DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2005.0031

玻璃化冷冻法保存人类胚胎干细胞

麦庆云，周灿权，李　涛，邓明芬，方　丛，庄广伦
（中山大学附属第一医院生殖医学中心，广东　广州　510080）

摘　要：【目的】探讨玻璃化冷冻方法保存人类胚胎干细胞的效率。【方法】冷冻保存人类胚胎干细胞，按冷冻方法的不同分为玻璃化冷冻组和慢速冷冻组，比较两组解冻后人类胚胎干细胞的细胞复苏率、克隆生长与分化情况，并比较分析解冻后的与未经冷冻的胚胎干细胞的生长、分化情况，鉴定解冻后人类胚胎干细胞的全能性。【结果】玻璃化冷冻组与慢速冷冻组解冻后的细胞复苏率分别为81.9%和22.8%（$P < 0.001$）。慢速冷冻组解冻后克隆生长较玻璃化冷冻组缓慢且更易分化。两组未分化的胚胎干细胞继续培养的生长与分化情况一致。玻璃化冷冻组解冻后第6代人类胚胎干细胞染色体核型正常，SSEA-4、SSEA-3阳性，表达OCT-4基因。人类胚胎干细胞来源的畸胎瘤包含了来源于3个胚层的组织细胞。【结论】玻璃化冷冻是保存人类胚胎干细胞的有效方法，解冻后的干细胞在继续培养过程中仍可保持其正常核型和全能性。

关键词：玻璃化冷冻；慢速冷冻；人类胚胎干细胞
中图分类号：R329.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-3554(20005)03-封2-05

Vitrified Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells

MAI Qing-yun, ZHOU Can-quan, LI Tao, DENG Ming-fen, FANG Chong, ZHUANG Guang-lun
(Center of Human Assisted Reproduction, The First Affiliated Hospital, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To evaluate the efficiency of vitrification cryopreservation of human embryonic stem cells.【Methods】 Human embryonic stem (ES) cell clumps from identical cell line were randomly allocated to be cryopreserved by vitrification or slow freezing protocols. The recovered rates of the frozen clumps, the levels of the proliferation and differentiation of stem cells after freezing, thawing and culture were compared among these two cryopreservation group and noncryopreserved group. The pluripotency of human embryonic stem cells after thawing was identified.【Results】81.9% of the human ES cell clumps were recovered after vitrification, while only 22.8% of cell clumps were recovered after slow freezing. The difference was statistically significant ($P< 0.001$). The colonies after vitrification manifested not only faster growth but also lower level of differentiation when compared with those colonies after slow freezing protocol. However, the growth and the differentiation of those undifferentiated colonies from both groups were the same as the colonies from the non-cryopreservative stem cells during the prolonged culture period. The passage level 6 of vitrified human embryonic stem cells retained the properties of pluripotent cells including a normal karyotype, expression of the transcription factor OCT-4, stage specific expressed antigen-4 (SSEA-4) and antigen-3 (SSEA-3). Teratomas growth of these cells displayed the development of a variety of tissue types encompassing all three germ layers.【Conclusion】Vitrification is an effective method to cryopreserve human embryonic stem cells. During the prolonged culture, the human embryonic stem cells may retain their normal karyotype and pluripotency after cryopreservation.

Key words: vitrification cryopreservation; slowly cryopreservation; human embryonic stem cell
[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(3):inside front cover, 358-360, inside back cover]

有效的人类胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)冷冻及解冻方法能够保证干细胞在不同研究中心间的运输及传递，促进干细胞基础研究与临床应用的发展。目前所广泛使用的传统慢速冷冻法保存人类胚胎干细胞效率较低，多数胚胎干细胞解冻后死亡和易于分化。Reubinoff等[1]首先报道了应用玻璃化冷冻法保存人类胚胎干细胞取得

（下转第358页　to page 358）

收稿日期：2004-08-25
基金项目：广东省科技攻关基金资助项目(2003A3020305)
作者简介：麦庆云(1975-)，女，广东广州人，博士生. E-mail: maiqingyun@yahoo.com.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

