

人多能干细胞的冷冻与保存

刘鸿燕^{1,2}, 黄元华², 马燕琳² (1郑州大学第一附属医院, 河南省郑州市 450052; 2海南医学院附属医院, 海南省海口市 570102)

文章亮点:

- 1 此问题已知信息: 人多能干细胞的应用前景广阔, 但目前缺少安全高效标准化的冷冻方案。
- 2 文章增加新信息: 文章围绕人多能干细胞冷冻原理, 针对冷冻过程中造成损伤的原因和机制, 从冷冻保护剂的选择与优化, 添加分子物质提高冷冻复苏率, 冷冻贴壁克隆、悬浮克隆以及分散的单个细胞, 无异源性成分条件下的冷冻等 4 方面论述冷冻领域的进展, 为新的更有效的冷冻方案的形成提供依据。
- 3 临床应用意义: 人多能干细胞的出现在生物医药领域引起广泛关注, 安全高效的冷冻方案能促进其应用于各领域。

关键词:

干细胞; 培养; 细胞冷冻保存; 冷冻原理; 冷冻方法; 冷冻损伤; 玻璃化; 程序化冷冻; 安全性; 冷冻保护剂; 国家自然科学基金

主题词:

干细胞; 多能干细胞; 胚胎干细胞; 低温保存; 冷冻

基金资助:

国家科技部 973 项目(2012CB966502); 海南省科技厅国际合作重点项目(GJXM20100004, GJXM201106); 人力资源和社会保障部 2011 年度留学人员科技活动择优资助项目(201150804); 海南省自然科学基金项目(812185); 海口市重点科技计划项目(2012078); 国家国际科技合作专项(2014DFA30180); 海南省重大科技项目(ZDZX2013003); 国家自然科学基金(81060175, 81060016)

摘要

背景: 人多能干细胞的出现与发展是近年来生物医学研究领域的重大突破。但其在基础/临床研究中的广泛应用还有诸多限制, 建立安全有效标准化的冷冻保存方案是人多能干细胞广泛应用面临的重大挑战。

目的: 回顾人多能干细胞冷冻领域的研究进展, 探索造成冷冻损伤的原因和机制及改进方式, 致力于促进新的更有效的冷冻方案形成。

方法: 以“人多能干细胞、人胚胎干细胞、人诱导多能干细胞、玻璃化、程序化冷冻、慢冻法、冷冻保存”为中文检索词, 以“human pluripotent stem cells, human embryonic stem cell, human introduced pluripotent stem cell, vitrification, programmed cryopreservation, slow-freezing, cryopreservation”为英文检索词, 应用计算机检索中国知网全文数据库、万方全文数据库、维普(VIP)期刊全文数据库、PubMed 数据库有关人多能干细胞冷冻保存技术的文献, 排除与研究目的无关及重复文献, 保留 58 篇文献进一步总结分析。

结果与结论: 了解人多能干细胞冷冻过程中造成冷冻损伤的原因和机制, 是寻找高效的冻存方案的关键。需要更清晰的了解冷冻过程中损伤的原理, 改进和创新低温生物技术来避免各种冷冻损伤的发生并致力于探讨可重复的, 高效的, 符合 GMP 要求的, 能大规模冻人多能干细胞的方案。

刘鸿燕, 黄元华, 马燕琳. 人多能干细胞的冷冻与保存[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(14):2275-2281.

Cryopreservation of human pluripotent stem cells

Liu Hong-yan^{1,2}, Huang Yuan-hua², Ma Yan-lin² (1First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; 2Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, Hainan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The appearance and development of human pluripotent stem cells is a major breakthrough in the biomedical field. There are still many obstacles limiting its clinical application. To establish a safe and effective cryopreservation method may be a great challenge.

OBJECTIVE: To review the progress in the cryopreservation of human pluripotent stem cells, and to explore the cause and mechanism of freezing injury, thereby developing a new and more effective cryopreservation protocol.

METHODS: A computer-based search of CNKI, Wanfang, VIP and PubMed databases was performed using the key words of “human pluripotent stem cells, human embryonic stem cell, human induced pluripotent stem cell, vitrification, programmed cryopreservation, cryopreservation” both in English and Chinese. Irrelevant and repetitive papers were excluded, and finally 58 papers were included for further analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: To better understand the cause and mechanism of freezing injury during

刘鸿燕, 女, 1987 年生, 河南省巩义市人, 汉族, 2014 年郑州大学毕业, 硕士, 主要从事干细胞专业的研究。

通讯作者: 黄元华, 教授, 海南医学院附属医院, 海南省海口市 570102

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.14.023
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)14-02275-07
稿件接受: 2014-02-26

Liu Hong-yan, Master, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, Hainan Province, China

Corresponding author: Huang Yuan-hua, Professor, Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, Hainan Province, China

Accepted: 2014-02-26

pluripotent stem cells cryopreservation is crucial for establishing a new and more effective cryopreservation protocol. We should improve and develop low-temperature biotechnologies to avoid freezing injury, thereby establishing a cryopreservation protocol for human pluripotent stem cells that is repeatable, high-efficiency and accords with GMP requirements.

