的比例稀释离心管中的下层血细胞沉淀, 缓慢将其铺加至人淋巴细胞分离液 (TBD, 中国) 的表面, 保持分离液与稀释血细胞悬液的界面清晰, 然后以 600×g 的离心力离心 15 min, 离心结束后, 吸取中间白膜层至新的 50 mL 离心管中, 添加 PBS 后再以 600×g 的离心力离心 10 min, 离心结束后, 弃去上清液, 用 PBS 定容至 50 mL, 混合均匀后取 0.5 mL 用于细胞数量和细胞活率检测, 再以 400×g 的离心力离心 10 min, 离心结束后, 弃去上清液, 分别使用 GY、SB 和 IM 冷冻保护剂, 按照冻存浓度为 $4 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 进行细胞冷冻。

1.4.3 NK 细胞制备 首先将冻存的脐血 / 外周血来源单个核细胞进行复苏培养, 按照 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种到预先使用 anti-CD3 (Peprotech, 美国) 和 anti-CD16 (Peprotech, 美国) 初步激活的培养瓶中, 然后添加含有 2 000 U/mL 白细胞介素 2 (Peprotech, 美国)、50 ng/mL 白细胞介素 15 (Peprotech, 美国)、10 ng/mL 白细胞介素 21 (Peprotech, 美国) 和 5% CTS™ Immune Cell SR (Gibco, 美国) 的无血清培养基 (依科赛, 中国), 从第 4 天开始, 每隔 1 d 补充添加含 1 000 U/mL 白细胞介素 2 和 50 ng/mL 白细胞介素 15 的无血清培养基, 以保持总细胞浓度在 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。当细胞数量呈对数增长时, 将所有细胞悬液转移到培养袋 (NIPRO, 日本) 中, 直至培养期结束。整个培养过程在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 的加湿培养箱中进行。培养至第 14 天收集细胞, 分别取对应的 IM、SB、GY 3 种冷冻保护剂, 按照冻存浓度为 $4 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 进行细胞冻存。同时取样进行流式细胞术分析和细胞杀伤毒性检测。

1.4.4 CIK 细胞制备 首先对冻存的脐血 / 外周血来源单个核细胞进行复苏培养, 按照 $2.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种到使用 anti-CD3 初步激活的培养瓶中, 并在 RPMI 1640 培养基 (Gibco, 美国) 中重悬, 添加 5% 血浆替代物 (达科为, 中国), 第 2 天加入 1 000 U/mL 干扰素 γ (同立海源, 中国), 第 3 天加入 10 ng/mL 白细胞介素 1 α (Peprotech, 美国)、250 U/mL 白细胞介素 2 和 5% 血浆替代物。从第 4 天开始, 每隔 1 d 补充添加含 150 U/mL 白细胞介素 2、500 U/mL 干扰素 γ 和 5% 血浆替代物的培养基, 以保持总细胞浓度在 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。当细胞数量呈对数增长时, 将所有细胞悬液转移到培养袋 (NIPRO, 日本) 中, 直至培养期结束。整个培养过程在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 的加湿培养箱中进行。培养至第 14 天收集细胞, 分别取对应的 IM、SB、

GY 3 种冷冻保护剂按照细胞浓度为 $4 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 进行冻存。同时取样进行流式细胞术分析和细胞杀伤毒性检测。

1.4.5 细胞数量和活率检测 采用电脉冲三维扫描分析技术方法检测干细胞的细胞数量和细胞活率, 首先将 100 μL 细胞悬液添加到 10 mL Casyton (罗氏, 德国) 溶液中, 然后使用快速细胞分析仪 CASY-TT (罗氏, 德国) 检测。另外, 采用双荧光染色法分别在细胞低温保存前和细胞解冻后评估免疫细胞的数量和活力, 具体方法是将细胞悬液与吖啶橙 / 碘化丙啶 (Nexcelom, 美国) 染料以 1 : 1 的比例混合, 然后使用荧光活力细胞计数仪器 AUTO 2000 (Nexcelom, 美国) 检测。通过冷冻后活细胞数量除以冷冻前活细胞数量计算细胞回收率。

1.4.6 流式细胞术分析 为了分析细胞表面标志物, 选取 CD105、CD90、CD73、CD29 作为间充质干细胞阳性指标, CD34、CD45、HLA-DR、CD14、CD79a 作间充质干细胞阴性指标; 免疫细胞则分析 CD3、CD8、CD16、CD56 细胞亚群。将待测 200 μL 细胞悬液与免疫荧光标记抗体及相应的同型对照抗体混合, 如 CD3-FITC、CD3-PerCP、CD8-PE、CD16-APC、CD45-FITC、CD56-PE 等 (BD, 美国)。细胞与单克隆抗体在 4 °C 下孵育 30 min, 然后用 PBS 洗涤 2 次, 将细胞重悬后上机分析。采用 BD FACSCalibur 收集数据, 使用 CellQuest Pro 软件进行分析。

1.4.7 细胞分化能力检测

(1) 成骨分化: 取复苏后的细胞样品, 以 $2.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ – $3.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种于明胶包被后的 12 孔板中, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞融合度达到 70%–100% 时, 使用成骨诱导完全培养基 (赛业, 中国) 进行诱导分化, 每三四天更换半量培养基, 培养至第 28 天进行茜素红染色。

(2) 成脂分化: 取复苏后的细胞样品, 以 $2.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ – $3.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种于明胶包被后的 12 孔板中, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞融合度达到 70%–100% 时, 使用成脂诱导完全培养基 (赛业, 中国) 进行诱导分化, 每三四天更换 1 次培养基, 培养至第 28 天进行油红 O 染色。

(3) 成软骨分化: 取复苏后细胞样品, 以 $(3.0$ – $5.0) \times 10^5$ 个细胞接种于 15 mL 离心管中, 使用成软骨诱导完全培养基 (赛业, 中国) 进行诱导分化, 离心后, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养两三天 (根据实际细胞生长情况)。当离心管底的细胞皱缩成团, 呈现圆球状时, 轻轻振动离心管底部使软骨球脱离管底并悬浮在液体中。每两三天更换 1 次培养基, 诱导 21–28 d 后进行固定、脱水、包埋、切片处理, 使用阿利新蓝染色液进行染色。

1.4.8 细胞杀伤毒性检测 由于 NK 细胞和 CIK 细胞对靶细胞的识别是非特异性的, 因此选用实验室已保存的黑色

素瘤细胞系 Mel624(ATCC, 美国) 作为杀伤实验的靶细胞。将脐血 / 外周血单个核细胞来源的 CIK 细胞和 NK 细胞复苏洗涤后加入含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 然后按照 1×10^4 / 孔的量加入到 96 孔板中, 每孔细胞悬液体积为 100 μ L, 根据免疫细胞和肿瘤细胞的效靶比 (E : T) 设为 20 : 1 共同培养。培养 24 h 后使用酶标仪 (Thermo, 美国) 在 490 nm 波长下检测各孔吸光度值。

