

Applying nanotechnology to cryopreservation studies: Status and future

张淼, 赵刚 and 顾宁

Citation: 科学通报; doi: 10.1360/N972019-00343

View online: <http://engine.scichina.com/doi/10.1360/N972019-00343>

Published by the 《中国科学》杂志社

Articles you may be interested in

[Nanotechnology in fragrances: current status and future prospects](#)

SCIENTIA SINICA Chimica **49**, 575 (2019);

[Preface: Nanotechnology in fragrances: current status and future prospects.](#)

SCIENTIA SINICA Chimica **49**, 573 (2019);

[Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos : current problems and future perspectives](#)

SCIENCE CHINA Life Sciences **57**, 903 (2014);

[Integrated research of parallel computing: Status and future](#)

Chinese Science Bulletin **54**, 1845 (2009);

[Current status and future of acid rain in China](#)

Chinese Science Bulletin **42**, 2076 (1997);

纳米技术应用于低温生物保存的研究现状与发展趋势

张淼¹, 赵刚², 顾宁^{1*}

1. 东南大学生物科学与医学工程学院, 江苏省生物材料与器件重点实验室, 南京 210009;

2. 中国科学技术大学电子科学与技术系, 合肥 230027

* 联系人, E-mail: guning@seu.edu.cn

2019-04-19 收稿, 2019-05-26 修回, 2019-06-06 接受, 2019-07-15 网络版发表

国家重大科学研究计划(2017YFA0104300)、国家自然科学基金重点项目(51832001)和江苏省自然科学基金(BK20180374)资助

摘要 低温保存作为生物样本保存最有效的途径之一, 为基础研究和临床应用提供了基础和保障. 传统低温保存技术有着明显缺陷, 纳米技术的应用不仅有望突破当前低温保存技术的瓶颈问题, 而且还将拓展传统低温生物学的研究范畴. 本文综述了低温保存应用纳米技术的研究现状, 重点阐述纳米颗粒在优化保护剂应用方案、改善低温保护剂性能、调控降温结晶过程、辅助高效复温过程和其他方面的应用. 同时, 本文还展望了纳米技术应用于低温保存领域的趋势, 并在此基础上探讨了研究中需要解决的关键问题.

关键词 低温生物学, 低温保存, 纳米技术, 磁性纳米颗粒

在生物和医学中, “低温”指低于正常体温(37°C)直至低于4 K(0 K=-273.15°C)的温度范围. 低温能够显著抑制生物体的生物和化学反应, 细胞或组织的新陈代谢活动会随温度的降低急剧减慢甚至完全停止^[1]. 因此, 将生物样本冷却到非常低的温度保存, 是长期有效储存生物分子、细胞、组织、器官的有效途径, 并且已广泛应用于组织工程、再生医学和临床治疗等多个领域^[2-9]. 细胞的保存是低温保存研究的一个重要领域, 低温可以保证细胞的长时间保存, 然而降温 and 复温方法及步骤却极易给细胞造成损伤, 直接影响了低温保存的有效性. 为了有效地抑制这些损伤, 添加适当的低温保护剂并且针对不同样本设计优化降温 and 复温程序非常重要. 低温保护剂溶液可以降低溶质(电解质)浓度, 从而减缓低温下细胞体积的变化, 并且通过降低水分子的冰点温度、促进细胞脱水减少细胞内结晶、增加细胞膜的通透性等, 以达到保护的作用^[10]. 传统的低温保存方法具有局限性, 使用高浓度低温保护剂具有

一定细胞毒性并对细胞有渗透性损伤, 同时降温 and 复温的效率也十分有限. 例如, 无法抑制冰晶的形成与生长对细胞产生的机械或生物化学应力损伤, 由于升温速率不够快导致的“重结晶”损伤, 从而难以达到理想的保存效果. 纳米技术的应用为低温保存的研究开辟了一条新途径. 纳米粒子具备量子尺寸效应、表面效应、小尺寸效应以及宏观量子隧道效应等特征. 其中, 磁性纳米粒子(以铁系氧化物为主)由于具备优良的颗粒尺寸可控性、生物相容性和降解性、表面可修饰性、内在磁响应性等^[11,12], 是应用最为广泛的纳米材料之一^[13-18]. 目前, 越来越多的研究发现, 纳米颗粒能够: (1) 调控细胞膜渗透性, 优化保护剂添加、去除过程^[19]; (2) 影响溶液内分子间相互作用, 加速晶核形成, 定向控制冰晶的形成和生长, 提升冷冻效率^[20,21]; (3) 有效改变溶液的传热特性以及热力学性质, 例如提高溶液的热导率和黏度, 抑制冰晶的形成和生长, 改善溶液玻璃化的转变条件等, 提升低温保存的成功率^[22-24]; (4)

引用格式: 张淼, 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. 科学通报, 2019, 64

Zhang M, Zhao G, Gu N. Applying nanotechnology to cryopreservation studies: Status and future (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64, doi: [10.1360/N972019-00343](https://doi.org/10.1360/N972019-00343)

提高材料的生物相容性. 另外, 利用磁性纳米粒子的磁感应加热效应, 已经实现了对不同体积的冻存生物样本均匀、高效复温^[25-27]. 纳米技术的应用, 为探索低温保存领域提供了全新的思路 and 空间.

1 低温保存过程对细胞的损伤

细胞等生物样本可以在低温下长期保存, 但却极易在添加/去除低温保护剂、降温以及复温过程中遭受致命性损伤. 低温保存的主要步骤如图1所示, 包括: 低温保护剂的添加、降温、长期稳定的贮存样品、复温以及低温保护剂(CPA)的移除^[28].

在冷冻前添加适当的低温保护剂是低温保存的关键, 但是高浓度保护剂易对细胞造成渗透性损伤, 并且具有一定细胞毒性. 保护剂的细胞毒性以及细胞对该保护剂的渗透性都可以决定其保护作用. 1949年, Polge等人^[29]无意间发现10%~20%甘油可以在低温下有效保护精子; 之后, Lovelock和Bishop^[30]又发现二甲基亚砜(DMSO)可以作为保存细胞的保护剂. 对于细胞膜可渗透的保护剂来说, 如DMSO、乙二醇、丙二醇等, 添加和移除保护剂的过程中会造成细胞体积的变化, 如果保护剂的浓度过高或过低, 添加时细胞的收缩及移除时细胞的扩张程度超过了细胞本身的耐受极限, 将导致常温下细胞的渗透性损伤. 研究表明, 在冷冻前, 添加渗透性保护剂后, 细胞先渗透性失水体积收缩, 随后保护剂分子随着水分子一起进入细胞, 细胞体积也随之增大直至平衡^[31]. 添加非渗透性的保护剂后, 如糖类、羟乙基淀粉(HES)等, 细胞最终体积和保护剂渗透压成反函数关系. 此类保护剂本身并没有保护作用, 但一般具有较高的玻璃化转变温度, 因此通常会与渗透性保护剂联用, 有助于将生物样本稳定地保护在黏稠的玻璃态中. 因此, 选择合适的低温保护剂, 优化添加、移除方案, 减少对细胞带来的渗透性损伤十分

必要.

