

• 生物技术与方法 •

不同尺寸形貌抑冰微纳米材料对细胞冷冻保护性能的影响

许淼^{1,2#}, 宋玉^{1,2#}, 张静金秋^{1,2}, 赵叶瑜^{1,2}, 耿华曼^{1,2}, 翁晓刚^{1,2}, 刘忠华^{1,2}, 程金菊³, 颜廷胜^{1,2*}

1 东北农业大学 黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030

2 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

3 东北农业大学 食品科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

许淼, 宋玉, 张静金秋, 赵叶瑜, 耿华曼, 翁晓刚, 刘忠华, 程金菊, 颜廷胜. 不同尺寸形貌抑冰微纳米材料对细胞冷冻保护性能的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2294-2307.

XU Miao, SONG Yu, ZHANG Jingjinqu, ZHAO Yeyu, GENG Huaman, WENG Xiaogang, LIU Zhonghua, CHENG Jinju, YAN Tingsheng. Cryoprotective effects of deicing micro/nanomaterials with different sizes and shapes on cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2294-2307.

摘要: 抑冰纳米材料被广泛研究以提高对细胞、组织或器官等的冷冻保存效率。不同组分、尺寸、形貌的抑冰纳米材料可有效抑制冰晶的形成和生长, 从而减少对生物样品冻存的损伤。本研究通过水热法制备出不同尺寸的碳复合体微粒(carbon composite particles, CCPs)和特殊形貌的微纳米材料。结果显示随着碳复合体微粒粒径尺寸减小, 细胞冻存保护效果增强。而相较于球形结构的碳复合体微粒, 不对称纳米粒子(Janus nanoparticles)和纳米花(WSP nanoflower)材料对细胞冻存的保护作用明显增强。另外, 将适当浓度微纳米抑冰材料与商品化冷冻保护剂联合使用, 可进一步提高对细胞冷冻保护的效果。本文制备的微纳米防冻材料可有效提高细胞的冷冻保存效率, 在生物医学研究和低温保存应用中具有巨大的潜力。

关键词: 抑冰材料; 细胞冻存; 碳复合体微粒; 纳米花; 不对称纳米粒子

资助项目: 科技创新 2030-重大项目(2023ZD0407503); 黑龙江省优秀青年科学基金(YQ2023C020); 中国博士后科学基金(2023MD734140)

This work was supported by the STI 2030-Major Project (2023ZD0407503), the Outstanding Youth Program of the Natural Science Foundation of Heilongjiang (YQ2023C020), and the China Postdoctoral Science Foundation (2023MD734140).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: yantingsheng@neau.edu.cn

Received: 2023-12-25; Accepted: 2024-04-28

Cryoprotective effects of deicing micro/nanomaterials with different sizes and shapes on cells

XU Miao^{1,2#}, SONG Yu^{1,2#}, ZHANG Jingjinqiu^{1,2}, ZHAO Yeyu^{1,2}, GENG Huaman^{1,2}, WENG Xiaogang^{1,2}, LIU Zhonghua^{1,2}, CHENG Jinju³, YAN Tingsheng^{1,2*}

1 Key Laboratory of Animal Cellular and Genetic Engineering of Heilongjiang Province, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

2 School of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

3 School of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: Extensive studies have been conducted on deicing nanomaterials to improve the cryoprotective effects on cells, tissues, and organs. The nanomaterials with different composition, sizes, and shapes can inhibit the formation and growth of ice crystals, thereby reducing the damage to the cryopreserved samples. In this study, the carbon composite particles (CCPs) with different sizes and shapes were prepared by the hydrothermal method. The results demonstrated that the cryoprotective effect of CCPs enhanced with the decrease in particle size. Compared with spherical CCPs, Janus nanoparticles and WSP nanoflower with special shapes demonstrated improved protective effects on cryopreserved cells. In addition, the combination of deicing micro/nanomaterials at appropriate concentrations with commercial cryoprotectants exerted improved cryoprotective effects on cells. The prepared deicing micro/nanomaterials can improve cell cryopreservation, demonstrating great application potential in biomedical research and cryopreservation.

Keywords: deicing materials; cell cryopreservation; carbon composite nanoparticles; nanoflower; Janus nanoparticle

超低温保存法一般是指利用适宜的冻存保护剂(cryoprotectant, CPA)及冷冻降温程序将细胞降温至 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,通过低温暂停细胞的代谢活动并维持其生物功能,使细胞新陈代谢完全停止而处于近似“休眠”状态,从而实现长期保持其活性和功能的技术^[1]。超低温保存技术已广泛应用于组织工程与再生医学、细胞治疗、生物样本库以及生殖医学工程等诸多领域。研究发现,降温冷冻与复温融解过程中发生的各种化学和物理损伤是冷冻保存的生物样品的主要破坏机制^[2]。在这些损伤中,冰晶的形成、生长和再结晶对低温保存的样品是致命的,是目前实现高效低温保存面临的主要问题和限制^[3-4]。

此外,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、甘油等常用CPA的使用可能导致细胞毒性损伤和冻融过程中的渗透损伤等。因此,如何实现对低温保存过程中冰晶的形成及生长的有效抑制,降低其对保存样品的损伤,仍是有待解决的热点问题^[5]。开发新的化学工具和冷冻策略来应对冷冻保存中的挑战是非常必要的。

近年来,随着化学、生物和材料研究的快速发展,研究人员研制了各种创新材料和生物技术工具来抑制冰晶的形成和生长,这为低温保存科学提供了革命性的改进^[6-7]。与传统的CPA相比,微纳米CPA优异的渗透性和特殊的物理特性,使其具有更好的低温保护效果^[8]。

目前,基于小分子、有机物、聚合物等衍生出来的新型微纳米材料已被大量研究,用于提供生物相容性 CPA 和一些固有的微纳米 CPA。有研究发现,糖类可以有效地抑制冰晶的成核和生长^[9],还表现出抑制冰再结晶的特性^[10],从而更有效地促进了低温保存。一些来自单糖和双糖的小分子 CPA 可用作冰再结晶抑制剂(ice recrystallization inhibitors, IRIs),目前已经开发出许多纳米载体,通过促进细胞渗透功能来增强这些小分子 CPA 的低温保护特性^[8]。海藻糖作为一种具有出色低温保护性能的天然双糖,被广泛研究作为传统 CPA 的无毒替代品^[11]。2010年, Lynch 等^[12]通过生物聚合物将海藻糖输送至绵羊红细胞中,有效地提高了细胞冻存率。Liu 等^[13]发现,利用糖肽和海藻糖之间的协同相互作用,可以增强用于防止渗透胁迫和冰损伤膜的保护效果,证明了生物相容性糖肽和海藻糖的联合使用或可应用于冷冻保存。除上述的基于小分子的纳米 CPA 外,基于有机点的纳米 CPA 同样被证实可有效促进低温保存。Pegg 等^[14]受到抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)的启发,通过水热法制备出了一种源自葡萄糖(glucose carbon dots, G-CDs)的碳点(carbon dots, CDs),具有较高的 IRI 活性,可有效地抑制冰的生长和再结晶。

纳米材料具有提升细胞活性的作用,是细胞冷冻保存技术中的研究热点^[15],但这些制剂尺寸、形貌对细胞冷冻保存效率影响仍需进一步探索。对此,我们利用水热法^[16]成功地制备了与碳点有相同特性的不同尺寸的碳复合体微粒(carbon composite particles, CCPs),并探究了这些不同尺寸 CCPs 对细胞生物相容性的影响以及对细胞冷冻保存的作用。金纳米粒子具有尺寸小、形态稳定,易于制成不同的形状的优点^[17],而纳米花集成了抑制冰晶的形成、生长以及快速消融的一体化功能^[18],基于这些特性,我们又制

