

文章编号:0253-4339(XXXX)XX-0001-10

doi: 10.12465/issn.0253-4339.20260207002

小肠类器官慢速冷冻工艺的优化研究

贾淑芹 曹裕坤 胡叶静 周新丽

(上海理工大学健康科学与工程学院 生物系统热科学研究所 上海 200093)

摘要 小肠类器官在肠道生理研究与药物筛选中具有重要价值,但其冷冻保存技术常面临复苏存活率低、结构与功能受损等瓶颈。本文旨在通过引入冷冲击置核技术并优化降温参数,建立一种高效、稳定的小肠类器官慢速冷冻方案。在传统慢速冷冻工艺中引入置核环节,系统研究置核温度、冰晶生长阶段终点温度及降温速率对冻存效果的影响。通过检测复苏后的存活率评估冻存效果,采用H&E染色观察形态完整性、免疫荧光检测增殖标志物及连接蛋白,并利用RT-qPCR定量检测干性指标和多分化谱系的表达水平。置核技术显著提升了复苏效果,存活率从 $(85.05\pm3.06)\%$ 提升至 $(88.84\pm1.78)\%$,H&E显示置核后结构较完整。 -8°C 置核并以 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降温至 -60°C ,其存活率 $(89.02\pm2.06\%)$ 显著优于传统降温盒组 $(83.11\pm2.45\%)$ 。形态学和相关染色进一步证实,优化组类器官复苏后结构致密,增殖能力增强。同时,干性标志物、上皮连接蛋白及多谱系分化相关基因表达均显著上调,成功维持了全谱系分化潜能。置核技术通过主动诱导有序成核,有效降低了过冷度引起的机械损伤。优化后的工艺在存活率、结构完整性及生物学功能维持方面均优于传统方法,为类器官库构建及标准化应用提供了可靠技术方案。

关键词 类器官;慢速冷冻;置核;冻存工艺;程序降温

中图分类号: R318.52;Q813.1

文献标识码: A

Optimization of Slow-Freezing Protocols for Small Intestinal Organoids

Jia Shuqin Cao Yukun Hu Yejing Zhou Xinli

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Institute of Thermal Science for Biological Systems, Shanghai 200093, China)

Abstract

Objective Small-intestinal organoids are highly valuable for intestinal physiological research and drug screening. However, their cryopreservation is often limited by low recovery rates as well as structural and functional damage. This study aimed to establish an efficient and stable slow-freezing protocol for small intestinal organoids by introducing controlled ice nucleation (seeding) and optimizing the key cooling parameters.

Methods Focusing on slow-freezing, a seeding step was incorporated into the conventional protocol to investigate the effects of seeding temperature, terminal temperature for ice crystal growth, and cooling rate on cryopreservation outcomes. Evaluations included assessing survival rates, H&E staining for morphology, and immunofluorescence for proliferation markers and junction proteins. RT-qPCR was used to measure the expression of stemness and multilineage markers.

Results and Discussions Seeding significantly enhanced post-thaw recovery, increasing viability from $(85.05\pm3.06)\%$ to $(88.84\pm1.78)\%$, with H&E staining revealing better organoid architectural preservation. Parameter optimization identified an optimal protocol consisting of ice nucleation at -8°C followed by cooling at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -60°C . This optimized regimen achieved a significantly higher survival rate $(89.02\pm2.06\%)$ than the conventional passive cooling box method $(83.11\pm2.45\%)$. Morphological and immunostaining analyses demonstrated that recovered organoids exhibited compact structures and enhanced proliferation. Additionally, upregulated expression of stemness, epithelial junction integrity, and multilineage genes confirmed the effective preservation of their full-spectrum differentiation potential.

Conclusions Seeding actively induces ordered ice nucleation, thereby reducing the mechanical damage caused by excessive

收稿日期:2026-02-07;修回日期:2026-02-25;录用日期:2026-03-20

责任编辑:王亚薇



移动阅读

supercooling. The optimized protocol outperforms traditional methods in survival, structural integrity, and biological function, thus providing technical support for organoid biobanking and standardized applications.

Keywords organoids; slow-freezing; seeding; cryopreservation protocol; controlled-rate freezing

小肠类器官来源于肠干细胞,能够高度再现肠上皮的腺窝结构、分化谱系与屏障功能,被认为是目前最接近体内生理状态的肠道研究模型。小肠类器官用于解析肠道发育、炎症、感染、肿瘤发生等机制^[1],并广泛应用于药物筛选、毒性评价和再生医学研究^[2]。然而,其培养周期长、成本高且存在批次差异,长期持续传代可能导致表观遗传漂移^[3]。冷冻保存为类器官的大规模应用、多中心共享和标准化研究提供了技术基础,一方面,可靠的冻存体系可实现类器官库的构建与标准化供应,支持多中心研究及大规模药物测试;另一方面,有助于减少连续培养带来的批次间差异与成本消耗,提高模型的一致性与可追溯性。

小肠类器官具有空腔结构、细胞极性强、基底膜依赖性高等特征^[4],这使其在冷冻过程中对冰晶损伤和渗透压变化尤为敏感^[5]。虽然已有研究利用程序降温盒实现了小肠类器官的冻存与复苏,但其保存质量仍难以达到标准化应用的需求^[6]。B. E. Lee等^[7]使用10% DMSO(dimethyl sulfoxide)的保护剂冻存肠道类器官,复苏后的存活率(83%)与新鲜对照存在显著差异,且冻存后的类器官在复苏初期生长缓慢。T. F. Zur Bruegge等^[8]使用程序降温盒冻存正常和被感染的结肠类器官,经冷冻保存的类器官在细菌刺激下表现出更高的促炎反应和增殖活性,但对屏障相关基因Cldn4的上调幅度减弱。

