刘琴,朱以良,陈芳,等. 脂肪干细胞低温保存方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(2): 165-174.

Liu Q, Zhu YL, Chen F, et al. Progress in cryopreservation protocols for adipose-derived stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(2): 165-174.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.02.018

脂肪干细胞低温保存方法研究进展

刘琴,朱以良,陈芳,喻晶,杨丽君,张宜*

(中部战区总医院医疗保障中心实验动物室,武汉 430070)

【摘要】 脂肪干细胞因其独特的优势,是组织工程研究的热点种子细胞之一。寻找理想的脂肪干细胞低温保存方法是研究者们一直努力的目标。迄今为止,关于脂肪干细胞低温保存方法的研究已比较多。本文综述了基础低温生物学和脂肪干细胞低温保存的方法,并对其未来研究方向进行了展望。

【关键词】 组织工程;脂肪干细胞;细胞冻存;低温保护剂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 02-0165-10

Progress in cryopreservation protocols for adipose-derived stem cells

LIU Qin, ZHU Yiliang, CHEN Fang, YU Jing, YANG Lijun, ZHANG Yi*

(Laboratory Animal Office of Medical Security Center, Central Theater Command General Hospital, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Adipose-derived stem cells (ASCs) have become important seed cells in tissue engineering, because of their unique advantages. Extensive research has been conducted to determine the ideal method of cryopreservation for ASCs. In this review, we summarize the basic cryobiology and cryopreservation protocols for ASCs, and look forward to future research into cryopreservation protocols for ASCs.

【Keywords】 tissue engineering; adipose-derived stem cells; cell cryopreservation; cryoprotective agent

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脂肪干细胞 (adipose-derived stem cells, ASCs), 来源于脂肪组织、取材方便、对自体损伤较小,具有自我更新能力强、多向分化潜能突出、排斥反应概率低、自体移植不发生反应等众多优势,在组织工程领域显示出广阔的应用前景和发展未来,是组织工程研究的热点种子细胞之一^[1]。高效的细胞低温保存是有效保障 ASCs 作为组织工程的一种热点种子细胞关键点之一。目前,关于 ASCs 低温保存方法的研究已比较多,

但是缺乏系统的归纳和总结。本文较系统地综述了基础低温生物学和 ASCs 现有的低温保存方法,并对其未来研究方向进行了展望。

1 基础低温生物学

1.1 低温保存原理

低温保存是细胞保存最常见的方法之一,其机制为细胞的新陈代谢在低温时急速减慢。保存时间的长短与所采取的冻存温度有关,理论上

【作者简介】刘琴(1986—),女,硕士,主管技师,研究方向:细胞生物学和实验动物学。E-mail:liuqin_0629@163.com

【通信作者】张宜(1965—),男,硕士,主任药师,研究方向:药学信息。E-mail:abcd1566@sina.com

是保存时间随着冻存温度的降低而延长。

低温保存方法按照冻存液在冻结后是否形成冰晶来划分,可分为非玻璃化冻存法和玻璃化冻存法^[2]。非玻璃化冻存,又称慢速冷冻,目的是细胞面临胞内冰晶形成和渗透脱水的情况下仍能维持复杂的细胞微观结构,以此法保存的细胞或多或少都有冰晶的形成^[3]。玻璃化冷冻,又称快速冷冻,它的原理是将样本放在低温保护剂(cryoprotective agent, CPA)体系中,对细胞进行适度的脱水,经急速降温,把细胞内部变成非晶体的玻璃化固态^[3]。以该方法冻结的细胞悬液没有冰晶的形成。

低温保存一般包括 CPA 添加、降温冷冻、深低温存储、复温融解和 CPA 去除 5 个步骤^[4]。操作过程中的任何一个步骤或者几个步骤的综合作用都会对细胞造成一定的损伤,特别是细胞从常温到储存温度的来回变化,细胞内外的溶液很容易发生相变,使得细胞外溶液的渗透压增大,导致细胞死亡^[5]。

1.2 CPA 的种类

细胞在不添加任何 CPA 的情况下直接冻存时,细胞内外的水分会很快形成冰晶,从而引起一系列不良反应,如细胞内结构成分的破坏、细胞能量代谢障碍、细胞内容物丧失等^[6]。因此,低温保存的关键之一是添加恰当的、适量的 CPA。凡是添加到细胞悬浮液中,可以提高复苏后细胞的活性和功能的物质均可被称为 CPA。CPA 主要有两类:一类是渗透性 CPA,如二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、丙三醇、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、丙二醇(propylene glycol, PG)、甲醇、乙醇、丙醇、甲酰胺等。其特性主要是具有较高的水溶性,能轻易地穿过细胞膜,以及细胞毒性小,结冰时,CPA 通常能通过与水分子形成氢键,从而对水形成一种束缚力,降低了水的冰点,抑制冰晶的形成,且随着 CPA 浓度的增加,结合未冻结水的能力越强,从而抑制了水分子的运动^[2]。另一类为非渗透性 CPA,主要包括果糖、葡萄糖、麦芽糖等低分子量的单糖;蔗糖、海藻糖等双糖;棉子等多糖类;聚蔗糖、右旋糖酐、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、聚合物羟乙基淀粉等分子量大于 1000 Da 的高分子化合物^[2]。此类 CPA 诱发玻璃化的机

