

微囊化细胞冻存的研究进展****☆

余松林, 韩宝三, 杜志勇, 吴旭波, 吴薇, 王加祥, 黄芳, 李宏为, 沈柏用, 彭承宏

Cryopreservation of microencapsulated cells

Yu Song-lin, Han Bao-san, Du Zhi-yong, Wu Xu-bo, Wu Wei, Wang Jia-xiang, Huang Fang, Li Hong-wei, Shen Bo-yong, Peng Cheng-hong

Abstract

BACKGROUND: Cell microencapsulation provides a new approach for a large scale, highly active *in vitro* culture and long-term preservation method of cells. Cryopreservation of microencapsulated cells is an important preservation method at present. Resuscitated cells become more and more applicable in clinical and basic researches.

OBJECTIVE: To analyze researches related to cryopreservation of microencapsulated cells in recent years, and to summarize the development of technology on cryopreservation of microencapsulated cells.

METHODS: Using "Microcapsules, Cryopreservation" in Chinese as the key words, CNKI (1979/2010) and VIP database (1989/2010) were retrieved. Using "Cryopreservation, Microencapsules" in English as the key words, PUBMED database (1979/2010) was retrieved. The retrieval languages are limited to Chinese and English respectively. Articles about cryopreservation of microencapsulated cells were included, excluding other forms of cryopreservation research. The index is the effect after the cryopreservation of a variety of microencapsulated cells. Totally 43 papers were screened out.

RESULTS AND CONCLUSION: With the development of the bioartificial liver and other cell transplantation research, the requirements of the microencapsulated cells will significantly increase. The cryopreservation technology of microencapsulated cells has become one of key technologies on guaranteeing its smooth application. Currently, there are a lot of researches regarding the cryopreservation technology of microencapsulated cells, many studies show that the cell viability and biological function can maintain a good level after resuscitation of microencapsulated cells, but related mechanisms are not yet fully clarified, so as to have a need to optimize the various cryopreservation methods.

Yu SL, Han BS, Du ZY, Wu XB, Wu W, Wang JX, Huang F, Li HW, Shen BY, Peng CH. Cryopreservation of microencapsulated cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(25):4713-4716. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 细胞微囊化为细胞大规模、高活性体外培养及长期存储提供了新的途径, 低温保存是目前保存细胞的重要方法, 技术日新月异, 复苏细胞在临床和基础研究中的应用越来越多。

目的: 分析近年来微囊化细胞冻存的相关研究, 对微囊化细胞冻存技术的发展作一总结。

方法: 以“微囊, 冻存”为检索词, 检索中国期刊网(1979/2010)及维普数据库(1989/2010), 限定文章语言种类为中文; 以“Cryopreservation, Microcapsule”为检索词, 检索 PubMed 数据库(1979/2010), 限定文章语言种类为 English。纳入含有微囊化细胞冻存的研究, 排除其他形式细胞冻存的研究, 结果以各种细胞微囊化后进行冻存处理后产生作用为指标, 共检索到 43 篇文献。

结果与结论: 随着生物人工肝与以及其他细胞移植研究的深入, 对微囊化细胞的需要量将显著增加, 微囊化细胞的低温保存技术已成为保证其顺利应用的关键技术之一。目前, 微囊化细胞的低温保存技术已经开展了不少研究, 有多项研究结果表明复苏后微囊化细胞的存活率和生物学功能都能保持较好的水平, 但相关机制仍未完全阐明, 各种冻存方法还需要优化。

关键词: 微囊化细胞; 低温保存; 冻存保护剂; 降温; 复苏; 综述文献

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.25.038

余松林, 韩宝三, 杜志勇, 吴旭波, 吴薇, 王加祥, 黄芳, 李宏为, 沈柏用, 彭承宏. 微囊化细胞冻存的研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(25):4713-4716. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

细胞是进行细胞移植、生物人工器官研究的基本材料。近年来, 随着肝细胞及胰岛细胞等腺体细胞移植研究的开展, 特别是生物人工肝为肝衰竭的治疗开辟了新途径, 有几种以培养肝细胞为基础的生物人工肝已进行 I~III 期临床试验, 取得了令人欢欣鼓舞的疗效^[1-3],