细胞杀瘤活性 (%) = [1 - (共培养细胞吸光度值 - 效应细胞吸光度值) / 靶细胞吸光度值] \times 100%

1.5 主要观察指标 ①脐带华通氏胶组织冻存复苏后细胞形态、细胞数量和活率; ②脐带间充质干细胞冷冻前后的细胞数量和活率, 以及复苏后细胞分化潜能、细胞表面标志物表达; ③脐血和外周血单个核细胞冷冻前后细胞数量和活率; ④脐血和外周血单个核细胞衍生的 CIK / NK 细胞冷冻前后细胞数量和活率, 以及复苏后的细胞表面标志物和细胞杀瘤活性。

1.6 统计学分析 数据统计分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件 (GraphPad 软件, 美国)。组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 计数资料以百分率 (%) 表示。显著性水平设定为 $P < 0.05$, 表示差异有显著性意义。文章统计学方法经过深圳市北科生物科技有限公司生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 冷冻前的细胞数量和活率

2.1.1 脐带间充质干细胞冷冻前细胞数量、活率及表面标志物表达 从 3 个脐带样本中培养扩增脐带间充质干细胞至第 2 代, 细胞浓度分别为 4×10^9 L⁻¹ 和 4×10^{10} L⁻¹, 采用 ST、CT、GY 3 种冷冻保护剂进行细胞冻存, 每支规格为 1 mL, 细胞活率分别为 97.43%, 97.41%, 95.86%。细胞冻存前进行了细胞表面标志物检测, 其中阳性指标 CD90、CD73、CD105、CD29 均不低于 98%, 阴性指标 CD45、CD34、CD19、CD14、CD79a、HLA-DR 均不超过 2%。

2.1.2 脐血 / 外周血来源单个核细胞冷冻前细胞数量和活率 对采集不超过 12 h 的脐血和外周血进行分离培养后, 将脐血单个核细胞按照细胞浓度 4×10^9 L⁻¹ 采用 GY、SB、IM 3 种冷冻保护剂进行细胞冻存, 每支规格为 1 mL, 3 个样本的细胞活率分别为 94.53%, 95.45%, 93.19%; 将外周血单个核细胞按照细胞浓度 4×10^9 L⁻¹ 采用 GY、SB、IM 3 种冷冻保护剂进行细胞冻存, 每支规格为 1 mL, 3 个样本的细胞活率分别为 99.84%, 99.62%, 99.80%。

2.1.3 NK 细胞和 CIK 细胞冷冻前细胞数量和活率 由脐血 / 外周血单个核细胞衍生的 NK 细胞和 CIK 细胞, 按照细胞浓度 4×10^{11} L⁻¹ 采用 GY、SB、IM 3 种冷冻保护剂进行细胞冻存, 每支规格为 1 mL, 其中外周血单个核细胞

衍生的 NK 细胞活率分别为 94.51%, 93.94%, 95.50% (平均为 94.65%), CIK 细胞活率分别为 90.03%, 89.70%, 90.96% (平均为 90.23%)。脐血单个核细胞衍生的 NK 细胞活率分别为 94.28%, 94.43%, 97.00% (平均为 94.90%), CIK 细胞活率分别为 95.8%, 94.69%, 96.12% (平均为 95.54%)。

2.2 GY 对脐带华通氏胶组织复苏培养的细胞形态、细胞数量和活率的影响与 ST、CT 相似 在经过 GY、ST 和 CT 冻存 2 周后, 将脐带华通氏胶组织块复苏培养至第 11 天, 通过倒置显微镜 (OLYMPUS-IX73, 日本) 观察 3 组细胞样本均呈现出长梭形或纺锤形态 (图 1), 且细胞融合度均达到 85%。将细胞按照 5×10^6 L⁻¹ 的细胞浓度培养到第 2 代进行细胞数量和活率检测 (表 2), ST 组细胞平均收获量为 14.33×10^6 , 平均活率为 95.25%; CT 组细胞平均收获量为 14.65×10^6 , 平均活率为 94.09%; GY 组细胞平均收获量为 15.82×10^6 , 平均活率为 95.65%。综合细胞数量和活率结果来看, 新开发的 GY 冷冻保护剂略优于其他 2 种, 但 3 种冷冻保护剂对冻存效果的影响并无显著差异。

表 2 | 不同冷冻保护剂冻存脐带组织复苏后的细胞数量和活率 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 | Cell number and viability of resuscitated umbilical cord tissue frozen with different cryoprotectants

组别	细胞数量 ($\times 10^6$)	细胞活率 (%)
ST 组	14.33 \pm 2.20	95.25 \pm 0.77
CT 组	14.65 \pm 3.81	94.09 \pm 0.94
GY 组	15.82 \pm 3.57	95.65 \pm 0.96
F 值	0.173 1	2.470 0
P 值	0.845 1	0.165 0

2.3 GY 对细胞数量和活率的影响与其他冷冻保护剂相似

2.3.1 不同冷冻保护剂对脐带间充质干细胞回收率和活率的影响 为了评估新开发的 GY 冻存保护剂在低冻存浓度 (4×10^9 L⁻¹) 和高冻存浓度 (4×10^{10} L⁻¹) 下的效果, 复苏了分别使用 3 种冷冻保护剂冻存的第 2 代脐带间充质干细胞, 检测细胞数量和活率, 并计算回收率, 通过对比回收率来评估冻存效果。低浓度冻存细胞复苏结果显示 (图 2A), ST 组平均获得 3.80×10^6 个细胞, 平均回收率为 95.08%, 细胞平均活率为 96.82%; CT 组平均获得 3.68×10^6 个细胞, 平均回收率为 92.00%, 细胞平均活率为 95.96%; GY 组平均获得 3.85×10^6 个细胞, 平均回收率为 96.25%, 细胞平均活率为 97.60%。细胞活率与冻存前平均活率 96.90% 基本一致。3 组在细胞回收率和细胞活率上并无显著性差异。高浓度冻存细胞复苏结果显示 (图 2B), ST 组平均获得 3.73×10^7 个细胞, 回收率为 93.25%, 细胞平均活率为 96.74%; CT 组平均获得 3.65×10^7 个细胞, 平均回收率为 91.25%, 细胞平均活率为 96.54%; GY 组平均获得 3.80×10^7

个细胞, 平均回收率为 95%, 细胞平均活率为 97.47%。细胞活率与冻存前平均活率 96.90% 基本一致。3 组在细胞回收率和细胞活率上也无显著性差异。根据低密度冻存和高密度冻存后的细胞回收率和细胞活率结果, 显示新开发的 GY 冷冻保护剂的冻存效果与其他两组冷冻保护剂无显著性差异。因此, GY 冷冻保护剂可应用于脐带华通氏胶组织块和间充质干细胞冻存, 为组织和干细胞类细胞冷冻工艺提供了良好的技术参考。