由于程序降温盒未对成核过程进行干预,样本可能出现深度过冷现象,其成核时瞬间释放的潜热可引起显著的渗透压变化^[9-10],从而对细胞活性及类器官结构产生不可控的机械应力。这类物理损伤可能是造成类器官结构破碎及复苏后生长缓慢的重要因素。置核被认为是消除过冷现象、调控冰晶形态的关键手段^[11-12]。通过在较高的零下温度下诱导成核,可有效抑制胞内成冰^[13],使水分以受控方式从细胞内外溢,从而减轻对敏感三维结构的机械挤压。虽然物理置核、化学置核及超声辅助成核等工程化技术^[14-16]已在细胞聚集体和球体中显示出提升活性的潜力^[17-19],但针对具有高度极性和空腔结构的小肠类器官,如何通过精确的置核控制来优化其冷冻结局,目前仍缺乏系统性研究与报道。

在慢速冷冻工艺中,降温程序可划分为4个阶段:液体降温、成核、冰晶生长和固体冷却^[20-21]。根据

P. Mazur^[22]的两因子假说,水分外渗速率与环境降温速率之间的动态平衡直接决定了“溶液损伤”与“胞内成冰”的博弈结果。与单细胞悬液相比,对于体积较大且具有单层上皮结构的小肠类器官而言,其水分外渗面临更高的跨膜阻力与胞间输运路径。因此,不同的起始置核温度、降温速率及冰晶生长的终止温度,不仅影响胞外冰晶的生长排布,更直接关系到类器官在相变过程中的渗透压梯度变化。若相关参数设定不当,类器官在未达到渗透压平衡前即进入固体冷却阶段,将加剧细胞膜张力与应力的累积,进而诱发不可逆的结构溃散。

本研究的主要目的是建立一套更加高效的适用于小肠类器官的慢速冷冻工艺。首先,研究冷冲击置核对小肠类器官冷冻保存的效果。其次,优化小肠类器官冷冻过程中的程序降温参数,包括置核温度的设定、冰晶生长阶段的终止温度以及降温速率。最后,通过存活率检测、H&E染色、免疫荧光和RT-qPCR多层次指标,从形态、结构和功能多方面评估优化慢速冷冻工艺对小肠类器官的保存效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、培养基(DMEM/F-12)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)消化液购自美国Gibco公司,DMSO购自美国Sigma公司,小鼠小肠类器官完全培养基、基质胶购自中国上海瑞瑟齐生物科技有限公司,EDTA消化液购自中国北京索莱宝科技有限公司,I型胶原酶(Collagenase I)、DNase I购自德国BioFroxx公司,AO/PI溶液购自美国Revvity公司。冷冻保护剂配方为10%DMSO+10%FBS+DMEM/F-12培养基,按照体积分数配制。

1.2 小肠类器官的构建

实验动物的饲养与处置过程符合国家实验动物管理条例及相关规范,动物处死采用快速颈椎脱臼法以减少痛苦。如前所述方法建立小肠类器官^[23]。处死5~7周龄C57BL/6小鼠,获得小肠组织。使用DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)冲洗肠道,纵向剪开组织,使绒毛面朝上。使用载玻片刮掉肠绒毛,然后剪成3 mm²的肠段,清洗3~5次。使用DPBS配制5 mmol/L EDTA消化液,将肠段转移至消

化液,4℃消化25~30 min。将肠段转移至DPBS终止消化,使用巴氏吸管吹打组织,镜检观察隐窝分离情况。将溶液通过70 μm细胞筛网过滤,获得隐窝悬液。转移至离心管,以1 200 r/min离心4 min。将沉淀重悬于基质胶中,接种于48孔板中,在培养箱中孵育30 min使基质胶凝固。之后加入小肠类器官完全培养基,2 d全换液,4~5 d进行传代,有广泛出芽即可用于后续实验。

1.3 慢速冷冻程序及复苏

传统慢速冷冻方法:将类器官重悬于1 mL冷冻保护剂中,转移至冻存管,在4℃平衡30 min后,放入程序降温盒(BS-02-CFC, Biosharp, 中国),转移至-80℃冰箱,该降温盒的冷却速率约为1℃/min,24 h后放入液氮中长期储存。

冷冲击置核慢速冷冻方法:将盛有1 mL小肠类器官悬液的冻存管转移至程序降温仪(CryoMed Freezer 7453, Thermo Fisher Scientific, USA),4℃平衡30 min以加载保护剂,之后以1℃/min降至-8℃,从该温度开始进行冷冲击程序,以50.0℃/min降温至-50℃,再立即以35.0℃/min升温至-15℃并平衡10 min。随后样品以1℃/min降温至-40℃,以10.0℃/min降温至-80℃,最后放入液氮中进行长期储存。

复温时从液氮中快速取出冻存管,置于37℃恒温水浴锅复温,至冰晶融化。后将冻存管中的溶液吸出,放入1 mL的培养基中离心去除冷冻保护剂溶液,并用培养液洗涤3次,进行后续的检测。

1.4 冷冲击慢速冷冻程序参数的优化

置核温度:除置核温度外,其余冷冻程序均与1.3节所述冷冲击置核慢速冷冻方法一致。4℃平衡30 min,以1℃/min分别降至-6℃、-8℃、-12℃,开始进行冷冲击程序,对比不同置核温度对类器官冻存效果的影响。程序降温仪腔内温度及样品温度曲线,如图1所示。

冰晶生长阶段的终点温度:在最优置核温度条件下,除冰晶生长阶段终点温度外,其余冷冻程序均与1.3节所述方法一致。冷冲击置核程序结束等温平衡10 min后,样品以1℃/min降温至-40℃、-50℃、-60℃。

冰晶生长阶段的降温速率:在最优置核温度及终点温度条件下,除冰晶生长阶段降温速率外,其余冷冻程序均与1.3节所述方法一致。冷冲击置核程序结束等温平衡10 min后,样品以0.5、1、3℃/min降温至-40℃。