Subject headings: stem cells; multipotent stem cells; embryonic stem cells; cryopreservation; freezing

Funding: the National 973 Program, No. 2012CB966502; the International Cooperation Projects of Hainan Science and Technology Bureau, No. GJXM20100004, GJXM201106; the Selected Technology Foundation for Overseas Chinese Scholars of the Ministry of Human Resources and Social Security of China in 2011, No. 201150804; the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 812185; the Major Science and Technology Plan of Haikou City, No. 2012078; the International S&T Cooperation Program of China, No. 2014DFA30180; the Major Science and Technology Project of Hainan Province, No. ZDZX2013003; the National Natural Science Foundation of China, No. 81060175, 81060016

Liu HY, Huang YH, Ma YL. Cryopreservation of human pluripotent stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014; 18(14):2275-2281.

0 引言 Introduction

人多能干细胞包括人胚胎干细胞、人诱导多能干细胞和生殖干细胞^[1-3], 研究较多的是前两者。从1998年第一株人胚胎干细胞的建立到人诱导多能干细胞的发现, 生物医学研究进入新的发展阶段。尤其是近年来人多能干细胞在细胞治疗方面取得的新进展, 使其为临床治疗包括帕金森病在内的神经退行性疾病、糖尿病, 心血管疾病等提供可能^[4-5]。但是人多能干细胞的广泛应用还受到诸多限制, 其中建立安全有效标准化的冷冻保存方案是人多能干细胞广泛应用面临的重大挑战。本文将回顾人多能干细胞冷冻领域的研究进展, 致力于促进新的更有效的冷冻方案形成。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

检索人: 第一作者。

检索时间范围: 1980年1月至2013年12月。

检索词: 英文检索词 “human pluripotent stem cells, human embryonic stem cell, human induced pluripotent stem cell, vitrification, the programmed cryopreservation, cryopreservation”; 中文检索词 “人多能干细胞、人胚胎干细胞、人诱导多能干细胞、玻璃化、程序化冷冻、慢冻法、冷冻保存”。

检索数据库: PubMed数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>); 中国知网(<http://www.cnki.net/>); 万方数据库(<http://www.wanfangdata.com.cn/>); 维普数据库(<http://www.cqvip.com>)。

检索文献量: 共检索到文献106篇。

1.2 纳入标准 ①与组织细胞冷冻保存相关的文章。②与干细胞冷冻保存相关的文章。

1.3 排除标准 与研究内容无关以及内容重复的文章。

1.4 质量评估 计算机初检得到138篇文献, 包括中文11篇, 英文127篇。阅读标题与摘要进行初筛, 排除与

研究目的与本无内容无关及重复文献80篇, 最后保留58篇归纳总结。

2 结果 Results

2.1 人多能干细胞

2.1.1 人类胚胎干细胞 在小鼠胚胎干细胞建株之后, 培养技术不断改进^[6], 最终Thompson等^[1]在1998年建立第一株人多能干细胞。建株的人多能干细胞来源于行体外受精与胚胎移植(In Vitro Fertilization, IVF-ET)治疗的患者胚胎, 这些细胞具有正常的核型, 在长期培养传代过程中有无限增殖和自我分化潜^[7]。人多能干细胞有明显的形态特征: 成克隆团块样生长, 克隆边界清晰, 内部细胞连接紧密, 细胞核质比高, 单个细胞内可见明显的细胞核。人多能干细胞有很高的端粒酶活性, 并表达某些细胞表面标志物和转录因子, 如SSEA-4, SSEA-3, TRA抗原, Oct3/4, Nanog^[8-9]。人多能干细胞能否分别在体内和体外分化为3个胚层(内胚层、中胚层、外胚层)的细胞是检测其是否具有多能性的手段, 主要的鉴定试验^[10]: ①在体外悬浮培养的细胞团块随机分化为拟胚体, 并对形成的拟胚体行细胞免疫化学分析或者PT-PCR检测其多能性。②在免疫缺陷的小鼠体内形成畸胎瘤。

