

文章编号:0253-4339(2020)02-0159-08
doi:10.3969/j.issn.0253-4339.2020.02.159

细胞低温保存过程中冰晶成核的研究进展

蒋沛¹ 火晓越¹ 刘宝林¹ 刘威¹ 梁玮²

(1 上海理工大学生物系统热科学研究所 上海 200093; 2 上海交通大学医学院附属新华医院 环境与儿童健康教育部和上海市重点实验室 上海 200092)

摘 要 细胞低温保存过程中,胞内冰损伤是其主要损伤因素之一,这可以通过控制冰晶成核来降低。本文总结了物理、化学及生物控制成核方法在低温保存领域的应用,归纳了各类控制成核方法的机理及对细胞产生的影响,对比得出生物及化学试剂控制成核方法较为优异。并提出最佳成核温度的概念,在该温度下,胞外冰产生且引导细胞适当脱水,减少胞内自由水,降低胞内冰的产生几率,为控制成核在细胞低温保存领域的应用指明了方向。
关键词 低温保存;胞内冰损伤;冰晶成核;抑制成核;置核
中图分类号:TB61⁺1; R318.52 **文献标识码**: A

Ice Nucleation during Cell Cryopreservation: A Review

Jiang Pei¹ Huo Xiaoyue¹ Liu Baolin¹ Liu Wei¹ Liang Wei²

(1. Institute of Biothermal and Techonology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China; 2. Ministry of Education and Shanghai Key Laboratory of Children's Environmental Health, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

Abstract The major challenge to cell cryopreservation is intracellular ice formation (IIF), which can be reduced by controlling ice nucleation. In this review, the influence of ice nucleation on super-cooling and damage zone was analyzed. Physical, chemical, and biological methods have been applied to control ice nucleation during cryopreservation. The mechanisms of these methods were summarized and the influence of these methods on cell cryopreservation were discussed. Then it was proposed that biological and chemical methods should be superior methods of controlling ice nucleation. Additionally, the best ice seeding temperature was further proposed. At this temperature, ice crystals are initiated in the extracellular solution, which could result in minimal cell volume by reducing intracellularly active water properly, and then the incidence of IIF is reduced. The direction of ice seeding applied in the cell cryopreservation was pointed out.
Keywords cryopreservation; intracellular ice damage; ice nucleation; suppressed nucleation; ice seeding

受损细胞及组织的修复与再生已成为临床医学面临的巨大难题,全世界每年有超过 50 000 个造血干细胞和 100 800 个实体器官移植手术^[1],但由于免疫排斥反应,术后病患的痊愈情况并不理想。与此同时,组织工程和再生医学领域正在迅速发展,成人干细胞如间充质干细胞具有自我更新和分化能力,可发展成特定细胞,用于修复再生医学中受损的组织和器官^[2],如能提前提取胚胎干细胞或成人干细胞进行低温保存,将解决匹配供体难寻及免疫排斥等问题。
低温保存细胞时,降温条件不同,细胞状态不同,如图 1 所示慢速冷冻保存(图 1-I ~图 1-VI)和玻璃化保存(图 1-VII)是低温保存的两种方式,其胞内冰

的生成量及形态不同。玻璃化保存是最理想的保存方式,细胞的玻璃态固化不会改变细胞的原子或结构元的位置,因此并未破坏细胞功能^[3],但目前很难达到完全玻璃化保存。慢速冷冻保存过程中,细胞低温损伤的来源主要有溶质损伤(图 1-I)和胞内冰损伤(图 1-III,图 1-IV),低温冷却速率慢,胞内水大量渗出,易造成溶质损伤;而冷却速度快,细胞内水来不及渗出易造成胞内冰损伤^[4-5]。梁玮等^[6]研究表明,胞内冰不仅对细胞造成机械损伤,还可能损伤细胞功能,并可能造成细胞内生物大分子的降解或突变等。低温保存过程中产生的胞内冰是细胞受损的主要因素之一。

基金项目:国家自然科学基金(51776130)资助项目。(The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51776130).)