1.5 存活率测定

使用两步酶解法解离新鲜或复苏后的小肠类器

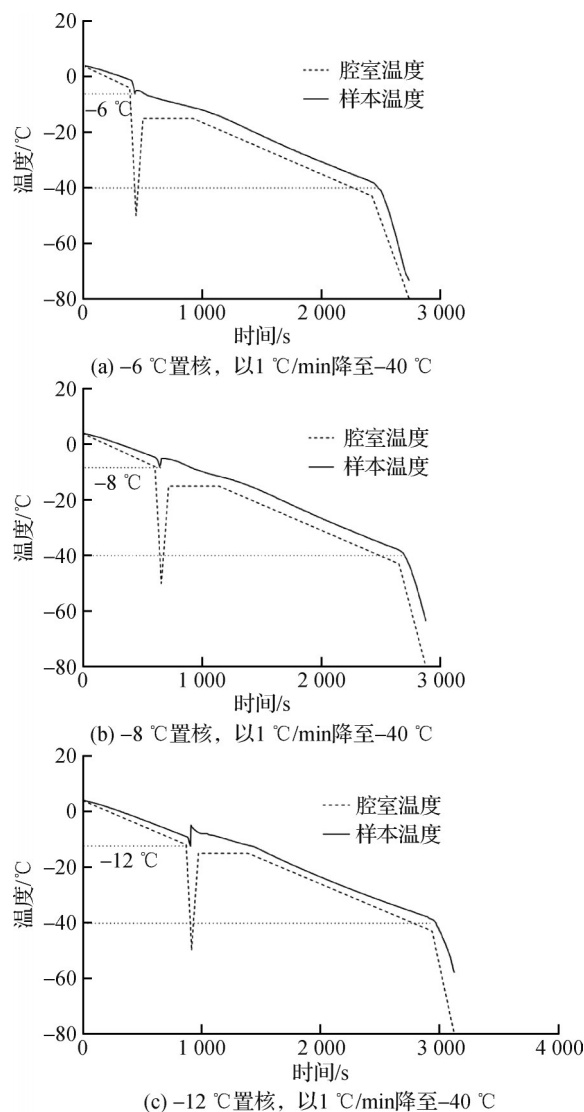


图1 冷却过程中腔室与样品的温度曲线

Fig.1 Temperature curves of chamber and sample during cooling

官,进行存活率测定。用4 mg/mL I型胶原酶的消化液在培养箱中消化15 min,随后加入含有5 mg/mL Dnase I的0.25%胰蛋白酶溶液进行同样的消化处理。消化完成后,立即加入等体积含有体积分数10% FBS的DMEM/F-12培养基以终止酶解反应。期间使用移液枪进行吹打,吹散细胞团。之后使用AO/PI溶液对单细胞进行染色。取细胞悬液和AO/PI溶液各10 μL,混匀滴加在细胞计数板上,放入细胞计数仪(JSY-FL-045H,广州博大博聚科技有限公司)进行计数和活性检测。

1.6 复苏后小肠类器官组织学和免疫荧光染色分析

形态学结构的完整性是评价小肠类器官冷冻复苏效果的基础。通过H&E染色直观观察冷冻保存对类器官结构及细胞排列的影响,判定是否存在明显

的结构破坏。小肠类器官经固定后进行常规H&E染色。使用多聚甲醛固定24 h后, PBS (phosphate-buffered saline) 冲洗3次, 依次梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。切片机切取5 μm 厚连续切片, 42 $^{\circ}\text{C}$ 展片, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片2 h。切片经二甲苯 I、II 各10 min 脱蜡, 梯度乙醇复水, 蒸馏水冲洗。Harris 苏木素染核5 min, 流水返蓝10 min; 0.5% 伊红Y (醇溶) 染胞质1 min, 快速蒸馏水轻冲。再次梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。染色结束, 显微镜采集图像。

免疫荧光染色能够从分子水平进一步评价冷冻复苏后小肠类器官的生物学功能恢复与表型维持情况。通过检测增殖标志物(Ki-67)以验证类器官在经历慢冻应激后是否仍保留增殖能力, 然后利用杯状细胞特异性标志物(MUC2)评价类器官向功能性肠道细胞谱系分化的能力, 最后观察上皮细胞间紧密连接(ZO-1)的连续性, 用于评估细胞极性的建立与物理屏障功能的完整性。小肠类器官经固定后进行免疫荧光染色。使用多聚甲醛固定、石蜡包埋切片。烤片脱蜡复水后, 使用柠檬酸钠缓冲液微波抗原修复, 之后血清室温封闭30 min, 弃封闭液。滴加兔抗 ZO-1 (Invitrogen, 61-7300, 1:200)、兔抗 Ki-67 (Abcam, ab15580, 1:200) 和小鼠抗 MUC2 (Abcam, ab272692, 1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。滴加 Alexa Fluor 488-标记山羊抗兔 IgG (Invitrogen, A32731, 1:400, 含4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 避光室温孵育2 h。抗荧光淬灭剂封片, 指甲油密封, 显微镜采集图像。使用 ImageJ 对免疫荧光染色图像信息进行定量, 对于类器官增殖活性的评估, 通过计算 Ki-67 阳性细胞核数占 DAPI 染色总细胞核数的比例来确定。对于屏障蛋白 ZO-1 及黏蛋白 MUC2, 通过设定统一的荧光阈值, 测量其荧光阳性面积占比。为直观对比各组间的差异, 所有定量结果均相对于新鲜对照组进行归一化处理, 即将新鲜组的数据设定为1.0, 实验组结果以其相对倍数表示。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应分析(RT-qPCR)

解冻小肠类器官后继续培养, 培养至第6天, 收集类器官并去除基质胶。总RNA(ribonucleic acid)采用 TRIpure Total RNA Extraction Reagent (ELK Biotechnology, EP013) 提取, 经 EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (ELK Biotechnology, EQ003) 反转录为 cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) 后, 使用 EnTurbo™ SYBR Green PCR SuperMix (ELK

Biotechnology, EQ001) 在 QuantStudio 6 Flex 荧光定量PCR仪 (Life Technologies) 上进行 qPCR 检测。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行相对定量分析。所有目标基因的转录水平首先归一化至内参基因 actin 以校正样本间的差异。在结果图中, 数据以新鲜组的基因表达水平为基准 (设定为1) 进行展示, 反映各实验组与新鲜组之间的比值关系。