（上接封 2 form inside front cover）

了良好的效果，本研究将其方法进行改良并探讨玻璃化冷冻与慢速冷冻两种不同方法对人类胚胎干细胞冷冻保存的效率，并对解冻后两组人类胚胎干细胞生长与分化情况进行比较，以建立一种高效的人类胚胎干细胞冷冻保存方法。

1 材料及方法

1.1 人类胚胎干细胞的培养

本实验所用的人类胚胎干细胞来源于本中心 2002 年 11月建立的人类胚胎干细胞系。以昆明小鼠胚胎成纤维细胞为饲养层，干细胞培养基由高糖 DMEM、胎牛血清、β-巯基乙醇、非必须氨基酸、谷氨酰氨和白血病抑制因子组成，每 5~7 d 用机械法将胚胎干细胞克隆消化成为含 50~100 个细胞的团块再种植到新的饲养层上。

1.2 胚胎干细胞的冷冻

用机械法对同一培养皿的人类胚胎干细胞进行消化后共获得 142 个人类胚胎干细胞团块，对 70 个人类胚胎干细胞团块进行慢速冷冻，其余 72 个进行玻璃化冷冻。

1.2.1 玻璃化冷冻 ①玻璃麦管的制备：将玻璃细管放在火焰烧烤变软后拉细，冷却后将玻璃管于最细处截断，送气体消毒备用。②冷冻液（vitrification solution, VS）和解冻液（thaw solution, TS）的配制：冷冻过程需应用两种冷冻液，以 PBS 加 200 mL/L 的胎牛血清为基础液， 冷冻液 1 含 100 mL/L DMSO 和 100 mL/L 丙二醇， 冷冻液 2 含 200 mL/L DMSO、200 mL/L 丙二醇和 0.5 mol/L 蔗糖。解冻液由含不同浓度蔗糖的梯度液组成：包括含 0.2 mol/L 蔗糖的基础液、含 0.1 mol/L 蔗糖的基础液和不含蔗糖的基础液。③玻璃化冷冻及解冻过程：所有冷冻操作都在室温进行。每次将 10~15 个胚胎干细胞团块分别在冷冻液 1 中孵育 1 min 和冷冻液 2 中孵育 25 s，把团块聚集到大约 10 μL 冷冻液 2 的小滴内。然后把玻璃麦管的细端埋入滴内，通过虹吸作用将所有细胞团块吸入麦管立即将其投入液氮内并保存。所有解冻操作在 37 ℃ 的衡温加热台上进行。将麦管由液氮取出后迅速将其细端开口埋入添加 0.2 mol/L 蔗糖的基础液内，当麦管内的液体开始液化时，用手指封住麦管的粗端开口通过管内冷空气扩张使管内细胞团块流入皿内。1 min 后将胚胎干细胞团块在含 0.1 mol/L 蔗糖的基础液和和不含蔗糖的基础液内各孵育 5 min， 最后将细胞团块种植到新的饲养层细胞上。

1.2.2 胚胎干细胞的慢速冷冻 将 50~100 个胚胎干细胞团块直接放入添加 100 mL/L DMSO 的胚胎干细胞培养液中混匀，-4 ℃放 1 h，-70 ℃ 冰箱过夜，第 2 天早晨将冷冻管移入液氮长期保存。解冻时将冷冻管于 37 ℃水浴解冻，加等量含胚胎干细胞培养液中和， 以 1 000 r/min （r=15 cm）离心 5 min，去上清，回收胚胎干细胞团块种植到新的饲养层细胞上[2]。