2.1.2 人诱导多能干细胞 诱导多能干细胞的出现是干细胞研究领域的另一重大突破, 即通过4种转录因子将体细胞重编程为诱导多功能干细胞。诱导多能干细胞可以通过各种体细胞诱导得到, 它的发现使能得到不同患者特定基因类型的干细胞^[11-13]。诱导多能干细胞和人多能干细胞形态相似, 具备人多能干细胞的的多能性特征, 能表达特定的表面标志物和转录因子, 在体内外均能分化为3个胚层所有类型的细胞, 在免疫缺陷的小鼠体内能形成畸胎瘤。

2.2 人多能干细胞的冻存

2.2.1 冻存原理 将细胞、组织或者器官冷冻在-80℃尤其是-140℃以下, 并能保证其存活能力的过程称为细胞的冷冻保存^[14]。温度下降会影响细胞的生化进程,

细胞长期保存在液氮(-196 °C)里,细胞酶的代谢受到抑制,几乎完全停滞,在复温后细胞恢复代谢能力,继续其生化进程。

2.2.2 常用的冷冻方法 细胞低温保存的最大威胁之一来自于低温状态下水结晶对细胞器和细胞膜的损伤。根据避免细胞内外水结晶的原理,用于人多能干细胞冻存的常用方法包括慢冻法和玻璃化两种。

慢冻法: 慢冻法是一种较经典的冷冻方法^[15]。在慢冻法中,远离标本的保护液内的水分通过缓慢有序结晶,逐步将细胞内水分吸出,并使标本周围处于极高渗透压状态而避免冰晶形成。慢冻法主要操作步骤^[16]: ①收集细胞。②添加冷冻液。③在一定的冷却速率下(从-1至-10 °C/min),细胞悬液逐步形成固体。④细胞长期低温储存(通常在液氮中)。⑤快速解冻,细胞悬液37-40 °C水浴。⑥通过离心去除冷冻剂。⑦在合适的条件下接种培养细胞。慢冻法对多种成体细胞、造血细胞、人间充质干细胞甚至小鼠胚胎干细胞都是有效的,但因其低复苏率和高分化率不适用于人多能干细胞的冷冻^[17-19]。

玻璃化: 玻璃化最早用于冻存牛卵、牛胚^[1],后又用于人多能干细胞。玻璃化冷冻是将克隆块依次放入两种浓度逐渐升高的冷冻液中,细胞在两种冷冻液中的停留连续且短暂(37 °C或者室温分别停留60 s和26 s)。冷冻液的基本成分是二甲基亚砷和乙二醇,蔗糖浓度随培养基不同而变化。例如Reubinoff等玻璃化冻存人多能干细胞使用20%二甲基亚砷,20%乙二醇和0.5 mol/L蔗糖。

玻璃化冷冻中,通过高张力的玻璃化液和较快的降温速率使溶液中的水不能形成晶体,而形成玻璃体。玻璃体的形成需要足够快的降温速率。通过把含有克隆块(< 10)的冷冻液小滴(1-20 μL)放在开放式麦管尖端,然后直接浸入液氮的以达到足够快的降温速率^[20-21]。在解冻的过程中为避免冰晶再形成,升温速率也要尽可能快,可直接将冻存的克隆浸入预温好的含有蔗糖的培养基内,以蔗糖作为渗透性缓冲液逐步洗脱冷冻保护剂^[22]。

人多能干细胞的慢冻法与玻璃化法的比较:由于一些研究报道对比玻璃化冷冻人多能干细胞克隆的复苏率> 75%,而程序化冷冻的复苏率只有5%-10%,玻璃化被很多实验室使用,作为冷冻保存人多能干细胞的方法^[23-24]。当然,玻璃化也有它的局限:需要大量的人力,并且对操作人员技术要求高;它不适用于大量冷冻保存细胞;并且细胞直接与液氮接触也有污染的风险^[25]。很多研究者一直在尝试克服这些局限性。

Li等^[23]的研究对比了3个人多能干细胞冷冻方案,包括使用冻存管的慢冻法,使用塑料麦管的玻璃化冷冻法及慢冻法。通过解冻后一两天和七八天的贴壁未分化

克隆数来评估3种方案的冷冻效率,得出结论:玻璃化的效率最高(复苏率80%-90%),两种慢冻法效率均低,不适合冻存人多能干细胞,用程序降温仪能显著提高慢冻法的冷冻效率(复苏率50%,慢冻法为5%)。除使用冻存管的慢冻法以外,另外2种方法解冻后培养过程均不影响细胞多能性及核型正常。同一时期另一研究称尽管使用程序降温仪使慢冻法的效率有所提高(4%-8%提高到10%-20%),但仍不足以用于人多能干细胞的冻存,该研究指出最佳冻存条件:使用SR(Serum Replacement)和二甲基亚砷的浓度逐步增加的一系列冷冻保护液,在冷冻前逐步转移人多能干细胞团块至这些冷冻液中;解冻时使用逆过程逐步置换出冷冻液。该方案将程序降温仪和分步法结合起来,得到的冻存效率为30%-50%^[26]。