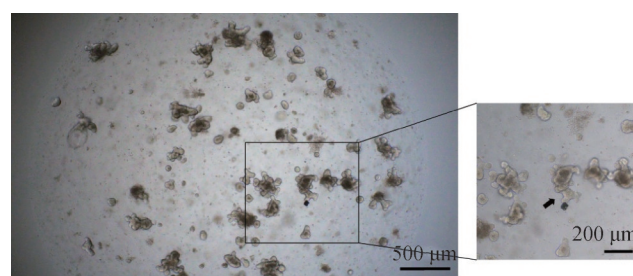
1.8 统计分析

每组实验重复3次, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。数据采用 GraphPad 软件进行统计分析。多组间对比使用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA), 以 $P<0.05$ 作为差异显著性评判标准。下图中不同字母(a、b、c)表示经单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及 Tukey's HSD 多重比较检验后, 各组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

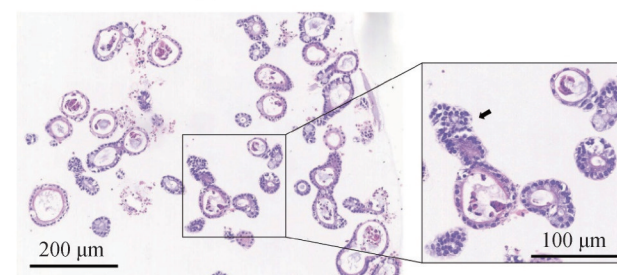
2 结果与讨论

2.1 小肠类器官的构建及鉴定

按照1.2节的方法构建的小鼠小肠来源的类器官, 其明场显微图像如图2(a)所示。可以看出, 类器官形成典型的空腔-芽状结构, 多个隐窝样突起围绕中央空腔排列 (箭头所示为出芽结构的代表性图像), 模拟体内小肠的隐窝绒毛结构。此外, 类器官边界光滑, 内部空腔透明或含有少量细胞碎片, 表明其具备良好的生物活性。H&E染色结果如图2(b)所示, 进一步证实了小肠类器官由单层极化上皮细胞



(a) 小鼠小肠类器官明场图像



(b) 小鼠小肠类器官H&E染色图像

图2 小鼠小肠类器官的明场和H&E图像

Fig.2 Brightfield and H&E staining images of mouse small intestinal organoids

构成,细胞核整齐排列于基底侧,中央形成清晰空腔。同时芽状突起部分存在大量单层柱状上皮细胞,表明其良好的增殖性^[5]。

免疫荧光染色结果如图3所示,Merge表示各荧光通道图像的叠加结果(merged image)。增殖标志物 Ki-67 的阳性信号主要集中于类器官的出芽区域,呈核内点状分布,提示该区域具有较高的增殖

活性;MUC2黏液分泌细胞标志物呈阳性表达,表明类器官存在杯状细胞的分化及其黏液分泌功能;ZO-1 紧密连接标志物呈连续的网状荧光分布于细胞间,证实类器官的紧密连接结构完整,上皮屏障保持良好。上述标志物表达模式均符合成熟小肠类器官的典型结构与功能特征,可用于后续冷冻保存实验。

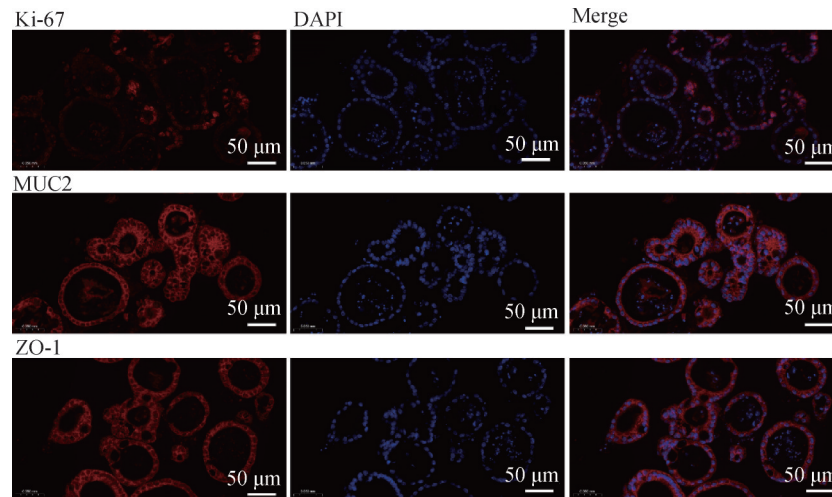


图3 小鼠小肠类器官免疫荧光染色图像

Fig.3 Immunofluorescence staining image of mouse small intestinal organoids

2.2 不同冷冻程序对冻存效果的影响

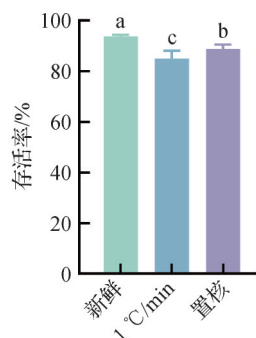
传统程序降温盒冻存和冷冲击置核冻存的类器官存活率如图4(a)所示。使用程序降温盒冻存类器官的存活率为 $(85.05 \pm 3.06)\%$,显著低于新鲜组的 $(93.81 \pm 0.68)\%$ ($P < 0.05$)。-8℃冷冲击置核处理后类器官复苏存活率显著高于传统程序降温盒法($P < 0.05$),为 $(88.84 \pm 1.78)\%$ 。图4(b)和(c)形态学观察显示,传统程序降温盒组复苏后,部分类器官结构破碎;而置核组类器官结构保持相对完整,腔体清晰,上皮层连续性好。

传统程序降温盒法中,冰核随机形成且生长不受控,不受控的深度过冷会使致命的细胞内冰在相邻细胞间传播,造成大规模细胞死亡^[19]。置核通过在较高温度下触发受控成核,降低溶液过冷度,从而减少冰晶成核数量、减缓冰晶生长速率并重塑冰晶形态,显著降低冰晶介导的机械损伤和细胞内冰形成风险^[11]。Li Rui等^[17]在细胞聚集体冻存中使用共聚焦拉曼成像观察到置核可有效限制冰晶形成。Gao Yanan等^[18]研究指出诱导胞外冰核形成能有效保护3D球体的内部结构,防止细胞在冷冻过程中因冰晶穿刺而发生剥落。这些研究印证了可控冰形成在复杂结构生物样本冻存中的价值。