2.3.2 不同冷冻保护剂对脐血 / 外周血来源单个核细胞回收率和活率的影响 通过检测脐血 / 外周血来源单个核细胞复苏后的细胞数量和活率, 计算出细胞回收率, 通过对比细胞回收率评估 GY 冷冻保护剂的效果。对于脐血单个核细胞, IM 组复苏后平均获得 3.51×10^7 个细胞, 平均活率为 93.60%, 平均回收率为 87.67%; SB 组复苏后平均获得 3.57×10^7 个细胞, 平均活率为 94.48%, 平均回收率为 89.25%; GY 组复苏后平均获得 3.55×10^7 个细胞, 平均活率为 94.56%, 平均回收率为 88.75%。3 组之间无论是细胞活率还是细胞回收率均无显著性差异 (图 3A)。对于外周血单个核细胞, IM 组复苏后平均获得 3.55×10^7 个细胞, 平均活率为 93.60%, 平均回收率为 88.83%; SB 组复苏后平均获得 3.40×10^7 个细胞, 平均活率为 94.48%, 平均回收率为 85.08%; GY 组复苏后平均获得 3.60×10^7 个细胞, 平均活率为 94.77%, 平均回收率为 89.92%。3 组之间无论是细胞活率还是细胞回收率均无显著性差异 (图 3B)。综合细胞数量和活率结果来看, 新开发的 GY 冷冻保护剂对脐血 / 外周血单个核细胞冻存复苏后的细胞回收率与 IM、SB 冷冻保护剂无显著性差异, 即 GY 冷冻保护剂适用于脐血和外周血单个核细胞的冻存工艺。

2.3.3 不同冷冻保护剂对 NK 细胞和 CIK 细胞回收率和活率的影响 对冻存后的 NK 和 CIK 细胞复苏后进行细胞数量和活率检测, 对于脐血单个核细胞衍生的 NK 细胞: IM 组复苏后平均获得 3.39×10^8 个细胞, 平均活率为 94.51%, 平均回收率为 84.70%; SB 组复苏后平均获得 3.43×10^8 个细胞, 平均活率为 95.33%, 平均回收率为 85.68%; GY 组复苏后平均获得 3.48×10^8 个细胞, 平均活率为 97.18%, 平均回收率为 86.88%。使用 3 种冷冻保护剂冻存脐血单个核细胞衍生 NK 细胞的细胞回收率无显著性差异 (图 4A)。对于脐血单个核细胞衍生的 CIK 细胞: IM 组复苏后平均获得 3.32×10^8 个细胞, 平均活率为 92.72%, 平均回收率为 83.05%; SB 组复苏后平均获得 3.38×10^8 个细胞, 平均活率为 92.03%, 平均回收率为 84.53%; GY 组复苏后平均获得 3.39×10^8 个细胞, 平均活率为 93.04%, 平均回收率为 84.64%; 使用 3 种冷冻保护剂冻存脐血单个核细胞衍生 CIK 细胞的细胞回收率无显著性差异 (图 4B)。对于外周血单个核细胞衍生的 NK 细胞: IM 组复苏后平均

获得 3.31×10^8 个细胞, 平均活率为 91.92%, 平均回收率为 82.87%; SB 组复苏后平均获得 3.32×10^8 个细胞, 平均活率为 94.29%, 平均回收率为 82.89%; GY 组复苏后平均获得 3.36×10^8 个细胞, 平均活率为 94.80%, 平均回收率为 83.99%; 使用 3 种冷冻保护剂冻存外周血单个核细胞衍生 NK 细胞的细胞回收率无显著性差异 (图 4C)。对于外周血单个核细胞衍生的 CIK 细胞: IM 组复苏后平均获得 3.44×10^8 个细胞, 平均活率为 95.02%, 平均回收率为 85.94%; SB 组复苏后平均获得 3.50×10^8 个细胞, 平均活率为 95.38%, 平均回收率为 87.55%; GY 组复苏后平均获得 3.51×10^6 个细胞, 平均活率为 96.89%, 平均回收率为 87.73%。使用 3 种冷冻保护剂冻存外周血单个核细胞衍生 NK 细胞的细胞回收率无显著性差异 (图 4D)。根据细胞数量和活率检测结果显示, 无论是脐血单个核细胞还是外周血单个核细胞衍生的 CIK 细胞和 NK 细胞, 在细胞回收率和活率方面, 使用 3 种冷冻保护剂无显著性差异, 这表明新开发的 GY 冷冻保护剂适用于脐血 / 外周血来源单个核细胞衍生的 NK 细胞 / CIK 细胞的冷冻过程。针对免疫细胞, 无论是单个核细胞还是衍生的 NK 细胞 / CIK 细胞, 均可以采用 GY 冷冻保护剂, 为标准化及规模化推广应用提供了技术基础。

2.4 GY 对细胞复苏扩增后表面标志物的影响与其他冷冻保护剂相似

2.4.1 脐带间充质干细胞表面标志物检测 使用 3 种冷冻保护剂冻存的第 2 代脐带间充质干细胞复苏后进行表面标志物检测, 结果显示, 与细胞冻前检测结果一致, 阳性标志物的平均阳性率达到 95% 以上, 而阴性指标均低于 2%, 3 组细胞表面标志物均无显著性差异 (图 5)。

2.4.2 CIK 细胞和 NK 细胞亚群分析 脐血单个核细胞衍生的 CIK 细胞: GY 组平均由 57.79% 的 $CD3^+CD8^+$ 细胞和 23.80% 的 $CD3^+CD56^+$ 细胞组成; SB 组平均由 53.36% 的 $CD3^+CD8^+$ 细胞和 29.25% 的 $CD3^+CD56^+$ 细胞组成; IM 组平均由 51.28% 的 $CD3^+CD8^+$ 细胞和平均 27.09% 的 $CD3^+CD56^+$ 细胞组成 (图 6A)。外周血单个核细胞衍生的 CIK 细胞: GY 组平均由 58.26% 的 $CD3^+CD8^+$ 细胞和 15.23% 的 $CD3^+CD56^+$ 细胞组成; SB 组平均由 54.11% 的 $CD3^+CD8^+$ 细胞和 16.67% 的 $CD3^+CD56^+$ 细胞组成; IM 组平均由 53.82% 的 $CD3^+CD8^+$ 细胞和 11.26% 的 $CD3^+CD56^+$ 细胞组成 (图 6A)。

脐血单个核细胞衍生的 NK 细胞: GY 组平均由 79.05% 的 $CD56^+CD16^+$ 细胞组成; SB 组平均由 75.86% 的 $CD56^+CD16^+$ 细胞组成; IM 组平均由 71.91% 的 $CD56^+CD16^+$ 细胞组成 (图 6B)。外周血单个核细胞衍生的 NK 细胞: GY 组平均由 68.40% 的 $CD56^+CD16^+$ 细胞组成; SB 组平均由 65.02% 的 $CD56^+CD16^+$ 细胞组成; IM 组平均由 61.95% 的 $CD56^+CD16^+$ 细胞组成 (图 6B)。

无论是脐血单个核细胞还是外周血单个核细胞衍生的 CIK 和 NK 细胞，在同类细胞使用 3 组冷冻保护剂冷冻复苏后细胞的表面标志物表达无显著性差异，表明所开发的 GY 冷冻保护剂在冻存效果上与 IM、SB 一致。