2.2.3 冷冻损伤 在冷冻过程中,暴露于低温环境可引起细胞损伤甚至死亡。冷冻损伤可以单独或同时发生在以下一个或几个环节:①冷冻保护剂的细胞毒性损伤^[27-28]。②在冻融的过程中冷冻保护剂的渗透性损伤^[29]。③细胞内冰晶形成的机械损伤^[30]。④解冻过程中细胞内再结晶的机械损伤^[31]。程序化冷冻中主要通过细胞外溶液固相液相迅速转换减少这种损伤,玻璃化则是用高浓度的冷冻保护剂阻止冰晶形成来使细胞免受损伤。

降温速率是冷冻过程中与细胞损害相关的另一个变量。在玻璃化冷冻法中,降温速率非常快,细胞内外呈玻璃化凝固,无冰晶形成或形成很小的冰晶,对细胞膜和细胞器不致造成损伤,细胞也不会高浓度的溶质中长时间暴露而受损。在慢冻法中,如果降温速率较快,细胞完全脱水前胞内形成冰晶,冰晶破坏细胞器和细胞膜从而引起细胞死亡。如果降温速率缓慢,细胞内的水因渗透作用完全脱出而皱缩,也会造成细胞死亡。当降温速率介于既能避免胞内冰晶形成,同时又可以防止细胞严重脱水时才能避免细胞受损伤,称该降温速率为复苏范围或复苏窗。多数真核生物在不使用冷冻保护剂时,不存在或者很难观察到其复苏窗。冷冻保护剂避免细胞内冰晶形成的作用很小,更多是防止或者减少慢冻过程中的脱水和皱缩^[32]。因此,不论是否使用冷冻保护剂,严格控制降温速率都是减少慢冻法中细胞冷冻损伤的关键。使用程序降温仪能实现控制降温速率,技术上更可靠并可重复。一些实验研究了程序降温仪与人多能干细胞冷冻保存的相关性。Ware等^[33]报道使用程序降温设备,二甲基亚砷作为冷冻保护剂,麦管为载体,冷冻效率为60%-70%,并且分化率不增加。该研究总结了成功冻存人多能干细胞的3个关键因素:①在胞内冰晶形成的瞬时温度之上的某个温度使细胞外结冰(-7 °C至-12 °C)。②合适的降温速率(-0.3 °C至-1.8 °C/min)。③速溶(在25-37 °C)。另一个研究描述

了一个改进方案: 样本从0 °C到-35 °C降温速率为-0.5 °C/min, 在投入液氮或者快速解冻之前温度保持在-10 °C以下。该方案复苏率为80%^[34]。有研究使用可编程降温仪成功冻存贴壁诱导多能干细胞, 这个冷冻方案包括6步: ①从0 °C到-10 °C降温速率-1 °C/min。②保持细胞在-10 °C 30 min。③以-3 °C/min的速率降温至-40 °C。④以-1 °C/min的速率降温至-60 °C。⑤以-0.33 °C/min的速率降温至-80 °C。⑥维持细胞在-80 °C 5 min, 然后转移到液氮中。此方案冻存贴壁诱导多能干细胞克隆的复苏率为63%(用乙二醇作为保护剂), 比同等条件下不使用程序冷冻仪时复苏率增加了6倍^[35]。

2.3 人多能干细胞冷冻技术的改进 过去数十年里, 为了提高冻存效率, 许多实验室都致力于改进人多能干细胞冷冻方案, 包括: 使用不同的冷冻保护剂或分子物质、使用无动物源性冷冻液、冷冻贴壁或者悬浮的克隆团块或者单个细胞悬液。

2.3.1 冷冻保护剂的选择与优化 冷冻保护剂大致分为2种: ①渗透性保护剂(如二甲基亚砷和乙二醇)。②非渗透性保护剂(如蔗糖和海藻糖)。它们的作用不同: 渗透性保护剂能够穿过细胞膜渗透到细胞内产生一定的摩尔浓度, 降低细胞内外未结冰溶液中电解质的浓度, 从而保护细胞免受高浓度电解质的损伤, 同时, 细胞内水分也不会过分外渗, 避免了细胞过分脱水皱缩; 非渗透性保护剂则通过在细胞外表面形成粘性透明壳保护细胞^[36-37]。选择合适的保护剂或者保护剂混合物, 能够提高细胞冷冻率。