降温速率过高或过低, 对细胞来说都是致命的. Diller和Cravalho^[32]首次利用低温显微镜对生物样本进行可控速率的升温或降温, 记录、观测了生物样本冷冻和复温的动态过程以及冰晶的生长情况. 如图2所示, Mazur^[33]归纳的两因素假说阐述了降温速率对细胞的低温损伤机制, 奠定了低温生物学的基础: (1) 缓慢降温导致“溶液效应”. 虽然细胞有充足的脱水时间, 不易形成胞内冰晶, 但细胞会长时间暴露在高浓度溶液下, 脱水程度严重并且被胞外产生的冰晶损伤; (2) 快速降温产生胞内冰晶(intracellular ice formation, IIF). 由于降温速率过快, 细胞内的水分子没有足够的时间渗出细胞外, 使得细胞内外渗透压不平衡且形成细胞内冰晶, 造成致命性的细胞损伤. 此外, 每一类型的细胞都具有一个特定的最佳降温速率, 该降温速率下细胞的低温损伤程度最小, 同时存活率最高, 细胞的存活率与降温速率呈现倒“U”型. 这是因为不同细胞的细胞膜对水的渗透率的差异性很大, 所以研究细胞膜对水分子的渗透性、冰晶的生长规律和抑制冰晶生长, 对成功的低温保存至关重要. 在现有的冷冻方式中, 玻璃化保存被视为保存细胞、组织、器官最有效的方法之一^[34]. 玻璃化保存的概念, 最早由Luyet^[35]在1939年提出, 该方法采取超快速降温($>10^6$ °C/min)方式, 同时在冷冻前添加高浓度的保护剂溶液(例如80%(w/w)甘油), 即使在玻璃化过程中产生大量的冰核, 但由于溶液的高黏度抑制了冰核的发展、冰晶的形成和生长, 从而保证了样本的长期保存.

复温过程中, 如果升温速率不够快, 会导致冰核迅速生长成冰晶损伤细胞(也称为“重结晶”), 从而形成反玻璃化现象. 目前, 传统复温方法, 如水浴加热法、微波加热法等, 对单细胞悬液效果较好, 但对较为复杂、排列紧密组织的复温存在局限性, 易导致组织产生较

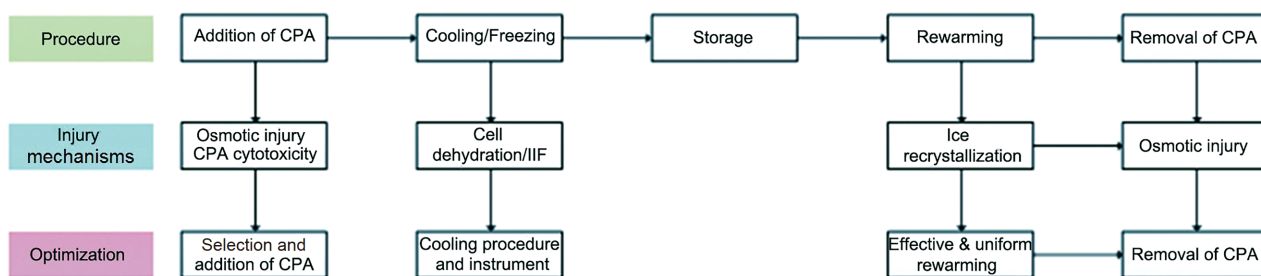


图1 (网络版彩色)低温保存的主要步骤、损伤机制及方案优化^[28]

Figure 1 (Color online) Procedure, injury mechanisms and optimization in cryopreservation^[28]

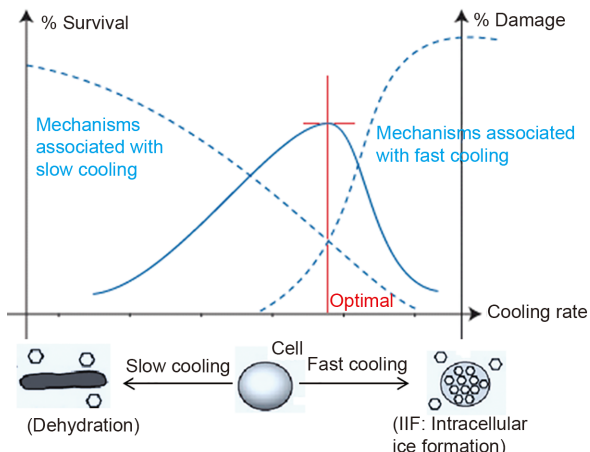


图2 (网络版彩色)细胞冷冻损伤机制的两因素假说示意图^[33]. 对于特定的细胞类型, 存在一个最佳降温速率. 当降温速率低于最佳速率, 冷冻损伤源于“溶液效应”. 当降温速率高于最佳速率时, 胞内冰晶的产生将会造成致命性的冷冻损伤

Figure 2 (Color online) Two-factor hypothesis of cell injury during freezing^[33]. There is a cell specific optimal cooling rate. At slow cooling rates below the optimal rate, cell injury results from “solution effects”. At high cooling rates above the optimal rate, the formation of intracellular ice leads to lethal cell injury

大的温度梯度、热应力损伤. 有研究认为, 相比降温过程导致的冰晶, 复温过程中产生的冰晶对细胞的损伤更大^[36]. 因此, 影响低温保存效果的另一关键因素是提升复温过程中的升温速率, 以达到快速、均匀、高效复温.

2 纳米技术在低温保存中的应用现状

近年来, 研究发现不同种类、尺寸、浓度、体积分数及分布的纳米颗粒在低温保存中具有以下优势: (1) 调节细胞膜渗透性, 优化保护剂添加、去除过程; (2) 有效改善保护剂溶液的传热特性以及热力学性质, 增加溶液黏度从而改善溶液玻璃化的转变; (3) 提升降温、复温效率等. 因此, 纳米技术有望成为突破当前低温保存瓶颈的关键技术.