收稿日期:2019-02-25;修回日期:2019-04-23

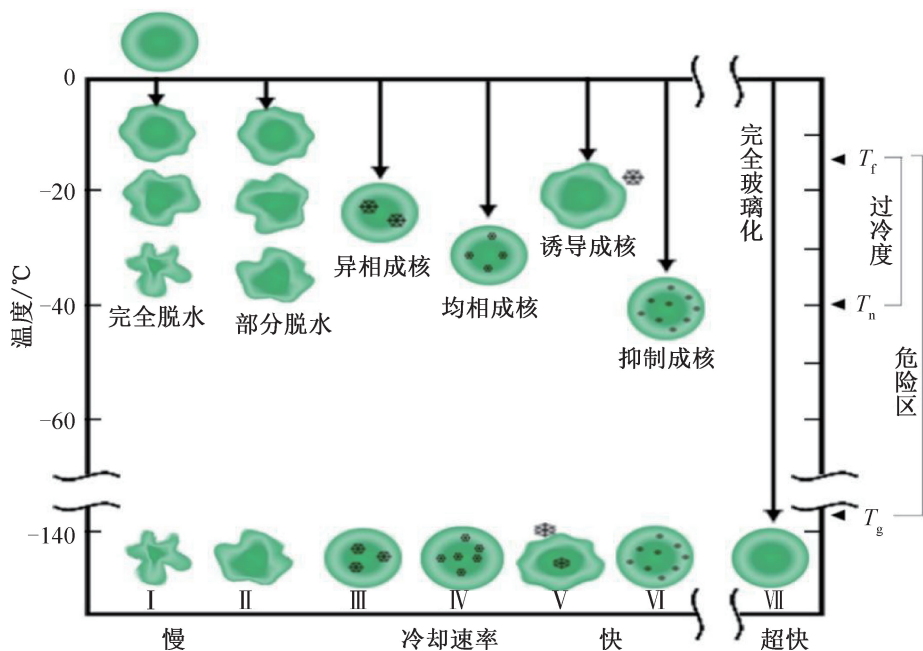


图 1 不同降温条件下低温保存的细胞状态^[12]

Fig.1 Cell status under different conditions during cryopreservation^[12]

提高细胞的低温保存质量,降低冰晶损伤主要从减少冰晶的生成及抑制冰晶生长两方面入手,两者都与冰晶成核温度有密切关系。成核温度的变化会影响卵母细胞/卵巢^[7]、胚胎干细胞^[8-9]等各种细胞的生存能力和结构完整性^[10-11]。本文主要分析成核温度对于冰晶成核与生长的影响,总结目前低温保存领域控制冰晶成核的方法及机理。

1 成核温度对冰晶的影响

成核温度对冰晶的影响实际是通过影响过冷度($T_f \sim T_n$)和危险区($T_f \sim T_g$),进而影响冰晶的成核、生长及形貌,控制成核温度可以使得胞内冰损伤最小化^[13]。

1.1 成核温度对过冷度的影响

欲使液相自发转成固相,液体过冷到低于 T_f (凝固点)的温度即 T_n (初始成核温度)是必要的,此时产生过冷度 ΔT ($\Delta T = T_f - T_n$),形成冰晶的相变驱动力 ΔG (固液态的吉布斯自由能之差),当 ΔG 也大于成核势垒 ΔG^* ,形成冰晶晶核,结冰自发进行。

冰晶成核分为均相成核(图 1-IV)和异相成核(图 1-III)两种,均相成核在一个体系内各处的成核几率均相同,异相成核是指水在尘埃、容器表面及其他异相表面等处形成晶核^[4]。纯水的均相成核温度为 $-35 \sim -38\text{ }^\circ\text{C}$ ^[12],生物材料异相成核温度一般在 $-10 \sim -30\text{ }^\circ\text{C}$ ^[14],异相成核的过冷度比均相成核的过冷度小很多^[15]。过冷度较大则形成的晶核多,过冷

度小时则形成的晶核少^[16]。已有学者研究出晶核生成模型并验证其在生物领域的适用性,刘宝林等^[17]将实验与胞内冰成核模型相结合,系统地研究了老鼠成骨细胞在低温保存过程中的胞内冰生成规律,并应用数学模型较好地预测了多种降温速率下老鼠成骨细胞的胞内冰生成率。

溶液过冷度较小时,形成的冰晶形貌可能呈针状、羽状或盘状,但最终均发展成树枝状。M. Bayer-Giraldi 等^[18]研究一种从海冰硅藻中提取出来的冰面结合蛋白(fcIBPs),结果显示, $\Delta T < 0.3\text{ K}$ 时,冰晶呈盘状; $0.3\text{ K} < \Delta T < 0.5\text{ K}$ 时,平行于基面的冰面开始出现树枝状分叉,且随着 ΔT 的增大,树枝状分叉越密集。呈树枝状的原因是结晶过程中所释放的潜热不能迅速地被传递出去,树枝状的冰晶棱角锋利,造成细胞损伤。

冰晶的生长是水分子扩散到晶核表面并有序聚集的过程^[19]。通过均相成核或异相成核之后,冰晶就从晶核向不同方向扩展生长,一般在平行于基面的方向上生长,垂直于基面的方向上生长十分缓慢,可忽略。冰晶的生长速率随过冷度的增大而增大,D. A. Vorontsov 等^[20]在研究中提到纯水中冰晶体尖端生长速率随过冷度的变化:

$$R(\Delta T) = \beta \Delta T^n \quad (1)$$

式中: β 和 n 均为实验常数。 β 是面的动力学系数,根据实验数据 $n = 1.70 \sim 2.37$ 。他们研究了羧化的多聚赖氨酸(COOH-CPLL)保护剂、过冷度与冰晶

生长速率的关系,发现无论何种浓度,溶液冰晶生长速率均随着过冷度的增加而增加。

1.2 成核温度对危险区的影响

图 2 所示为典型低温保护剂溶液相图, T_m 为熔融温度, $^{\circ}\text{C}$; T_h 为均相成核温度, $^{\circ}\text{C}$; T_g 为玻璃化转变温度, $^{\circ}\text{C}$; T_d 为反玻璃化转变温度, $^{\circ}\text{C}$ 。降温时,温度达到玻璃化转变温度 T_g 以下,溶液即固化为玻璃态,而 $T_i \sim T_g$ 区域冰晶快速生长,损伤细胞,为第一危险区;复温时,温度达到反玻璃化转变温度 T_d 后,冰晶再次生长,物质开始脱离玻璃化状态, $T_d \sim T_m$ 区域为第二危险区。