理与渗透性 CPA 相似,但发生在细胞外,程度较小^[2]。

2 ASCs 的低温保存方法

评价一个低温保存方法是否适用于 ASCs 的指标有很多,细胞活力是主要的参考指标之一,>70%通常被认为是普遍接受的解冻后细胞活力阈值,也是临床应用的基准^[7]。达到细胞活力要求后继续分析低温保存后 ASCs 细胞形态、克隆形成能力、细胞表型、多向分化能力等生物学特性的变化。

2.1 非渗透性 CPA

2.1.1 甲基纤维素

甲基纤维素(methylcellulose, MC)是一种高分子量聚合物,有利于促进溶液玻璃化、稳定蛋白质和细胞膜、抑制冰晶生长^[8]。作为 CPA 时常使用的浓度为 1%,低温保存人 ASCs 效果不是很理想,细胞活力仅有 46%,在冻存液中加入 10% 人自体血清/10% 胎小牛血清,反而会降低细胞活力^[9]。RAY 等^[10]将冻存液常规采用的配制体系 DMEM 培养基换为磷酸盐缓冲液,用含 1% MC 的磷酸盐缓冲液低温保存人 ASCs,细胞活力并未得到明显提高。

2.1.2 PVP

PVP 是一种非离子型高分子化合物,其单独作为 CPA 低温保存 ASCs 的效果仍不理想^[9]。研究者用含 10% PVP、10% 人自体血清/40% 胎小牛血清/80% 胎小牛血清的 DMEM 溶液体系低温保存人脂肪组织中的血管基质成分、ASCs 第一代,并与含 10% DMSO、80% 人自体血清/胎小牛血清的 DMEM 溶液体系比较,发现 PVP、对照组低温保存后细胞活力分别为 70%、80% 左右,PVP 的低温保存能力低于 DMSO;PVP 低温保存效果与细胞代数有关,人 ASCs 第一代的低温保存效果优于血管基质成分;血清种类、浓度对于提升 PVP 的低温保存效果作用不大^[9]。然而,RAY 等^[10]认为在含 PVP 的冻存液中不添加血清可得到理想的低温保存效果,方法是改冻存液常规采用的配制体系 DMEM 培养基为氯化钠溶液。他们用含 10% PVP 的磷酸盐缓冲液于 -80 °C 低温保存人 ASCs 48 h,复苏后其细胞活力为 55%,明显高于对照组(含 10% DMSO 的磷酸盐缓冲液)。

磷酸盐缓冲液的主要成分为氯化钠、磷酸氢二钠、氯化钾和磷酸二氢钾,人 ASCs 在含 10% PVP 的氯化钠溶液体系中的活力为 70%,明显高于含 10% PVP 的磷酸氢二钠/氯化钾/磷酸二氢钾溶液,说明磷酸盐缓冲液中起主要作用的成分为氯化钠。进一步分析发现在 10% PVP 的氯化钠溶液中添加 60 mmol 依克多因后,细胞活力可达到 81%,细胞仍保持着成脂、成骨分化能力。

2.1.3 蔗糖

蔗糖可以增加跨膜的渗透压梯度使细胞处于高渗透压环境中,细胞脱水,稳定细胞膜,从而发挥其低温保护作用。ROGULSKA 等^[11]取 0、100、200、300 mmol 蔗糖预处理经 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)/10% 人血小板裂解液培养的人 ASCs 24 h,接着用含 100、200、300 mmol 蔗糖的冻存液保存,复苏后发现用蔗糖预处理人 ASCs 后再冻存可以明显提高蔗糖的低温保存效果,100 mmol 蔗糖预处理与含 200 mmol 蔗糖冻存液的保存效果最好,300 mmol 蔗糖预处理人 ASCs 后其细胞形态可能因为渗透压太高而发生改变;进一步研究发现复苏后的培养条件影响人 ASCs 的生物学特性,用含 10% 人血小板裂解液的生长液培养冻存后的人 ASCs 所得的细胞数目多于 10% FBS,且群体倍增时间缩短,增殖能力和成骨能力更强。

2.1.4 海藻糖

海藻糖是一种非还原糖,广泛存在于机体中,能够抵御极端缺水和寒冷的条件,其主要有两种功能:一是在细胞脱水时扮演水的作用,形成氢键从而促进生物大分子优先水化,如在低温保存时出现冷冻浓缩现象时;二是在脱水状态时形成具有极低分子迁移能力的玻璃基质,从而暂停任何降解和代谢活动^[12]。大部分哺乳动物细胞缺乏体内合成海藻糖的机制^[13]。单独用海藻糖低温保存 ASCs 的效果非常不理想。保存人/马 ASCs 的细胞存活率均仅为 10% 左右,与含 10% DMSO 冻存液 (不加任何血清) 达 80% 的细胞存活率形成鲜明对比^[14-15],可能的原因是海藻糖不具有膜穿透性,从而难以达到防止冰晶形成的目的。