2.1 纳米技术优化低温保护剂添加/去除方案

低温保护剂的添加、去除过程中, 细胞损伤主要来自于体积变化过大超过细胞承受阈值, 或者保护剂的细胞毒性. 细胞体积随外界环境(渗透压)的变化反映了细胞膜对水分的渗透特性. 因此, 根据细胞膜对水分子及保护剂溶液分子的渗透率来确定细胞体积的变化极限, 对避免细胞的渗透损伤具有重要意义. Yue等人^[19,37,38]利用自主制备的微灌流腔系统, 将

微灌流腔和显微镜装置结合, 分别研究了不同温度(非冻结状态)下, 羟基磷灰石(HA)纳米颗粒对猪肾内皮细胞(PIECs), 以及 Fe_3O_4 纳米颗粒对Sf21细胞的渗透响应的影响. 图3(a)记录了PIECs在高磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的细胞体积响应情况. 当细胞的渗透环境由PBS变成含有0.01%纳米颗粒的3×PBS后, 细胞脱水, 体积开始收缩. 研究表明, 如图3(b)所示, 添加纳米颗粒可以明显调控细胞膜水渗透系数(L_p), 增加 L_p 的温度敏感性, 纳米颗粒在 -2 和 5°C 时, 降低了 L_p 数值; 而在 14 和 23°C 时, 则促使 L_p 数值升高. 这可能是由于较低温度下细胞的吞噬作用被抑制, 或者纳米颗粒对细胞膜上蛋白质分子(例如水通道蛋白)有强烈的吸附作用, 使蛋白质分子构象发生变化, 从而影响了水分子运输的功能, 这些被吸附的蛋白质分子也可能介导了纳米颗粒的吞噬. 结果还发现, 纳米颗粒会降低参考温度下细胞膜对水分的渗透系数(L_p)且增加水分子透膜运输的活化能(E_{Lp}), E_{Lp} 越高表示 L_p 随温度升高的增加程度越高. 此外, 研究发现 Fe_3O_4 纳米颗粒对Sf21细胞膜的渗透系数也有明显的调控作用, 加入 Fe_3O_4 纳米颗粒后, L_p 对于温度的敏感性大大降低, 且 L_p 受所添加的纳米颗粒浓度的影响不大(图3(c)). 通过定量分析纳米颗粒对特定细胞的细胞膜传输性质的影响, 根据得到的渗透参数可以拟合不同情况下细胞体积的变化, 对保护剂的添加、去除过程进行优化, 避免细胞体积过度变化造成的损伤.

2.2 纳米技术调控、优化降温过程

通过分析糖类、DMSO、NaCl等溶液的冻结过程发现, 保护剂溶液的性质及降温速率能够决定冰晶的生长、形态和结构, 也直接影响了冷冻效果^[39,40]. 若不能根据实际需要调控降温过程, 将无法保证最佳的冷冻效果, 而作为近几年出现的低温保存新策略, 纳米低温保存可以改善该问题. 利用纳米材料本身的性质, 及其对保护剂溶液的传热及热力学性质等的影响, 一方面既可以提升降温过程中的冷冻效率, 另一方面也可以改善冰晶的形成与生长、增加细胞的降温速率响应、影响溶液玻璃化的转变, 以达到提升生物材料低温保存成功率的效果.

2.2.1 纳米材料提升降温/冷冻效率

Yan和Liu^[41]最早研究了纳米颗粒在降温过程中对生物组织的影响, 评估了聚四氟乙烯(PTFE)、四氧化三铁、铜、金刚石等纳米颗粒后, 发现不同种类、粒

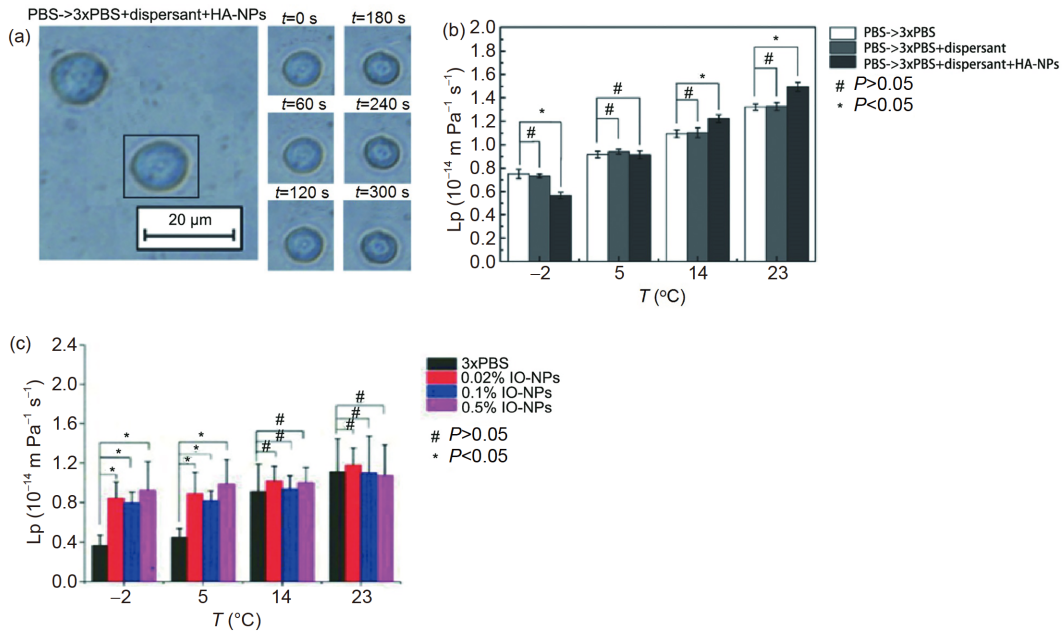


图3 (网络版彩色) 纳米颗粒对细胞的体积响应及细胞膜水渗透性系数的影响。(a) PIECs细胞的体积响应(由PBS变为3×PBS+0.01%HA纳米颗粒)^[38]; (b) 不同温度下, 纳米颗粒对PIECs细胞的水渗透系数Lp的影响^[38]; (c) 不同温度下, 不同浓度纳米颗粒对Sf21细胞的水渗透系数Lp的影响^[19]

Figure 3 (Color online) Effect of nanoparticles on cell volume response and membrane hydraulic permeability parameters. (a) The osmotic volume responses of PIECs (an osmotic shift from PBS solution to 3×PBS+0.01%HA-Nanoparticles)^[38]; (b) effect of different temperature and nanoparticles on cell membrane hydraulic conductivity (Lp) of PIECs^[38]; (c) effect of different temperature and concentrations of nanoparticles on Lp values of Sf21 cells^[19]

径、浓度和加载量的纳米颗粒都会影响组织的冻结过程。如图4所示, 在相同的降温速率下, 相比热导率较差的纳米颗粒(如PTFE), 具有良好热传导性能的纳米颗粒(如金刚石)会显著增加细胞的降温速率响应。同时, 这种调控效果还受纳米颗粒悬液的载液量, 及颗粒本身的热性能(如密度、热容)影响。纳米颗粒的浓度与其传热性能息息相关。Sun等人^[42]对猪肉、猪的肝脏和心脏3种离体组织的冷冻效果进行了研究, 由于不同类型

的生物组织在生物和物理等方面的性质各不相同, 因此注射Fe₃O₄纳米颗粒溶液后, 其冷冻过程中的温度响应也有所不同。其中, 猪肉的降温速率响应最佳, 达到相同冷冻效果所需要的纳米颗粒加载量最小。

目前, 低温治疗是手术中利用超低温来摧毁病灶的一种治疗方法, 通常在临床上将冷冻探针(又称冷刀)插入病灶组织, 通过控制刀头循环降温 and 升温。在降温过程中, 组织会在探针周围形成冰球, 通过冷冻和解冻