2.5 GY 对干细胞冻存后三系分化的影响与 ST、CT 相似使用 GY、ST、CT 冷冻保护剂冻存间充质干细胞复苏后进行三系分化检测，结果显示，3 组细胞都具有良好的成骨、成脂和成软骨分化能力(图 7)，再次验证了新开发的 GY 冷冻保护剂在冻存效果上与 ST 和 CT 一致。

2.6 GY 对脐血 / 外周血单个核细胞衍生的 NK 细胞和 CIK 细胞杀瘤活性与 IM、SB 相似 为验证新开发的 GY 冷冻保护剂对最终细胞制剂有效性方面的影响，复苏了经 3 种冷冻保护剂保存的脐血 / 外周血单个核细胞来源的 NK 细胞和 CIK 细胞，并进行了体外细胞杀伤毒性检测。在 NK 细胞 /CIK 细胞与黑色素瘤细胞系 Mel624 的效靶比 (E : T) 为 20 : 1 共培养后，确认了细胞的杀瘤活性(表 3)。结果显示，脐血单个核细胞衍生的 NK 细胞在杀瘤活性上 3 组间无显著性差异 ($P=0.332\ 4$)，其中 GY 组对 Mel624 的平均致死率为 66.48%，略高于 SB 组的 60.91% 和 IM 组的 64.86%；外周血单个核细胞衍生的 NK 细胞在杀瘤活性上 3 组之间无显著性差异 ($P=0.118\ 6$)，SB 组、IM 组与 GY 组对 Mel624 的致死率分别为 59.35%，62.22% 和 63.63%。SB 组、IM 组和 GY 组脐血单个核细胞来源的 CIK 细胞对 Mel624 的平均致死率分别为 61.94%，64.19% 和 62.08% ($P=0.378\ 0$)，SB 组、IM 组和 GY 组外周血单个核细胞来源的 CIK 细胞对 Mel624 的平均致死率分别为 58.62%，61.18% 和 61.22% ($P=0.377\ 4$)。不同冷冻保护剂之间的杀瘤活性基本在 50%–70% 范围，SB 组呈现的结果较 GY 组略低，可能和细胞冻存的密度相关。SB 的细胞浓度范围上限的建议是在 $1 \times 10^9\ L^{-1}$ ，而实际细胞浓度达到了 $1 \times 10^{11}\ L^{-1}$ 。但是 3 组的整体结果没有显著性差异，结果说明 GY 冷冻保护剂与 IM、SB 在 CIK 细胞和 NK 细胞的杀瘤活性方面相似。

表 3 | 不同冷冻保护剂冻存 NK 细胞 /CIK 细胞复苏后的细胞杀瘤活性 ($\bar{x} \pm s$, %)

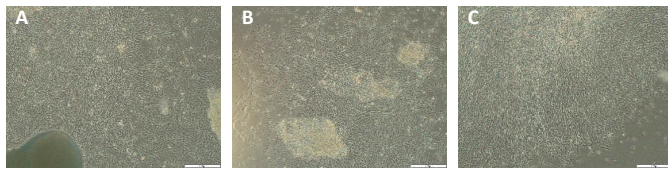
组别	脐血单个核细胞		外周血单个核细胞	
	NK 细胞	CIK 细胞	NK 细胞	CIK 细胞
SB 组	60.91±6.12	61.94±3.17	59.35±3.36	58.62±2.26
IM 组	64.86±5.85	64.19±1.61	62.22±5.22	61.18±4.38
GY 组	66.48±4.51	62.08±5.12	63.63±3.55	61.22±4.76
F 值	1.579	1.264	5.590	1.266
P 值	0.332 4	0.378 0	0.118 6	0.377 4

3 讨论 Discussion

生物体的低温冷冻一直是生物医学领域的研究热点^[27]。传统的缓慢降温低温保存方法容易导致细胞外水分形成冰晶。而细胞外冰晶的形成会导致胞外溶质浓度升高^[28]，为了平衡渗透压，渗透浓度梯度会驱动细胞内液体穿过半透膜。在降温速率缓慢的情况下，细胞体积会收缩，胞内发生脱水，产生溶质性损伤；在降温速率较快的情况下，容易造成细胞内冰晶的形成。复温过程中，胞外冰晶融化导致水分渗入细胞内，可能引发细胞内再结晶，最终损伤细胞导致细胞死亡^[29-31]。为了实现理想的冷冻效果，应选择合适的冷冻保护剂，并严格控制整个冷冻和复温过程中的温度变化，以尽量减少细胞内外冰晶的形成，从而有效避免冷冻损伤，最大限度地保留细胞活性。

冷冻保护剂分为两种：一种是渗透性的，一般属于小分子，例如二甲基亚砜、异丙醇、甘油等，他们可以渗透到细胞内，作用于细胞内维持渗透压的平衡来规避细胞损伤；另一种是非渗透性的，基本为大分子，例如右旋糖酐、动物血清、蔗糖、海藻糖等，由于分子质量大，很难通过细胞膜渗透到细胞内，主要作为细胞外保护剂减少冷冻过程中的细胞损伤。目前二甲基亚砜已经成为细胞冻存保护剂的经典组成成分，然而其安全性问题仍然存在一定争议。毒理学数据表明，二甲基亚砜是一种微毒类的化学试剂，存在急性和慢性毒性。临床试验显示，患者应用二甲基亚砜后可能出现不同程度的临床毒性^[4-6]。二甲基亚砜在临床环境中的细胞毒性与一些不良反应相关，如恶心、呕吐、腹泻、溶血、皮疹、肾功能衰竭、高血压、心动过缓和肺水肿，其毒性程度的高低有待于进一步研究^[32]。为了避免或减少二甲基亚砜可能存在的毒性作用，有研究单位正在探索新的化合物和技术，并力求开发出无二甲基亚砜的更为安全有效的替代品^[33-34]。

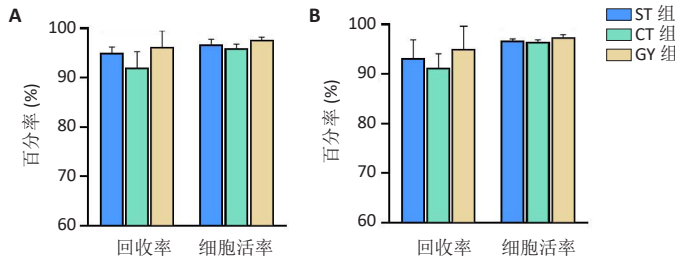
多项研究结果表明，因海藻糖独特的结构能够协助生物体在低温环境下实现稳定^[35]。海藻糖是一种无毒的生物相容性保护剂，在细菌、真菌和动植物体内均有发现，属于一种天然的非还原性双糖^[36]。目前，海藻糖已被有效用于各种细胞的低温保存，包括小鼠精子、造血干细胞、红细胞、人脂肪组织来源间充质干细胞、人源性肝细胞、人类胰岛细胞和皮肤来源细胞等^[37]；在其他方面，海藻糖协同其他递质实现了细胞外囊泡的低温保存。综上，在细胞回收率和活率方面海藻糖具有很好的冻存效果，这和此研究的结果是一致的。此外，海藻糖冷冻保存的细胞可以不被清洗而使用，这对于“现货型”细胞的治疗应用更为高效便捷且范围更广泛，但海藻糖的低温保护作用机制极其复杂，目前尚未明确，而且在不同的文章中存在相互矛盾的结论^[35]。此研究中海藻糖