1.3 观察两组胚胎干细胞解冻后生长及分化情况

3 d 后将两组细胞解冻， 将保持完整形态且细胞未散离的胚胎干细胞团块回收，比较两组细胞解冻后团块的复苏率（复苏率=团块回收数目/冷冻团块数目）。将复苏后胚胎干细胞团块种植到小鼠胚胎成纤维细胞上。人类胚胎干细胞集落形态扁平疏松克隆，细胞间界限明显，形似鸟巢，克隆的细胞数目可通过克隆的表面积 $1/4\pi ab$ （a 与 b 分别为近似椭圆形克隆的长半径与短半径）进行粗略的估计。为了评估不同冷冻方法对胚胎干细胞解冻后细胞复制生长的影响， 将种植后第2天、第7天和第9天 两组胚胎干细胞克隆的大小进行对比。

未分化的人类胚胎干细胞体积小，细胞核显著，胞浆少，核质比高，有一个或多个核仁。分化后的人类胚胎干细胞细胞间界限不清，紧密堆积，细胞可呈立方样，细胞核小，胞浆丰富，在倒置显微镜下两者有明显差别。根据倒置显微镜下观察分化细胞在克隆中所占比例，对胚胎干细胞克隆的分化情况进行分级： 未分化指分化细胞 < 30%，大部分分化指分化细胞占 30%~70%， 完全分化指分化细胞 > 70%。将第 9 天玻璃化冷冻组胚胎干细胞与第 9 天慢速冷冻组和第 7 天同期培养的未经冷冻胚胎干细胞进行分化情况的比较。

1.4 玻璃化冷冻组解冻后人类胚胎干细胞的鉴定

利用免疫组化方法检测解冻后第 6 代人类胚胎干细胞表面抗原：SSEA-1,SSEA-3, SSEA-4（Deve-lopmental studies Hybridoma Bank at the University of IOWA）的表达[3]。碱性磷酸酶染色。RT-PCR 检测干细胞转录基因 OCT-4(引物: 5′-CTTGC TGCAGAAGTGGGTGGAGGAA-3′; 5′-CTGCAGTGT GGGTTTCGGGCA-3′)的表达[4]。以及胚胎干细胞核型鉴定[5]。

将解冻后第 10 代人类胚胎干细胞制备成 1×10^6 的细胞悬液，注射至严重联合免疫缺陷小鼠睾丸和单侧前后腿内进行体内分化，观察 6~8 周，摘取瘤体并进行常规病理组织切片染色，分析其细胞组织结构。

1.5 统计分析

采用 SPSS 10.0 软件，对计量资料进行 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 两组胚胎干细胞解冻后细胞复苏率比较

解冻过程中，可见玻璃化冷冻组有部分细胞死亡脱落导致细胞团块完全松散解离，72 个胚胎干细胞团块回收 59 个，复苏率为 81.9%；慢速冷冻组解冻后有大量死亡单细胞，70 个胚胎干细胞团块回收 16 个， 复苏率为 22.8%。四格表法统计 χ^2=18.10, P< 0.05,有统计学意义。

2.2 两组胚胎干细胞解冻后细胞复制生长比较

玻璃化冷冻组与慢速冷冻组解冻后人类胚胎干细胞的第 2 天细胞克隆大小无明显差异，而第 7 天和第 9 天玻璃化冷冻组的细胞克隆较慢速冷冻组克隆大， 经 t 检验有

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

统计学差异,见表 1。

表 1　胚胎干细胞克隆大小比较

Table 1　Comparison of the mean areas of colonies　($\bar{x}\pm s$, mm^2)

	Vitrified group (n=59)	Slow freezing group (n=16)	t	P
2 d	0.042±0.006 2	0.039 8±0.003 8	1.883 2	0.064 2
7 d	0.2254±0.052 9	0.123 6±0.013 3	7.590 6	0.000 3
9 d	1.0231±0.146	0.690 6±0.071 9	8.755 6	0.000 4

2.3　**人类胚胎干细胞克隆分化情况比较**

比较玻璃化冷冻组与慢速冷冻组的胚胎干细胞克隆第 9 天的分化程度并与未经冷冻胚胎干细胞种植后第 7 天分化程度与玻璃化冷冻组进行比较,结果见表 2。

表 2　胚胎干细胞克隆分化程度比较

Table 2　Comparison of the background differentiation of ES cell colonies　n(%)