但要把这些系统在临床上真正推广应用, 必须获得足够数量且具有高活性功能良好的肝细胞。

细胞微囊化为细胞大规模、高活性体外培养及长期存储提供了新的途径, 低温保存是目前保存细胞的重要方法, 技术日新月异, 复苏细胞在临床和基础研究中的应用越来越多, 本文将就国内外微囊化细胞冻存技术的应用进展作一综述。

Shanghai Institute of Digestive Surgery, Department of General Surgery, Center of Organ Transplantation, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Yu Song-lin☆, Studying for doctorate, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Department of General Surgery, Center of Organ Transplantation, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China ysl1997@sina.com

Correspondence to: Peng Cheng-hong, Chief physician, Professor, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Department of General Surgery, Center of Organ Transplantation, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China chhpeng@hotmail.com

Supported by: the State Plan for High-Tech Research and Development in Eleventh Five-year Period (863 program), No. 2008AA02Z417*; Key Project of the National Natural Science Foundation of China, No. 20434030*; the National Natural Science Foundation of China, No. 30772105*, 20074031*; the National Science Foundation of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, No. 07ZR14076*

Received: 2010-03-10 Accepted: 2010-04-21

上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普通外科器官移植中心, 上海市 200025

余松林, 男, 1976年生, 江西省都昌县人, 汉族, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普通外科器官移植中心在读博士, 主要从事人工肝, 肝移植及肝胆胰疾病方面的研究。
ysl1997@sina.com

通讯作者: 彭承宏, 主任医师, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普通外科器官移植中心, 上海市 200025
chhpeng@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225(2010)25-04713-04

收稿日期: 2010-03-10
修回日期: 2010-04-21
(20100310001/WL·Y)

1 资料和方法

1.1 资料来源 2010-01第一作者以“微囊, 冻存”为检索词, 检索中国期刊网(1979/2010)及维普数据库(1989/2010), 限定文献语言种类为中文; 以“Cryopreservation, Microencapsulation”为检索词, 检索PubMed数据库(1979/2010), 限定文献语言种类为English, 检索文献包括研究原著、综述、述评、经验交流、病例报告和荟萃分析等。总计检索43篇, 未进行手工检索。

1.2 资料筛选及评价

纳入标准: 与微囊化细胞冻存相关的研究。

排除标准: 其他形式细胞冻存的研究。

1.3 资料提取 由两名评价员分别仔细阅读所获文题、摘要和全文, 以确定符合纳入标准的文献。如遇分歧则征求第三方的意见解决。如果实验报告的资料不全, 则进一步与实验的主要研究者联系获取。

1.4 文献检索结果及质量评价 对每一篇符合纳入标准的文献进行以下几个方面的评价: ①研究主要涉及微囊化细胞的冻存方法。②研究主要涉及微囊化细胞经冻存后复苏细胞功能。文献筛选和质量评价由两位研究者独立进行并交叉核对, 如有分歧, 则通过讨论或由第三位研究者协助解决。由两人独立用统一的资料提取表提取数据, 遇到分歧讨论解决。

共检索到43篇相关文献, 24篇文献符合纳入标准, 排除的19篇文献为重复或Meta分析, 符合纳入标准的24篇文献中, 有6篇是国内的, 其余都是国外的相关研究报道。其中3篇讨论了细胞运用的现状及前景^[1-3], 2篇涉及了细胞微囊化技术^[4-5], 10篇是关于冻存液组成的研究^[6-15], 3篇是有关微囊化细胞降温步骤的实验^[16-18], 5篇是涉及复苏方式及复苏后细胞的功能检测的研究。

2 结果

2.1 细胞的微囊化 细胞微囊化是采用多种无毒的高分子材料包裹肝细胞形成直径数十微米至数百微米微囊的技术。制作微囊常用的膜材料主要有海藻酸盐、多聚赖氨酸、壳聚糖、2-甲基丙烯酸(MAA)、羟乙基甲基丙烯酸酯(HEMA)、甲基丙二酸盐(MMA)、琼脂糖, 聚丙烯酰胺及羟甲基纤维素等, 海藻酸盐因具有良好的生物相容性和来源方便是应用最早和最广泛的微囊膜材料。微囊的膜具有良好的生物相容性、合适的通透性、较