图注：图 A-C 分别为 CT、ST、GY 冻存脐带华通氏胶组织复苏后的细胞生长形态。

图 1 | 不同冷冻保护剂冻存脐带华通氏胶组织复苏后的细胞形态学观察 (×40)

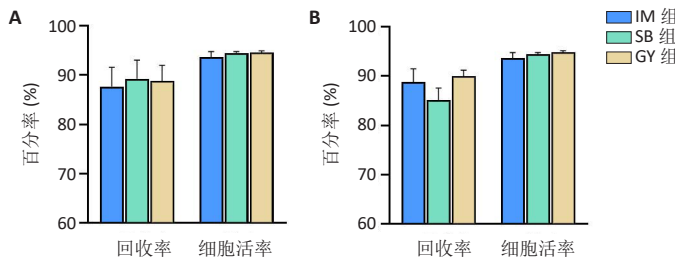
Figure 1 | Cell morphology of resuscitated umbilical cord Wharton's jelly tissue frozen with different cryoprotectants (×40)



图注：图 A 为细胞浓度为 $4 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 时冻存复苏后的细胞回收率和活率， $P > 0.05$ ；B 为细胞浓度为 $4 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 时冻存复苏后细胞回收率和活率， $P > 0.05$ 。

图 2 | 不同冷冻保护剂冻存脐带间充质干细胞复苏后的细胞回收率和活率

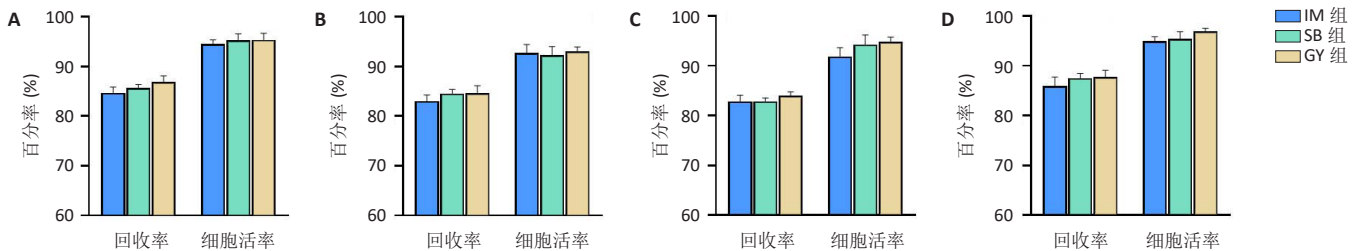
Figure 2 | Cell recovery and viability of umbilical cord mesenchymal stem cells after resuscitation thawing frozen with different cryoprotectants



图注：图 A 为 IM、SB 和 GY 冷冻保护剂冷冻脐血单个核细胞复苏后的细胞回收率和活率， $P > 0.05$ ；B 为 IM、SB 和 GY 冷冻保护剂冷冻外周血单个核细胞复苏后的细胞回收率和活率， $P > 0.05$ 。

图 3 | 不同冷冻保护剂冻存脐血 / 外周血单个核细胞复苏后的细胞回收率和活率

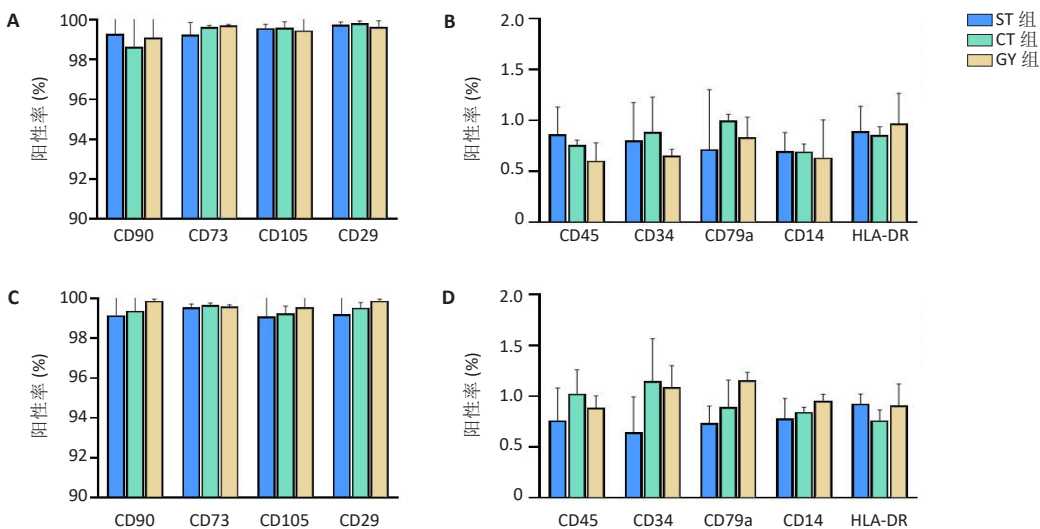
Figure 3 | Cell recovery and viability after resuscitation thawing of umbilical cord blood/peripheral blood mononuclear cells frozen with different cryoprotectants



图注：图 A, B 为脐血单个核细胞衍生的 NK、CIK 细胞使用 3 种冷冻保护剂冻存后复苏细胞的回收率和活率， $P > 0.05$ ；C, D 为外周血单个核细胞衍生的 NK、CIK 细胞使用 3 种冷冻保护剂冻存后复苏细胞的回收率和活率， $P > 0.05$ 。