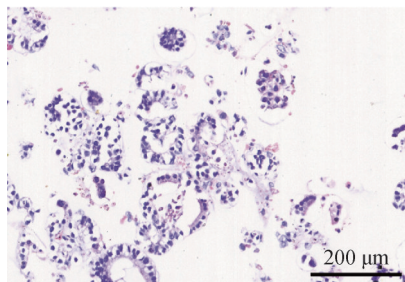
2.3 冷冲击慢速冷冻程序参数对冻存效果的影响

不同置核温度保存小肠类器官的复苏存活率如图5(a)所示,-6、-8、-12℃置核后的存活率分别为 $(79.10 \pm 2.76)\%$ 、 $(89.79 \pm 1.76)\%$ 、 $(83.43 \pm 2.00)\%$,其中-8℃置核组存活率显著高于其他2组($P < 0.05$)。置核通过主动诱导冰晶有序成核,减少因过冷导致的瞬时大量冰核形成。-6℃时冰晶成核效率低,可能会导致局部渗透压失衡,从而使细胞受损;-12℃时过冷度过大,冰晶瞬间大量生长,会损伤细胞膜和细胞间连接^[24];而-8℃时过冷度适中,不仅能保证结晶过程完成,而且有时间使细胞适应渗透压变化。N. Dan等^[12]提出在接近体系平衡冰点的高成核温度下主动诱导成核,可最大化T细胞脱水、抑制胞内冰,获得最优冻存存活率。这与蒋沛等^[13]提出的适宜过冷度可减少细胞冷冻损伤一致。

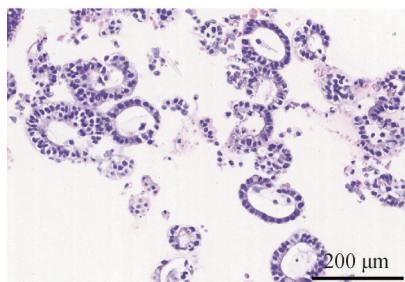
在-8℃置核条件下,不同终点温度的复苏存活率如图5(b)所示,-40、-50、-60℃对应的存活率分别为 $(87.80 \pm 2.30)\%$ 、 $(81.72 \pm 1.53)\%$ 、 $(89.00 \pm 0.60)\%$,其中-50℃组存活率显著低于其他2组($P < 0.05$)。冰晶生长阶段的终点温度,核心在于确保细胞充分脱水以规避胞内结冰,与缩短高渗暴露时长以减轻渗透损伤之间,寻求一个最佳终点温度。-40℃既保



(a) 传统方案和置核处理的存活率



(b) 传统方案解冻后的H&E染色图像



(c) 置核处理解冻后的H&E染色图像

图4 置核操作对小肠类器官冻存的影响

Fig.4 Effect of seeding on cryopreservation of small intestinal organoids

证了足够的脱水,又减少了细胞暴露在保护剂中的毒性暴露时间^[25]; -60 °C则可能利用了低温下溶液黏度剧增带来的物理保护^[26]。针对小肠类器官这一具有管腔结构的特殊模型, -50 °C可能是跨膜渗透压平衡最脆弱的临界点。

降温速率对复苏存活率的影响如图5(c)所示,

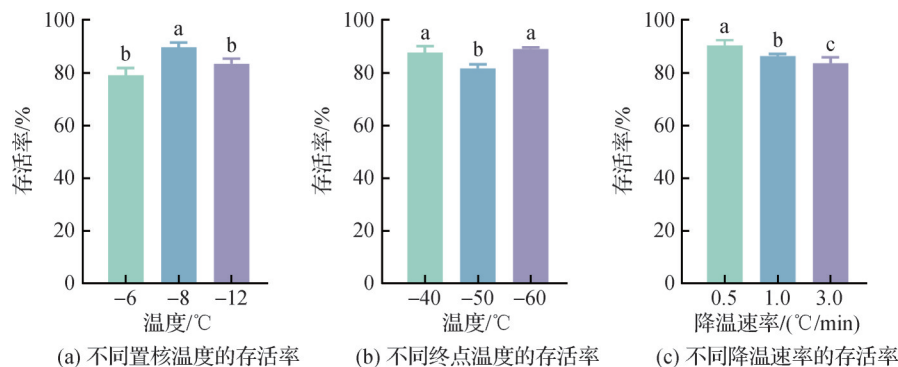


图5 多参数优化后的小肠类器官在解冻后的存活情况

Fig.5 Post-thaw survival of small intestinal organoids following multi-parameter optimization

0.5、1、3 °C/min 降温后的存活率分别为(90.42±2.06)%、(86.47±0.85)%、(83.69±2.26)%,其中0.5 °C/min与1 °C/min组无显著差异,但均显著高于3 °C/min组($P<0.05$)。降温速率的核心在于平衡胞内结冰与溶质效应,3 °C/min的较快冷却速度超越了类器官细胞的水渗透外流能力,使胞内水分未能及时流出,从而诱发了致死性的胞内结冰及相关的细胞骨架紊乱;而0.5 °C/min与1 °C/min的慢速降温,胞外冰晶缓慢生长,产生适度渗透压梯度,驱动细胞适度脱水,有效避免了胞内结冰。虽然较慢的速率会延长细胞暴露于高渗残余液的时间(即溶质效应),但对于结构复杂的小肠类器官而言,这种适度的脱水平衡了机械损伤与渗透压冲击,更有利于维持基底膜完整性与三维结构稳定。

综上所述,确定小肠类器官慢速冷冻的最佳工艺参数为-8 °C置核,以0.5 °C/min降温至-60 °C,再以10 °C/min降温至-80 °C后转入液氮储存。

2.4 传统与优化工艺慢冻的复苏质量对比

使用传统方法与优化工艺慢冻小肠类器官复苏后立即的存活率如图6(a)所示。优化程序组复苏存活率(89.02%±2.06%)显著高于传统程序降温盒组(83.11%±2.45%),且与新鲜组无显著差异($P>0.05$),表明该优化工艺能够有效维持类器官的活性。

复苏后培养4 d后明场观察如图6(b)和(c)所示,传统程序降温盒组类器官以囊泡样结构为主,圆形单腔囊泡占多数,出芽数量少,囊腔扩张;而优化程序组类器官出芽丰富,结构致密。图6(d)和(e)的H&E染色结果进一步证实,传统程序降温盒组肠上皮细胞形态不均一,排列不规则;优化程序组细胞层排列紧密,细胞核形态均一,可见多个典型芽状结构,与未冻存类器官的染色结果相似。