强的机械稳定性^[4]。细胞微囊化后囊膜提供了细胞附着的基质, 使部分细胞相互接触形成一种三维结构。此外, 微囊膜合适的通透性允许白蛋白、营养物质及代谢物的自由弥散, 但又能阻止免疫球蛋白和补体等高分子物质通过, 从而起到免疫屏障作用^[5]。

2.2 冻存液的组成 微囊化细胞的冻存过程中, 合适的冻存液有助于细胞克服低温保存过程中细胞内外渗透压剧烈变化导致的损伤。当前使用的冻存液种类较多, 没有形成一致的用法, 有许多问题还处在进一步的研究当中。低温保存使用的冻存液有DMEM、RPMI-1640、F12、L-15、M199 HEPES等培养液, 并加有100~200 mol/L二甲基亚砷、胎牛血清、抗生素、制霉菌素、糖皮质激素、葡萄糖、右旋葡萄糖、蔗糖、果糖、胰岛素、胰高血糖素、生长因子、甘氨酸、谷胱甘肽、牛血清白蛋白、L-谷氨酰胺、丙三醇或乙二醇等, 具体成分或浓度各有不同。

Inaba等^[6]用含体积分数为7.5%胎牛血清、体积分数为1%青霉素、0.1 g/L链霉素、20 mmol/L HEPES、2.7 mmol/L的右旋糖、2 mol/L二甲基亚砷的RPMI1640冻存液, 液氮中冻存胰岛细胞4周, 细胞无明显的损伤, 仍然保持较好的胰岛素分泌功能。Zhou等^[7]也以类似的冻存液进行了猪胰岛细胞的冻存实验, 也取得了满意的冻存效果。Chin等^[8]把肝细胞用微囊包裹后, 用含0.25 mol/L蔗糖的体积分数为20%二甲基亚砷去平衡微囊化肝细胞3 min后, 再用慢速冷冻法降温, 冻存后发现解冻后用M199洗涤培养的细胞活性>95%, 微囊完整性比前者稍低但也在60%以上, 取得了较好效果, 探索了一条简单便捷经济的冻存液配成方式。而Stiegler等^[9]换用了另一种冷冻保护剂甘油, 用含75%DMEM、体积分数为25%胎牛血清、1 mol/L甘油、0.4 mol/L蔗糖的冻存液体去冻存永生生化产胰岛素细胞系, 在经程序降温至-70℃后, 保存24 h后转液氮冻存, 结果显示细胞数量较其他加二甲基亚砷的组别有较明显增加, 说明甘油在冻存过程中对细胞的影响较小。Hang等^[10]最近在分离了人肝细胞后, 把人肝细胞微囊化包裹, 经上述处理后的人肝细胞储存在一个由含80%DMEM、体积分数为10%胎牛血清、10%二甲基亚砷的冻存媒质中, 后经含异丙醇的冷冻器以-80℃过夜后放置液氮冷冻1周, 解冻后发现蛋白分泌、尿素合成水平都较直接冷冻组要高的多。

目前各家报道的冻存液成分虽然不尽相同, 但是都在冻存过程中使用了冻存保护剂

(cryoprotective agent, CPA)。CPA主要分为两类, 分别为渗透性和非渗透性, 长期冻存微囊化细胞主要采用渗透性保护剂, 当前常用的是二甲基亚砜。其常用体积分数在10%~20%之间, 体积分数过低起不到有效的保护作用, 体积分数过高及非冻存期与细胞长时间接触。因毒性作用在这两种情况下都会导致细胞功能受损。细胞的最适体积分数各方报道不一, 而且不同类别细胞的最适体积分数也有一定的差别, 同一种属细胞都存在适用体积分数的区别, 如冻存微囊化胰岛细胞用2 mol/L二甲基亚砜^[11], 而冻存鼠肝细胞所用的适宜二甲基亚砜体积分数是16%, 人肝细胞在10%~20%之间等^[12], 在冻存微囊化牛肾上腺髓质细胞时适宜二甲基亚砜体积分数为10%^[13], 冻存液中加入二甲基亚砜, 防止细胞中游离蛋白质的聚集, 有效降低微囊化细胞培养液的冰点, 提高细胞膜对水的通透性。在慢速冷冻条件下, 水分在冻结前渗透出细胞, 在胞外形成冰晶, 从而减少胞内冰晶形成, 提高细胞复苏后存活率。另外添加或去除二甲基亚砜时需缓慢进行, 以防内外渗透压在短时间内变化过大造成极大的差距导致细胞水肿或脱水^[14]。国内叶萍等^[15]研究了单纯的微囊在利用低温保护剂二甲基亚砜情况下, 低温保存微囊的情况, 发现结论微囊在低温保存过程中主要受到冰晶生长所导致的机械性损伤, 提高降温速率与添加低温保护剂可以有效地抑制冰晶生长, 从而可以较好的维持微囊的形态。