Katkov等^[38]对4种不同的诱导多能干细胞冷冻保护剂(二甲基亚砷, 乙二醇, 丙二醇, 甘油剂)作了细胞毒性对比。即将细胞暴露在含10%保护剂的溶液中, 37 °C, 30 min, 结果显示: 二甲基亚砷毒性最强, 甘油毒性最小。同样的冷冻保护剂, 在慢冻法中得到相反的结果, 即二甲基亚砷毒性最小, 甘油毒性最大。这说明, 温度对冷冻保护剂的影响很大。用冷冻保护剂和ROCK抑制因子联合冷冻诱导多能干细胞也得到同样的结果, 乙二醇因与二甲基亚砷相同的保护作用但更小的细胞毒性, 成为冷冻保护剂首选。此外, 该研究明确指出, 人多能干细胞复苏效率低主要由冻融的过程引起, 而非冷冻保护剂添加和去除。

Ha等^[39]对慢冻法中冷冻保护剂成分进行了详细研究, 得出5%二甲基亚砷+体积分数50% FBS(Fetal Bovine Serum)的浓度比例对诱导多能干细胞的冻存是最有效的, 维持细胞存活率在10%。后来他们研究不同浓度的其他冷冻保护剂组合, 并与5%二甲基亚砷+体积分数50% FBS对比。研究发现5%二甲基亚砷+体积分数50% FBS+10%乙二醇能使复苏效率提高30%, 且细胞解冻后传3代以上维持其性能, 被认为是最有效地冷冻

保护剂组合^[39]。

2.3.2 添加分子物质提高存活率 添加ROCK抑制剂是冷冻领域的一个重大突破。ROCK是一类丝、苏氨酸蛋白激酶, 已经发现ROCK能够调节分子生物多个路径, 如细胞凋亡, 细胞周期, 细胞粘附, 分化以及基因表达^[40-42]。Watanabe等^[43]首次报道, 加入ROCK抑制剂Y-27632能提高低密度种植的游离人多能干细胞克隆形成率25倍以上^[2]。Li等^[44]证实Y-27632添加到解冻后人多能干细胞的培养基中能提高人多能干细胞的复苏率。Martin-Ibanez等^[45]报道冻存游离的单个胚胎干细胞时, 添加Y-27632到冷冻液中, 可增加细胞的存活率, 但与不添加Y-27632对照组相比, 人多能干细胞的克隆形成率未提高。在解冻后的培养基中加入Y-27632, 人多能干细胞的克隆形成率也没有明显增加。同时添加Y-27632到冷冻液和解冻液中, 则明显提高复苏率, 且复苏后多数克隆表达多能性标记物: Oct-4, nanog, SSEA-4, TRA-1-81和TRA-1-60。这说明添加Y-27632增加了人多能干细胞的生长速度, 且不影响人多能干细胞的正常核型及维持多能性。人多能干细胞诱导多能干细胞分别在有饲养层和无饲养层两种培养条件下, 冻存时添加Y-27632也得到相似结论^[46-47]。但Miyazaki等^[48]研究发现, 如果冻存的游离单个人多能干细胞解冻后以适当的密度种植(3×10^5 个/cm²), 在不使用ROCK抑制剂的情况下, 复苏效率高达(86.8±3.1)%。但之前大多数单个分散人多能干细胞的冷冻方案中均使用ROCK抑制剂(Y-27632), 且多数研究认为ROCK抑制剂能显著提高冻/融的单个或多能干细胞或者诱导多能干细胞细胞的复苏率。

ROCK抑制剂也与其他分子物质联合使用添加到解冻后的培养基中, 如半胱天冬酶抑制剂(Caspase inhibitors), p53抑制剂(p53 inhibitors)或者Bax抑制剂(Bax inhibitors)。Xu等^[49-50]研究发现3种抑制剂组合(Caspase inhibitors+Y-27632, Caspase9 inhibitor+Y-27632和Bax inhibitor+Y-27632)均没有单用ROCK抑制剂时能增强冷冻保护作用。用p53抑制剂+Y-27632抑制剂的复苏率与单用ROCK抑制剂时相似, 然而, 单独用p53抑制剂不能增加复苏率。该研究另一篇文章也阐述了同样的结果, 含体积分数10%75%DMSO+2.5%聚乙二醇和p53抑制剂+y-27632处理解冻后的培养基, 能提高复苏率。