免疫荧光染色结果如图7所示,2组冻存复苏后

的类器官均能检测到 Ki-67、MUC2 和 ZO-1 的表达。同时根据阳性信号进行定量的数据如图 8 所示,与未冻存类器官相比,冻存后 Ki-67 表达显著增加,MUC2 和 ZO-1 表达显著减弱。Ki-67 表达增加可能是类器

官复苏后的损伤修复^[27],而 ZO-1 表达减弱可能是受到冰晶损伤,这与 T. F. Zur Bruegge 等^[8]在结肠类器官冻存中观察到的屏障功能相关基因表达异常规律一致。此外,MUC2 表达情况与 RT-qPCR 结果一致。

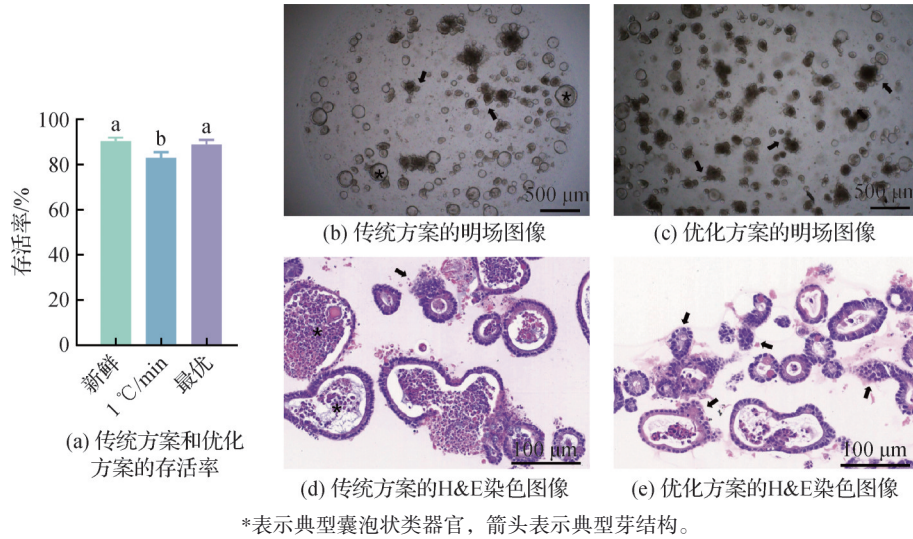


图6 不同冻存方案解冻后第4天小肠类器官的存活率、明场及 H&E 染色图像

Fig.6 Morphology and H&E staining of small intestinal organoids 4 days post-thaw

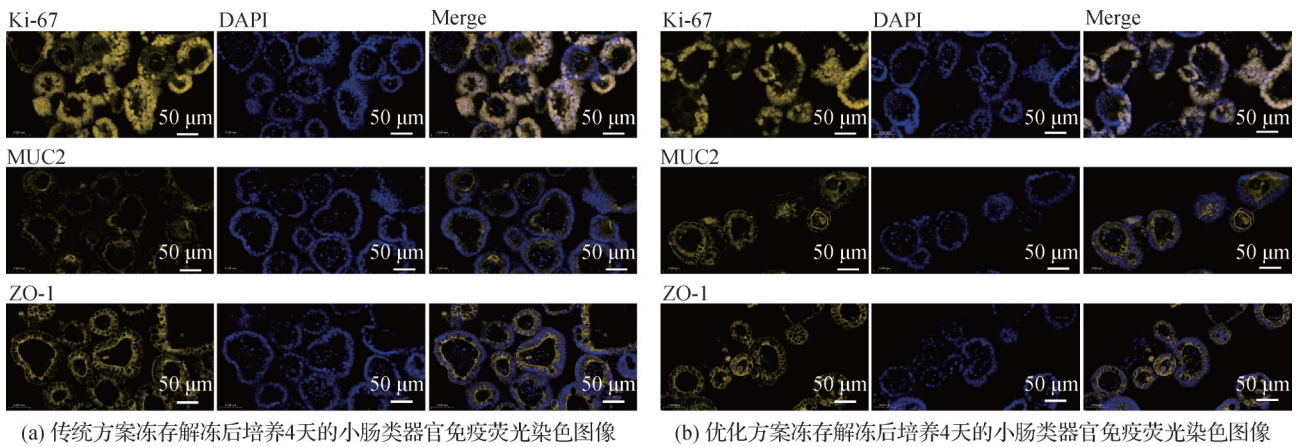


图7 不同冻存方案解冻后第4天小肠类器官的免疫荧光染色图像

Fig.7 Immunofluorescence staining of small intestinal organoids 4 days post-thaw

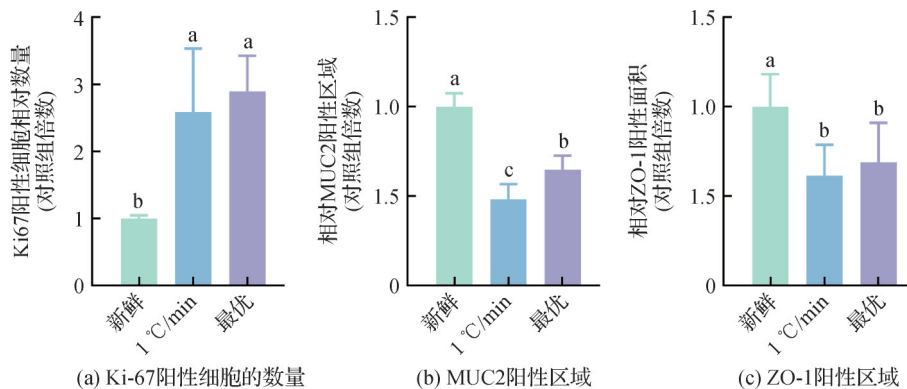


图8 免疫荧光阳性信号的定量分析

Fig.8 Quantitative analysis of immunofluorescence-positive signals

RT-qPCR 检测结果如图 9 所示,与未冻存类器官相比,冻存后肠干细胞标志物 Lgr5、上皮细胞标志物 E-cad、肠吸收细胞标志物 Villin 及杯状细胞标志物 MUC2 的表达均显著降低,且优化程序组的表达水平显著高于传统程序降温盒组。潘氏细胞标志物 Lyz 与肠内分泌细胞标志物 ChrgA 的表达,在优化程序组与未冻存组间无显著差异。