2.3 降温步骤 在微囊化细胞的冻存过程中降温步骤是成功完成细胞冻存的关键。既往研究指出, 微囊化肝细胞的降温方法与刚分离的肝细胞相似, 国内于聪慧等^[16]在20世纪末就探索了长期冻存对微囊化肝细胞形态结果和功能的影响, 把微囊化肝细胞按冻存时间不同分为A, B, C, D 4组, 其中D组为不冻存组, 先以-1 °C/min速度降至-25 °C, 置30 min再以-5 °C/min降至-40 °C, 置30 min, -80 °C停60 min后立即放入液氮中, 分别于15, 30, 60 d后取出, 立即放入40 °C恒温浴箱中解冻, 解冻时间约2 min, 实验证实冻存后前3组的细胞活率较高, 肝细胞的形态结构正常, 肝细胞葡萄糖-6-磷酸酶、糖原及白蛋白染色正常, 培养4 d后各组总蛋白和尿素氮的合成分泌功能与新鲜微囊化肝细胞差异无显著性。国外Murua等^[17]把鼠的肌原细胞微囊化后在20%二甲基亚砜的保护下进行了直接放进液氮、在-80 °C置2 h后放进液氮冷冻、以及在-20 °C置1 h后-80 °C停23 h后放进液氮冷冻等实验, 结果发现分阶段降温比直接及少降温的方法, 肌原细胞保存的功能及结构要好, 适合长期保存微囊化肌原细胞。

有学者采用电脑程控的降温仪研究了降温方式对微囊化细胞的冻存影响, 其程序复杂, 温度变化复杂, 效果肯定。Sarkis等^[18]将培养24 h的微囊化胰岛移入无菌玻璃安瓶中, 加入含1.5 mol/L二甲基亚砜抗冻剂的RPMI1640培养液1.5 mL, 将瓶封口后, 放入4 °C冰箱内平衡60 min

以利于抗冻剂溶液的充分渗透, 然后采用微机控制程序降温仪, 以两种不同降温速率低温保存微囊化胰岛。一种是先以5 °C的降温速率从4 °C降到0 °C, 维持20 min, 再以1 °C/min的降温速率降到-80 °C, 然后投入-196 °C的液氮中保存; 另一种方式是以5 °C的降温速率从4 °C降到0 °C, 维持20 min, 再以0.3 °C/min的降温速率降到-40 °C, 改为1 °C/min降至-80 °C, 随即投入-196 °C的液氮中保存; 冻存2周后复温发现微囊化胰岛细胞回收率高、具有良好的胰岛素分泌功能和逆转高血糖的作用, 其中后一种方法要稍好于前一方法, 但两者差异不大。

其他研究发现从常温降至合适的保存温度时, 降温速度直接影响细胞内外冰晶形成的先后顺序, 从而影响细胞内外的渗透压。如降温速度小于-0.1 °C/min, 细胞外的水分先形成冰晶, 细胞外的渗透压增大, 胞内外渗透压差明显增大, 细胞膜受损, 大分子物质外漏, 导致细胞死亡。如降温速度过快, 细胞内外同时形成冰晶, 引起细胞器损伤、细胞内蛋白质变性及细胞核内染色体空间构型改变等, 最后也同样导致细胞死亡^[18]。目前, 国内外学者多采用分阶段降温措施, 其降温速度在1.0~1.5 °C/min, 可较好保持细胞活力。学者大多认为冻存细胞的损伤主要为“溶质反应”所致, 后者引起的pH值和渗透压较大变化导致细胞膜渗漏, 当复苏时水分子进入细胞, 引起细胞的水肿、变性直至死亡。分阶段降温比匀速降温对肝细胞影响小。