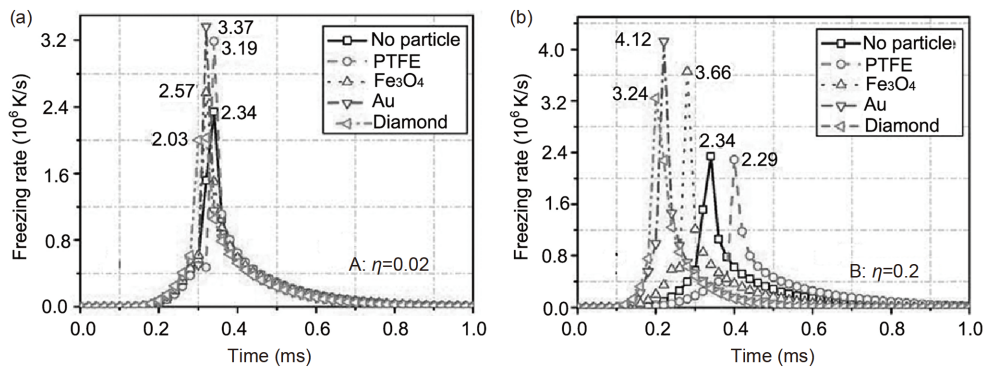


图4 纳米颗粒的种类及载液量(η=2%(a)及20%(b))对细胞降温速率响应的影响^[41]

Figure 4 Effect of different kinds of nanoparticles on freezing-rate response at the core of the cell, where the volume fraction of particles is distributed uniformly by η = 1% in the cell, and η = 2% (a), η = 20% (b) outside the cell, respectively^[41]

病灶, 利用冰晶的形成、血液的凝结等机理来破坏病灶. 如果降温过程不彻底或不恰当, 将无法摧毁病灶, 甚至会影响周围原本健康的组织, 从而导致手术失败. Yu等人^[21]将纳米金属铝颗粒溶液注射到猪肉组织, 观测由冷冻探针引起的目标组织的温度响应, 结果如图5(a)所示. 在距冷冻探针相同距离的情况下, 纳米颗粒显著降低了组织所能达到的最低温度, 这是由于纳米颗粒的热导率高于水和组织, 加快了降温速率, 从而提高了冷冻效率. 肿瘤组织的形状大多比较复杂, 确保最优的冷冻范围对于治疗效果来说十分重要. 如图5(b)所示, 注射纳米颗粒溶液后, 可以扩大冷冻探针引起的冰球范围且控制冰球的生长方向, 避免由于肿瘤组织的复杂性及插针位置等因素造成的各个探针之间的治疗“盲区”, 从而促进低温治疗效果, 强化对目标组织的冷冻杀伤力^[20]. 纳米低温治疗打破了传统低温治疗的局限性, 通过添加不同特性的纳米颗粒, 可以灵活调控手术的冷冻过程, 在临床上也显示了独特的价值.

2.2.2 纳米材料改善低温保护剂溶液的性质

首先, 纳米材料可以提高保护剂溶液的黏度, 这是由于纳米颗粒具有较大的表面能, 使其易于在溶液中聚集, 进而影响溶液的分散性及稳定性. 低温保护剂溶液在零下温度的黏度特性, 对低温保存过程中冰晶的形成以及分子扩散非常重要. Yi等人^[23]通过自主搭建的黏度测试系统, 研究了0~−30°C, HA纳米颗粒对常用的两种三元保护剂溶液体系(DMSO-H₂O-NaCl和glycerol-H₂O-NaCl)黏度的影响. 实验结果发现, 加入

0.1%(w/w)HA纳米颗粒可以增加保护剂溶液的黏度, 从而避免降温和复温过程中细胞失水、冰晶的形成和生长, 但纳米颗粒与体系中其他分子的相互作用与其在溶液中对扩散过程的影响仍待进一步研究.

此外, 纳米材料可以提高保护剂溶液的传热性能. Gao等人^[43]在聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)保护剂中添加HA纳米颗粒, 结果发现纳米颗粒在降温过程中的特定温度下可以提高保护剂溶液的导热系数以及热扩散系数, 改变溶液的比热容, 从而增强降温速率. Liu等人^[44]通过差示扫描量热仪研究发现, 添加HA纳米粒子能够明显降低丙三醇溶液的比热容. 这对减小低温保护剂浓度, 降低细胞的渗透性损伤等有着重要作用. 并且, 增强降温速率有利于玻璃化的实现, 能够促进低温保存效果.

另外, 纳米材料可以调节保护剂溶液的过冷度和成核温度. 在过冷度较高的情况下形成的冰晶, 外形较为锋利, 为了减少由此造成的损伤, 一般在降温时会使用“种冰”的方式来提前诱导冰晶成核, 以改善冰晶的形成状况(大小、形状等). 通常使用的物理方法通过放置预冷却金属刺激样品以形成冷点, 其往往只作用于冷点周围; 加入成核剂等的化学方法, 在试剂的毒性或成本等许多方面具有局限性^[45]. 基于纳米颗粒的表面亲水性、小尺寸、易于悬浮及低毒性等方面优势, Han等人^[46]研究了添加纳米颗粒对保护剂溶液过冷度、成核效果的影响, 发现添加纳米颗粒后, 溶液成核温度明显增高, 且过冷度降低. 如图6(a)所示, 将两根灌注乙二

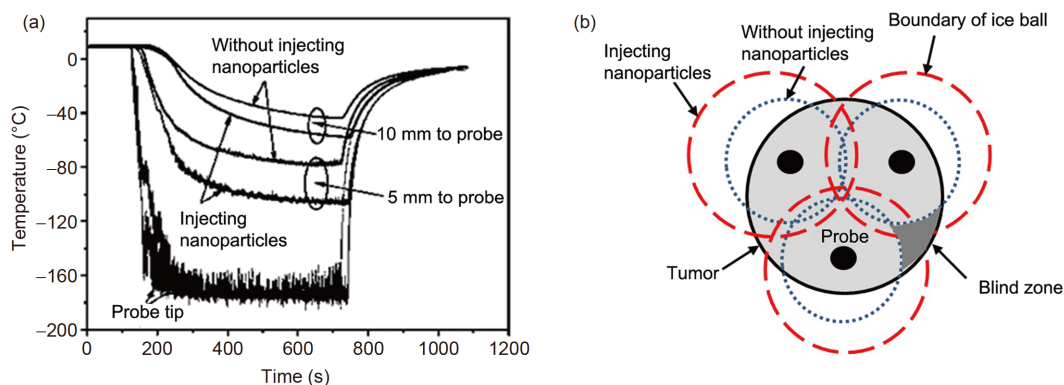


图 5 (网络版彩色)纳米颗粒提升目标组织的冷冻效率. (a) 加载纳米颗粒前后, 冷冻探针在不同检测距离情况下, 作用于猪肉组织的冷冻效果曲线^[21]; (b) 肿瘤组织中, 多枚冷冻探针共同作用下形成的冰球截面图. 加载纳米颗粒溶液可以扩大探针的作用范围, 克服治疗“盲区”^[20]
Figure 5 (Color online) Effect of nanoparticles on improving the freezing efficiency of targeted tissues. (a) Temperature-response curves in pork tissues (with and without injected nanoparticles) recorded at different measurement positions (5 and 10 nm)^[21]; (b) the cross section of ice balls formed under the function of several freezing probes in tumor tissue: loading nanoparticles expands the functional area and overcomes the “blind zone” compared to conventional cryosurgery^[20]