在类器官冷冻保存中,干细胞的活性和结构的完整性会受到攻击。肠干细胞、上皮细胞、肠吸收细胞对冷冻损伤是敏感的,冰晶损伤与渗透压冲击易导致其基因表达下调。Lgr5 表达水平是衡量肠道类器官复苏后增殖潜能的核心指标^[28]。E-cad 及 Villin 的下调通常意味着肠道类器官极性的丧失和极性上皮结构的破坏。杯状细胞的耐受性相对较弱,优化程序组通过调控降温速率和冰晶生长,避免这些细胞损伤。相比之下,潘氏细胞和肠内分泌细胞的耐受性相对较强,冻存对其影响较小。通过优化冻存工艺证明其在保存类器官多谱系分化特征方面的优越性,这对于药物筛选等需要功能性细胞参与的研究至关重要。

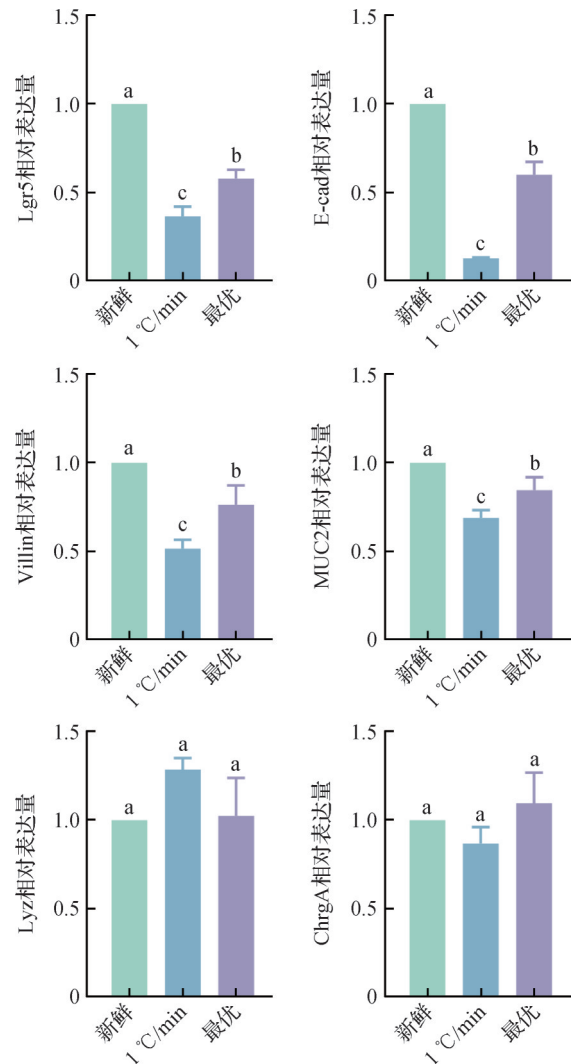
在本研究中,传统程序降温盒组(1 °C/min)显示出标志基因的显著下调,这直观地反映了冷冻过程对类器官细胞活力的削弱。虽然有研究^[7]报道 10% DMSO 冻存组与新鲜组在某些标记物表达上无统计学显著差异,观察到冻存组表达量反而高于新鲜组且无显著差异。这种差异可能源于实验系统的敏感度不同,观察之前的数据可以发现,其组间波动较大(误差棒较宽),这可能掩盖了潜在的生物学差异。本研究通过严格控制类器官的起始状态和复苏后的培养一致性,揭示了标准冻存对类器官功能单元的削弱作用。该结果与免疫荧光检测结果相互印证,表明优化程序不仅能维持类器官的形态与结构完整,更能有效保护其多谱系分化功能,为后续研究提供了功能稳定的模型资源。

3 结论

本文针对小肠类器官开展慢速冷冻工艺优化,得到结论如下:

1)与传统程序降温盒法相比,置核处理后类器官复苏存活率从(85.05±3.06)%提升至(88.84±1.78)%,H&E 染色显示腔体结构更清晰、上皮层连续性更好。置核处理能够减少过冷诱发的瞬时大量成核,从而有效降低冰晶形成与生长过程中产生的机械性损伤。

2)确定小肠类器官慢速冷冻的最佳工艺参数是



Lgr5 肠道干细胞标志物; E-cad 上皮细胞黏附分子; Villin 吸收性上皮细胞标志物; MUC2 杯状细胞标志物; Lyz 潘氏细胞标志物; ChrgA (Chromogranin A) 肠内分泌细胞标志物。

图 9 不同方案冻存解冻后类器官的基因表达分析

Fig.9 Post-thaw gene expression of small intestinal organoids by conventional and optimized protocols

-8 °C 置核、以 0.5 °C/min 降温至 -60 °C,相较于传统程序降温盒法(83.11%±2.45%)显著提升存活率(89.02%±2.06%)。其中,-8 °C 置核后存活率(89.79%±1.76%)显著优于-6 °C 和-12 °C 置核组;冰晶生长终点温度为-60 °C 时存活率最高(89.00%±0.60%),显著优于-50 °C 组;0.5 °C/min 与 1 °C/min 的降温速率显著优于 3 °C/min 组。

3)优化后的慢速冷冻程序改善了类器官的复苏质量与生物学功能,与传统方法相比,优化程序组复苏后芽状结构更多、结构更致密,囊泡样比例较低;H&E 染色显示细胞排列紧密、核形态均一,并保留典型芽状结构;免疫荧光检测显示 Ki-67 及紧密连接 ZO-1 均能够表达;RT-qPCR 结果证实,优化程序能