Group	Predominantly undifferentiated	Partial differentiated	Completely differentiated
Non-cryopreserved on 7 d(n=70)	51(72.8)	14(20.0)	5(7.1)
Slow freezing on 9 d(n=16)	1(6.2)	5(31.2)	10(62.5)
Vitrification on 9 d (n=59)	20(33.8)	29(49.1)	10(16.9)

The comparison between non-cryopreserved group and the vitrification group had statistical significance (χ^2=14.12, $P<0.01$); Statistical difference existed between the slow freezing and vitrification group (χ^2=19.639, $P<0.01$)

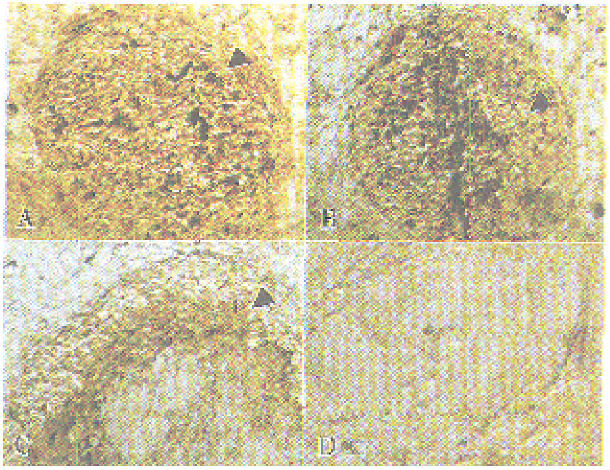

图 1　人类胚胎干细胞特异性表面抗原表达

Fig.1　Expression of SSEA on the surface of human ES cell clonies (100×)

A: SSEA-4 positive; B: SSEA-3 weak positive; C: SSEA-1 undifferentiated cells were negative in the center, with positive staining in the surrounding differentiated cells; D: ES cell surface markers were negative on MEFS

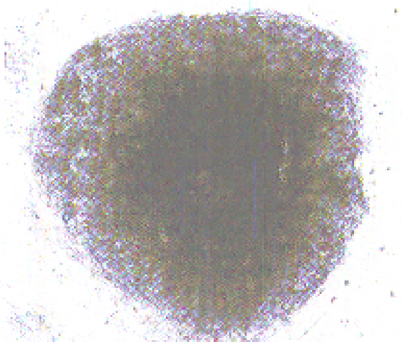

图 2　碱性磷酸酶染色

Fig.2　Purple stain for alkaline phosphatase (200×)

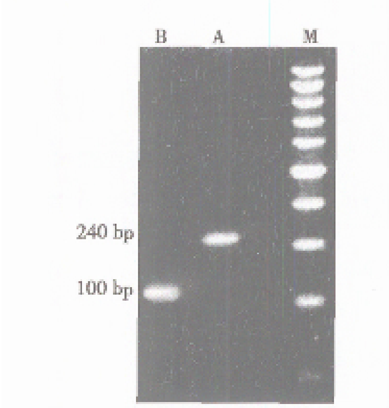

图 3　RT-PCR 检测 OCT-4 基因的表达

Fig.3　RT-PCR analysis of the expression of OCT-4

lane M:β-actine lane; A: Undifferentiated HES-1 cells lane B: Differentiated HES-1 cells

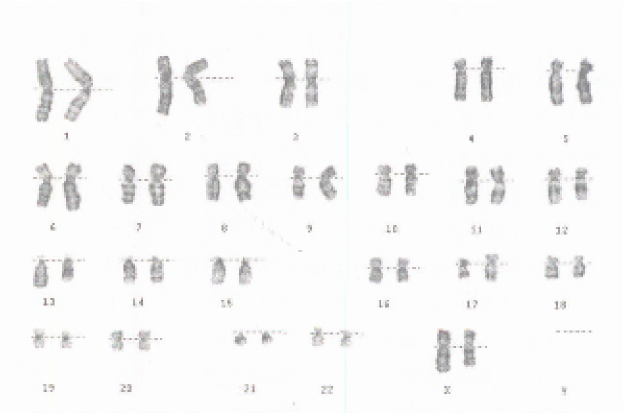

图 4　玻璃化冷冻后人类胚胎干细胞核型正常(46,XX)