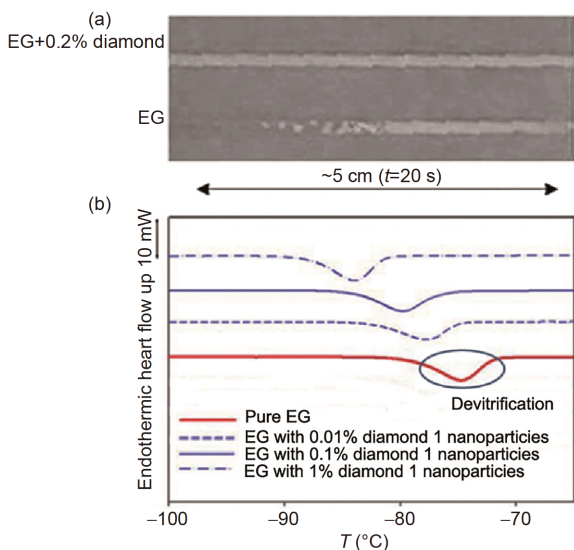


图6 (网络版彩色)金刚石纳米颗粒对降温过程中乙二醇溶液结冰速率(a)以及复温过程中乙二醇反玻璃化温度(b)的影响^[46]
 Figure 6 (Color online) Effect of diamond nanoparticles on ice growth rate of ethylene glycol (EG) solution during freezing (a) and devitrification temperature of EG solution during rewarming (b)^[46]

醇溶液的毛细管的一端同时插入液氮中, 载有0.2%金刚石纳米颗粒溶液的毛细管中形成5 cm冰晶所需的时间, 仅为不含纳米颗粒情况下的1/2, 纳米颗粒加速了乙二醇溶液的结冰. 此外, 通过在不同保护剂溶液中添加纳米颗粒, 在同一降温速率下, 纳米颗粒可以显著提高溶液的成核温度.

纳米材料还能够改变低温保护剂溶液的玻璃化和

反玻璃化(由玻璃态向晶态的转化)转变温度. 促进保护剂溶液的玻璃化, 对生物材料保持在玻璃态, 以及在复温过程中避免反玻璃化非常重要. Gao等人^[43]研究发现, 在PVP保护剂溶液中添加HA纳米颗粒, 溶液的玻璃化和反玻璃化转变温度均随着纳米颗粒浓度的升高而降低. Han等人^[46]的DSC测试结果显示(图6(b)), 在纳米颗粒作用下, 复温过程中乙二醇溶液的反玻璃化温度明显降低. Lv等人^[22]通过分析丙三醇溶液反玻璃化过程中析出的冰晶分数, 发现添加了60 nm, 0.5%纳米颗粒后, 丙三醇溶液的析晶分数仅为未添加溶液的1/7, 从而减弱了复温过程中的重结晶损伤. 在加入纳米颗粒改善保护剂性质的同时, 选择具有良好生物相容性的纳米颗粒也非常重要, 需要考虑纳米颗粒的毒性, 以及生物样本对外来颗粒的不良反应等问题.

2.3 纳米技术辅助玻璃化冷冻材料复温

玻璃化技术可以长期稳定地保存样本, 然而比冷冻过程更具有挑战性的是复温过程, 若不能高效复温, 将导致热应力损伤、样本产生裂纹以及重结晶等问题. 利用纳米技术可以成功克服传统复温方法的缺陷, 例如利用纳米颗粒的磁感应加热效应, 可以实现对较大体积的组织、器官等高效、快速、均匀加热, 大大提升了玻璃化保存的成功率. 以血管组织的复温为例, 如图7(a)所示, Manuchehrabadi等人^[27]在低温保护剂中添加磁性纳米颗粒, 将玻璃化冻存的组织置于交变磁场中, 通过调控磁场的强度及频率, 磁感应线圈激发纳米

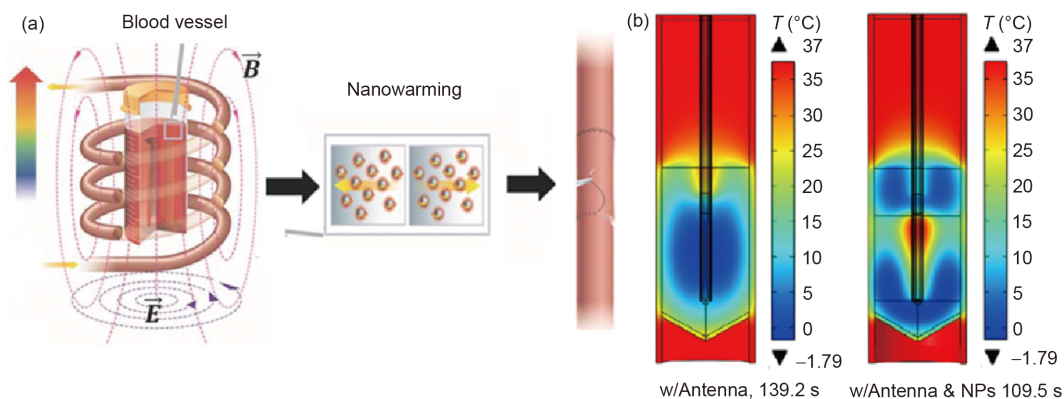


图7 (网络版彩色)磁性纳米颗粒辅助冷冻材料的高效复温. (a) 血管组织纳米磁感应加热复温^[27]: 将载有保护剂及纳米颗粒的冷冻组织置于交变磁场中, 磁感应线圈激发纳米颗粒快速、均匀加热, 避免组织复温过程中的损伤并保证其后续可测试、使用性; (b) 利用微波天线电磁加热效应, EC2冷冻溶液样品复温过程中的温度分布^[48]
 Figure 7 (Color online) Improved and rapid rewarming of frozen samples using magnetic nanoparticles. (a) Blood vessel tissue rewarming using inductive heating of magnetic nanoparticles^[27]: Vitrified tissue loaded with cryoprotectant and nanoparticles is placed in an alternating magnetic field, an inductive coil stimulates rapid and uniform heating of nanoparticles in the tissue, which avoids warming failure and ensures further testing or use of the tissue; (b) temperature distribution in the frozen EC2 solution sample, during microwave antenna rewarming process^[48]