备了不同形貌的抑冰材料 SiO₂-Au 不对称纳米粒子(Au Janus)和 WSP 纳米花(WSP nanoflower)进行进一步探究,以期进一步提高细胞冷冻保存效率。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂:葡萄糖、蔗糖、乳糖购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;氨基酸键合金纳米粒子购自上海麦克林生化科技股份有限公司;4-巯基苯基乙酸、聚丙烯酸、正硅酸乙酯、氢氧化铵、硒脲晶体(selenourea crystals)、六氯化钨粉末(WCl₆)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、N,N-二甲基甲酰胺、无水乙醇、DMEM 培养液、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒)购自北京兰杰柯科技有限公司; Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

细胞:人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)及小鼠成肌细胞(C2C12)购自上海安为生物科技有限公司;牛乳腺上皮细胞(MAC-T)购自上海泽叶生物科技有限公司。

仪器与设备:H-7650 透射显微镜购自日立公司; SYNC 激光粒度仪购自麦奇克有限公司;高温高压反应釜购自上海析牛莱伯仪器有限公司; TP-350E+智能数显磁力加热搅拌器购自杭州米欧仪器有限公司; Allegra 64R 高速冷冻离心机购自贝克曼库尔特有限公司; YTLG-10A 真空冷冻干燥机购自上海叶拓科技有限公司; Forma Steri-Cult 二氧化碳培养箱购自赛默飞世尔科技公司; SpectraMax iD3 酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司; Evolution 201 紫外可见分光光度计购自赛默飞世尔科技公司; MDF-U3386S 超低

温冰箱购自三洋公司; HWS-24 电热恒温水浴锅购自上海一恒科技有限公司。

1.2 抑冰微纳米材料制备

1.2.1 不同尺寸碳复合体微粒制备

以葡萄糖、蔗糖、乳糖为前体, 通过水热法制备不同尺寸的碳复合体微粒(carbon complex particles, CCPs), 命名为葡萄糖-CCPs (glucose-CCPs, G-CCPs)、蔗糖-CCPs (sucrose-CCPs, S-CCPs)和乳糖-CCPs (lactose-CCPs, L-CCPs)。分别称取 0.5 g 不同前体, 溶于 50 mL 去离子水并转移至高压釜中, 180 °C处理 4 h。将反应后的混合溶液以 4 000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀物。利用截留分子量为 10 000–14 000 Da 的透析膜透析, 进一步去除上清液中的前体及小分子杂质。将所得物质冷冻干燥, 获得不同尺寸的碳复合体微粒固体材料。

1.2.2 双侧不对称纳米材料制备

基于先前报道的方法^[19]进行适当优化, 制备 SiO₂-Au 不对称纳米粒子(Au Janus)。量取 1 mL 的金纳米粒子分散液, 加入 4-巯基苯基乙酸和聚丙烯酸各 10 μL, 室温搅拌 1 h。随后, 依次加入 0.4 mL 正硅酸乙酯和 50 μL 氢氧化铵溶液, 室温搅拌反应过夜。将反应后的混合溶液以 6 000 r/min 离心, 去掉上清液, 利用透析膜(截留分子量为 8 000 Da)除去沉淀物中残余小分子等杂质。冷冻干燥, 获得 Au Janus 粉末, 置于 4 °C冰箱中保存备用。

1.2.3 花瓣状结构微纳米粒子的制备

通过一步法溶剂热途径反应制备二硒化钨(WSe₂)-聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)花瓣状结构微纳米粒子(WSP nanoflowers)。将 0.5 mmol 硒脲晶体、0.1 mmol 六氯化钨粉末(WCl₆)和 0.1 g (或 0.5、1.0 和 2.0 g) PVP 混溶于 20 mL N,N-二甲基甲酰胺, 充分混合后, 转入到高温反应釜中, 180 °C密封反应 24 h。反应

结束后, 将样品冷却至室温, 用乙醇和蒸馏水充分清洗, 冷冻干燥获得 WSP nanoflowers, 置于 4 °C冰箱中保存备用, 并分别命名为 WSP 0.1、WSP 0.5、WSP 1.0 和 WSP 2.0。

1.3 材料的表征

分别将待测样品重悬于去离子水中, 并将其滴加到具有碳支持性膜的超薄铜网上, 待溶剂自然挥发之后, 通过透射显微镜(transmission microscope, TEM)观察样品形态。进一步在激光粒度仪中利用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)^[20]方法对样品粒度分布情况进行检测。

1.4 抑冰微纳米材料的生物相容性评价

1.4.1 细胞毒性测试

利用 CCK-8 试剂盒对不同种类抑冰微纳米材料的生物相容性进行评价。将 HUVEC 培养在 96 孔板上, 每孔接种 5×10³ 个细胞, 在 37 °C 条件下培养 24 h。将抑冰微纳米材料用培养基分散, 配制系列浓度, 分别取 100 μL 的样品加入细胞培养板的孔中。在细胞培养箱中与细胞共培养 24 h 后, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗 3 次, 加入新 DMEM 培养基, 随后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 继续孵育 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光值(OD₄₅₀ 值)。每个浓度梯度设 3 个平行, 对照组包含细胞和培养基, 空白组只加培养基。计算存活率公式如下:

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{(\text{实验组 } OD_{450} \text{ 值} - \text{空白组 } OD_{450} \text{ 值})}{(\text{对照组 } OD_{450} \text{ 值} - \text{空白组 } OD_{450} \text{ 值})} \times 100.$$

对上述结果进行分析后, 选取最优浓度对 HUVEC、MAC-T 以及 C2C12 重复上述实验, 并分别在细胞培养箱中与细胞共培养 24、48、72 h 后对细胞毒性进行测定。每组设 3 个平行, 对照组包含细胞和培养基, 空白组只加培养基。

1.4.2 溶血性能测试

采用小鼠血细胞悬液进行溶血实验^[21]。将一定量的微纳米材料与 5 mL 的 2% 小鼠血细胞悬液(用 0.9% 的氯化钠溶液稀释, 微纳米材料终浓度为 1.25、2.50 和 5.00 mg/mL)混合, 37 °C 孵育 3 h。然后将血细胞悬液以 1 000 r/min 离心 10 min, 用紫外/可见分光光度计测定 545 nm 处吸光值(OD_{545} 值), 计算溶血率。以双蒸馏水作为阳性对照, 以 0.9% 的氯化钠溶液作为阴性对照。溶血比计算公式如下:

$$\text{溶血比} = \frac{(\text{实验组 } OD_{545} \text{ 值} - \text{阴性对照组 } OD_{545} \text{ 值})}{(\text{阳性对照组 } OD_{545} \text{ 值} - \text{阴性对照组 } OD_{545} \text{ 值})} \times 100\%$$

1.5 抑冰微纳米材料对细胞冷冻保存的影响

选取 HUVEC 进行冷冻保存细胞恢复研究。分别将制得的抑冰微纳米材料与二甲基亚砜(DMSO)、商品化羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch, HES, 800 mg/mL)和聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA, 4 mg/mL)分散在 PBS 溶液中, 以 10% DMSO 为阳性对照组, 以 PBS 为空白对照组。用 DMEM 配制 6.25×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液, 后将 0.4 mL 细胞悬浮液移至 1 mL 冷冻管中后, 实验组中分别加入 0.1 mL 上述混悬液, 阳性对照组中加入 0.05 mL DMSO 及 0.05 mL PBS (DMSO 终浓度为 10%), 空白对照组中加入 0.1 mL PBS。将冷冻管密封后置于冷冻容器中, 用大约 -10 °C/min 的速度冷冻样品。在 -80 °C 冰箱中冷冻 24 h 后, 将冷冻管取出到液氮罐中储存。7 d 后, 将冷冻管从液氮罐中取出, 放入 37 °C 水浴中快速解冻, 最后用 10 mL DMEM 培养基洗涤细胞。选用 CCK-8 法对细胞活性进行测定, 冷冻保存复苏 24 h 后, 用 Calcein-AM/PI 双染试剂盒测定活细胞与死细胞的比例。

1.6 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理、统计

分析和相关性分析, 方差分析 $P < 0.05$ 时, 表明结果具有显著性差异, 用 * 表示; $P < 0.01$ 时, 用 ** 表示; $P < 0.001$ 时, 用 *** 表示。采用 Prism 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同尺寸微纳米粒子形貌及粒径大小