Fig.4　Normal karyotype of vitrified human ES cells (46, XX)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 人类胚胎干细胞全能性鉴定

玻璃化冷冻组人类胚胎干细胞可表达特异性表面抗原:SSEA-1 阴性、SSEA-3 弱阳性、SSEA-4 阳性(图 1)。碱性磷酸酶活性为阳性(图 2),RT-PCR 可检测到检测 OCT-4 基因的表达(图 3)。经玻璃化冷冻方法冷冻解冻后培养至第 6 代的人类胚胎干细胞染色体核型正常(图 4)。胚胎干细胞于 SCID 小鼠体内形成畸胎瘤,切片染色可见三个胚层的细胞组织,包括横纹肌细胞、软骨、腺上皮细胞、神经细胞等(图 5)。

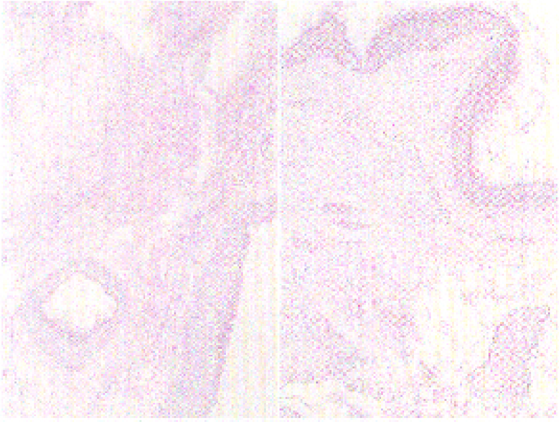

图 5 人类胚胎干细胞来源畸胎瘤组织

Fig.5 Human embryonic stem cell stem from teratomas tissue

Derivatives of three germ layers can be seen (100×,HE)

3 讨 论

目前多用慢速冷冻和快速解冻方法对胚胎干细胞进行冷冻保存及复苏,它对于可消化为单细胞的小鼠胚胎干细胞系保存是行之有效的,但对人类胚胎干细胞效果较差,在我们的研究中仅有 22.8%的胚胎干细胞团块能够回收,并且大部分的胚胎干细胞种植后易于分化。由于人类胚胎干细胞来源困难,早代细胞数目少,在体外的长期培养过程中其全能性易改变,因此探讨一种高效的冷冻方法对人类胚胎干细胞系的保存与应用有重要意义。Rall 等 [6]在 1985 年将玻璃化冷冻方法最早应用于小鼠胚胎的冷冻。1986 和 1988 年,Trounson[7,8]将玻璃化冷冻分别用于用于人类卵子和胚胎的冷冻保存。最近有资料表明玻璃化冷冻对于其他冷冻方法不佳的猪和大鼠胚胎也是一种有效的方法[9,10]。Yokota 等[11]报道该方法用于冷冻保存多细胞胚胎如:桑椹胚和囊胚效果更好。据此,我们认为人类胚胎干细胞来源于囊胚内细胞团,它们的生理特性相似,应该也适用于玻璃化冷冻保存。我们的实验结果显示,玻璃化冷冻组解冻后的胚胎干细胞团块复苏率为 81.9%, 所有复苏的胚胎干细胞团块均可种植形成 ES 克隆,其中 30%的克隆可保持未分化状态,50%的克隆可保持大部分未分化状态,其总效率为 27.7%。慢速冷冻组的 70 个细胞团块解冻后有 16 个胚胎干细胞团块复苏,种植后只 1 个细胞克隆保持未分化状态,其总效率仅为 1.2%。说明玻璃化冷冻组的细胞恢复复制增殖能力与保持全能性的总效率高于慢速冷冻组。