2.4 复苏方式及复苏后的功能检测 复苏是指快速将低温保存的微囊化细胞恢复至常温的过程, 适当的复苏方法可确保低温保存的成果。目前微囊化细胞的复苏方式从步骤上大致可以分为两种, 一种是直接法, 即复温时直接将冻存管置于39 °C水浴中解冻, 解冻时间大约2 min, 此法现被广泛采用^[19-20]。另一种是在玻璃化保存微囊化细胞时分阶段升温法, Agudelo等^[11]在解冻玻璃化微囊胰岛细胞时分两步进行, 首先, 把保存在-185 °C程控降温仪中的玻璃化微囊胰岛细胞以30 °C/min的速度从-185 °C升温至-100 °C, 然后在具有室温含30%二甲基亚砜的水溶液中迅速升温至融化。另外解冻后对微囊化细胞的处理也有些不一致, 主要反映在析出冷冻剂二甲基亚砜上, Wu等^[21]在解冻微囊化肝细胞后, 在室温下把微囊化肝细胞放入含1 mol/L的蔗糖中, 然后依次把蔗糖的浓度递减为0.7, 0.25, 0.2, 0.15 mol/L, 完成每步时间为2.0~2.5 min。但李保国等^[22]在解冻微囊化胰岛细胞后, 用冷Hank's液作倍比稀释, 逐步透出二甲基亚砜, 离心弃去上清液, 洗涤3次后, 加入含体积分数为20%小牛血清的RPMI1640培养液, 置于37 °C、含体积分数为5%CO₂、95%空气的培养箱内培养, 效果也很好。

复苏后检测微囊化细胞功能是评价冻存方法优劣的关键。对复苏细胞的功能检测概括如下: ①细胞的结构改变, 在光镜或电镜下观察细胞形态、胞质中颗粒、细胞骨

架结构、细胞器及细胞膜的完整性等^[6-8, 12, 16]。②检测细胞的功能,如微囊化的肝细胞可检测肝细胞内或释出的琥珀酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸酶、细胞色素P450、LDH、AST、细胞内ATP含量、能量交换情况、白蛋白和尿素合成能力以及氯化铵清除能力,细胞色素P450及其同工酶可反映肝细胞代谢及对环境的适应能力,LDH的漏出可以初步看出肝细胞的损伤情况等^[14, 18, 20, 23]。如是微囊化胰岛细胞可以观察复苏后胰岛的回收率,进行胰岛素分泌功能实验,以及胰岛移植实验等^[22, 24]。肾上腺髓质细胞可检测细胞儿茶酚胺的分泌功能^[13]。

3 讨论

随着生物人工肝以及其他细胞移植研究的深入,对微囊化细胞的需要量将显著增加,微囊化细胞的低温保存技术已成为保证其顺利应用的关键技术之一。目前,微囊化细胞的低温保存技术已经开展了不少研究,复苏后微囊化细胞的存活率和生物学功能都能保持较好的水平,但仍不够成熟,需要进一步去深入研究,如能深入探讨微囊化细胞的低温保存机制,必将推动生物人工肝和细胞移植的发展。

4 参考文献

[1] van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, et al. Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg.* 2004;240(2):216-230.

[2] Demetriou AA, Brown RS Jr, Busutil RW, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg.* 2004;239(5):660-667.

[3] Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K, et al. Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation.* 2003;10(5):460-469.

[4] Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, et al. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol.* 2004;22(2):87-92.

[5] Haque T, Chen H, Ouyang W, et al. In vitro study of alginate-chitosan microcapsules: an alternative to liver cell transplants for the treatment of liver failure. *Biotechnol Lett.* 2005;27(5):317-322.

[6] Inaba K, Zhou D, Yang B, et al. Normalization of diabetes by xenotransplantation of cryopreserved microencapsulated pancreatic islets. Application of a new strategy in islet banking. *Transplantation.* 1996;61(2):175-179.

[7] Zhou D, Vacek I, Sun AM. Cryopreservation of microencapsulated porcine pancreatic islets: in vitro and in vivo studies. *Transplantation.* 1997;64(8):1112-1116.

[8] Chin Heng B, Yu H, Chye Ng S. Strategies for the cryopreservation of microencapsulated cells. *Biotechnol Bioeng.* 2004;85(2):202-213.

[9] Stiegler PB, Stadlbauer V, Schaffellner S, et al. Cryopreservation of insulin-producing cells microencapsulated in sodium cellulose sulfate. *Transplant Proc.* 2006;38(9):3026-3030.