图 4 | 不同冷冻保护剂冻存 CIK/NK 细胞复苏后的细胞回收率和活率

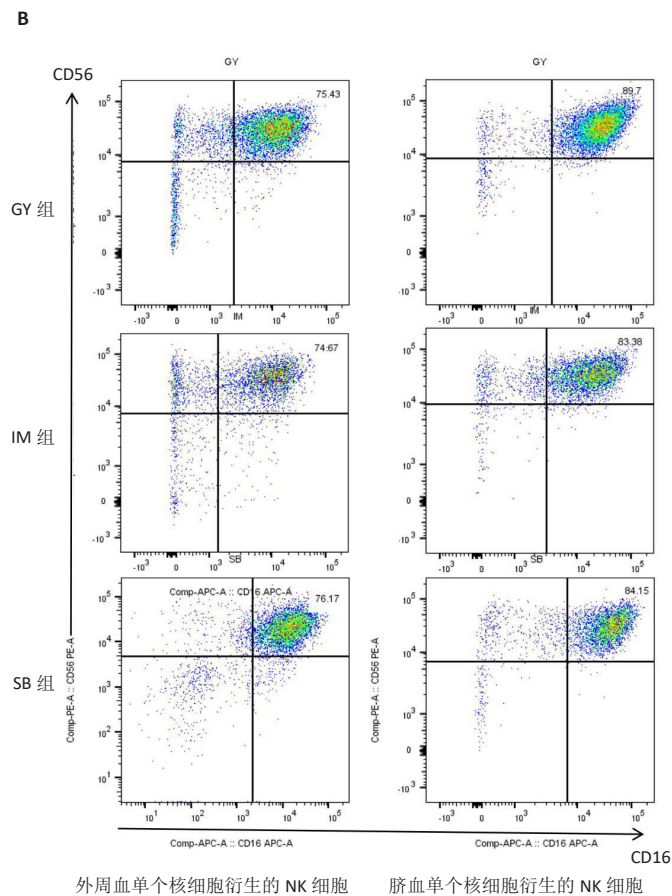
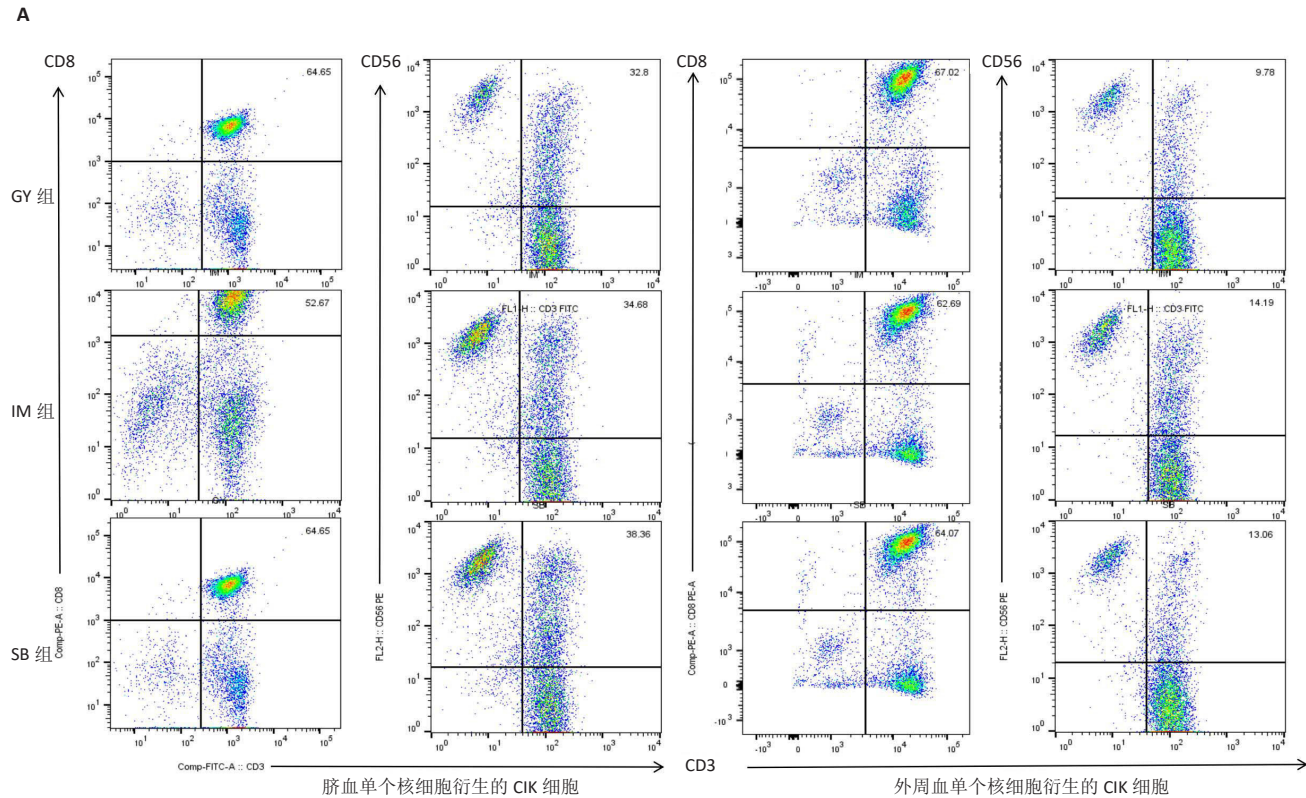
Figure 4 | Recovery and viability rates of CIK/NK cells frozen after resuscitation thawing with different cryoprotectants



图注：图 A, B 为细胞浓度为 $4 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 时冻存复苏后的细胞表面标志物表达， $P > 0.05$ ；C, D 为细胞浓度为 $4 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 时冻存复苏后的细胞表面标志物表达， $P > 0.05$ 。

图 5 | 不同冷冻保护剂冻存脐带间充质干细胞复苏后的细胞表面标志物表达

Figure 5 | Expression of cell surface markers of umbilical cord mesenchymal stem cells frozen with different cryoprotectants after resuscitation thawing



图注：图 A 为脐血 / 外周血单个核细胞衍生的 CIK 细胞表面标志物表达；
B 为脐血 / 外周血单个核细胞衍生的 NK 细胞细胞表面标志物表达。
图 6 | 不同冷冻保护剂冻存 CIK/NK 复苏后的细胞表面标志物表达
Figure 6 | Expression of cell surface markers of CIK/NK frozen with different cryoprotectants after resuscitation thawing

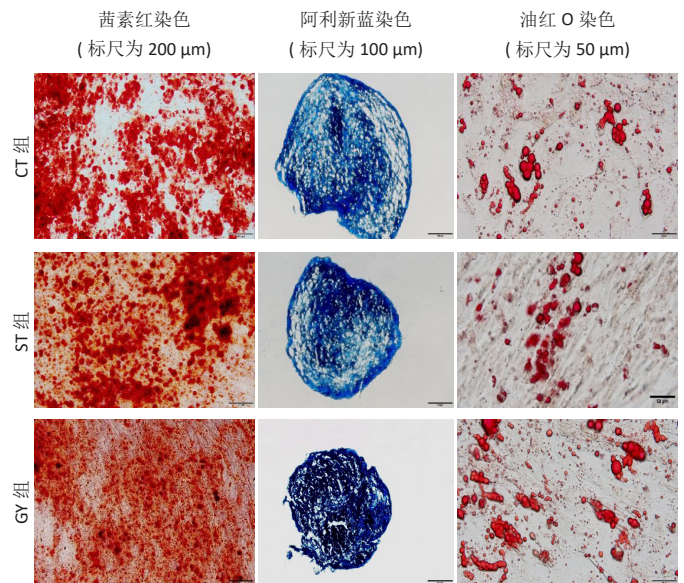


图 7 | 不同冷冻保护剂冻存脐带间充质干细胞复苏后的细胞分化潜能
Figure 7 | Differentiation potential of three lines after resuscitation thawing of umbilical cord mesenchymal stem cells frozen with different cryoprotectants