将制备的碳复合体微粒与购买的金纳米粒子(Au nano)相对比, 并对其粒径进行统计。透射电镜(TEM)结果显示, 各微纳米粒子呈球状, 分散性良好, 无团聚现象(图 1A-1D)。激光粒度仪检测(DLS)结果显示, Au nano 的平均粒径为 (36 ± 12) nm (图 1E), G-CCPs 为 (192 ± 18) nm (图 1F), S-CCPs 为 (346 ± 22) nm (图 1G), L-CCPs 为 (899 ± 31) nm (图 1H)。所制备的 3 种碳复合体微粒, 平均粒径均大于 Au nano, 其中 L-CCPs 的平均粒径最大, G-CCPs 平均粒径适中。在尺寸大小方面, DLS 与 TEM 表征结果基本一致, 但因为 DLS 表征的不仅是碳点本身的尺寸, 还包括其周围包裹着的离子和分子, 由 DLS 测得的尺寸会比 TEM 观察结果略大一些。此外, 各组碳复合体微粒粒径分布相对集中, 均一性良好, 结果更具有普遍性。

2.2 不同尺寸微纳米粒子生物相容性评价

细胞生长状态和增殖速率是评价生物材料生物相容性的主要参数。将 Au nano、G-CCPs、S-CCPs 和 L-CCPs 分别与 HUVEC 细胞共培养 24 h 后, 观察各组细胞生长状态, 并通过 CCK-8 试剂盒检测不同浓度各抑冰纳米粒子对 HUVEC 细胞增殖速率的影响。光学成像结果显示, 共培养 24 h 后的 HUVEC 细胞生长状态良好。其中由于 L-CCPs 粒径较大, 在与细胞共培养过程中可以明显地观察到 L-CCPs 的分布情况, 而 Au nano、G-CCPs、S-CCPs 的平均粒径较小, 几乎观察不到(图 2A-2D)。CCK-8 测试结果显示, 相

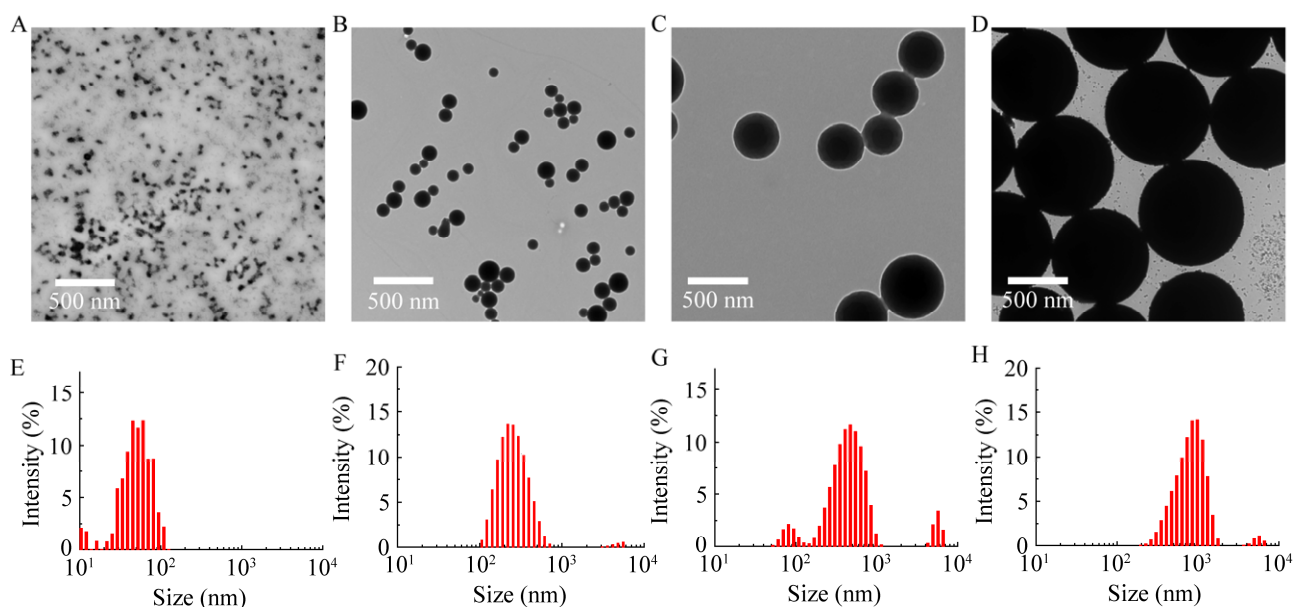


图 1 Au nano (A)、G-CCPs (B)、S-CCPs (C)和 L-CCPs (D)微纳米材料的 TEM 图像及激光粒度仪检测 Au nano (E)、G-CCPs (F)、S-CCPs (G)和 L-CCPs (H)的粒径分布情况

Figure 1 Morphology and particle size distribution of different particles. TEM images of Au nano (A), G-CCPs (B), S-CCPs (C), and L-CCPs (D) micro/nanomaterials. Laser particle size analyzer was used to detect the particle size distribution of Au nano (E), G-CCPs (F), S-CCPs (G), and L-CCPs (H).

较于对照组，添加抑冰纳米粒子的各实验组的细胞活性均大于 100% (图 2E-2H)。另外，各组抑冰纳米材料在低浓度(1.25 mg/mL)添加时均具有更好的促细胞增殖作用，表明 1.25 mg/mL 各组抑冰纳米材料具有良好的生物相容性，对不同细胞也无毒副作用。随后，我们选用了浓度为 1.25 mg/mL 的各组抑冰微纳米材料，分别与 HUVEC (图 2I)、MAC-T (图 2J)及 C2C12 (图 2K) 细胞共培养 24、48、72 h，再次通过 CCK-8 试剂盒进行检测。结果显示，与对照组相比，各组抑冰微纳米材料对多种细胞的 24、48、72 h 的连续培养均未出现抑制细胞增殖的现象。

为进一步检测其潜在毒性，我们进行了溶血实验，通过测量溶血程度来评估纳米颗粒对血细胞膜的破坏程度，进而检测其血液相容性。红细胞在 PBS 缓冲液中可以稳定存在，不易涨破，小鼠红细胞在 PBS 中的平均溶血率为 5.33%。

与 PBS 组相比，不同浓度 G-CCPs、S-CCPs 和 L-CCPs 的添加，对小鼠红细胞溶血率无显著影响，表现出很好的红细胞相容性(图 2M-2O)。但高浓度的 Au nano (5.00 mg/mL)添加会导致较高的溶血率，即高浓度 Au nano 对红细胞具有一定毒性(图 2L)。

2.3 不同尺寸微纳米粒子对细胞冻存保护性能研究

为探究各碳复合体微粒对细胞冷冻保存的影响，分别将碳复合体微粒、HES 和 PVA 分散在 PBS 溶液中作为冷冻保护剂，探究其对 HUVEC 在冷冻保存和复苏过程中的保护作用。结果显示，相较于 PBS 对照组，Au nano、G-CCPs、S-CCPs 和 L-CCPs 组冷冻复苏后的细胞存活率明显提高，说明这些微纳米制剂起到了对细胞冻存保护的效果。粒径尺寸对细胞冻存保护的效果有明显影响，其中最小尺寸的 Au nano