为提高海藻糖低温保存能力,近几年,研究者们发展了多种可以将海藻糖递送至细胞内的

策略^[16-22],分子仿生低温保存方法是其中的一种。ZHANG 等^[22]合成了一种具有低度响应性的聚合物:聚 N-异丙基丙烯酰胺-丙烯酸正丁酯,其可以用于海藻糖的纳米封装、递送和细胞内可控释放,将海藻糖引入细胞内部,实现自然界中该糖在膜两侧的同时存在。这种仿生低温保存技术可以大幅度降低,甚至是完全消除低温保存对渗透性 CPA 的需求,极大地推动其作为一种无毒的 CPA 用于细胞和组织的低温保存。该团队进一步将这种技术用于人 ASCs 的低温保存,与常规 DMSO 冻存液相比,保存效率更高,还值得关注的是无需海藻糖之外的任何其他 CPA^[22]。

2.2 渗透性 CPA

DMSO 是最常用的渗透性 CPA,由 10% DMSO、90% FBS 组成的冻存液被认为是标准的冻存液配方^[23]。ASCs 用 DMSO 冻存后,其存活率降低,但研究者们对于其它生物学特性的变化持有不同的观点。王静等^[24]认为 DMSO 冻存不影响大鼠 ASCs 表面抗原的表达和增殖能力,但冻存后细胞凋亡率明显升高、成骨能力降低。SHAH 等^[25]也认为 DMSO 冻存液会明显降低人 ASCs 成脂成骨的分化能力。然而,YONG 等^[14]发现 DMSO 冻存液低温保存人 ASCs 前后的细胞表型、增殖能力、多向分化能力相似,有趣的是冻存后人 ASCs 相关干性基因如多能性相关八聚体结合转录因子 4、性别决定区 Y 框蛋白 2、胚胎干细胞关键蛋白的表达量却明显提高。DURANDT 等^[26]同样持低温保存不影响人 ASCs 成脂分化能力的观点。

DMSO 的毒性在室温条件下很低,但在 37 °C 条件下其毒性增加。细胞复苏后安全去除 DMSO,最大限度地降低它对 ASCs 的渗透性损伤和毒性损伤,是目前 CPA 处理面临的一大挑战。已有研究证实若用于治疗的人 ASCs 含有未完全清除的 DMSO 则会引起血管内容血和血清转氨酶的升高^[27],DMSO 还可诱导 20 几种人干细胞系进行分化^[28],因此,在进行治疗前需要仔细清除掉残余的 DMSO。

2.2.1 血清

血清具有稳定细胞膜和调节细胞渗透压的作用^[29],血清的浓度、种类影响着低温保存的效果。DI BELLA 等^[30]研究发现用含 10% DMSO 冻

存液保存犬 ASCs 时,冻存液中 FBS 含量低于 50%会影响细胞形态,FBS 添加量为 40%、50%~70%、80%~90% 3 种情况下细胞活力分别约为 60%、80%、98%,FBS 含量为 80%时,细胞成骨、成脂分化能力和多能性相关八聚体结合转录因子 4、性别决定区 Y 框蛋白 2、胚胎干细胞关键蛋白的表达量与新鲜细胞无明显区别,认为用含 10% DMSO、80% FBS 的冻存液可保存犬 ASCs 长达 7 年。

含 DMSO 的冻存液中所用血清主要为动物血清,其次为自体血清或者其他可替代血清的物质,如人自体血清、人血小板裂解液等。有报道用含 10% DMSO、80%胎小牛血清/自体血清的两种冻存液保存人 ASCs,两种冻存液保存的人 ASCs 的细胞活力无明显区别,有相似的成脂、成骨分化能力^[9]。WANG 等^[31]将人 ASCs 第 2 代保存于 10% DMSO+90% FBS、3% DMSO+97%人血小板裂解液 2 种冻存液中,发现人 ASCs 的细胞活力均大于 80%,且增殖能力、细胞表型和分化潜能与新鲜的人 ASCs 相似,认为 3% DMSO、97%人血小板裂解液的组合可作为理想的人 ASCs 冻存液。DUARTE ROJAS 等^[32]用含 10% DMSO、90% FBS/人血小板裂解液血清/人血小板裂解液 3 种冻存液保存人 ASCs,复苏后细胞活力均大于 75%,前两种保存细胞的细胞存活率、增殖能力相似,血小板裂解液保存细胞的增殖能力不太理想,认为人血小板裂解液血清可以作为 FBS 的替代物。从上述文献可以看出对于人血小板裂解液保存对人 ASCs 增殖能力影响的研究结果不一致,可能与脂肪组织供体的健康状态、人血小板裂解液使用浓度等有关。

2.2.2 其他因素

脂肪组织的取材部位、供体年龄、抽脂技术影响人 ASCs 的部分生物学特性。与上肢和腰部来源 ASCs 相比,来自腹部和大腿人 ASCs 低温保存后保持了更加显著的细胞增殖能力、迁移能力和分化能力^[33]。供体年龄越年轻,低温保存后人 ASCs 的增殖能力、迁移能力更强,能更有效地提高其辅助的脂肪移植物在小鼠体内的存活率,但不影响成脂分化能力^[34]。水射流辅助吸脂术比传统吸脂术的机械损伤小,获得的人 ASCs 低温保存后的细胞增殖能力、迁移能力、成脂分化能