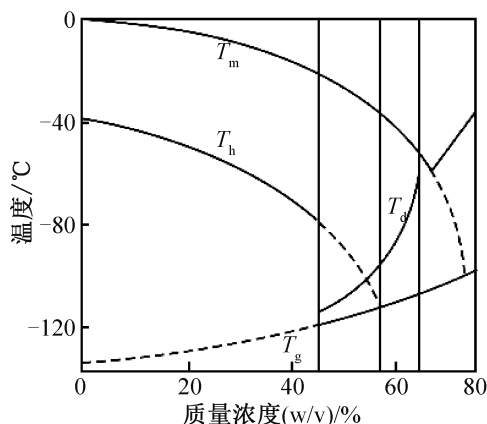


图 2 典型低温保护剂溶液相图^[4]

Fig.2 Typical cryoprotectant solution phase diagram^[4]

对于玻璃化保存,第二危险区易再结晶,出现反玻璃化现象,对细胞损伤较大,解决思路有缩短危险区或抑制第二危险区冰晶的成核及生长。Huang Haishui 等^[21]研究发现可通过控制成核减少第二危险区胞内冰晶再生长尺寸,进而降低胞内冰对细胞的威胁,且归纳出第二危险区大致在 $-10 \sim -30^{\circ}\text{C}$ 。

使用海藻酸钠水凝胶封装细胞再进行低温保存,不仅可以提升降温过程中保护剂溶液的玻璃化程度,而且能够抑制第二危险区的反玻璃化,抑制原因可能是海藻酸钠水凝胶高黏度阻碍水分子运动^[22-23]。Liu Xiaoli 等^[22]使用海藻酸钠水凝胶封装猪脂肪干细胞,保护剂溶液为 1 mol/L 二甲亚砜(DMSO)+ 1 mol/L 乙二醇(EG)+ 1.3 mol/L 海藻糖。未被微囊化细胞的存活率低于 27% ,被微囊化细胞具有相对较高的存活率(63.5%),低温显微镜观察发现未微囊化细胞组的 T_m 为 -70.8°C ,升温时在 -20.6°C 开始反玻璃化,而微囊化细胞组 T_m 被抑制到 -84.1°C ,未出现反玻璃,且冰晶更少更小。Huang H. 等^[23]通过添加海藻酸钠水凝胶实现了低浓度(2 mol/L)且较大体积($250\text{ }\mu\text{L}$ 麦管)的玻璃化冻存,研究发现降温过程

中,冰晶首先在海藻酸钠水凝胶外侧生成,内侧无冰晶出现。微胶囊化后的小鼠胚胎干细胞(mESCs)和人脂肪干细胞(hADSCs)存活率均显著提高。

综上所述,过冷度较小,产生的晶核数量少,冰晶生长速率较慢,冰晶形态棱角较少,对细胞产生的威胁较小。而缩短危险区,可缩短冰晶生长时间,降低冰晶尺寸。学者们不断研究有效控制冰晶成核的方法,以及这些方法对于低温保存过程中细胞的影响。

2 物理方法控制成核

控制成核的物理方法有手动置核和物理场影响成核,手动置核是较为成熟的物理诱导成核方式,外加物理场也会影响低温保存过程中水分子的相变,通过不同的作用机理来诱导或抑制冰晶成核。

2.1 手动置核

早期低温保存细胞时,就有通过将小冰晶体引入过冷样品中的研究案例。外来晶种具有污染培养液的可能性,消除方法是通过在低温容器外侧局部产生过冷点,使得溶液异相成核,提高成核温度。

C. B. Ware 等^[7]研究手动置核对人胚胎干细胞存活率的影响,保护剂为 10% (v/v, 体积浓度) DMSO,使用经液氮冷却过的钳子在 -10°C 接触试管外侧,将细胞的存活率从 $3.0\% \pm 2\%$ 提升至 $79\% \pm 15\%$ 。虽存活率提升,但未研究置核后对胞内外冰晶的影响,且置核温度较单一,未充分研究成核温度对胞内外冰晶的影响及细胞存活率的影响。L. Lauterboeck 等^[24]研究了在不同温度诱导成核对间充质干细胞(MSC)的影响,分别在 -4 、 -10 、 -14°C 手动置核,结果显示 5% (v/v) DMSO 的自发成核温度为 $-19 \pm 3^{\circ}\text{C}$,发现只有 -14°C 组出现胞内冰, -4°C 虽未出现胞内冰,但胞外冰尺寸较大,复温后细胞膜破裂,相对于对照组(自发成核),只有 -10°C 的再培养率是上升的,上升了 70% 。

由此可知,低温保存过程中的成核温度需适当控制,在较高温度诱导成核虽然避免了胞内冰损伤,但胞外冰晶尺寸过大,细胞严重脱水,细胞功能完整性及存活率会降低,在较低的温度诱导成核,有出现胞内冰的危险。因此,存在一个最佳成核温度使得细胞保存质量最高。

2.2 物理场控制成核

手动置核原理简单,但不便于同时操作多个样本,物理场可弥补该弊端,物理场通过干扰水分子运动或影响水分子内能等改变成核温度,表 1 总结了细胞低温保存过程中用于控制冰晶成核的物理场、原理