大部分关于ROCK抑制剂对冻存过程影响的研究没有阐述其分子机制。Xu和Li等^[50-51]均报道用Y-27632冻存人多能干细胞, 解冻后1 d细胞凋亡减少和/或半胱天冬酶活性降低。这与之之前Watanabe等研究的ROCK抑制剂有抗凋亡作用的结果一致^[2]。此外, Li等还证实添加Y-27632提高了冻存人多能干细胞的贴附性, 能促进细胞形成集落并贴附于基底膜, 这就阻止了人多能干

细胞凋亡提高了存活率^[3]。Li 指出Y-27632并不能直接抑制凋亡通路,而是通过降低人多能干细胞对外部环境的敏感性,使细胞之间能进行信号交流,从而避免脱落凋亡。此外, Mollamohammadi等^[47]用RT-PCR分析显示,应用ROCK抑制剂时,细胞整合素链 αV , $\alpha 6$ 和 $\beta 1$ 链的表达显著增加。整合素表达增加可能是维持细胞未分化状态、增强细胞与基底层贴附从而提高冻存效率的原因^[52]。使用ROCK抑制剂冻存人多能干细胞,即使多次传代后细胞多能性以及核型稳定性不受影响^[2]。ROCK抑制剂如Y-27632或法舒地尔已被应用于心血管疾病临床治疗^[53],说明它们用于冻存人多能干细胞也是安全的。尽管ROCK抑制剂确切的作用机制还不清楚,但它的使用为完善人多能干细胞冷冻方案及培养方案提供新的思路。

2.3.3 冻存贴壁人多能干细胞克隆、悬浮克隆以及分离的单个细胞 由于慢冻法冷冻悬浮人多能干细胞的复苏率低,许多研究尝试用玻璃化法冷冻贴壁的克隆。Ji等^[54]用10%二甲基亚砷+体积分数30%FBS冻存贴壁在24孔板的人多能干细胞克隆。该研究证实冻存贴壁克隆的复苏率是细胞悬液的5倍。Katkov等^[38]报道了一个用乙二醇作保护剂并应用程序降温仪的多步骤冷冻贴壁诱导多能干细胞克隆方案,这种方法冻存诱导多能干细胞克隆的效率比慢冻法高6倍。有两种原因解释冷冻贴壁克隆效率较高的原因:①悬浮克隆冷冻时细胞不贴壁,在冷冻过程中克隆内部大量细胞死亡或损伤,这是造成悬浮克隆复苏率低的关键原因。②冻存贴壁克隆过程中,细胞之间连续的细胞外信号对增强细胞生存力和降低分化也起到重要作用。该方法主要的缺点是不能大量储存细胞,另外,培养皿的不能像冷冻管那样密封,增加了样本在液氮内储存时的交叉污染。为此,Nie等^[55]尝试用微载体(Cytodex 3)冷冻贴壁人多能干细胞,使大量冻存贴壁细胞成为可能。这些微载体由一层薄的胶原蛋白共价耦合一层交联葡聚糖矩阵形成,它与MatrigelTM基底层或者辐照的MEF一起提高人多能干细胞克隆的贴附性。该研究首次报道了人多能干细胞克隆在两种微载体上能有效的增殖(MatrigelTM和MEF包被),并将这种冷冻方法与慢冻法比较。人多能干细胞微载体悬浮于10% DMSO+体积分数30%FBS的冷冻液内,细胞密度为 1×10^6 mL/10 cm²,细胞悬液被转移至冻存管内,置于程序降温盒(降温速率是-1 °C/min),之后储存于液氮内,于解冻后7 d进行细胞计数评估细胞复苏率,并与慢冻法相比较,观察到在微载体上冷冻的效率是无微载体的1.7倍。尽管复苏率增加不明显,但对该方法进一步优化为将来大量冻存细胞提供可能。

人多能干细胞成克隆团块状生长,当细胞分散成单个时容易受到损伤并凋亡^[2],这也是为什么大多数冷冻保

护方案冷冻人多能干细胞克隆团块以提高效率。此外,因为解冻后准确的活细胞数很难计算,冷冻克隆团块更方便计算复苏率。但冷冻克隆团块限制了克隆内部细胞暴露于冷冻保护剂,因此,T'Joene等^[56]用单个细胞分散液,将细胞处理成单个细胞与微细胞团的混合液后再冷冻,提高了冷冻效率。Miyazaki提倡冷冻单个细胞分散液的方法冷冻保存人多能干细胞,他们最新的研究中利用慢冻法冷冻单个人多能干细胞取得了良好的效果。