力更好,富集 ASCs 的脂肪移植物的成活率更高^[35]。

2.2.3 改进方法

DMSO 低温保存 ASCs 后会影响到其活力,提高低温保存效果的途径有很多。一是在冻存液中加入一定的物质来提高低温保存后 ASCs 的存活率。如在含 DMSO 冻存液中加入硒,硒可以通过促进抗凋亡基因 bcl-2 的表达从而提高低温保存后小鼠 ASCs 的存活率^[36]。在含 DMSO 的冻存液中加入盐酸法舒地尔或谷胱甘肽/Y-27632 可以提高低温保存后猪 ASCs 的细胞活性^[37-38]。在含 DMSO 的冻存液中加入纳米氧化石墨烯,可以提高低温保存后人 ASCs 细胞活力,降低早期凋亡水平,还能通过改善移植脂肪组织的血管生成和降低炎症反应来提高移植脂肪组织的存活率^[39]。二是在低温保存前对人/犬 ASCs 进行热休克处理,可以提高 DMSO 的低温保存效果,且用含 10% DMSO、40%血清的冻存液保存经上述处理的犬 ASCs 即可,大大降低了血清的使用浓度^[40-41]。三是将冻存后的人 ASCs 培养于低氧(2% O₂)条件下,低氧条件可以提高冻存后人 ASCs 的存活率和增殖率^[42]。四是 DMSO 与渗透性 CPA 的联合应用。DMSO 和 PEG 组合的冻存液:含 0.9%氯化钠、5% DMSO、5% PEG、2%人血清白蛋白,保存岩藻糖基化人 ASCs,与含 0.9%氯化钠、10% DMSO、2%人血清白蛋白的冻存液相比,复苏后活细胞的百分比显著升高,显示出更优、更快的细胞附着和扩散,细胞表型标志物 CD73、CD90 和 CD105 表达水平显著更高,抗炎/免疫调节特性的再激活表现更好^[43]。

3 渗透性 CPA 和非渗透性 CPA 的联合应用

单独使用非渗透性 CPA 保存 ASCs 的效果不太理想,为解决此问题,将渗透性 CPA 和非渗透性 CPA 联合应用是可探讨的途径之一。

3.1 戊糖麦芽糖与 DMSO 的组合

戊糖麦芽糖是一种低分子碳水化合物,最近被描述为一种很有前景的 CPA 候选物质。用含 10%戊糖麦芽糖、1%/2% DMSO、4%人自体血清的冻存液保存人 ASCs,与含 10% DMSO、4%人自体血清的冻存液相比,两者细胞活力均为 90%左

右,增殖能力和成脂、成软骨分化能力也相当,虽然随着 DMSO 浓度的降低影响了 ASCs 抑制 T 细胞增殖能力,但从减少 DMSO 用量的角度来说,甚至将 DMSO 浓度由 10% 降至 1%,此种含戊糖麦芽糖的组合冻存液在某种程度上可以作为一种有效且毒性较低的人 ASCs 低温保存方法^[44]。

3.2 海藻糖与渗透性 CPA 的组合

海藻糖与渗透性 CPA 的联合应用可提升低温保存效果。海藻糖与甘油组成的冻存液低温保存人 ASCs,与含 10% DMSO、90% FBS 的冻存液相比,细胞活力无显著变化,细胞的迁移能力提高,并持有理想的多向分化能力^[45]。用含 3% 海藻糖、5% 右旋糖酐 40、10% PG 的乳酸林格氏液低温保存人 ASCs,细胞复苏后保持较好的细胞活力、膜联蛋白 V 阳性率、集落形成能力、细胞增殖能力、细胞表面抗原阳性、成脂成骨能力、对细胞因子刺激的反应等,与含 3% 海藻糖、5% 右旋糖酐 40、10% DMSO 的乳酸林格氏液相比无明显差异^[46]。进一步研究发现将 PG 浓度降低至 2.5%~5% 后,复苏后细胞的增殖能力显著提高^[46]。

单独使用海藻糖低温保存马 ASCs 的细胞存活率仅为 10% 左右,用海藻糖与 DMSO 组成的冻存液低温保存可以将细胞存活率提升到 20% 左右,进一步在海藻糖与 DMSO 的组合上加入人工合成抑冰剂 SuperCool X-1000,细胞存活率达到 42.8%^[15]。研究者认为虽然海藻糖、DMSO、SuperCool X-1000 联合应用低温保存马 ASCs 的细胞存活率与 DMSO 仍然有一定的差距,但是两者克隆形成能力、多向分化潜能并无明显区别,且 Super Cool X-1000 可有望降低此种组合冻存液中 DMSO 的浓度。

4 冻存脂肪组织

大多数文献为直接低温保存细胞,近年来有研究者冻存脂肪组织,从复苏的脂肪组织中分离 ASCs。含 10% DMSO、90% FBS 的冻存液是脂肪组织常规的保存体系,也出现了一些新冻存液体体系。KOÇAK 等^[23]发现脂肪组织在 100% 异丙醇中的冻存效果优于常规冻存液。遗憾的是该研究的低温保存温度为 -80 °C,未对 100% 异丙醇在 -196 °C 条件下低温保存脂肪组织的效果进行探讨。SHAIK 等^[47]认为含 2% DMSO、6% 人血清白