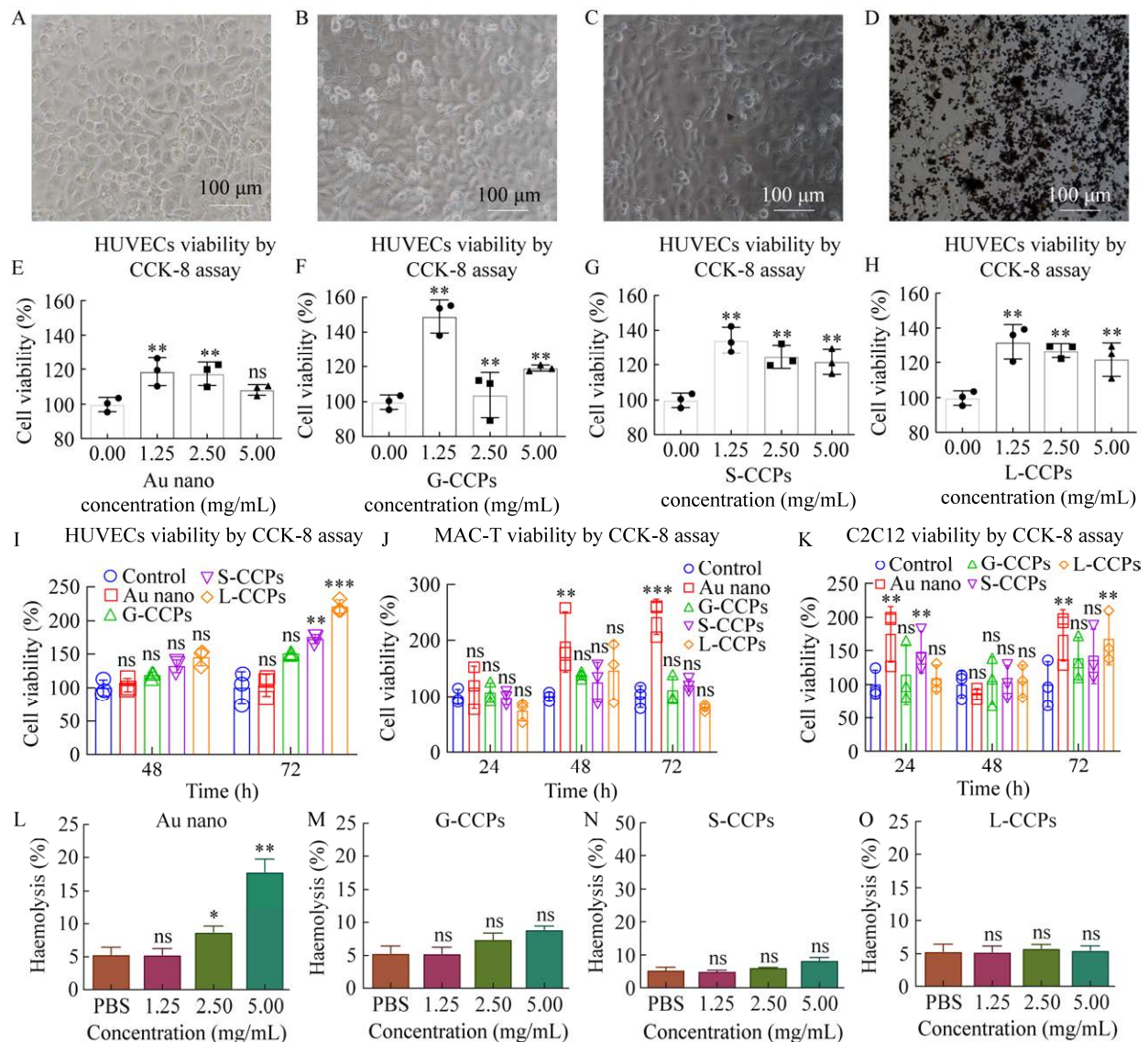


图 2 不同尺寸微纳米粒子生物相容性评价 Au nano (A)、G-CCPs (B)、S-CCPs (C)和 L-CCPs (D)微纳米材料与 HUVEC 细胞共培养光镜图. 不同浓度的 Au nano (E)、G-CCPs (F)、S-CCPs (G)和 L-CCPs (H) 纳米材料对 HUVEC 细胞毒性检测. 浓度为 1.25 mg/mL 的 Au nano、G-CCPs、S-CCPs 和 L-CCPs 微纳米材料对 HUVEC (I)、MAC-T (J)及 C2C12 (K)细胞毒性检测. 不同浓度的 Au nano (L)、G-CCPs (M)、S-CCPs (N)和 L-CCPs (O)微纳米材料对小鼠红细胞溶血影响. 误差线表示 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, 独立实验); ns 表示无显著差别 $P \geq 0.05$; *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$

Figure 2 Evaluation of biocompatibility of different nanoparticles. Au nano (A), G-CCPs (B), S-CCPs (C), and L-CCPs (D) micro/nanomaterials co cultured with HUVEC cells under light microscopy. Different concentrations of Au nano (E), G-CCPs (F), S-CCPs (G), and L-CCPs (H) micro/nanomaterials were used to detect the cytotoxicity of HUVEC cells. Detection of cytotoxicity of Au nano, G-CCPs, S-CCPs, and L-CCPs nanomaterials with a concentration of 1.25 mg/mL on HUVEC (I), MAC-T (J), and C2C12 (K) cells. The effects of different concentrations of Au nano (L), G-CCPs (M), S-CCPs (N), and L-CCPs (O) micro/nanomaterials on mouse red blood cell hemolysis. The error line represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, independent experiment); ns represents no significant difference, $P \geq 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

在高浓度时, 具有潜在的细胞毒性, 影响了细胞冻存保护效果; G-CCPs、S-CCPs 和 L-CCPs 随粒径尺寸减小, 细胞冻存保护效果增强, 其中 5.00 mg/mL 的 G-CCPs 组细胞存活率最高, 达到 41.56% (图 3A), 且高于 10% DMSO 组 (细胞存活率 12.57%)。但是, 所制备的碳复合微体粒冷冻保护效果仍不及商品化冻存保护剂的 HES (细胞存活率 64.76%) 和 PVA (细胞存活率 48.43%)。细胞活死染色结果与 CCK-8 检测结

果相一致。在 PBS 对照组中, 仅观察到极少数活细胞, 大部分细胞死亡。G-CCPs 对细胞冻存保护效果较好, 可观察到大量的活细胞, 明显多于 Au nano 组, 接近于商品化冻存保护剂 HES 组和 PVA 组 (图 3B)。