猜想和缺点。

目前物理场在细胞低温保存领域运用最成功的例子是日本的 cell alive system(CAS),CAS 结合了程序化的冷冻机和振荡的磁场,在冷冻过程中磁场能提升水分子的自由度,阻止水分子的聚集,且水分子内能降低,水更加稳定,进而抑制冰晶成核。S. Y. Lee 等^[30]使用 CAS 冷冻保存牙周干细胞,发现其存活率

可达 73%。Lin Peiyi 等^[8]分别使用普通慢速冷冻法和 CAS 机(震荡频率为 60 Hz,震荡强度为 0.1 mT)对人胚胎干细胞进行保存,保护剂为 5% (v/v) DM-SO,后者复温后的存活率提升了 22%。虽然物理场能够影响成核,但物理场如静电场、微波可能对细胞产生不利影响,所以物理场在生物材料低温保存领域应用较少。

表 1 低温保存过程中控制冰晶成核的物理场
Tab.1 The physics of controlling ice nucleation during cryopreservation

方法	效果	机理	缺点
超声波 ^[25-26]	诱导	超声波空化产生气泡,气泡破裂时引发成核	易引发二次成核,形成碎小冰晶
微波 ^[27]	抑制	水分子在微波场中产生力矩,抑制了水分子簇的形成	微波对细胞具有杀伤性
静电场 ^[13, 28-29]	诱导	静电场降低了成核势垒 ΔG^* , 允许水以较低程度的过冷度成核	电场强度较高时,可能击穿细胞
磁场 ^[8, 30]	抑制	震荡磁场可提升水分子的自由度,水分子内能降低,水更加稳定	效果不稳定

3 化学方法控制冰晶成核

3.1 化学方法诱导成核

有些化合物的结构或表面性质易使溶液形成晶核,称之为冰成核剂(icenucleatingagent: INA),作用机理是其表面可与水分子交互作用,使得水分子有序排列,且随着 INA 表面“有序”水分子数量的增加,成核发生的可能性越接近平衡冰点,过冷度也越小^[31]。应用在低温保存领域的 INA 有结晶胆固醇(Cholesterol crystals; CholC)和胶囊化的碘化银等。碘化银已被成功地用于诱导牛和兔胚胎的接种^[9]。结晶胆固醇是一种有机结晶物, G. C. Sosso 等^[32]认为 CholC 位于无机(如矿物晶体)和生物(如灭火细菌)冰成核剂之间,因为 CholC 既具有前者的有序的表面,又具有后者的柔韧性,通过实验及分子模拟发现 CholC 比许多无机成核剂更有效,胆固醇表面的柔韧性及其低密度的亲水性官能团与水分子形成分子笼,有助于六角冰(1h)和立方冰(1c)的成核,猜测 CholC 具有显著冰成核活性的原因如下: 1) 柔性亲水表面有助于形成非常规结构的冰结合面; 2) 通过晶体表面的多样化形貌提供了不同的成核位点。I. Massie 等^[31]研究了将 CholC 加入保护剂后的影响。在 12% (v/v) DM-SO 保护的海藻酸盐包裹的肝球体中,一组实验组加入 1 mg/ml CholC,结果显示未添加 CholC 组的 T_i 为 $-22.1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta T = 17.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, 而添加组 T_i 为 $-8.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.46\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 复温后 48 h 检测到的添加组细胞活力及膜活力约均为未添加组的 2 倍。由此可知,添加 INA 后胞外溶液的成核温度提高,过冷

度也相应减小,胞外溶液在 INA 作用下成核,胞内无 INA 且过冷度较小并不会产生胞内冰,随着胞外晶核生长,胞内缓慢脱水,减少胞内冰的生成几率。

纳米微粒加入低温保护剂中时,溶液异相成核,纳米微粒有着成核基体的作用,影响溶液的过冷度。Han X. 等^[33]研究发现在多元醇低温保护剂中加入纳米微粒后,异相成核,成核温度点升高,过冷度降低,加速冰晶的形成。唐临利等^[34]利用 DSC 测量乙二醇、丙三醇水溶液中加入不同质量分数、不同粒径的 HA 纳米微粒后的过冷度,结果显示 HA 纳米微粒加入后,线性多元醇水溶液过冷度显著降低,且过冷度随着纳米微粒粒径的增大而减小。高志新等^[35]还发现当纳米微粒质量浓度越高,保护剂溶液过冷度的减小越显著。当纳米粒子加入溶液中时,外来颗粒的加入会造成成核自由能势垒的改变,纳米粒子会替代原有的界面成为具有成核基体的存在,突破成核势垒所需要的能量更小,因此促进了晶核生成。但对于细胞而言,较高浓度的纳米微粒具有毒性, Liu Xiaoli 等^[22]通过使用海藻酸钠水凝胶封装细胞解决了该问题,海藻酸钠水凝胶壳将纳米微粒与细胞隔开,降低纳米微粒对细胞造成的损伤。复温时采用 15 A 磁场作用于添加了 0.5% (w/v, 质量浓度) Fe_3O_4 纳米颗粒保护剂,发现其存活率达到了 82.3%。