蛋白的冻存液与含 10% DMSO、35% 牛血清白蛋白的冻存液保存人吸脂液的效果无明显区别,两种保存方法分离培养的人 ASCs 的细胞活力、细胞表型标记物(CD90、CD29、CD34、CD146、CD31、CD45)的表达量、成脂成骨分化能力均相当。低温保存温度在一定程度上影响脂肪组织冻存后 ASCs 的活性。ROATO 等^[48]用含 10% DMSO、FBS 的冻存液保存人脂肪组织,-80 °C 冻存 3 d 后转入 -196 °C 液氮,复苏后,-196 °C 条件下组织分离培养的 ASCs 活力优于 -80 °C。

与新鲜吸脂组织来源 ASCs 相比,冻存脂肪组织来源 ASCs 的增殖能力、分化能力降低,浓缩血小板能有效促进冻存脂肪组织来源 ASCs 活性,但是与新鲜脂肪组织仍有一定差距^[49]。

5 商业化冻存液

某些商业化冻存液申请了发明专利,含有未公开的成分,所以单独分为一类。NutriFreez[®] D10 细胞冻存液,一种商业无血清冷冻保存溶液,含有 MC、10% DMSO 和其他未公开的成分。CryoStore[®] CS10 细胞冻存液,一种不含动物成分的冷冻保存介质,含有 10% DMSO 和其他未公开的成分。有研究者分别用这两种细胞冻存液低温保存岩藻糖化人 ASCs,与含 0.9% 氯化钠、10% DMSO、2% 人血清白蛋白的冻存液相比,商业化细胞冻存液冷冻保存的细胞在解冻后活细胞的百分比显著升高,显示出更好、更快的细胞附着和扩散能力,细胞表型标志物 CD73、CD90 和 CD105 表达水平更高^[43]。更重要的是,细胞的免疫调节活性甚至超过了未冻存细胞。

6 声、光、电、磁等技术在低温冻存 ASCs 中的应用

若复温过程过慢,细胞内外出现反玻璃化或再结晶的可能性非常大,从而给细胞带来致命性的损伤。37 °C 水浴复温是常规使用的复温方法,这种方法的复温速率有限,在复温过程中很容易出现冰晶。进一步提高 CPA 的浓度可以抑制冰晶的形成,但同时细胞受到的毒性作用和渗透性损伤也随着增加,且 CPA 的添加和去除过程也更加复杂。优化有效的复温技术是低温保存发展的关键问题之一。近年来研究表明,在不增加

CPA 浓度,甚至是降低 CPA 浓度的前提下,声、光、电、磁等单一或多物理场辅助的复温过程可实现低温保存后的安全复温^[50-52]。其中,磁热辅助复温在 ASCs 低温保存中的研究比较多。

为降低复温时反玻璃化或再结晶出现的概率,CPA 使用的浓度常高达 6~8 mol/L^[53]。LIU 等^[54]将 CPA 的使用浓度降低至 2 mol/L,并结合 Fe₃O₄ 超顺磁性颗粒调控的磁热复温方法应用于猪 ASCs 海藻酸盐水凝胶构建物的复温,实现了猪 ASCs 海藻酸盐水凝胶构建物的玻璃化保存和磁热复温。

7 总结与展望

寻找到合适的 ASCs 低温保存方法一直是研究者们努力追寻的目标。用于 ASCs 的 CPA 主要有非渗透性和渗透性两大类,非渗透性 CPA 的毒

性虽然比渗透性 CPA 低,然而冻存效果仍然比不上渗透性 CPA 的代表 DMSO。DMSO 仍是研究者们采用最为广泛的 ASCs CPA,但如何最大限度地降低它对 ASCs 的毒性损伤和渗透性损伤是一大难题。近年来,涌现出了仿生低温保存方法,添加毒性保护物质,渗透性 CPA 与非透性 CPA 联用,在复温操作过程中融入声、光、电、磁等单一或多物理技术。这些低温保存方法各有优缺点,如表 1 所示。值得注意的是,目前关于 ASCs 低温保存方法的研究也存在一些问题。一是文献中降温速率各有不同。对于特定的细胞类型都自有一个最佳的降温速率,ASCs 的最佳降温速率还需要深入探讨。二是降温方法都是根据实验室的条件来确定的。控制降温速率的方法有程序冻存和人工转移,大多数实验室缺乏程序降温装置,采用人工转移的方法。已有研究指出降温

表 1 ASCs 低温保存方法的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of cryopreservation protocols for ASCs

冻存方法 Cryopreservation protocols	CPA/物理技术 CPA/physical technology	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
非渗透性 CPA Nonpermeable CPA	甲基纤维素 MC	有利于促进溶液玻璃化、稳定蛋白质和细胞膜、抑制冰晶生长 ^[8] It is beneficial for promoting solution vitrification, stabilizing proteins and cell membranes, and inhibiting ice crystal growth ^[8]	细胞活力仅有 46% ^[9] , 低于解冻后细胞活力阈值 Cell viability is only 46% ^[9] , which is lower than the threshold for cell viability after thawing
	聚乙烯吡咯烷酮 PVP	可用磷酸盐缓冲液配制冻存液 Phosphate buffer solution can be used to prepare the cryopreservation solution	细胞活力虽然达到 70%~80%, 但仍低于标准冻存液低温保存效果 Although the cell viability has reached 70%~80%, it is still lower than the cryopreservation effect of standard freezing solution
	蔗糖 Sucrose	低毒性 Low toxicity	细胞活力仅有 45% ^[11] , 低于解冻后细胞活力阈值 Cell viability is only 45% ^[11] , which is lower than the threshold for cell viability after thawing 海藻糖不具有膜穿透性, 从而难以达到防止冰晶形成的目的
	海藻糖 Trehalose	研究热点之一, 发展了多种将其递送至细胞内的策略 One of the research hotspots, various strategies have been developed to deliver it into cells	Trehalose does not have membrane penetrability, making it difficult to achieve the goal of preventing ice crystal formation 单独使用时保存 ASCs 的细胞存活率均为 10%左右 ^[14-15] Cell survival rate of ASCs is about 10%, when it is used alone ^[14-15]