和其他保护剂协同的低温保持效果与含有二甲基亚砜冷冻保护剂无显著差异，进一步说明了海藻糖具有替代二甲基亚砜冷冻保护的功能。

此外还有在冷冻保护剂中添加动物来源血清，虽然血清在细胞培养中发挥重要作用，可以促进细胞附着、增殖，结合和中和有毒分子，降低剪切应力，并提供抗氧化防御，但是由于血清批次间的差异波动、来源不稳定等

各种因素,使用前需要进行大量的验证工作,因此会导致生产和科研工作变得非常复杂。此外,动物来源血清中细菌和朊病毒等可能会传染并诱导引起免疫反应^[38-40]。因此,FDA发布了严格禁止使用异种产品的指导方针^[13],后续衍生出使用无血清培养基添加5%二甲基亚砷组合,如果已经采用无血清体系来培养细胞,却使用了含有血清的冻存液,再次引入了血清,依旧在细胞药品申报和临床研究中存在各种问题。

在实际研究和生产中,目前的企业和研究机构根据细胞多样性、冷冻工艺的复杂性和成本等多维度评估,针对不同类型的细胞选用不同的冷冻保护剂,包括市售成品类和自行配制冷冻保护剂,涵盖了针对干细胞和免疫细胞的不同类型产品,以及需要程序性降温或非程序降温的产品。即使是同一种类型的细胞在冷冻过程中所使用的冷冻保护剂有效成分浓度也存在多样性,多样性的冷冻保护剂难以推进细胞大规模冻存的工业化;自配产品通常采用“现配现用”的模式,同时这些自配冷冻保护剂的安全性常常受到质检限制,因为无法在短时间内准确检测其无菌状态,这在规模化细胞制品生产中是潜在的安全隐患^[41]。近年来,超低温保存技术也在应用中不断革新,包括冷冻保护剂组合和新冷冻保护剂的通用应用技术。目前市场上出现了一些通用型冷冻保护剂,尽管大多数不含血清,但仍含有一定比例的二甲基亚砷,或者仅适用于科研阶段的使用,并对细胞浓度有所限制。由于大部分产品需要进口,因此其成本远高于自配冷冻保护剂。在规模化应用场景下,这些产品的成本将进一步增加,从而限制了它们在市场上的推广。同时,由于供应链受国际贸易影响较大,这些产品的供应稳定性难以保障。对于已经上市的国产化成分限定的冷冻保护剂,其冻存效果仍需进一步提高。

为了解决以上存在的问题,该研究基于供应链稳定性因素筛选国产试剂,并进行联合配比的研究开发,将新开发的GY冷冻保护剂与市售产品以及几种新鲜配制的冷冻保护剂进行了比较。结果表明,脐带华通氏胶组织在冻存2周后能够正常复苏培养,并且在细胞形态和数量方面与其他组无显著性差异;细胞回收率和活性在冷冻后仍然保持较高水平,细胞表面标志物表达和细胞分化情况均未见明显差异,表明GY冷冻保护剂在脐带华通氏胶组织和间充质干细胞冷冻中表现出良好效果。在免疫细胞方面,使用GY冷冻保护剂的脐血/外周血单个核细胞回收率与使用IM和SB冻存保护剂无显著差异。进一步比较脐血/外周血单个核细胞复苏扩增衍生的NK细胞和CIK细胞数量发现,CIK细胞的增殖效果优于NK细胞,这与LIANG等^[42]的研究结果一致,但不同组别间的细胞收获量无显著性差异。此外,脐血/外周血单个核细胞复

苏扩增衍生的NK细胞或CIK细胞使用3种冻存保护剂冻存后的杀瘤活性无显著性差异,可能因细胞冻存密度不同而导致GY组的结果略优于SB组。综上所述,GY冷冻保护剂在多种组织或多种细胞类型中都表现出良好的适用性。

根据以上分析,GY冷冻保护剂在规模化生产应用方面具有广阔前景。首先,该产品不含血清和二甲基亚砷,有效规避了血清可能带来的异质性和免疫反应风险,同时避免了二甲基亚砷可能引发的细胞毒性;其次,成分清晰明了,可提前进行大批量配制并进行批检测放行,从而解决新鲜配制可能带来的安全性(尤其是微生物污染方面)风险;第三,该产品在成本方面具备一定优势,相较于进口冷冻保护剂,在规模化应用中更具竞争力;第四,国产试剂供应充足,避免了进口产品供应不稳定的影响;第五,细胞浓度范围广($4 \times 10^9 \text{ L}^{-1} - 4 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$),使用少量冷冻保护剂即可达到相同冷冻效果,减少了临床应用的清洗流程。综上所述,在生物体冷冻技术领域,首次研究了一种安全无毒性且可规模化配制的国产化冷冻保护剂,可适用于干细胞和免疫细胞冷冻并长期保存,为多种细胞类型冻存提供了新的方案,在市场化、规模化和标准化应用上奠定了坚实的技术基础,对指导实际生产具备较大的参考意义。

该研究评估了GY冷冻保护剂在1年期冷冻保存过程中的效果,并将其与市售的成品冻存液进行了比较,结果显示,GY冷冻保护剂在冷冻保存效果上与市售产品无显著差异。然而,长期稳定性实验还需进一步深入探索研究。目前,细胞治疗行业涉及多种不同类型的细胞,例如间充质干细胞、成纤维细胞、造血干细胞、淋巴细胞、诱导多能干细胞等。由于细胞特性的复杂性和多样性,该研究选择了代表性的几个细胞类型进行了研究测试,但并未涵盖所有细胞类型,因此后续需要扩大研究范围以覆盖更多细胞类型。目前,相关研究单位也在进行类似的研究^[22, 43-45],实现理想的冻存技术仍需进一步的探索实验和技术攻关。通过优化实验步骤,提升冻存效果,并持续推动细胞在临床实践、生物医学等领域的应用,有助于解决细胞大规模冻存的工业化问题,促进细胞治疗行业的良好发展。