[10] Hang H, Shi X, Gu G, et al. In vitro analysis of cryopreserved alginate-poly-L-lysine-alginate-microencapsulated human hepatocytes. *Liver Int.* 2010;30(4):611-622.

[11] Agudelo CA, Iwata H. The development of alternative vitrification solutions for microencapsulated islets. *Biomaterials.* 2008;29(9):1167-1176.

[12] Guillouzo A, Riolland L, Fautrel A, et al. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact.* 1999;121(1):7-16.

[13] 李学敏, 李涛. 微囊牛肾上腺髓质细胞的冻存及其活性评价[J]. *生物医学工程与临床.* 2003, 7(1): 7-9.

[14] Canaple L, Nurdin N, Angelova N, et al. Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multicomponent polymer capsules--in vitro cryopreservation studies. *J Hepatol.* 2001;34(1):11-18.

[15] 叶萍, 陈儿同, 徐彬凯, 等. 海藻酸钠/壳聚糖微囊冻存的低温显微实验[J]. *中国医药生物技术.* 2008, 3(6): 409-414.

[16] 于聪慧, 魏玉华, 冷希圣, 等. 长期冻存对微囊化肝细胞形态结构功能的影响及在急性肝功能衰竭中的治疗作用[J]. *中华实验外科杂志.* 1999, 16(5): 414-416.

[17] Murua A, Orive G, Hernández RM, et al. Cryopreservation based on freezing protocols for the long-term storage of microencapsulated myoblasts. *Biomaterials.* 2009;30(20):3495-3501.

[18] Sarkis R, Benoist S, Honiger J, et al. Transplanted cryopreserved encapsulated porcine hepatocytes are as effective as fresh hepatocytes in preventing death from acute liver failure in rats *Transplantation.* 2000;70(1):58-64.

[19] 田磊, 高宇红, 李雁凌, 等. APA-3T3细胞微囊的深低温保存[J]. *军医进修学院学报.* 2006, 27(3): 225-227.

[20] Kusano T, Aoki T, Yasuda D, et al. Microcapsule technique protects hepatocytes from cryoinjury. *Hepatol Res.* 2008;38(6):593-600.

[21] Wu Y, Yu H, Chang S, et al. Vitreous cryopreservation of cell-biomaterial constructs involving encapsulated hepatocytes. *Tissue Eng.* 2007;13(3):649-658.

[22] 李保国, 华泽钊, 王国兴, 等. 微囊化对大鼠胰岛细胞冻存后功能的影响[J]. *中国医药工业杂志.* 2001, 32(11): 503-506.

[23] Mei J, Sgroi A, Mai G, et al. Improved survival of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated cryopreserved porcine hepatocytes in mice. *Cell Transplant.* 2009;18(1):101-110.

[24] 侯军, 薛武军, 田小辉, 等. 微囊化大鼠胰岛细胞的冷冻保存[J]. *南方医科大学学报.* 2006, 26(1): 46-48.

关于作者: 文章资料收集、成文由第一作者完成, 经通讯作者审核并对文章负责。

基金资助: 国家“十一五”高新技术研究发展计划——“863”资助项目(2008AA02Z417); 国家自然科学基金重点资助项目(20434030); 国家自然科学基金资助项目(30772105, 20074031); 上海市科委自然科学基金资助项目(07ZR14076)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

此问题的已知信息: 微囊化细胞的冻存既往研究不多, 主要是运用细胞冻存的技术对微囊化后的细胞进行冻存。

本综述增加的新信息: 低温保存是目前保存微囊化细胞的重要方法, 本文中有关冻存液组成、降温步骤和复苏技术都进行了综述, 介绍了微囊化细胞冻存的最新进展。细胞是进行细胞移植、生物人工器官研究的基本材料。

临床应用的意义: 近年来, 随着肝细胞及胰岛细胞等腺体细胞移植研究的开展, 特别是生物人工肝为肝衰竭的治疗开辟了新途径, 有几种以培养肝细胞为基础的生物人工肝已进行I~III期临床试验, 取得了令人欢欣鼓舞的疗效, 这些系统要在临床上真正推广应用, 微囊化细胞的低温保存尤显重要, 复苏细胞在临床研究中的应用也越来越多。微囊化细胞冻存技术必将随着相关研究的发展而更广泛的应用于临床中。