2.3.4 在无源性成分的条件下冻存 多能干细胞 应用于临床需要符合生产质量管理规范,即诱导多能干细胞和人多能干细胞的建系、培养、诱导分化、冷冻等过程无源性成分。在冷冻领域,也有研究致力于形成无源性冷冻方案。Reubinoff等尝试优化已有的玻璃化冷冻方案:用密闭麦管冻存人多能干细胞,用人血清白蛋白代替FBS作为冷冻液中的主要蛋白,细胞最后储存于气相的液氮内。这种方法除去了冷冻液中的动物源成分,降低了人多能干细胞与病毒以及其它病原体交叉污染的风险;另外细胞冻存在密闭的麦管中不与液氮接触,避免了潜在的交叉污染。且该方案与玻璃化方案冷冻效率相似。

Holm等^[57]尝试了一个无源性成分并且化学成分明确的冷冻方案,该方案使用的冷冻保护剂叫作STEM-CELLBANKER,包含10%DMSO、葡萄糖和高分子聚合物(未说明),将其溶解于PBS内,慢冻法冷冻保存人多能干细胞于冻存小管内。解冻后,细胞在称为CELLOTION的溶液(含有NaCl)中复苏,离心去除冷冻保护剂后接种于丝裂霉素处理过的HFF饲养层上。在不添加ROCK抑制剂的情况下用该方法冷冻人多能干细胞团块和诱导多能干细胞单细胞悬液,复苏率大幅增加并且对细胞的增殖与分化没有任何不利影响。因此,这是一个简单有效并能大量冻存符合临床应用标准的人多能干细胞的方案。Beier等^[58]介绍了一种新的冷冻方法,该方法引进一种冷冻仪器,能使人多能干细胞在培养、冷冻储存以及解冻后复苏种植都在该仪器中进行,该方法利用玻璃化法成功冷冻大量贴壁的人多能干细胞,并且整个过程细胞不与液氮接触。

3 讨论 Discussion

为了人多能干细胞能更快更广泛应用于基础/临床研究,应致力于探讨可重复的,高效的,符合GMP(Good Manufacturing Practice)要求的,能大规模冻存人多能干细胞的方案。了解人多能干细胞冷冻过程中造成冷冻损伤的原因和机制,是寻找高效的冻存方案的关键。以前众多研究的结果越来越清晰的表明人多能干细胞细胞之间的接触和信号传递是细胞存活并保持未分化状态的关键。需要更清晰的了解冷冻过程中损伤的原理,改进和创新低温生物技术来避免各种冷冻损伤的发生。

另外, 冷冻领域的进一步发展也需要更明确的多方位的评价标准, 而不仅仅是解冻后短时间的复苏率及传代后的多能性保持。随着人多能干细胞的建系、培养及传代方法的进一步改进, 期待符合临床应用标准的简单有效并能大量冷冻人多能干细胞方案的出现。

致谢: 感谢郑州大学一附院及海南省生殖中心的支持, 感谢广州生物医药与健康研究院和南方医科的合作与支持。

作者贡献: 第一作者构思并设计文章内容, 通讯作者提出修改意见, 通讯作者及第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突问题。

学术术语: 人多能干细胞明显的形态特征-成克隆团块样生长, 克隆边界清晰, 内部细胞连接紧密, 细胞核质比高, 单个细胞内可见明显的细胞核。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
- [3] Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(5):13726-1373.
- [4] Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(1):51-59.
- [5] Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, et al. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells*. 2010;28(1):93-99.
- [6] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- [7] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000;227(2):271-278.
- [8] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003;113(5):643-655.
- [9] Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2003;5(1):79-88.
- [10] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000;18(4):399-404.
- [11] Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(1):51-59.
- [12] Raya A, Rodriguez-Piza I, Navarro S, et al. A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells. *Nat Protoc*. 2010;5(4):647-660.
- [13] Sun N, Longaker MT, Wu JC. Human iPS cell-based therapy: considerations before clinical applications. *Cell Cycle*. 2010;9(5):880-885.
- [14] Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90-96.
- [15] Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 2007;47(5):935-945.
- [16] Hubel A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev*. 1997;11(3):224-233.
- [17] Berz D, McCormack EM, Winer ES, et al. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. 2007;82(6):463-472.
- [18] Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, et al. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2187-2194.
- [19] Richards M, Fong CY, Tan S, et al. An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(5):779-789.
- [20] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998;51(1):53-58.
- [21] Vajta G, Holm P, Greve T, et al. Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *J Reprod Fertil*. 1997;111(1):65-70.
- [22] Hunt CJ, Timmons PM. Cryopreservation of human embryonic stem cell lines. *Methods Mol Biol*. 2007;368:261-270.
- [23] Li Y, Tan JC, Li LS. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertil Steril*. 2010;93(3):999-1005.
- [24] Zhou CQ, Mai QY, Li T, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Chin Med J*. 2004;117(7):1050-1055.
- [25] Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(6):779-796.
- [26] Lee JY, Lee JE, Kim DK, et al. High concentration of synthetic serum, stepwise equilibration and slow cooling as an efficient technique for large-scale cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertil Steril*. 2010;93(3):976-985.
- [27] Muldrew K, McGann LE. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys J*. 1994;66(2):532-541.
- [28] Schneider U, Maurer RR. Factors affecting survival of frozen-thawed mouse embryos. *Biol Reprod*. 1983;29(1):121-128.
- [29] Mazur P, Schneider U. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys*. 1986;8(4):259-285.
- [30] Fujikawa S. Freeze-fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice. *Cryobiology*. 1980;17(4):351-362.