作者贡献:王清芳和张芬负责实验实施、论文撰写,昌广萍和李子喻负责实验数据分析处理,邢岚、钟桂强、陈辉、刘波、刘振宇负责细胞培养、指标检测,彭浩和曾秀萍负责数据和文章的校对,梁晓负责实验设计。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- MURRAY KA, GIBSON MI. Chemical approaches to cryopreservation. *Nat Rev Chem.* 2022;6(8):579-593.
- 胡方方, 李延, 崔趁趁, 等. 人卵巢组织玻璃化冷冻及移植的影响因素分析 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2023,15(9):20-24.
- SHAHID MA, KIM WH, KWEON OK. Cryopreservation of heat-shocked canine adipose-derived mesenchymal stromal cells with 10% dimethyl sulfoxide and 40% serum results in better viability, proliferation, anti-oxidation, and in-vitro differentiation. *Cryobiology.* 2020;92:92-102.
- DING Y, LIU S, LIU J, et al. Cryopreservation with DMSO affects the DNA integrity, apoptosis, cell cycle and function of human bone mesenchymal stem cells. *Cryobiology.* 2024;114:104847.
- 赵刚, 周学迅, 高大勇. 细胞低温保存原理与进展 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2024,54(6):1109-1128.
- SUGISHITA Y, MENG L, SUZUKI-TAKAHASHI Y, et al. Quantification of residual cryoprotectants and cytotoxicity in thawed bovine ovarian tissues after slow freezing or vitrification. *Hum Reprod.* 2022;37(3):522-533.
- BAHSOUN S, COOPMAN K, AKAM EC. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *J Transl Med.* 2019;17(1):397.
- 刘代艳, 于泊洋, 孔群芳, 等. 海藻酸微囊替代 DMSO 和 FBS 的 STO 细胞冷冻保存研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2012,12(33):6413-6418.
- MANTRI S, KANUNGO S, MOHAPATRA PC. Cryoprotective Effect of Disaccharides on Cord Blood Stem Cells with Minimal Use of DMSO. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2015;31(2):206-212.
- CROWLEY CA, SMITH WPW, SEAH KTM, et al. Cryopreservation of Human Adipose Tissues and Adipose-Derived Stem Cells with DMSO and/or Trehalose: A Systematic Review. *Cells.* 2021;10(7):1837.
- FUJITA Y, NISHIMURA M, KOMORI N, et al. Protein-free solution containing trehalose and dextran 40 for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cryobiology.* 2021;100:46-57.
- 张鹏, 刘宝林. 人脐带间充质干细胞新型冻存液实验研究 [J/OL]. *制冷学报*, 1-10[2024-07-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2182.tb.20240524.1119.002.html>.
- HALME DG, KESSLER DA. FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N Engl J Med.* 2006;355(16):1730-1735.
- BARRO L, BURNOUF PA, CHOU ML, et al. Human platelet lysates for human cell propagation. *Platelets.* 2021;32(2):152-162.
- CHEN MS, WANG TJ, LIN HC, et al. Four types of human platelet lysate, including one virally inactivated by solvent-detergent, can be used to propagate Wharton jelly mesenchymal stromal cells. *N Biotechnol.* 2019;49:151-160.
- LEE S, JOO Y, LEE EJ, et al. Successful expansion and cryopreservation of human natural killer cell line NK-92 for clinical manufacturing. *PLoS One.* 2024;19(2):e0294857.
- GAO L, ZHOU Q, ZHANG Y, et al. Dimethyl Sulfoxide-Free Cryopreservation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Based on Zwitterionic Betaine and Electroporation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7445.
- 吕玲, 邢义高, 张秀涛, 等. 通用型细胞冻存保护液的探索 [J]. *中国医药生物技术*, 2022,17(4):347-349.
- 姬广超, 王晓明, 王玉琪, 等. 临床用途细胞冻存保护液探索实验 [J]. *中国医药生物技术*, 2021,16(2):158-160.
- MARQUEZ-CURTIS LA, ELLIOTT JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects: Update from 2015 review. *Cryobiology.* 2024;115:104856.
- AL-SAQI SH, SALIEM M, QUEZADA HC, et al. Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2015;16(2):181-193.
- HUANG Z, LIU W, MA T, et al. Slow Cooling and Controlled Ice Nucleation Enabling the Cryopreservation of Human T Lymphocytes with Low-Concentration Extracellular Trehalose. *Biopreserv Biobank.* 2023;21(4):417-426.
- WANG J, SHI X, XIIONG M, et al. Trehalose glycopolymers for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Cryobiology.* 2022;104:47-55.
- NTAI A, LA SPADA A, DE BLASIO P, et al. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2018;31:102-112.
- AL-SAQI SH, SALIEM M, QUEZADA HC, et al. Correction to: Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2019;20(2):329-330.
- 马洁, 刘彩霞, 谭琴, 等. 细胞产品质量控制与质量管理 [J]. *药物评价研究*, 2021,44(2):273-292.
- 窦蒙家, 张明宽, 饶伟, 等. 人体低温保存: 通向未来“永生”之路? [J]. *科学*, 2017,69(6):1-4+69.
- 刘威, 郭明伟, 郭治宇, 等. 胞内冰形成机理研究进展 [J]. *制冷学报*, 2018,39(3):126-134.
- 邱佳裔, 贾晓青, 黄岗, 等. 细胞、组织冻存方法及应用的研究进展 [J]. *中国生物制品学志*, 2017,30(5):546-550.
- ARUTYUNYAN I, FATKHUDINOV T, SUKHIKH G. Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):236.
- PAVÓN A, BELOQUI I, SALCEDO JM, et al. Cryobanking Mesenchymal Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1590:191-196.
- AWAN M, BURIKAK I, FLECK R, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med.* 2020;15(3):1463-1491.
- DAS S, NIEMEYER E, LEUNG ZA, et al. Human Natural Killer Cells Cryopreserved without DMSO Sustain Robust Effector Responses. *Mol Pharm.* 2024;21(2):651-660.
- HEISKANEN A, SATOMAA T, TIITINEN S, et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells.* 2007;25(1):197-202.
- JURKUNAS UV, YIN J, JOHNS LK, et al. Cultivated autologous limbal epithelial cell (CALEC) transplantation: Development of manufacturing process and clinical evaluation of feasibility and safety. *Sci Adv.* 2023;9(33):eadg6470.
- HU Y, LIU X, LIU F, et al. Trehalose in Biomedical Cryopreservation-Properties, Mechanisms, Delivery Methods, Applications, Benefits, and Problems. *ACS Biomater Sci Eng.* 2023;9(3):1190-1204.
- 刘宝林, 赵子威. 红细胞低温保存中海藻糖的加载方法 [J]. *上海理工大学学报*, 2022,44(1):11-17.
- WHALEY D, DAMYAR K, WITEK RP, et al. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant.* 2021;30:963689721999617.
- WILL RG, IRONSIDE JW, ZEIDLER M, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.* 1996;347(9006):921-925.
- PEDEN AH, SULEIMAN S, BARRIA MA. Understanding Intra-Species and Inter-Species Prion Conversion and Zoonotic Potential Using Protein Misfolding Cyclic Amplification. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:716452.
- WENG L. Cell Therapy Drug Product Development: Technical Considerations and Challenges. *J Pharm Sci.* 2023;112(10):2615-2620.
- LIANG X, HU X, HU Y, et al. Recovery and functionality of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells using five different xeno-free cryoprotective solutions. *Cryobiology.* 2019;86:25-32.
- MARESCHI K, ADAMINI A, CASTIGLIA S, et al. Cytokine-Induced Killer (CIK) Cells, In Vitro Expanded under Good Manufacturing Process (GMP) Conditions, Remain Stable over Time after Cryopreservation. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(5):93.
- XU R, SHI X, HUANG H, et al. Development of a Me2SO-free cryopreservation medium and its long-term cryoprotection on the CAR-NK cells. *Cryobiology.* 2024;114:104835.
- YAMATOYA K, NAGAI Y, TERAMOTO N, et al. Dimethyl Sulfoxide-Free Cryopreservation of Differentiated Human Neuronal Cells. *Biopreserv Biobank.* 2023;21(6):631-634.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)