2.4 不同形貌微纳米粒子形貌及粒径大小

为进一步探究粒子结构形貌对细胞冷冻保存的影响, 本研究制备了具有不同表面基团和形貌的特征的 Au Janus 和 WSP nanoflower 微纳

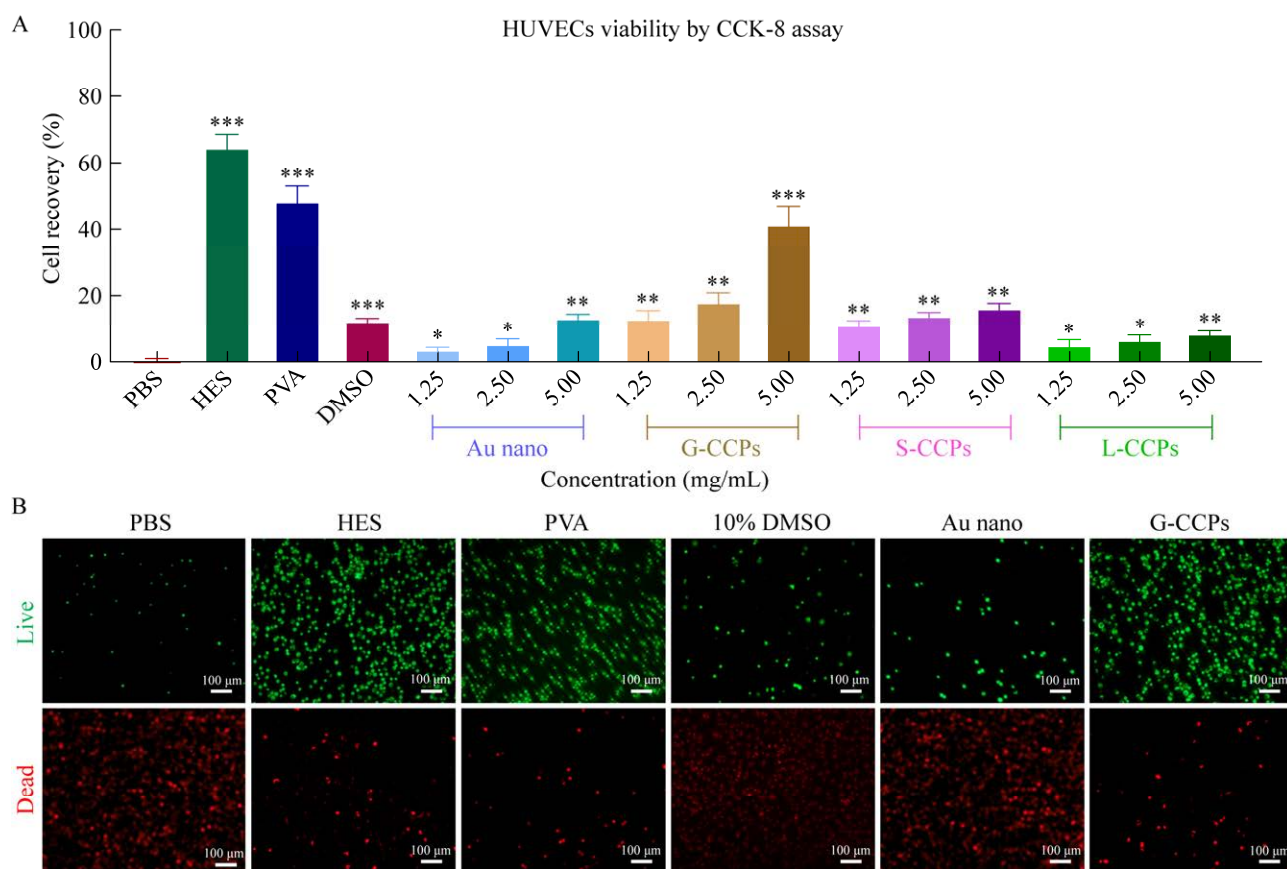


图 3 不同尺寸微纳米粒子对细胞冻存保护性能研究 A: 冻存后复苏的 HUVEC 细胞存活率. B: 冻存后复苏的 HUVEC 细胞活死染色的荧光图像, 标尺 100 μm . 误差线表示 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, 独立实验); *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 3 Study on the protective properties of micro/nanomaterials of different sizes for cell cryopreservation. A: Survival rate of HUVEC cells recovered after cryopreservation. B: Fluorescence images of HUVEC cells revived after cryopreservation and stained for viability and death, with a scale of 100 μm . The error line represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, independent experiment). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

米材料。透射电镜结果显示, Au Janus 材料颗粒结构均匀(图 4A), 呈现非核壳半封装结构, 粒径分布集中, 平均粒径为(78±12) nm (图 4B)。图 4C 展示了 WSP 0.1 的 TEM 图像, 其由多层纳米片状结构组成了如同花样的复杂结构, 分散性良好, 平均粒径为(142±23) nm (图 4D)。

2.5 不同形貌 WSP 的制备及细胞冻存保护性能研究

随着合成时 PVP 用量的增加, WSP 微纳米粒子花瓣状结构逐渐消失, 最终变为纳米球形态(图 5A–5D)。经对比, 其粒径大小呈下降趋势, 但变化不明显(图 5E), 其中, WSP 0.5 的平均粒径为(135.60±13.00) nm, WSP 1.0 的平均粒径为(122.10±12.30) nm, WSP 2.0 的平均粒径

为(114.00±13.02) nm。CCK-8 测试结果显示, 随着 PVP 用量的增加, WSP 纳米粒子的防冻效果减弱(图 5F)。后续均采用防冻效果最佳的 WSP 0.1 进行进一步探究。

2.6 不同形貌微纳米粒子的生物相容性评价与细胞冻存保护性能研究

细胞毒性检测结果显示 Au Janus 和 WSP nanoflower 两种材料在低于 2.50 mg/mL 的浓度时, 无细胞毒性, 而浓度增加至 5.00 mg/mL 时, 两者均显示出较低的细胞毒性(图 6A、6B)。溶血检测结果显示, 两种材料在测试浓度范围内均无明显溶血现象, 具有良好的血细胞相容性(图 6C、6D)。细胞冷冻保存复苏结果显示, 添加了不同量 Au Janus 或 WSP nanoflower 的复苏

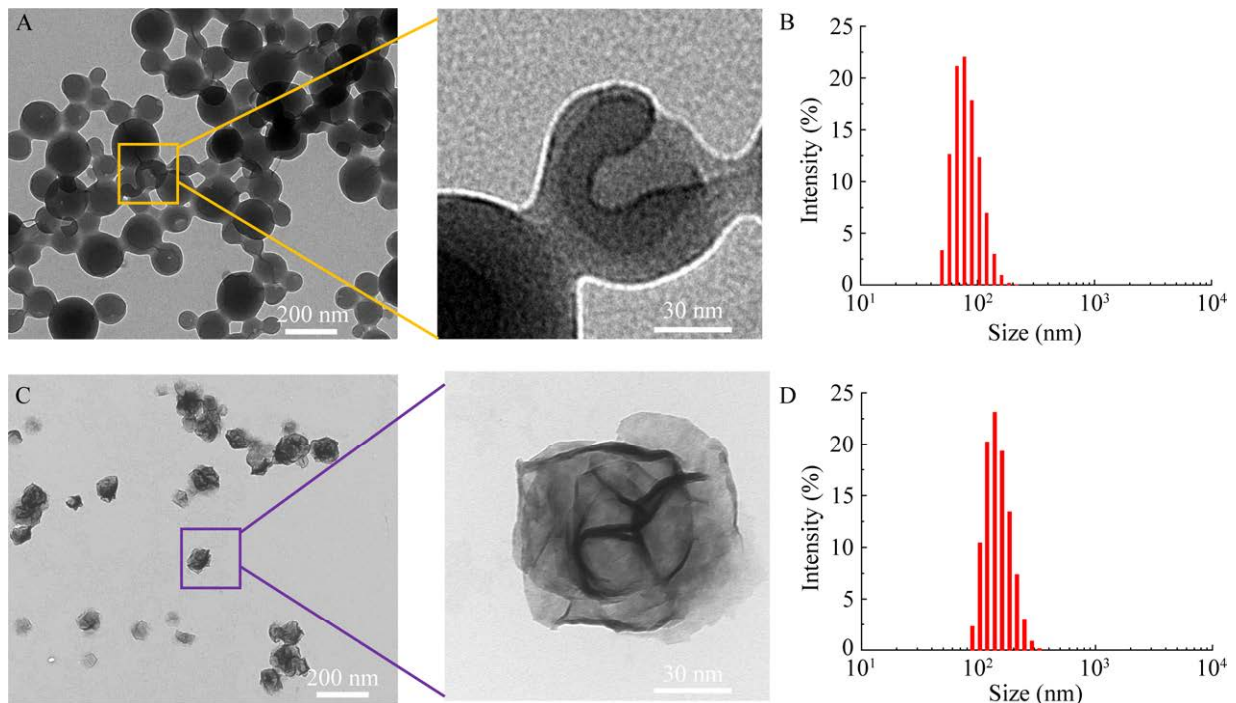


图 4 Au Janus 和 WSP nanoflower 的形貌及粒径分布 A: Au Janus 透射电镜图. B: Au Janus 粒径分布图. C: WSP 0.1 透射电镜图. D: WSP 0.1 粒径分布图

Figure 4 Morphology and particle size distribution of Au Janus and WSP nanoflower. A: Au Janus transmission electron microscopy image. B: Au Janus particle size distribution map. C: Transmission electron microscopy of WSP 0.1. D: WSP 0.1 particle size distribution map.