续表1

冻存方法 Cryopreservation protocols	CPA/物理技术 CPA/physical technology	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
渗透性 CPA Permeable CPA	二甲亚砷 DMSO	含 10% DMSO、90% FBS 的冻存液被认为是标准的冻存液配方 ^[23] A solution containing 10% DMSO and 90% FBS is considered the standard formula for cryopreservation solution ^[23] 应用最为广泛的 CPA It is the most widely used CPA 提高其低温保存效果的途径很多 There are many ways to improve its cryopreservation effect	关于它对 ASCs 低温保存后除细胞活力以外的生物学特性的影响还未形成统一看法 No consensus on its impact on the biological characteristics of ASCs after cryopreservation, except for cell viability 复苏后 DMSO 的安全去除存在一些挑战 Some challenges in the safe removal of DMSO after recovery
渗透性 CPA 和非渗透性 CPA 的联合应用 Combination of permeable CPA and nonpermeable CPA	戊糖麦芽糖与 DMSO 的组合 Combination of pentaisomaltose and DMSO	可将 DMSO 常使用的浓度 10% 降至 1% ^[44] , 降低 DMSO 的毒性 Concentration of DMSO can be reduced from 10% to 1% ^[44] , the toxicity of DMSO is decreased	此组合的冻存液需使用人自体血清, 影响人 ASCs 抑制 T 细胞增殖能力 ^[44] This cryopreservation solution requires the use of human autologous serum, which affects the ability of human ASCs to inhibit T cell proliferation ^[44]
	海藻糖与甘油/丙二醇的组合 Combination of trehalose and glycerol or propylene glycol	拓宽了冻存液配方的研究思路, 不使用 FBS Research ideas for cryopreservation solution are expanded, and FBS is not used 提高海藻糖的低温保存效果 Cryopreservation effect of trehalose is improved	目前研究数据较少 Currently, the available research data is limited
	海藻糖与 DMSO 的组合 Combination of trehalose and DMSO	能够减少 DMSO 的用量 Concentration of DMSO can be reduced 不使用 FBS FBS is not used	ASCs 存活率太低, 只有 42% ^[15] Survival rate of ASCs is too low, only 42% ^[15]
冻存脂肪组织 Frozen adipose tissue	DMSO/异丙醇 DMSO or isopropanol	增加了 ASCs 的保存方法 Cryopreservation protocols for ASCs are added	与新鲜脂肪组织相比, 冻存脂肪组织来源 ASCs 的增殖能力、分化能力降低 ^[49] Proliferation and differentiation ability of ASCs derived from frozen adipose tissue are reduced, which are compared with fresh adipose tissue ^[49]
商业化冻存液 Commercial cryopreservation solution	成分未公开 Undisclosed ingredients	无血清或不含动物成分 Serum or animal components is not contained 低温保存效果好 Cryopreservation effect is ideal	申请了发明专利, 含有未公开的成分 Invention patent has been applied, and it contains undisclosed ingredients
声、光、电、磁 Sound, light, electricity and magnetism	磁热复温 Magnetic rewarming	降低 CPA 的使用浓度 Concentration of CPA is reduced 复温更精确、更安全 Rewarming is more precise and safer	处理过程较复杂 Process is somewhat complex 要求特殊设备、技术 Special equipments and technologies are required 成本高 Cost is high

装置会影响复苏效果^[9],故不同降温方法可能导致研究结果存在差异。三是 CPA 的浓度存在差异,可能导致研究结果存在差异。

综上所述,找到安全高效、配方简单、应用便捷的 ASCs 低温保护溶液体系仍是未来研究者们探索的重点。

参考文献:

- [1] BUCHERT J M, LOTZ B, DIEDERICH S, et al. Adipose-derived stromal cells: isolation, expansion, and differentiation [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2598: 75–85.
- [2] 蒋冉, 胡静怡, 姚桂东. 人类生殖细胞低温冷冻保存现状与研究进展 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2024, 44(1): 103–108.
- JIANG R, HU J Y, YAO G D. Current status and research progress in the development of cryopreservation of human germ cells [J]. *Chin J Reprod Contracept*, 2024, 44(1): 103–108.
- [3] MAZUR P, SEKI S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to 70, 000°C/min and warmed at 610° to 118, 000°C/min; a new paradigm for cryopreservation by vitrification [J]. *Cryobiology*, 2011, 62(1): 1–7.
- [4] 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.
- ZHAO G, ZHOU X X, GAO D Y. Principles and advances of cell cryopreservation [J]. *Sci Sin Vitae*, 2024, 54(6): 1109–1128.
- [5] MAZUR P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing [J]. *J Gen Physiol*, 1963, 47(2): 347–369.
- [6] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 2 版. 西安: 世界图书出版公司, 2007.
- SITU Z Q, WU J Z. *Cell culture* [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2007.
- [7] ROBB K P, FITZGERALD J C, BARRY F, et al. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency [J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(3): 289–306.
- [8] GAO D, CRITSER J K. Mechanisms of cryoinjury in living cells [J]. *ILAR J*, 2000, 41(4): 187–196.
- [9] DEVIREDDY R, THIRUMALA S. Preservation protocols for human adipose tissue-derived adult stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 702: 369–394.
- [10] RAY S S, PRAMANIK K, SARANGI S K, et al. Serum-free non-toxic freezing solution for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(8): 1397–1404.
- [11] ROGULSKA O, PETRENKO Y, PETRENKO A. DMSO-free cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stromal cells: expansion medium affects post-thaw survival [J]. *Cytotechnology*, 2017, 69(2): 265–276.
- [12] HE X. Thermostability of biological systems: fundamentals, challenges, and quantification [J]. 2011, 5: 47–73.
- [13] TONER M, KOCSIS J. Storage and translational issues in reparative medicine [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 961: 258–262.
- [14] YONG K W, PINGGUAN-MURPHY B, XU F, et al. Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9596.
- [15] NASCIMENTO C, SARAIVA M V A, PEREIRA V M, et al. Addition of synthetic polymer in the freezing solution of mesenchymal stem cells from equine adipose tissue as a future perspective for reducing of DMSO concentration [J]. *Braz J Vet Med*, 2023, 45: e002523.
- [16] GAO S, NIU Q, WANG Y, et al. A dynamic membrane-active glycopeptide for enhanced protection of human red blood cells against freeze-stress [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(10): e2202516.
- [17] WANG Y, GAO S, ZHU K, et al. Integration of trehalose lipids with dissociative trehalose enables cryopreservation of human RBCs [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9(1): 498–507.
- [18] NIU Q, GAO S, LIU X, et al. Membrane stabilization *versus* perturbation by aromatic monoamine-modified γ -PGA for cryopreservation of human RBCs with high intracellular trehalose [J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(31): 6038–6048.
- [19] GAO S, ZHU K, ZHANG Q, et al. Development of icephilic ACTIVE glycopeptides for cryopreservation of human erythrocytes [J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(2): 530–542.
- [20] ZHANG Q, LIU B, CHONG J, et al. Combination of hydrophobically modified γ -poly (glutamic acid) and trehalose achieving high cryosurvival of RBCs [J]. *Sci China Technol Sci*, 2021, 64(4): 806–816.
- [21] CHENG Y, YU Y, ZHANG Y, et al. Cold-responsive nanocapsules enable the sole-cryoprotectant-trehalose cryopreservation of β cell-laden hydrogels for diabetes treatment [J]. *Small*, 2019, 15(50): e1904290.
- [22] ZHANG Y, WANG H, STEWART S, et al. Cold-responsive nanoparticle enables intracellular delivery and rapid release of trehalose for organic-solvent-free cryopreservation [J].