3.2 化学方法抑制成核

保护剂浓度的改变也会影响成核温度,一般随着浓度的增加,成核温度降低。由图 2 可知,对于大多数低温保护剂,如甘油、二甲基亚砷、蔗糖等,随着溶液浓度增大,溶液均相成核温度降低,冰晶快速生长

的危险区($T_f \sim T_g$)缩短,降低了冰晶尺寸。T. Gonda 等^[12]还发现随糖类浓度的增加,单糖(葡萄糖、果糖)的成核抑制效果逐渐大于二糖(蔗糖、麦芽糖、海藻糖)。目前运用较多的糖类保护剂是海藻糖,海藻糖无毒,其保护机制具有争议,主要有水替代假说及玻璃化假说^[36],已被成功应用于间充质干细胞^[21]、胚胎干细胞^[23]和人类诱导的多能干细胞^[37]等的低温保存。

人工合成的抑制冰晶成核生长的试剂有氧化石墨烯、聚乙烯醇(PVA)等。Weng Lindong 等^[38]研究了不同分子量的 PVA 的 T_f ,结果发现分子量越小,对于冰晶的抑制效果越好。R. C. Deller 等^[39]研究了不同浓度的 PVA(分子量为 9 KDa),发现 T_f 并不随浓度的增大而增大,加入 1 mg/mL PVA 的 T_f 最小(约为 $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$)。他们还进一步研究了 PVA 对 BeWo 细胞的影响,发现加入 2 mg/mL PVA 的实验组细胞代谢活性比不加 PVA 的对照组增加 75%^[40],PVA 的生物相容性较好,毒性小,且可以抑制冰晶的成核与生长,是较为优异的低温保护剂。T. Inada 等^[41]观测了几种抗冻蛋白及人工合成的阻冰剂(浓度均为 1 mg/mL)对于冰点的抑制效果,使用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度将溶液从 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降至 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。为了使效果观测更明显,溶液中还加入了碘化银(AgI)诱导冰晶成核,使得阻冰剂的抑制效果更易被观测到。每份样品加入的 AgI 数量为: $2 \leq \text{N}_{\text{AgI}} \leq 8$ 。观测结果如表 2 所示。

表 2 阻冰剂抑制成核效果 Tab.2 The effect of Anti-icing agent inhibits nucleation			
溶液	$T_n/^{\circ}\text{C}$	$T_f/^{\circ}\text{C}$	$\Delta T/^{\circ}\text{C}$
纯水	-6.6	-14.8	8.2
AFP I	-19.4	-27.5	8.1
AFP III	-11.4	-26.8	15.4
PVA(13~23 KDa)	-11.6	-30.6	19.0
PVP(10 KDa)	-11.8	-27.5	15.7
PEG(10 KDa)	-8.6	-23.8	15.2

注:AFP I:I 型抗冻蛋白;AFP III:III 型抗冻蛋白;PVA:聚乙烯醇;PVP:聚乙烯吡咯烷酮;PEG:聚乙二醇。

结果显示,加入阻冰剂后, T_f 被抑制,以 PVA 的抑制效果最为明显,达到了 $-30.6\text{ }^{\circ}\text{C}$,PVA 易形成玻璃态,加入到保护剂中可提升玻璃化转变温度 T_g ^[11]。因此,降温过程中的危险区被缩小,但过冷度也相应增大,冰晶成核后生长速率相应加快,此时需降温速率的配合,在冰晶未增大至损伤细胞尺寸时使细胞进

入玻璃化状态,危险区越短,所需的降温速率越小。若能及时进入玻璃化状态,细胞存活率提升,否则,细胞存活率下降。

4 生物方法控制成核

4.1 生物方法诱导成核

控制成核的生物方法主要有生物诱导成核剂,大多是冰核活性细菌,其成核关键在于冰核活性细菌分泌的一种蛋白质(Ice-nucleating proteins:INPs),可在高达 $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度下诱导冰晶成核^[42],如灭活的丁香假单胞菌(商品名:SNOMAX),成核关键是 inaZ 蛋白,不仅能够将水排列成规则结构,还能有效去除由于相变引起的潜热,满足了促进成核的两大条件^[43]。H. Desnos 等^[44]检测了 SNOMAX 浓度对纯水成核温度的影响,如表 3 所示。

表 3 SNOMAX 浓度对成核温度的影响 Tab.3 Effect of SNOMAX concentration on nucleation temperature		
组别	浓度/(mg/L)	$T_n/^{\circ}\text{C}$
1	>1	-2.0~-4.0
2	10^{-1}	-5.0~-6.0
3	$10^{-3} \sim 10^{-1}$	-7.0~-8.7
4	$<10^{-4}$	-17~-24

降温速率均为 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,每个样本体积均为 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。结果显示成核温度基本是随着浓度的增加而升高,且 1 组基本是在水平线 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上下浮动,4 组在水平线 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上下浮动,2 组和 3 组浮动较大。还有学者研究了 SNOMAX 诱导成核对细胞低温保存的影响,G. Missous 等^[45]在 0.9% (w/v) NaCl 中添加 SNOMAX 保存白地霉菌细胞,发现 SNOMAX 的浓度大于 $108\text{ fg}/\text{mL}$ 时,冰晶成核温度随浓度的增大逐渐提升。加入 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SNOMAX,成核温度为 $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$,其存活率相对于未添加 SNOMAX 增大了约 20%,达到了 $79\% \pm 6\%$ 。但来源于细菌的置核剂有污染细胞的可能,使用需谨慎。M. Teixeira 等^[46]通过实验检测到 SNOMAX 没有改变冷冻培养基的物理化学性质,也没有影响新鲜胚胎的胚胎发育,可用于小鼠胚胎的冷冻保存。