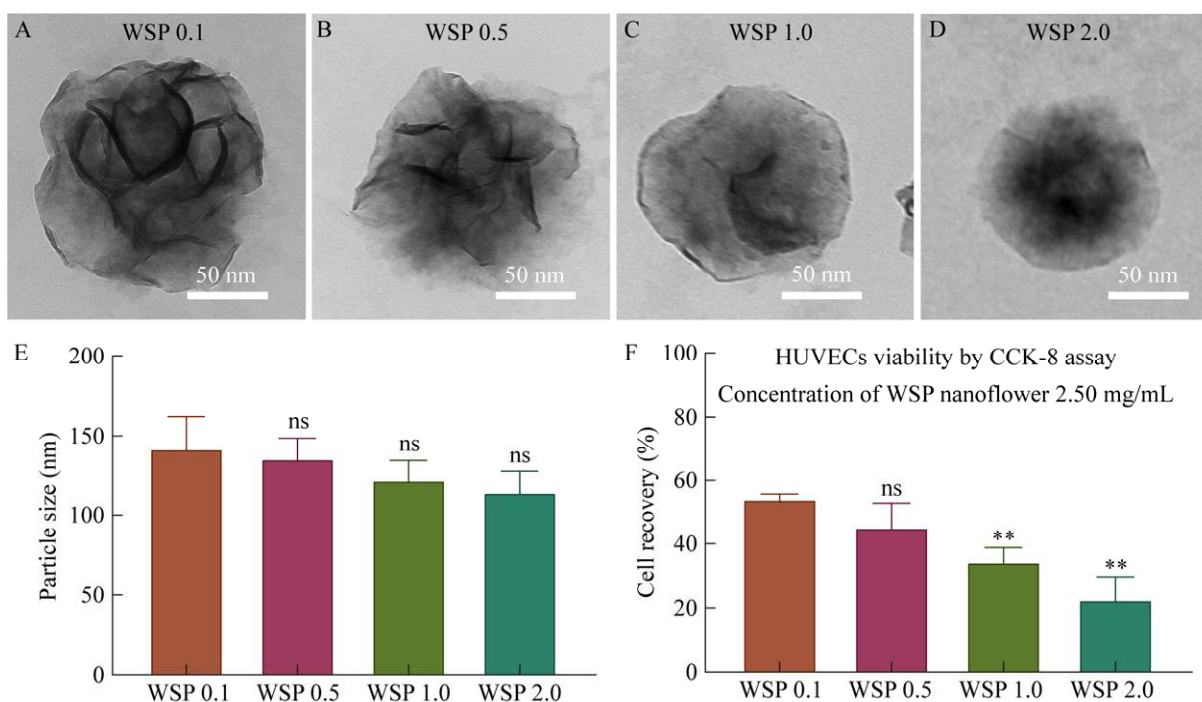


图 5 不同形貌 WSP 的制备及细胞冻存保护性能研究 WSP 0.1 (A)、WSP 0.5 (B)、WSP 1.0 (C)和 WSP 2.0 (D)透射电镜图. E: WSP 纳米粒子粒径大小. F: CCK-8 法检测 WSP 微纳米粒子对细胞冻存的影响. 误差线表示 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, 独立实验); ns 表示无显著差别 $P \geq 0.05$; **表示 $P < 0.01$

Figure 5 Preparation of WSP with different morphologies and study of cell cryopreservation protective properties. Transmission electron microscopy of WSP 0.1 (A), WSP 0.5 (B), WSP 1.0 (C) and WSP 2.0 (D). E: Size of WSP nanoparticles. F: CCK-8 method was used to detect the effect of WSP micro nanoparticles on cell cryopreservation. The error line represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, independent experiment); ns represents no significant difference, $P \geq 0.05$; ** indicates $P < 0.01$.

细胞存活率远高于 PBS 组, 且随着浓度增加, 对细胞冻存保护作用越强。其中 WSP nanoflower 展现了更强的细胞冻存保护作用, 以 5.00 mg/mL 添加时冻存细胞存活率分别为 54.47%, 显著高于 Au Janus 组, 接近 HES 组 64.77% 的存活率(图 6E)。细胞活死染色也显示出类似结果(图 6F)。

2.7 微纳米抑冰材料-商用冷冻保护剂联用对细胞冻存保护性能及机理分析

尽管现已证明所制备的抑冰材料可以实现对细胞冻存的保护, 但保护作用有限, 复苏细胞存活率仍然偏低。因此考虑将所制得的 Au Janus 和 WSP nanoflower 与 HES 联用, 以更好地

实现对细胞冻存保护作用。我们选择各材料对细胞冻存保护的最佳浓度(GCCPs-5.00 mg/mL、Au Janus-5.00 mg/mL、WSP nanoflower-2.50 mg/mL)与 HES 进行联合使用, 设置了 HES-GCCPs-5.00、HES-Au Janus-5.00、HES-WSP nanoflower-2.50 这 3 个实验组, 并以 PBS 和 HES 作为对照, 以探究微纳米抑冰材料-商用冷冻保护剂联合使用是否能实现更优的细胞冷冻保护效果。CCK-8 检测结果表明, 相较于 HES 组, 3 种制成的微纳米材料与 HES 联用的实验组复苏后的细胞存活率均有所提高, 其中 WSP nanoflower-2.50 mg/mL 组表现出最高的细胞存活率 93.47% (图 7A)。本文