玻璃化冷冻与慢速冷冻的主要差异在于冷冻速度与冷冻保护剂的浓度和种类的不同。玻璃化冷冻是一种超速冷冻方法,冷冻速度约为 1 500 ℃/min,使细胞内外的水分子迅速度过-5 ℃到-15 ℃的结冰期,避免细胞内外冰晶的形成。慢速冷冻速度约为 1 ℃/min,易使细胞外水分子形成大量冰晶对细胞结构形成间接损伤,破坏细胞间的连接结构使细胞松散解离最终无法回收团块。

解冻过程中避免细胞内外渗透压差改变过快对胚胎干细胞的复苏率提高也是很重要的。玻璃化冷冻的解冻液通过蔗糖浓度的改变使细胞外渗透压呈梯度性下降,避免渗透压的过快改变,防止细胞渗透性休克同时能够使低分子量的冷冻保护剂逐步渗出,提高干细胞解冻后的复苏率。在慢速冷冻后解冻的仅用培养液为稀释液,技术上不能避免这一问题,导致细胞外渗透压迅速降低,使大量的细胞外水分子通过细胞膜进入细胞内从而导致细胞水肿膨胀破裂也不利于冷冻保护剂的渗出。

但该方法仍有一定的限制,由于每次冷冻仅能在玻璃管中装载 10~15 个细胞团块,因此在增加了常规胚胎干细胞传代和冷冻保存的劳动强度。并且如果胚胎干细胞团块过大(细胞数大于 200),就会造成细胞团块装管困难。

解冻后的胚胎干细胞在生长过程中有明显自主分化的状况,这些可能是由以下 3 个原因所导致的。冷冻解冻过程中细胞器的损伤影响了人类胚胎干细胞的增生以及克隆形成。冷冻保护剂是一种强有力的胚胎干细胞分化诱导剂,解冻过程残留的冷冻保护剂诱导人类胚胎干细胞的分化。冷冻解冻过程中细胞的死亡导致细胞团块变小以及团块中细胞散离,在常规的培养条件下人类胚胎干细胞无法维持未分化状态。

我们对冷冻麦管进行了改良。使用玻璃管代替以往的塑料管。玻璃管管径更细,管壁更薄从而使玻璃化作用更明显,提高胚胎干细胞的保存效率。但玻璃细管每只仅能保存 10~15 个细胞团块,增加实验者的工作强度。

参考文献:

[1] Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, *et al.* Effective cryopreser-vation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method [J]. Hum Reprod, 2001,16(10):2187-94.

[2] Xu C, Inokuma MS, Denham J, *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2001,19(10):971-4.

[3] Thomson JA, Itzkovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.*

(下转封 3 to inside back cover)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（上接第 360 页　from page 360）

Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst [J]. Science, 1998, 282(11):1145-7.

［4］ Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, *et al*. Embryonic stem cell lines from human blastocyst: somatic differentiaton *in vitro* [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4):399-405.

［5］ Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, *et al*. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95(23): 13726-31.

［6］ Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification [J]. Nature, 1985,313(6003):573-5.

［7］ Trounson AO. Freezing human eggs and embryos [J]. Fertil Steril, 1986,46(1):1-12.

［8］ Trounson AO, Sjoblom P. Cleavage and development of human embryos *in vitro*, after ultrarapid freezing and thawing[J]. Fertil Steril, 1988, 50(2):373-6.

［9］ Vajta G, Holm P, Greve T, *et al*. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw method[J]. Acta Vet Scand, 1997, 38(4):349-52.

［10］ Vajta G, Holm P, Kuwayama M, *et al*. Open pulled straw vitrification: a new way to reduce cryinjuries of bovine ova and embryos [J]. Mol Reprod Dev, 1998,51(1):53-8.

［11］ Yokota Y, Sato S, Yokota M, *et al*. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts [J]. Fertil Steril, 2001,75(5):1027-9.

(编辑　张恩健)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net