使用生物方法诱导成核,可弥补手动置核的缺陷,同时对多个样本进行置核。但灭活的真菌和细菌除 INPs 外,还有其他物质,如真菌和细菌细胞膜破裂,胞内其他物质露出,可能影响置核准确性,甚至可

能污染被保存的细胞。

4.2 生物方法抑制成核

天然抗冻蛋白 (antifreeze proteins: AFPs) 发现于极寒地区的鱼或昆虫,能够抑制晶核的产生及生长。AFPs 具有吸附和抑制功能,其冰结合面和非冰结合面的协同作用抑制晶核的产生与生长^[47]。K. Nishijima 等^[48]研究了抗冻蛋白 (AFP) III 补充对兔精子细胞和胚胎冷冻保存的影响,发现相对于未添加 AFP III 的对照组,添加 500 $\mu\text{g/mL}$ AFP III 实验组的胚胎成活率提升了 12.5%,而添加 100 $\mu\text{g/mL}$ AFP III 组胚胎成活率降低了 7.5%,添加 1 000 $\mu\text{g/mL}$ AFP III 组胚胎成活率降低了 25.8%。结合表 2 可知,即使加入 1 000 $\mu\text{g/mL}$ AFP III 后溶液成核温度被明显抑制,但其存活率却降低,因此,抑制成核并不一定有利于细胞存活率。由此可知,细胞存活率是与抗冻蛋白的浓度相关的,浓度不同导致成核温度不同,覆盖冰面的范围不同,进而细胞存活率不同。存活率降低可能的原因有:1) 抗冻蛋白具有动态冰晶形态效应 (DIS),AFPs 结合到冰面,抑制冰晶生长,AFP 浓度较低时,会有冰面无 AFPs 结合,此处冰晶生长,形成针状的形态,从而造成机械损伤;2) AFP 属于非渗透性保护剂,浓度较高时,抑制了胞外溶液冰晶的成核生长。胞内自由水充足,温度降低,胞内溶液在一定过冷度下,产生胞内冰;3) AFP 浓度较高时,溶液成核温度较低,过冷度增大(表 2 可知),胞外冰晶成核后生长速率较快,且呈树枝状,棱角锋利,可能损伤到细胞膜。

5 总结与展望

综上所述,物理方法诱导成核不便于同时操作多个样本,使用置核剂诱导成核可弥补该缺陷(可将生物诱导成核剂与化学冰成核剂统称为置核剂),但成核温度不精准,可能原因有置核剂提供的成核位点不同及置核剂的微观表面结构不同。因此,提高置核法成核温度的精准度,可从改变置核剂表面界氢键官能团的性质(调整成核位点),以及调整置核剂的微观结构着手。因物理场同样会对细胞产生影响,如电场电压过高会将细胞击穿,因此物理方法控制成核在细胞低温保存领域应用较少。可将生物与化学方法中阻止冰晶成核生长的试剂称为阻冰剂,阻冰剂不仅能够较好的抑制成核,还可抑制冰晶生长,是较为优异的控制冰晶成核方式。

细胞低温保存过程中存在一最佳成核温度,在该温度下,胞外冰产生且引导细胞适当脱水,减少胞内自由水,降低胞内冰的产生几率。若高于此温度成

核,虽然避免了胞内冰损伤,但胞外冰晶生长时间增加,胞内细胞器等的结合水可能被剥夺,细胞功能完整性及存活率降低;若低于最佳成核温度成核,存在如下潜在的威胁:1) 过冷度大,冰晶形态呈树枝状,有刺破细胞膜、损伤细胞器的可能;2) 控制成核的方法大多是对胞外溶液进行影响,如 PVA、AFP 的使用,但并不会抑制胞内溶液成核,随着温度降低,可能胞外未成核,但胞内溶液过冷度达到成核条件,再加上胞内自由水充足,胞内冰产生,损伤细胞;3) 过冷度较大,产生的晶核较多,是复温过程中的潜在威胁。

对于不同的细胞,不同的保护剂溶液,最佳成核温度不同,可针对最佳成核温度进一步研究。细胞低温保存过程中,可将置核剂与阻冰剂同时使用,使用置核剂将细胞悬浮液诱导至最佳温度成核,减小冰晶成核率,使用阻冰剂可抑制冰晶在第一及第二危险区的成核及生长,猜测两者同时使用能更好的降低胞内冰晶尺寸,极大地提高细胞存活率,具体效果还有待深入研究。

本文受国家人类遗传资源共享服务平台 (2005DKA21300) 和上海市扬帆计划 (18YF1416200) 资助。(This project was supported by National Human Genetic Resources Sharing Service Platform (No. 2005DKA21300) and the Shanghai Sailing Program (No. 18YF1416200).)