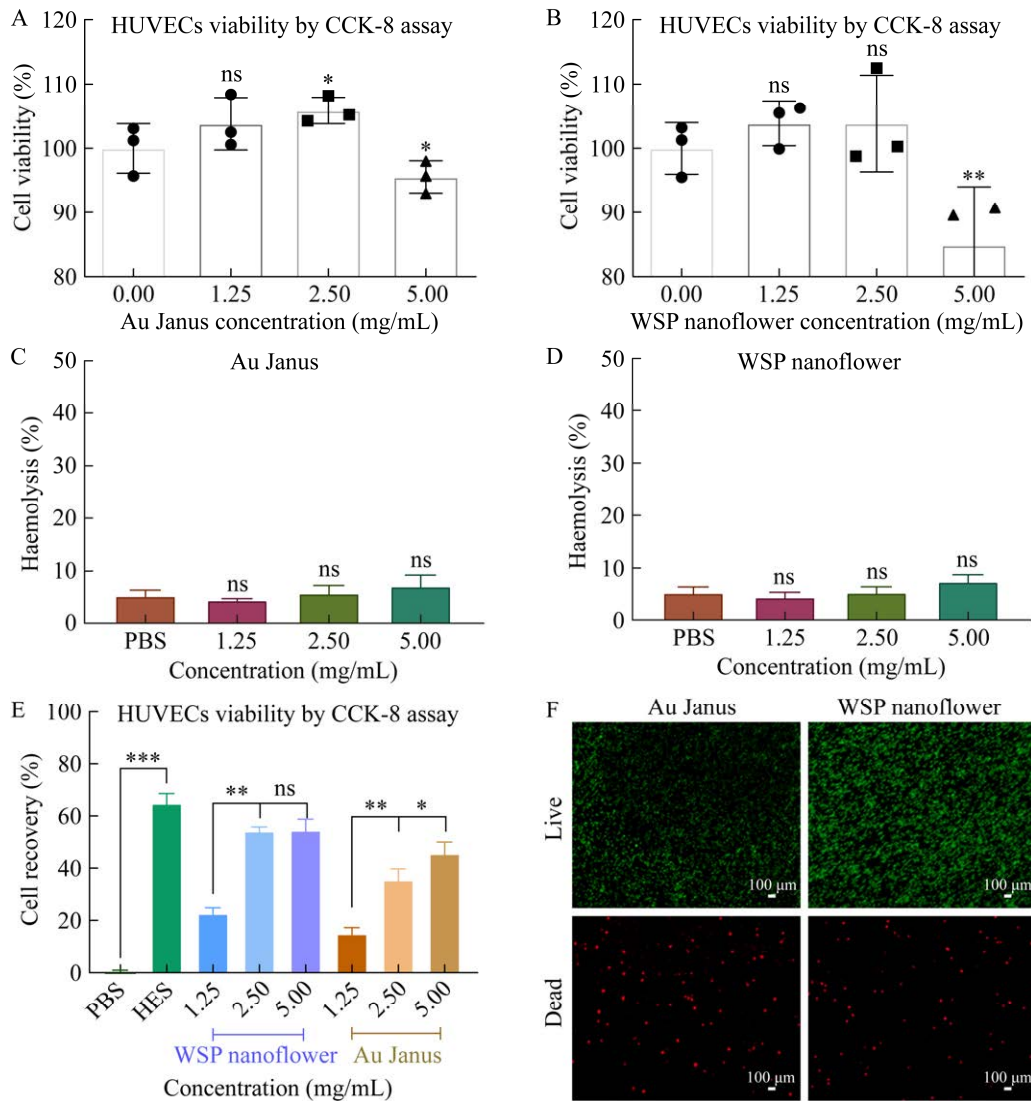


图 6 Au Janus 和 WSP nanoflower 的生物相容性评价与细胞冻存保护性能研究 A: 不同浓度 Au Janus 对 HUVEC 细胞毒性测试. B: 不同浓度 WSP nanoflower 对 HUVEC 细胞毒性测试. C: 不同浓度 Au Janus 对小鼠红细胞溶血影响. D: 不同浓度 WSP nanoflower 对小鼠红细胞溶血影响. E: CCK-8 法检测 Au Janus 和 WSP nanoflower 对细胞冻存的影响. F: 活死染色检测 Au Janus 和 WSP nanoflower 对细胞冻存的影响. 误差线表示 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, 独立实验); ns 表示无显著差别 $P \geq 0.05$; *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$

Figure 6 Study on the biocompatibility evaluation and cell cryopreservation protection performance of Au Janus and WSP nanoflower. A: Toxicity test of different concentrations of Au Janus on HUVEC cells. B: Toxicity test of different concentrations of WSP nanoflower on HUVEC cells. C: The effect of different concentrations of Au Janus on hemolysis of mouse red blood cells. D: The effect of different concentrations of WSP nanoflower on hemolysis of mouse red blood cells. E: CCK-8 method was used to detect the effects of Au Janus and WSP nanoflower on cell cryopreservation. F: Detection of the effects of Au Janus and WSP nanoflower on cell cryopreservation using live death staining. The error line represents $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, independent experiment); ns represents no significant difference; $P \geq 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

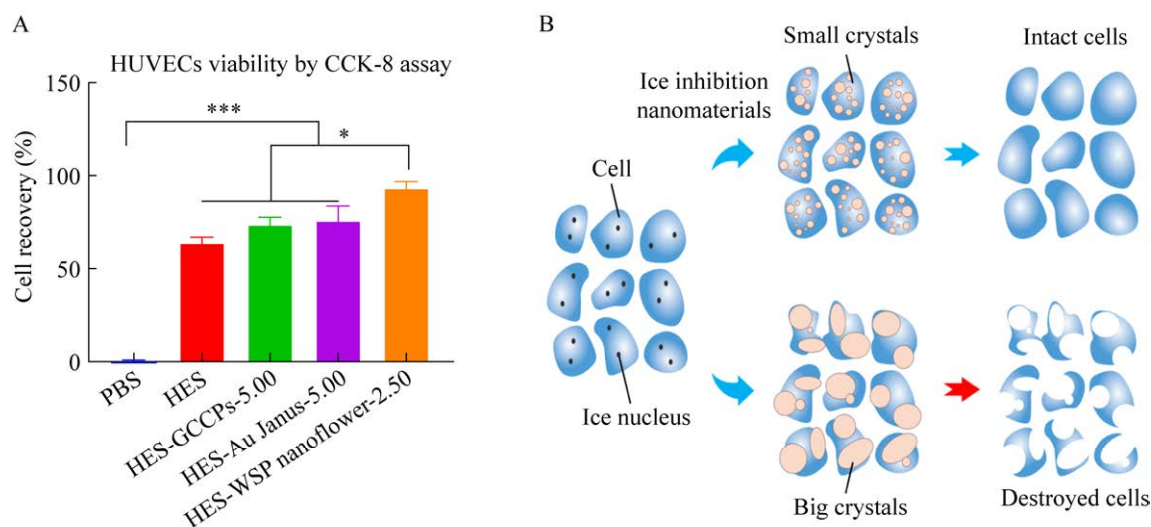


图7 微纳米抑冰材料-商用冷冻保护剂联用对细胞冻存保护性能(A)及机理分析(B)

Figure 7 Analysis of the protective performance and mechanism of the combination of micro/nano ice suppression materials and commercial cryoprotectants on cell cryopreservation. A: Study on the protective performance of micro/nano ice suppression materials combined with HES for cell cryopreservation. B: Analysis of cell cryopreservation protection mechanism of micro/nano ice suppression materials. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

制备的抑冰微纳米材料可通过促进吸附作用、氢键形成和热传导效率,调节冰晶生成速率和体积,抑制冰晶生长,显著减少细胞超低温保存过程中的冰损伤,提高细胞复苏后存活效率。同时可与商用防冻剂联用,加强对细胞冻存的保护作用,在生物医学研究、低温保存、运输和抗冰材料等方面具有巨大的应用潜力(图7B)。

3 讨论

低温保存技术可以实现器官、组织、细胞、疫苗和其他生物材料的长期保存,对于生物工程领域的临床应用和科学研究至关重要。低温保存冻融过程中冰晶的形成、生长和再结晶是造成生物样品损伤的主要机制之一。传统的解决方法是使用大量的有机低温保护剂(如DMSO)来防止冰晶生成,但重复使用DMSO会改变细胞DNA甲基化图谱,造成表型变化^[22]。人们在极地生物细胞中发现了一种抗冻蛋白,能阻止

胞液中冰核的形成与生长,维持非冰冻状态,以适应低温环境。近年来,受抗冻蛋白启发,许多纳米仿生抗冻材料被制备出来,并被证明能够有效地抑制冰晶形成和生长^[23-24]。通过精确控制纳米材料的尺寸和形貌,可显著改善冰晶与抗冻分子之间的界面相互作用。

目前通过水热法制备出的碳点粒径多小于10 nm^[25],尽管我们所制备出的碳复合体微粒相较于常规碳点粒径较大,但亦呈分散性良好的球状。且在本研究中,各抑冰微纳米材料均表现出良好的生物组织相容性及血液相容性。

以葡萄糖、蔗糖、乳糖为前体制备的碳点表面都存在大量羟基、羧基和环氧基等亲水性基团,这些基团不仅有利于碳点在水溶液中的分散,还可以与冰格相匹配,与冰晶生成氢键,抑制冰晶生长和重结晶^[19]。本研究通过相同方法所制备的G-CCPs、S-CCPs和L-CCPs碳复合体微粒表面亦存在大量的亲水性官能团,具有

修饰细胞内部冰晶形貌的作用,且能对冰晶生长及重结晶产生很好的抑制效果,进而有效提高细胞的冷冻保存效率。

有学者在研究过程中发现^[21],尺寸越大的抑冰材料吸附性越差,抑制冰晶生长及重结晶能力越弱,而尺寸越小的抑冰材料反而会表现出更好的抑冰效果。本研究发现,在一定尺寸范围内,颗粒尺寸越小,冻存保护效果越强,细胞存活率最高达到41.56%,表明这些微纳米材料主要通过抑制冰晶生长和重结晶过程,来实现其对细胞的冻存保护作用。而对于相同尺寸的抑冰材料,细胞存活率随着微纳米制剂浓度的增大而升高。

抑冰材料的表面基团特性和形貌特征与冰晶格匹配程度对防冻性能有重要影响^[26]。本研究结果显示,相较于球形结构的碳复合体微粒,具有特殊结构的 Au Janus 和 WSP nanoflower 纳米材料对细胞冻存的保护作用明显增强。这可从以下两个方面进行解释:在分子层面, Au Janus 独特的非对称特性^[27],通过分子相互作用和分子聚集或暴露控制冰晶生长的活性; WSP nanoflower 中含酰胺基团的 PVP 能够与水分子形成氢键^[27],从而改变冰状水分子的分水,影响冰核温度^[18]。在宏观层面, WSP nanoflower 的多层片状结构,为其与冰晶的充分接触创造了更大的比表面积,通过吸附-抑制作用,抑制冰晶生长。