- [31] Mazur P, Cole KW. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology*. 1989;26(1):1-29.
- [32] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984;247(3):C125-C142.
- [33] Ware CB, Nelson AM, Blau CA. Controlled-rate freezing of human ES cells. *Biotechniques*. 2005;38(6):879-880, 882-883.
- [34] Yang PF, Hua TC, Wu J, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling. *Cryo Letters*. 2006;27(6):361-368.
- [35] Wang HY, Lun ZR, Lu SS. Cryopreservation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells without dimethyl sulfoxide. *Cryo Letters*. 2011;32(1):81-88.
- [36] Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17(3):243-256.
- [37] Karlsson JO. Cryopreservation: freezing and vitrification. *Science*. 2002;296(5568):655-656.
- [38] Katkov II, Kan NG, Cimadamore F. et al. DMSO-Free Programmed Cryopreservation of Fully Dissociated and Adherent Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int*.2011;981606.
- [39] Ha SY, Jee BC, Suh CS, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1779-1785
- [40] Amano M, Chihara K, Kimura K, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*. 1997;275(5304):1308-1311.
- [41] Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 1999;285(5429):895-898.
- [42] Krawetz RJ, Li X, Rancourt DE. Human embryonic stem cells: caught between a ROCK inhibitor and a hard place. *Bioessays*. 2009;31(3):336-343.
- [43] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2007;25(6):681-686.
- [44] Li X, Meng G, Krawetz R, et al. The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells*. 2008;17(6):1079-1085.
- [45] Martin-Ibanez R, Unger C, Stromberg A, et al. Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2744-2754.
- [46] Claassen DA, Desler MM, Rizzino A. ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Mol Reprod*. 2009;76(8):722-732.
- [47] Mollamohammadi S, Taei A, Pakzad M, et al. A simple and efficient cryopreservation method for feeder-free dissociated human induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells. *Hum Reprod*.2009;24(10):2468-2476.
- [48] Miyazaki T, Nakatsuji N, Suemori H. Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis*.2013;19(1002):22725.
- [49] Xu X, Cowley S, Flaim CJ, et al. Enhancement of cell recovery for dissociated human embryonic stem cells after cryopreservation. *Biotechnol*. 2010;26(3):781-788.
- [50] Xu X, Cowley S, Flaim CJ, et al. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol*. 2010;26(3):827-837.
- [51] Li X, Meng G, Krawetz R, et al. The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells*. 2008;17(6):1079-1085.
- [52] Li X, Krawetz R, Liu S, et al. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod*. 2009;24(3):580-589.
- [53] Hu E, Lee D. Rho kinase as potential therapeutic target for cardiovascular diseases: opportunities and challenges. *Expert Opin Ther Targets*. 2005;9(4):715-736.
- [54] Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(3):299-312.
- [55] Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, et al. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Prog*. 2009;25(1):20-31.
- [56] T'Joene V, De Grande L, Declercq H, et al. An efficient, economical slow-freezing method for large-scale human embryonic stem cell banking. *Stem Cells Dev*. 2012;21(5):721-728.
- [57] Holm F, Strom S, Inzunza J, et al. An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1271-1279.
- [58] Beier AF, Schulz JC, Zimmermann H. Cryopreservation with a twist - towards a sterile, serum-free surface-based vitrification of hESCs. *Cryobiology*. 2013;66(3):256-260.