颗粒产热, 将磁场能量转换为热能, 在数秒内就可以完成对冻存组织的高效复温. 测试结果表明, 血管组织的长度和弹性模量等生物力学性能与新鲜对照组无显著差异, 保证了组织的后续可测试或使用性. 该纳米加热法(nanowarming)可以有效减少复温中组织的损伤、破裂, 能以 $>130^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率, 快速、稳定且均匀地加热包括体积为 $1\sim 80\text{ mL}$ 的物理系统, 以及 $1\sim 50\text{ mL}$ 的生物系统(如成纤维细胞、猪血管、猪心瓣膜等). 除了生物活性, 相对于传统对流加热或慢速复温, 组织的结构和特性也得到了更好保护. Wang等人^[25]结合 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒, 利用磁感应加热实现了人脐带基质间充质干细胞(hUCM-MSCs)的玻璃化保存及复温. 研究结果发现, 仅需 $0.05\%(\text{w}/\text{v})$ 纳米颗粒就可以显著降低反玻璃化及重结晶的风险, 将细胞的存活率由约 40% 提高至约 80% , 同时细胞的干细胞性及多向分化潜能也得到了完整的保留. Wang等人^[47]运用数值模拟的方法, 研究了纳米颗粒在单模谐振腔中电磁复温的效果. 模拟结果表明, 相比未添加纳米颗粒, 加载纳米颗粒可以将冻存样本的复温速率由 29.45 提高至 $47.76^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 而样本不同点所产生的最大温度梯度由 3.58 降低至 $1.64^{\circ}\text{C}/\text{mm}$. 在电磁场作用下, 纳米颗粒本身的产热以及对样本导热特性的改变, 可以大大地提升复温速率和温度分布的均一性, 从而避免热应力损伤. 为了进一步增强复温效果, Wang等人^[48]引入了天线, 利用微波天线电磁加热效应进行复温. 如图7(b)所示的样品温度分布, 添加纳米颗粒可以明显加快EC2冷冻溶液的融化, 这是由于纳米颗粒的导热及导电性都要高于EC2溶液, 同时降低了溶液中各点之间的温差使温度分布更均匀. Eisenberg等人^[49]发现, 利用纳米颗粒的磁感应加热效应复温, 可以避免表面加热导致的样品中心部位重结晶、热膨胀导致的结构损坏和断裂等问题. 由于胚胎的尺寸远超细胞, 传统对流加热方法经常导致胚胎复苏的失败, Khosla等人^[26]将金纳米棒注入斑马鱼胚胎, 利用激光激发金纳米棒加热, 复温速率可以高达 $1.4\times 10^7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 且整个复温过程只需 1 ms , 复温后胚胎的结构完整性、发育和发展潜力都得到了较高水平的维持. 以上这些研究也促进了纳米粒子和流体分子之间相互作用的基础研究, 拓展了纳米粒子在其他领域的应用. 其中, 磁性纳米颗粒的毒性、纳米颗粒在被保存的生物材料中是否能够均匀分布进而影响热源分布、细胞对纳米颗粒的摄取等问题均需要进一步研究.

2.4 低温保存应用纳米技术的其他研究

目前最常用的低温保护剂DMSO, 近年来被越来越多的报道指出具有细胞毒性^[50,51], 在临床使用前必须将其从细胞中移除, 不仅耗费时间还会导致细胞数量和质量的一步损失. 因此, 探索能够将DMSO用量最小化的低温保护剂方案非常重要. 海藻糖是一种天然糖类, 不仅无毒, 且易形成黏稠的玻璃态以提高样本在保存过程中的稳定性. 为了将非渗透性的海藻糖引入细胞, 在细胞内、外共同发挥保护作用, Rao等人^[52]将海藻糖包裹入具有特定性质的纳米微囊, 通过孵育将微囊递送入细胞内, 利用纳米颗粒对溶液pH的特殊响应, 以达到海藻糖在细胞内可控释放的目的. 实验结果表明, 将原代人脂肪源干细胞(hADSCs)与包裹海藻糖的纳米颗粒(nTRE)孵育, 将显著提高冷冻后细胞的存活率, 而单纯地将细胞与纳米颗粒(GNPs)或者海藻糖(fTRE)孵育则无此效果. Stefanic等人^[53]研究发现, 磷灰石纳米颗粒能够与红细胞膜的脂双分子层相互作用, 通过调控脂类分子的结构, 增强细胞膜的通透性, 从而介导海藻糖进入红细胞, 将冻存红细胞的存活率提升至 91% . Wang等人^[54]对平滑肌细胞的研究也有类似发现, 将磷灰石纳米颗粒与细胞及海藻糖共孵育, 纳米颗粒介导的细胞内海藻糖摄取率高达 $137.3\%\pm 34.5\%$, 且冷冻后细胞的存活率可达 83.6% , 比未添加纳米颗粒的处理组提升了 30% 左右. 此外, 研究发现将非编码RNA加载到脂肽纳米颗粒, 与器官进行预处理, 可以增加器官在低温保存、运输、移植等过程中对氧化应激损伤的耐受性^[55]. Stubbs等人^[56]研究发现, 聚乙烯醇(PVA)能够有效抑制复温过程中的重结晶, 但其缺乏结构相似性和灵活性. 将PVA修饰至金纳米颗粒的表面, 其抑制重结晶的效果相比单纯的聚合物更佳. 这可能是由于相比聚合物, 在金纳米颗粒载体上的化学链可以更加灵活自由、高效地发现冰晶并进行作用. Phippen等人^[57]也报道了类似发现.

3 结语与展望

综上所述, 近年来, 国内外的研究者已经成功实现了大部分生物材料的低温保存, 如蛋白质和遗传物质、细胞、组织和器官等, 对临床医学的研究也起到了极大的推动作用. 传统的低温保存技术, 仍然存在如何优化保护剂的使用方案、实现理想的降温和复温效果等局限性问题亟待解决. 将纳米技术应用于低温保

存,可以拓展传统低温保存的研究范畴,提供全新的思路,关键是可以突破当前低温保存中的技术瓶颈.通过不断深入研究发现,纳米材料可以调控细胞膜渗透性,从而优化添加、移除保护剂溶液的过程,减少渗透性损伤;增强保护剂溶液的导热系数、黏度,降低溶液的过冷度,影响低温保护剂的玻璃化性质,从而调控、优化降温及结晶过程;高效产热,从而辅助快速、均匀的复温过程,减少热应力、重结晶损伤.