本研究制备的抑冰材料可以单独实现对细胞冻存的有限保护,但复苏细胞存活率仍然偏低。商品冷冻保护剂 HES 等非渗透大分子物质可以优先与溶液中水分子结合,降低溶液中自由水的含量,减少冰晶的形成、降低冰点。将所制得的 Au Janus 和 WSP nanoflower 与 HES 联用,可进一步提高对细胞冷冻保护的效果。研究数据显示适当浓度微纳米材料与 HES 联合使用,有望实现基于渗透和非渗透作用的协同抑冰效应。

4 结论

本研究制备的不同尺寸和形貌的微纳米防冻材料具有较高的生物相容性,可有效抑制冰晶生长,提高细胞的冷冻保存效率。粒径尺寸对细胞冻存保护的效果有明显影响,碳复合体微粒随粒径尺寸减小,细胞冻存保护效果增强。相较于球形结构的碳复合体微粒,具有特殊结构的 Au Janus 和 WSP nanoflower 对细胞冻存的保护作用明显增强。适当浓度抑冰材料与 HES 联合使用可进一步增强对细胞冷冻的保护效果。本文制备的微纳米防冻材料在生物医学研究和低温保存应用中具有巨大的潜力。

尽管纳米防冻制剂的研究已取得一定成果,但合成过程大多涉及有毒有机化合物,因此有必要进一步优化方法,实现绿色制备。同时,虽然无机纳米防冻试剂在短期内对细胞、器官或组织表现出较低的毒副作用,但其长期的细胞毒性及相关免疫反应仍需深入研究。

REFERENCES

- [1] LIU M, ZHANG XY, GUO HS, ZHU YN, WEN CY, SUI XJ, YANG J, ZHANG L. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation of chondrocytes based on zwitterionic molecule and polymers[J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(10): 3980-3988.
- [2] GAO D, CRITSER JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells[J]. *ILAR Journal*, 2000, 41(4): 187-196.
- [3] BISSOYI A, NAYAK B, PRAMANIK K, SARANGI SK. Targeting cryopreservation-induced cell death: a review[J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2014, 12(1): 23-34.
- [4] PEGG DE. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs[J]. *Cryobiology*, 2010, 60(3 suppl): S36-S44.
- [5] AMINI M, BENSON JD. Technologies for vitrification based cryopreservation[J]. *Bioengineering*, 2023, 10(5): 508.
- [6] EROGLU A, RUSSO MJ, BIEGANSKI R, FOWLER A, CHELEY S, BAYLEY H, TONER M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 163-167.

- [7] GURRUCHAGA H, SAENZ del BURGO L, HERNANDEZ RM, ORIVE G, SELDEN C, FULLER B, CIRIZA J, PEDRAZ JL. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2018, 281: 119-138.
- [8] HUANG JD, GUO JM, ZHOU L, ZHENG GS, CAO JF, LI ZY, ZHOU Z, LEI Q, BRINKER CJ, ZHU W. Advanced nanomaterials-assisted cell cryopreservation: a mini review[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2021, 4(4): 2996-3014.
- [9] ZHANG MK, GAO C, YE B, TANG JC, JIANG B. Effects of four disaccharides on nucleation and growth of ice crystals in concentrated glycerol aqueous solution[J]. *Cryobiology*, 2019, 86: 47-51.
- [10] SZUREK EA, DHARIWAL N, EROGLU A. Sugars are more effective in suppressing intracellular ice formation than penetrating cryoprotectants[J]. *Cryobiology*, 2018, 85: 166-167.
- [11] HARA J, TOTTORI J, ANDERS M, DADHWAL S, ASURI P, MOBED-MIREMADI M. Trehalose effectiveness as a cryoprotectant in 2D and 3D cell cultures of human embryonic kidney cells[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017, 45(3): 609-616.
- [12] LYNCH AL, CHEN RJ, DOMINOWSKI PJ, SHALAEV EY, YANCEY RJ Jr, SLATER NKH. Biopolymer mediated trehalose uptake for enhanced erythrocyte cryosurvival[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(23): 6096-6103.
- [13] LIU B, ZHANG QF, ZHAO YH, REN LX, YUAN XY. Trehalose-functional glycopeptide enhances glycerol-free cryopreservation of red blood cells[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(37): 5695-5703.
- [14] WANG ZH, YANG B, CHEN Z, LIU D, JING LH, GAO C, LI J, HE ZY, WANG JJ. Bioinspired cryoprotectants of glucose-based carbon dots[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, 3(6): 3785-3791.
- [15] BHUSHAN B, KUMAR SU, GOPINATH P. Multifunctional carbon dots as efficient fluorescent nanotags for tracking cells through successive generations[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4(28): 4862-4871.
- [16] 廖子莹, 王宇辉, 郑建萍. 碳点基水相室温磷光复合材料研究进展[J]. *化学进展*, 2023, 35(2): 263-273. LIAO ZX, WANG YH, ZHENG JP. The research advance of carbon-dots based hydrophilic room temperature phosphorescent composites[J]. *Progress in Chemistry*, 2023, 35(2): 263-273 (in Chinese).
- [17] ZHAO L, SETH A, WIBOWO N, ZHAO CX, MITTER N, YU CZ, MIDDELBERG APJ. Nanoparticle vaccines[J]. *Vaccine*, 2014, 32(3): 327-337.
- [18] CHANG T, MOSES OA, TIAN CH, WANG H, SONG L, ZHAO G. Synergistic ice inhibition effect enhances rapid freezing cryopreservation with low concentration of cryoprotectants[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(6): 2003387.
- [19] CHEN T, CHEN G, XING SX, WU T, CHEN HY. Scalable routes to Janus Au-SiO₂ and ternary Ag-Au-SiO₂ nanoparticles[J]. *Chemistry of Materials*, 2010, 22(13): 3826-3828.
- [20] BEQA L, SINGH AK, KHAN SA, SENAPATI D, ARUMUGAM SR, RAY PC. Gold nanoparticle-based simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay for the selective detection of Pb(II) from paints, plastics, and water samples[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2011, 3(3): 668-673.
- [21] 王占辉. 仿生抗冻蛋白材料的制备及其控制冰晶性能研究[D]. 兰州: 西北师范大学硕士学位论文, 2020. WANG ZH. Study on the synthesis and control ice crystals performance of materials inspired by antifreeze protein[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest Normal University, 2020 (in Chinese).
- [22] VERHEIJEN M, LIENHARD M, SCHROODERS Y, CLAYTON O, NUDISCHER R, BOERNO S, TIMMERMANN B, SELEVSEK N, SCHLAPBACH R, GMUENDER H, GOTTA S, GERAEDTS J, HERWIG R, KLEINJANS J, CAIMENT F. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape *in vitro*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 4641.
- [23] 丁申毅. 金纳米棒@硅-碳点用于抑制冰重结晶和快速复温[D]. 重庆: 重庆交通大学硕士学位论文, 2022. DING SY. Gold Nanorod@Silica-carbon dots for ice recrystallization inhibition and rapid rewarm[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Jiaotong University, 2022 (in Chinese).
- [24] GEORGIOU PG, KONTOPOULOU I, CONGDON TR, GIBSON MI. Ice recrystallisation inhibiting polymer nano-objects *via* saline-tolerant polymerisation-induced self-assembly[J]. *Materials Horizons*, 2020, 8(7): 1883-1887.
- [25] 郭颖, 李午戊, 刘洋. 碳点的性质及其在化学发光分析中的研究进展[J]. *应用化学*, 2016, 33(6): 624-632. GUO Y, LI WW, LIU Y. Carbon dots and their research progress in chemiluminescence analysis[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2016, 33(6): 624-632 (in Chinese).
- [26] CHANG T, ZHAO G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(6): 2002425.
- [27] 郑明心, 谭臻至, 袁金颖. 光响应 Janus 粒子体系的构建与应用[J]. *化学进展*, 2022, 34(11): 2476-2488. ZHENG MX, TAN ZZ, YUAN JY. Construction and application of photoresponsive Janus particles[J]. *Progress in Chemistry*, 2022, 34(11): 2476-2488 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)