参考文献

- [1] TESSIER S N, WENG L, MOYO W D, et al. Effect of ice nucleation and cryoprotectants during high subzero-preservation in endothelialized microchannels[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018, 4(8):3006–3015.
- [2] HE Zhigang, HUA Jie, SONG Zhenshun. Concise review: mesenchymal stem cells ameliorate tissue injury via secretion of tumor necrosis factor- α stimulated protein/gene 6 [J]. *Stem cells International*, 2014:1–8.
- [3] LUYET B J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm[J]. *Biodynamica*, 1937, 29:1–14.
- [4] 华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京:科学出版社, 1994. (HUA Zezhao, REN Hesheng. *Technology of cryobiology and medical* [M]. Beijing: Science Press, 1994.)
- [5] PETERSEN A, SCHNEIDER H, RAU G, et al. A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature[J]. *Cryobiology*, 2006, 53(2):248–257.
- [6] 梁玮,王美霞,刘宝林. 低温保存对生物样本及其生物大分子的影响[J]. *中国生物医学工程学报*, 2017, 36(5):615–621. (LIANG Wei, WANG Meixia, LIU Baolin.

- The effect of cryopreservation on biospecimens and biomacromolecules[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2017, 36(5):615–621.)
- [7] WARE C B, NELSON A M, ANTHONYB C. Controlled-rate freezing of human ES cells[J]. Biotechniques, 2005, 38(6):879–880.
- [8] LIN Peiyi, YANG Yaochen, HUNG S H, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells by a programmed freezer with an oscillating magnetic field[J]. Cryobiology, 2013, 66(3):256–260.
- [9] KOJIMA T, SOMA T, OGURI N. Effect of ice nucleation by droplet of immobilized silver iodide on freezing of rabbit and bovine embryos[J]. Theriogenology, 1988, 30(6):1199–1207.
- [10] MORRIS G J, ACTON E. Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review[J]. Cryobiology, 2013, 66(2):85–92.
- [11] WANG Haiyan, LU Shushen, LUN Zhaorong. Glass transition behavior of the vitrification solutions containing propenediol, dimethyl sulfoxide and polyvinyl alcohol[J]. Cryobiology, 2009, 58(1):115–117.
- [12] GONDA T, SEI T. The inhibitory growth mechanism of saccharides on the growth of ice crystals from aqueous solutions[J]. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 2005, 51(1/3):70–80.
- [13] SALT R W. Effect of electrostatic field on freezing of super-cooled water and insects[J]. Science, 1961, 133(3451):458–459.
- [14] ZACHARIASSEN K E, KRISTIANSEN E, PEDERSEN S A, et al. Ice nucleation in solutions and freeze-avoiding insects-homogeneous or heterogeneous[J]. Cryobiology, 2004, 48(3):309–321.
- [15] WOLFE J, BRYANT G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects[J]. International Journal of Refrigeration, 2001, 24(5):438–450.
- [16] 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. (LIU Wei, GUO Mingwei, GUO Zhiyu. et al. Review of the mechanism of intracellular ice formation[J]. Journal of Refrigeration, 2018, 39(3):126–134.)
- [17] 刘宝林, JOHN M, 华泽钊. 低温保存过程中老鼠成骨细胞胞内冰的研究[J]. 制冷学报, 2007, 28(1):22–5. (LIU Baolin, JOHN M, HUA Zezhao. Intracellular ice formation of mouse osteoblasts during cryopreservation[J]. Journal of Refrigeration, 2007, 28(1):22–25.)
- [18] BAYER-GIRALDI M, SAZAKI G, NAGASHIMA K, et al. Growth suppression of ice crystal basal face in the presence of a moderate ice-binding protein does not confer hyperactivity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(29):7479–7484.
- [19] RUSSO KRAUSS I, MERLINO A, VERGARA A, et al. An overview of biological macromolecule crystallization[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(6):11643–11691.
- [20] VORONTSOV D A, SAZAKI G, HYON S H, et al. Anti-freeze effect of carboxylated epsilon-poly-L-lysine on the growth kinetics of ice crystals[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(34):10240–10249.
- [21] HUANG Haishui, ZHAO Gang, ZHANG Yuntian, et al. Predehydration and ice seeding in the presence of trehalose enable cell cryopreservation[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2017, 3(8):1758–1768.
- [22] LIU Xiaoli, ZHAO Gang, CHEN Zhongrong, et al. Dual suppression effect of magnetic induction heating and microencapsulation on ice crystallization enables low-cryoprotectant vitrification of stem cell-alginate hydrogel constructs[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(19):16822–16835.
- [23] HUANG H, CHOI J K, RAO W, et al. Alginate hydrogel microencapsulation inhibits devitrification and enables large-volume low-cpa cell vitrification[J]. Advanced Functional Materials, 2016, 25(44):6939–6850.
- [24] LAUTERBOECK L, HOFMANN N, MUELLER T, et al. Active control of the nucleation temperature enhances freezing survival of multipotent mesenchymal stromal cells[J]. Cryobiology, 2015, 71(3):384–390.
- [25] KIANI H, ZHANG Z, SUN D. Effect of ultrasound irradiation on ice crystal size distribution in frozen agar gel samples[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 18:126–131.
- [26] RAHMAN S M, STRUSSMANN C A, SUZUKI T, et al. Effects of ultrasound on permeation of cryoprotectants into Japanese whiting *Sillago japonica* embryos[J]. Cryobiology, 2017, 77:19–24.
- [27] HANYU Y, ICHIKAWA M, MATSUMOTO G. An improved cryofixation method: cryoquenching of small tissue blocks during microwave irradiation[J]. Journal of Microscopy, 1992, 165(2):255–271.
- [28] 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.
- [29] MA Yahong, ZHONG Lisheng, ZHANG Hong, et al. Effect of applied electric field on the formation and structure of ice in biomaterials during freezing[C]//2010 10th IEEE International Conference on Solid Dielectrics. Potsdam: IEEE, 2010.
- [30] LEE S Y, CHIANG P C, TSAI Y H, et al. Effects of cryo-

- preservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells[J]. *Journal of endodontics*, 2010, 36(8):1336–1340.
- [31] MASSIE I, SELDEN C, HODGSON H, et al. Cryopreservation of encapsulated liver spheroids for a bioartificial liver: reducing latent cryoinjury using an ice nucleating agent[J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2011, 17(7):765–774.
- [32] SOSSO G C, WHALE T F, HOLDEN M A, et al. Unraveling the origins of ice nucleation on organic crystals[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(42):8077–8088.
- [33] HAN X, MA H B, WILSON C, et al. Effects of nanoparticles on the nucleation and devitrification temperatures of polyol cryoprotectant solutions[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2007, 4(4):357–361.
- [34] 唐临利, 许海峰, 郝保同, 等. 纳米微粒对多元醇水溶液过冷度和水合性质的影响[J]. *低温与超导*, 2012, 40(8):60–63. (TANG Linli, XU Haifeng, HAO Baotong, et al. Effect of nanoparticles on supercooling and hydration properties of polyalcohols solutions[J]. *Cryogenics and Superconductivity*, 2012, 40(8):60–63.)
- [35] 高志新, 郝保同, 刘宝林, 等. 纳米微粒对乙二醇溶液过冷度的影响[J]. *低温工程*, 2010(3):52–55. (GAO Zhixin, HAO Baotong, LIU Baolin, et al. Effects of HA nanoparticles on subcooling of EG solutions[J]. *Cryogenics*, 2010(3):52–55.)
- [36] CROWE J H. Trehalose as a “chemical chaperone”: Fact and fantasy[J]. *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*, 2007:143–158.
- [37] NTAIA, LA SPADA A, DE BLASIO P, et al. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Research*, 2018, 31:102–112.
- [38] WENG Lindong, SWEI A, TONER M. Role of synthetic antifreeze agents in catalyzing ice nucleation[J]. *Cryobiology*, 2018, 84:91–94.
- [39] DELLER R C, VATISH M, MITCHELL D A, et al. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing[J]. *Nature Communications*, 2014, 5:3244.
- [40] DELLER R C, PESSIN J E, VATISH M, et al. Enhanced non-vitreous cryopreservation of immortalized and primary cells by ice-growth inhibiting polymers[J]. *Biomaterials Science*, 2016, 4(7):1079–1084.
- [41] INADA T, KOYAMA T, GOTO F, et al. Inactivation of ice nucleating activity of silver iodide by antifreeze proteins and synthetic polymers[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(18):5364–5371.
- [42] FAILOR K C, SCHMALE D G, VINATZER B A, et al. Ice nucleation active bacteria in precipitation are genetically diverse and nucleate ice by employing different mechanisms[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(12):2740–2753.
- [43] PANDEY R, USUI K, LIVINGSTONE R A, et al. Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water[J]. *Science Advances*, 2016, 2(4):e1501630.
- [44] DESNOS H, BAUDOT A, TEIXEIRA M, et al. Ice induction in DSC experiments with Snomax®[J]. *Thermochimica Acta*, 2018, 667:193–206.
- [45] MISSOUS G, THAMMAVONGS B, DIEULEVEUX V, et al. Improvement of the cryopreservation of the fungal starter *Geotrichum candidum* by artificial nucleation and temperature downshift control[J]. *Cryobiology*, 2007, 55(1):66–71.
- [46] TEIXEIRA M, BUFF S, DESNOS H, et al. Ice nucleating agents allow embryo freezing without manual seeding[J]. *Theriogenology*, 2017, 104:173–178.
- [47] LIU Kai, WANG Chunlei, MA Ji, et al. Janus effect of antifreeze proteins on ice nucleation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(51):14739–14744.
- [48] NISHIJIMA K, TANAKA M, SAKAI Y, et al. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit[J]. *Cryobiology*, 2014, 69(1):22–25.

通信作者简介

梁玮,女,博士,助理研究员,上海交通大学医学院附属新华医院,环境与儿童健康教育部和上海市重点实验室,15026813501,E-mail: liangwei@xinhumed.com.cn。研究方向:生物样本的低温保存与生物样本库的信息化管理。

About the corresponding author

Liang Wei, female, Ph. D., assistant researcher, Ministry of Education and Shanghai Key Laboratory of Children's Environmental Health, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, +86 15026813501, E-mail: liangwei@xinhumed.com.cn. Research fields: the cryopreservation of biological samples and the information management of biological sample banks.