由于生物体系统的复杂性,研究纳米与低温技术的结合,仍需要从宏观及微观的层面进行深入研究:(1) 纳米材料的功能性研究,例如纳米材料的生物相容性,包括纳米材料本身的毒性,加入生物体后产生的不良反应,选择不同纳米材料对生物体产生的效应.另外,生物降解性、抗冻性、可控释放等均需要被考虑;(2) 冷冻前添加纳米材料,在完成其使命后,如何从相应的生物体去除?这是该领域亟待进一步研究的关键问题

之一.根据现有的报道,复温之后可以利用常规的保护剂移除方法对大部分的纳米颗粒进行清除,例如目前常用的分步法,将生物体逐步暴露于不同浓度梯度的保护剂/纳米颗粒溶液中,在不同渗透压环境下利用渗透压差可以对保护剂及纳米材料进行逐步移除^[27].这样的方法相对比较柔和、安全,减少了渗透损伤.清除后的纳米颗粒是否有残留可以用磁共振成像(MRI)进行检测.但是,是否可以完全去除纳米颗粒,且去除步骤是否会对复苏后生物体的存活率或功能性产生影响,还需要进一步研究,也是纳米材料促进低温保存应用的挑战之一;(3) 调控纳米材料对生物体在冷冻与复温过程中传热传质、热力学和动力学机制研究,包括其改变成核、结晶的机制等;(4) 应用于临床时,根据实际需求制定最佳纳米技术协同低温保存方案.期待纳米技术应用于低温保存领域的研究取得重大突破,最终应用于临床医学并造福人类.

参考文献

- 1 Mazur P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 1984, 247: C125–C142
- 2 Aziz J, Morris G, Rizk M, et al. Cryopreservation of adult unrelated donor products in hematopoietic cell transplantation: The OneMatch experience and systematic review of the literature. *Transfusion*, 2017, 57: 2782–2789
- 3 Waters L, Padula M P, Marks D C, et al. Cryopreservation of UVC pathogen-inactivated platelets. *Transfusion*, 2019, 43: trf.15204
- 4 Cardoso L M F, Pinto M A, Henriques Pons A, et al. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. *Cryobiology*, 2017, 78: 15–21
- 5 Stoll C, Holovati J L, Acker J P, et al. Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch for cryopreservation of human erythrocytes. *Biotechnol Prog*, 2012, 28: 364–371
- 6 Oldenhof H, Bigalk J, Hettel C, et al. Stallion sperm cryopreservation using various permeating agents: Interplay between concentration and cooling rate. *Biopreserv Biobank*, 2017, 15: 422–431
- 7 Wang S, Goecke T, Meixner C, et al. Freeze-dried heart valve scaffolds. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2012, 18: 517–525
- 8 Gao D, Critser J K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J*, 2000, 41: 187–196
- 9 Zhang M, Oldenhof H, Sieme H, et al. Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochim Biophys Acta-Biomembr*, 2016, 1858: 1400–1409
- 10 Akhoondi M, Oldenhof H, Sieme H, et al. Freezing-induced cellular and membrane dehydration in the presence of cryoprotective agents. *Mol Membrane Biol*, 2012, 29: 197–206
- 11 Laurent S, Forge D, Port M, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 2008, 108: 2064–2110
- 12 Chen B, Sun J, Fan F, et al. Ferumoxytol of ultrahigh magnetization produced by hydrocooling and magnetically internal heating co-precipitation. *Nanoscale*, 2018, 10: 7369–7376
- 13 Li Y, Ye D, Li M, et al. Adaptive materials based on iron oxide nanoparticles for bone regeneration. *ChemPhysChem*, 2018, 19: 1965–1979
- 14 Ye D, Li Y, Gu N. Magnetic labeling of natural lipid encapsulations with iron-based nanoparticles. *Nano Res*, 2018, 11: 2970–2991
- 15 Xia Y, Sun J, Zhao L, et al. Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*, 2018, 183: 151–170
- 16 Jin J, Liu T, Li M, et al. Rapid *in situ* biosynthesis of gold nanoparticles in living platelets for multimodal biomedical imaging. *Colloids Surf B-Biointerfaces*, 2018, 163: 385–393
- 17 Wang Q, Chen B, Ma F, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles accelerate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via modulation of long noncoding RNA INZEB2. *Nano Res*, 2017, 10: 626–642
- 18 Yang F, Zhang X, Song L, et al. Controlled drug release and hydrolysis mechanism of polymer-magnetic nanoparticle composite. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 9410–9419

- 19 Wang J, Zhao G, Shu Z, et al. Effect of iron oxide nanoparticles on the permeability properties of Sf21 cells. *Cryobiology*, 2016, 72: 21–26
- 20 Liu J. Nano cryosurgical therapy: New frontier in nano medicine. *Sci Technol Rev*, 2007, 25: 67–74
- 21 Yu T H, Liu J, Zhou Y X. Selective freezing of target biological tissues after injection of solutions with specific thermal properties. *Cryobiology*, 2005, 50: 174–182
- 22 Lv F, Liu B, Li W, et al. Devitrification and recrystallization of nanoparticle-containing glycerol and PEG-600 solutions. *Cryobiology*, 2014, 68: 84–90
- 23 Yi J, Tang H, Zhao G. Influence of hydroxyapatite nanoparticles on the viscosity of dimethyl sulfoxide–H₂O–NaCl and glycerol–H₂O–NaCl ternary systems at subzero temperatures. *Cryobiology*, 2014, 69: 291–298
- 24 Xu H, Hao B, Liu L, et al. Calorimetric studies on thermal properties of nano-cryoprotectant solutions during vitrification. *CryoLetters*, 2016, 37: 406–410
- 25 Wang J, Zhao G, Zhang Z, et al. Magnetic induction heating of superparamagnetic nanoparticles during rewarming augments the recovery of hUCM-MSCs cryopreserved by vitrification. *Acta Biomater*, 2016, 33: 264–274
- 26 Khosla K, Wang Y, Hagedorn M, et al. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. *ACS Nano*, 2017, 11: 7869–7878
- 27 Manuchehrabadi N, Gao Z, Zhang J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles. *Sci Transl Med*, 2017, 9: eaah4586
- 28 Jang T H, Park S C, Yang J H, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrat Med Res*, 2017, 6: 12–18
- 29 Polge C, Smith A U, Parkes A S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949, 164: 666
- 30 Lovelock J E, Bishop M W H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 1959, 183: 1394–1395
- 31 Pegg D E, Diaper M P, Skaer H B, et al. The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol. *Cryobiology*, 1984, 21: 491–502
- 32 Diller K R, Cravalho E G. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells. *Cryobiology*, 1970, 7: 191–199
- 33 Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J General Physiol*, 1963, 47: 347–369
- 34 Finger E B, Bischof J C. Cryopreservation by vitrification. *Curr Opin Organ Trans Plant*, 2018, 23: 353–360
- 35 Luyet B J. Vitrification of water. *Phys Rev*, 1939, 56: 1244–1244
- 36 Akhtar T, Pegg D E, Foreman J. The effect of cooling and warming rates on the survival of cryopreserved L-cells. *Cryobiology*, 1979, 16: 424–429
- 37 Wang J, Zhao G, Zhang P, et al. Measurement of the biophysical properties of porcine adipose-derived stem cells by a microperfusion system. *Cryobiology*, 2014, 69: 442–450
- 38 Yue C, Zhao G, Yi J, et al. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on osmotic responses of pig iliac endothelial cells. *Cryobiology*, 2014, 69: 273–280
- 39 Sei T, Gonda T, Arima Y. Growth rate and morphology of ice crystals growing in a solution of trehalose and water. *J Cryst Growth*, 2002, 240: 218–229
- 40 Gonda T, Sei T. The inhibitory growth mechanism of saccharides on the growth of ice crystals from aqueous solutions. *Prog Cryst Growth Charact Mater*, 2005, 51: 70–80
- 41 Yan J F, Liu J. Nanocryosurgery and its mechanisms for enhancing freezing efficiency of tumor tissues. *NanoMed-Nanotechnol Biol Med*, 2008, 4: 79–87
- 42 Sun Z Q, Yan J F, Rao W, et al. Particularities of tissue types in treatment planning of nano cryosurgery. 2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2008. 887
- 43 Gao Z, Hao B, Liu B, et al. Effects of nanoparticles on specific heat of pvcryoprotectant solutions. *Chin J Low Temper Phys*, 2011, 33: 36–39
- 44 Liu L, Xu H, Hao B, et al. Effects of nanoparticles on specific heat of cryoprotectant solutions. *J Refriger*, 2012, 33: 55–60
- 45 John Morris G, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation—A review. *Cryobiology*, 2013, 66: 85–92
- 46 Han X, Ma H B, Wilson C, et al. Effects of nanoparticles on the nucleation and devitrification temperatures of polyol cryoprotectant solutions. *Microfluid Nanofluid*, 2008, 4: 357–361
- 47 Wang T, Zhao G, Liang X M, et al. Numerical simulation of the effect of superparamagnetic nanoparticles on microwave rewarming of cryopreserved tissues. *Cryobiology*, 2014, 68: 234–243
- 48 Wang T, Zhao G, Deng Z, et al. Theoretical investigation of a novel microwave antenna aided cryovial for rapid and uniform rewarming of frozen cryoprotective agent solutions. *Appl Thermal Eng*, 2015, 89: 968–977
- 49 Eisenberg D P, Bischof J C, Rabin Y. Thermomechanical stress in cryopreservation via vitrification with nanoparticle heating as a stress-moderating effect. *J Biomech Eng*, 2016, 138: 011010
- 50 Galvao J, Davis B, Tilley M, et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*, 2014, 28: 1317–1330