- Nano Lett, 2019, 19(12): 9051–9061.
- [23] KOÇAK P, ÜNSAL N, CANIKYAN S, et al. Comparison of adipocyte viability after short-term cryopreservation of adipose aspirates through 3 different techniques [J]. Aesthet Surg J Open Forum, 2023, 5: ojad026.
- [24] 王静, 刘洪利, 潘福勤, 等. 不同冻存方法对大鼠脂肪来源干细胞生物学特性的影响 [J]. 中国美容医学, 2023, 32(6): 108–111.
WANG J, LIU H L, PAN F Q, et al. Effects of different cryopreservation methods on biological characteristics of adipose stem cells in rats [J]. Chin J Aesthetic Med, 2023, 32(6): 108–111.
- [25] SHAH F S, LI J, ZANATA F, et al. The relative functionality of freshly isolated and cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cells [J]. Cells Tissues Organs, 2015, 201(6): 436–444.
- [26] DURANDT C, DESSELS C, DA SILVA C, et al. The effect of early rounds of *ex vivo* expansion and cryopreservation on the adipogenic differentiation capacity of adipose-derived stromal/stem cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15943.
- [27] WINDRUM P, MORRIS T C, DRAKE M B, et al. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres [J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 36(7): 601–603.
- [28] CHETTY S, PAGLIUCA F W, HONORE C, et al. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation [J]. Nat Methods, 2013, 10(6): 553–556.
- [29] BAHOUN S, COOPMAN K, AKAM E C. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review [J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 397.
- [30] DI BELLA S, CANNELLA V, MIRA F, et al. The effect of a 7 year-long cryopreservation on stemness features of canine adipose-derived mesenchymal stem cells (cAD-MSC) [J]. Animals, 2021, 11(6): 1755.
- [31] WANG C, XIAO R, CAO Y L, et al. Evaluation of human platelet lysate and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants for the cryopreservation of human adipose-derived stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(1): 198–203.
- [32] DUARTE ROJAS J M, RESTREPO MÚNERA L M, ESTRADA MIRA S. Comparison between platelet lysate, platelet lysate serum, and fetal bovine serum as supplements for cell culture, expansion, and cryopreservation [J]. Biomedicines, 2024, 12(1): 140.
- [33] QU Y, MU D, WANG Q, et al. Effects of harvest sites on cryopreserved adipose-derived stem cells and ASC-enriched fat grafts [J]. Aesthetic Plast Surg, 2020, 44(6): 2286–2296.
- [34] QU Y, ZHANG S, MU D, et al. Effects of age on the biological properties of cryopreserved adipose-derived stem cells and ASC-enriched fat grafts [J]. Aesthetic Plast Surg, 2023, 47(6): 2734–2744.
- [35] QU Y, LUAN J, MU D, et al. Does water-jet force affect cryopreserved adipose-derived stem cells? evidence of improved cell viability and fat graft survival [J]. Ann Plast Surg, 2021, 87(2): 199–205.
- [36] VALADBEYGI A, NAJI T, PIRNIA A, et al. Supplementation freeze-thawed media with selenium protect adipose-derived mesenchymal stem cells from freeze-thawed induced injury [J]. Cryobiology, 2016, 73(2): 135–139.
- [37] JI Y T, CHEN D Y, JIANG S L, et al. Effect of fasudil hydrochloride on the post-thaw viability of cryopreserved porcine adipose-derived stem cells [J]. Cryo Letters, 2014, 35(5): 356–360.
- [38] QU C Q, LI D W, SHEN N, et al. Effect of glutathione and Y27632 on the viability of cryopreserved porcine adipose-derived stem cells [J]. Cryo Letters, 2014, 35(4): 308–311.
- [39] LI Z, QI J, FU S, et al. Effects of nanographene oxide on adipose-derived stem cell cryopreservation [J]. Cell Tissue Bank, 2024, 25(3): 805–830.
- [40] SHAIK S, HAYES D, GIMBLE J, et al. Inducing heat shock proteins enhances the stemness of frozen-thawed adipose tissue-derived stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2017, 26(8): 608–616.
- [41] SHAHID M A, KIM W H, KWEON O K. 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 [J]. Cryobiology, 2020, 92: 92–102.
- [42] WAN SAFWANI W K Z, CHOI J R, YONG K W, et al. Hypoxia enhances the viability, growth and chondrogenic potential of cryopreserved human adipose-derived stem cells [J]. Cryobiology, 2017, 75: 91–99.
- [43] GIL-CHINCHILLA J I, BUENO C, MARTÍNEZ C M, et al. Optimizing cryopreservation conditions for use of fucosylated human mesenchymal stromal cells in anti-inflammatory/immunomodulatory therapeutics [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1385691.
- [44] SVALGAARD J D, MUNTHE-FOG L, BALLESTEROS O R, et al. Cryopreservation of adipose-derived stromal/stem cells using 1 ~ 2% Me₂SO (DMSO) in combination with pentaisomaltose: an effective and less toxic alternative to comparable freezing media [J]. Cryobiology, 2020, 96: 207–213.

- [45] ZHANG T Y, TAN P C, XIE Y, et al. The combination of trehalose and glycerol: an effective and non-toxic recipe for cryopreservation of human adipose-derived stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 460.
- [46] FUJITA Y, NISHIMURA M, WADA T, et al. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation solution containing trehalose, dextran 40, and propylene glycol for therapy with human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotechnology*, 2022, 74(5): 515-529.
- [47] SHAIK S, WU X, GIMBLE J M, et al. Non-toxic freezing media to retain the stem cell reserves in adipose tissues [J]. *Cryobiology*, 2020, 96: 137-144.
- [48] ROATO I, ALOTTO D, BELISARIO D C, et al. Adipose derived-mesenchymal stem cells viability and differentiating features for orthopaedic reparative applications: banking of adipose tissue [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 4968724.
- [49] 吴顺, 刘雪君, 张一帆, 等. 浓缩血小板提高冻存脂肪来源间充质干细胞活性的研究 [J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2022, 12(6): 321-328.
- WU S, LIU X J, ZHANG Y F, et al. Study on improving the activity of mesenchymal stem cells derived from frozen fat by concentrated platelets [J]. *Chin J Cell Stem Cell Electron Ed*, 2022, 12(6): 321-328.
- [50] XU R, TREEBY B E, MARTIN E. Experiments and simulations demonstrating the rapid ultrasonic rewarming of frozen tissue cryovials [J]. *J Acoust Soc Am*, 2023, 153(1): 517.
- [51] OLMO A, BARROSO P, BARROSO F, et al. The use of high-intensity focused ultrasound for the rewarming of cryopreserved biological material [J]. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2021, 68(3): 599-607.
- [52] 张森, 赵刚, 顾宁. 纳米技术应用于低温生物保存的研究现状与发展趋势 [J]. *科学通报*, 2019, 64(21): 2180-2190.
- ZHANG M, ZHAO G, GU N. Applying nanotechnology to cryopreservation studies: Status and future [J]. *Chin Sci Bull*, 2019, 64(21): 2180-2190.
- [53] YANG J, PAN C, ZHANG J, et al. Exploring the potential of biocompatible osmoprotectants as highly efficient cryoprotectants [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(49): 42516-42524.
- [54] LIU X, ZHAO G, CHEN Z, 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 Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(19): 16822-16835.

[收稿日期]2024-07-29