显著提高Lgr5、E-cad、Villin和MUC2的表达水平,Lyz和ChrgA的表达水平与新鲜组无显著差异,维持了类器官的多谱系分化功能。

综上,本研究建立的小肠类器官慢速冷冻优化工艺,在存活率、结构完整性及生物学功能维持方面均显著优于传统方法。本研究为其他类器官的保存提供了一个范式,即通过置核、参数优化和功能评价(多谱系标志物)来替代传统的经验性冷冻,这对于建立标准化类器官生物样本库及实现跨中心的数据共享具有直接的指导价值。

参考文献

- [1] Flood P, Hanrahan N, Nally K, et al. Human intestinal organoids: Modeling gastrointestinal physiology and immunopathology—current applications and limitations [J]. *European Journal of Immunology*, 2024, 54 (2) : 2250248.
- [2] Zhou Li, Luo Dan, Lu Wei, et al. Gastrointestinal tract organoids as novel tools in drug discovery [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, 15: 1463114.
- [3] Thalheim T, Siebert S, Quaas M, et al. Epigenetic drifts during long-term intestinal organoid culture [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1718.
- [4] Almeqdadi M, Mana M D, Roper J, et al. Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2019, 317(3): C405–C419.
- [5] He Wanjuan, Sun Qinlin, Ge Dan, et al. Application of nanomaterials in organoid culture and cryopreservation [J]. *Nanoscale Advances*, 2025, 7(23): 7483–7503.
- [6] Rogulska O, Havelkova J, Petrenko Y. Cryopreservation of organoids [J]. *Cryoletters*, 2023, 44(2): 65–75.
- [7] Lee B E, Lee B J, Lee K J, et al. A simple and efficient cryopreservation method for mouse small intestinal and colon organoids for regenerative medicine [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 595: 14–21.
- [8] zur Bruegge T F, Liese A, Donath S, et al. Intestinal organoids in colitis research: focusing on variability and cryopreservation [J]. *Stem Cells International*, 2021, 2021: 9041423.
- [9] Daily M I, Whale T F, Partanen R, et al. Cryopreservation of primary cultures of mammalian somatic cells in 96-well plates benefits from control of ice nucleation [J]. *Cryobiology*, 2020, 93: 62–69.
- [10] Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing [J]. *The Journal of General Physiology*, 1963, 47 (2) : 347–369.
- [11] John Morris G, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation—A review [J]. *Cryobiology*, 2013, 66 (2): 85–92.
- [12] Dan N, Shelake S, Luo W C, et al. Impact of controlled ice nucleation on intracellular dehydration, ice formation and their implications on T cell freeze-thaw viability [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 665: 124694.
- [13] 蒋沛, 火晓越, 刘宝林, 等. 细胞低温保存过程中冰晶成核的研究进展 [J]. *制冷学报*, 2020, 41(2): 159–166. (Jiang Pei, Huo Xiaoyue, Liu Baolin, et al. Ice nucleation during cell cryopreservation: a review [J]. *Journal of Refrigeration*, 2020, 41(2): 159–166.)
- [14] 李维杰, 宋立勇, 刘宝林, 等. 超声波植冰对 L-02 肝细胞低温保存的影响 [J]. *制冷学报*, 2021, 42(4): 158–166. (Li Weijie, Song Liyong, Liu Baolin, et al. Effect of ultrasonic ice seeding on cryopreservation of L-02 hepatocyte [J]. *Journal of Refrigeration*, 2021, 42 (4) : 158–166.)
- [15] Lindinger B, Mettin R, Chow R, et al. Ice crystallization induced by optical breakdown [J]. *Physical Review Letters*, 2007, 99(4): 045701.
- [16] Dalvi-Isfahan M, Hamdami N, Xanthakis E, et al. Review on the control of ice nucleation by ultrasound waves, electric and magnetic fields [J]. *Journal of Food Engineering*, 2017, 195: 222–234.
- [17] Li Rui, Yu Guanglin, Azarin S M, et al. Freezing responses in DMSO-based cryopreservation of human iPSC cells: aggregates versus single cells [J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2018, 24(5): 289–299.
- [18] Gao Yanan, Bissoyi A, Guo Qiongyu, et al. Induced extracellular ice nucleation protects cocultured spheroid interior and exterior during cryopreservation [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2025, 11 (1) : 208–212.
- [19] Murray K A, Gao Yanan, Griffiths C A, et al. Chemically induced extracellular ice nucleation reduces intracellular ice formation enabling 2D and 3D cellular cryopreservation [J]. *JACS Au*, 2023, 3(5): 1314–1320.
- [20] Nuytten G, De Geest B G, De Beer T. Relevance of controlled cooling and freezing phases in T-cell cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2024, 116: 104907.
- [21] Nuytten G, Revatta S R, Van Bockstal P J, et al. Development and application of a mechanistic cooling and freezing model of the spin freezing step within the framework of continuous freeze-drying [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(12): 2076.
- [22] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and

- implications [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1984, 247(3): C125-C142.
- [23] Sato T, Vries R G, Snippert H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. Nature, 2009, 459 (7244) : 262-265.
- [24] Körber C. Phenomena at the advancing ice - liquid interface: solutes, particles and biological cells [J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 1988, 21(2): 229-298.
- [25] McGann L E, Farrant J. Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196°C . I. Holding temperature and time [J]. Cryobiology, 1976, 13 (3) : 261-268.
- [26] Kilbride P, Meneghel J, Fonseca F, et al. The transfer temperature from slow cooling to cryogenic storage is critical for optimal recovery of cryopreserved mammalian cells[J]. PLoS One, 2021, 16(11): e0259571.
- [27] Mashouf P, Tabibzadeh N, Kuraoka S, et al. Cryopreservation of human kidney organoids [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2024, 81(1): 306.
- [28] Han S H, Shim S, Kim M J, et al. Long-term culture-induced phenotypic difference and efficient cryopreservation of small intestinal organoids by treatment timing of Rho kinase inhibitor [J]. World Journal of Gastroenterology, 2017, 23(6): 964.

通信作者简介

周新丽,女,教授,上海理工大学生物系统热科学研究所, 13817547878, E-mail: zjulily@163.com。研究方向:低温生物医学技术。

About the corresponding author

Zhou Xinli, female, professor, Institute of Biothermal Science, University of Shanghai for Science and Technology, 86-13817547878, E-mail: zjulily@163.com. Research fields: cryobio-medical technology.