- 51 Jena S, Aksan A. Effect of high DMSO concentration on albumin during freezing and vitrification. [RSC Adv](#), 2017, 7: 43611–43620
- 52 Rao W, Huang H, Wang H, et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. [ACS Appl Mater Interfaces](#), 2015, 7: 5017–5028
- 53 Stefanic M, Ward K, Tawfik H, et al. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation. [Biomaterials](#), 2017, 140: 138–149
- 54 Wang B, Liu G, Balamurugan V, et al. Apatite nanoparticles mediate intracellular delivery of trehalose and increase survival of cryopreserved cells. [Cryobiology](#), 2019, 86: 103–110
- 55 Luu B E, Storey K B. Solving donor organ shortage with insights from freeze tolerance in nature. [BioEssays](#), 2018, 40: 1800092
- 56 Stubbs C, Wilkins L E, Fayter A E R, et al. Multivalent presentation of ice recrystallization inhibiting polymers on nanoparticles retains activity. [Langmuir](#), 2019, 35: 7347–7353
- 57 Phippen S W, Stevens C A, Vance T D R, et al. Multivalent display of antifreeze proteins by fusion to self-assembling protein cages enhances ice-binding activities. [Biochemistry](#), 2016, 55: 6811–6820

Summary for “纳米技术应用于低温生物保存的研究现状与发展趋势”

Applying nanotechnology to cryopreservation studies: Status and future

Miao Zhang¹, Gang Zhao² & Ning Gu^{1*}

¹ School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Nanjing 210009, China;

² Department of Electronic Science and Technology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

* Corresponding author, E-mail: guning@seu.edu.cn

Currently, cryopreservation is considered as one of the most effective methods for preserving biological samples, such as biological molecules, cells, tissues and organs. Cryopreservation of cells has been studied a lot and attracts most interests. The conventional cell cryopreservation technique has a few limitations, including the cytotoxicity of the high concentrations of cryoprotective agents, osmotic stress caused by adding and removing of the protectants, uncontrolled formation and growth of ice during freezing process, ice recrystallization due to not rapid enough warming rate during rewarming process and so on. Nanotechnology has been more and more widely applied in the research of cryobiology field. The nanoparticles own characteristics of quantum size effect, surface effect, small size effect and macroscopic quantum tunneling effect. Among them, magnetic nanoparticles (mainly iron oxide nanoparticles) are one of the most common used nanomaterials, due to their excellent particle size controllability, biocompatibility and biodegradation, surface modifiability and intrinsic magnetic response. It has been expected that the nanotechnology will solve the current bottleneck problems for cryopreservation, as well as bring new ideas for expanding the research area of cryobiology. This article mainly reviews the recent research status concerned with applying the nanotechnology to the cryopreservation studies. It has been reported that loading nanoparticles in cryoprotectant solutions will affect the membrane hydraulic permeability parameters and volume response of cells, therefore, by fitting the parameters with proper model and predicting the cell volume change, the adding and removing process of the cryoprotective agents can be optimized to reduce the osmotic stress to cells. Moreover, nanoparticles are found to be able to change the thermal and physical properties of the cryoprotectants, e.g., specific heat, viscosity, nucleation and vitrification temperatures. As a result, the ice formation and growth can be regulated, and the freezing/cooling efficiency is largely improved. Furthermore, it has been shown that the magnetic induction heating effect of magnetic nanoparticles can provide a rapid enough warming rate under electrical and magnetic field, which avoids the ice recrystallization and rewarms the frozen samples uniformly with high efficiency. Besides, the nanotechnology has more applications such as the nanoparticles can bring the impermeable protectants into cells, increase the tolerance of organs to oxidative stress during cryopreservation and so on. The further studies to be done in future are also discussed: (1) The functionality of nanomaterials, e.g., the biocompatibility, including the toxicity of the nanomaterials, the effects and reactions of adding the different kinds of nanomaterials to organisms and so on; (2) removing the nanomaterials from the biological samples after cryopreservation is one challenge when applying the nanotechnology, the questions like how to remove the nanoparticles with minimum damages, whether the nanoparticles can be completely cleaned and how to detect the rest of them need to be considered; (3) the properties of nanomaterials during freezing and rewarming process, such as mechanisms of heat and mass transfer, thermodynamics concerned with ice nucleation and formation; (4) developing the optimized cryopreservation protocols according to the practical clinical uses is also of great importance. Hopefully, the application of the nanotechnology will achieve new breakthroughs in cryopreservation field, and the advancement benefits mankind and promotes the development of clinical medicine.

cryobiology, cryopreservation, nanotechnology, magnetic nanoparticles

doi: [10.1360/N972019-00343](https://doi.org/10.1360/N972019-00343)