

論低溫生物學者對活細胞冷凍保存的 認知與展望

趙乃賢

水產試驗所水產養殖組

台大生物產業機電工程學系主任林達德教授和畜產試驗所吳明哲主任邀請來自加拿大 Alberta 大學的著名血液、幹細胞與皮膚冷凍保存研究者 Dr. Locksley McGann 於 2008 年 3 月 13 日蒞臨台大演講。Dr. McGann 不僅用心地準備中文卡通投影片「低溫學－人類美好的明天，我們向你走來了！」鼓勵聽講者，而且內容精彩不在話下。筆者深深覺得應將活細胞低溫生物學的原理與冷凍保存原則多與國內水產界同儕分享，希望有朝一日水產種原庫能亦步亦趨追隨國內食品所、畜試所展開全面冷凍保存本土多樣化種原的工作。

Dr. McGann 原為生物工程學者，有鑑於 Alberta 曾經發生一次大火，不少市民受燒傷之禍，但當地卻苦無足夠的庫存醫用皮膚可以應急來為傷患治療，因而痛下決心以冷凍科學協助解決類似問題。從那時起，他向各方申請補助，包括 Candadian Institute of Health Research 和 Natural Science and Engineering Research Council of Canada 等，全力協助冷凍低溫生物學者研發如何藉冷凍保存系統大量長期儲備各種醫療用之活組織。Dr. McGann 在加拿大擔任多項相關職務，如 Laboratory of Medicine & Pathology, University of Alberta 教授、Medical and

Scientific Advisory Board, Hema-Quebec 顧問、Canadian Blood Services, Research and Development 合聘專家、Canadian Blood Service, Edmonton Stem Cell Transplant Program 研究部主任。另外，他一再努力和世界各國研究同好交流，於 1998－2000 年間擔任 International Society for Cryobiology 會長，2006 年承接舉辦該學會之年會事宜，擔任超低溫生物學研發的推手。

林達德教授早年自台大畢業後赴美紐約州康乃爾大學深造，師事低溫生物學界嚴師 Dr. Peter L. Steponkus，Dr. Steponkus 以植物原生質為研究對象，致力描述、分析、解讀其分子機制，以深入探討植物如何適應低溫和其他緊迫。另，因好奇心和興趣驅使，曾涉獵果蠅和牛胚冷凍低溫生物學研究，亦曾為了直接觀察細胞內冰晶隨溫度產生的變化，自行著手組合初階冷凍顯微鏡，確實多才多藝。當年筆者邀請初返國的林教授前來水試所參加日本東京大學平野禮次郎教授主講之超低溫生物學講習會，因而開始進行部分以使用水產生物為對象的合作研究。林教授在台大除擔任農業機械系所和生物機電工程系所的教授、主任外，有一部分研究即以水產生物為對象，設計如何改進冷凍顯微鏡功能，包括熱電致冷低溫顯微鏡之研製、改

良與應用於魚胚胎冷凍、熱電致冷低溫顯微鏡系統模組化設計與微膠囊冷凍實驗，一路走來著有成效。林教授和 Dr. McGann 有共同的研究興趣，也締造與水產試驗所多年合作研發魚貝配子冷凍的實績。

研究活細胞冷凍的理由之一在於活細胞近年來應用於農林漁牧、食品工業、生物技術和醫學上的實例不斷地增加，而實際利用時都需要透過長、短期低溫保存方竟其功。目前，最有效的體外保存細胞活力和功能的方法非低溫冷凍莫屬。茲概述基本原理如下，以提供基礎瞭解。溶液由液態變成固態，是所謂的結冰點，此時水以冰的狀態離開，溶質因而提升濃度，由於溶質濃度改變導致結冰點不斷下降（圖 1）。一般細胞懸浮液在未結冰時以水含量佔絕大部分，達結冰點時，溶質和細胞由於約有 60% 水結成冰，因此剩下的溶質和細胞相對地在溶液中所佔比例遞增。降溫時細胞懸浮液的滲透壓顯然亦有變化。開始時，細胞外容易逐漸結冰，溫度再遞降時，更多的水冷凝成冰，溶質濃度漸增，由於因應細胞外溶液的滲透壓提高現象，細胞逐漸皺縮，其程度視該種細胞對水之通透性而有別。此時因慢速與快速降溫有異而產生不同的冷凍傷害。慢速時，細胞處在高濃度溶液的時間較久，而形成傷害，可能的機轉在於電解質濃度偏高，當細胞過度皺縮時，冰晶難免帶來機械傷害，而皺縮及覆水也都會引發滲透壓力（圖 2）。反之，快速時胞內水分來不及流出以致胞內外滲透壓不平衡，短時間內快速降溫的結果，細胞質可能急遽進入超冷狀態。此時，細胞內大量形成冰晶而帶來傷害。其機轉為冰晶在原生

質膜造成破洞；另外，細胞內冰晶經常可能二次結晶。滲透壓未達平衡就直接在細胞膜造成損傷也大有可能。所以二者各有優劣，必需視細胞種類和細胞膜特性，選擇二種傷害都較少者來定出最佳冷凍速率，也就是 Peter Mazur 之二項因素假說。不添加冷凍保護劑時，由於濃縮的溶質讓曝露其間的細胞隨降溫速率由 $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 遞減至 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，產生由 0% 至約 90% 的細胞死亡率變動。同樣降溫速率由 $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 遞減至 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 時，因細胞內結冰所帶來的細胞死亡率由 100% 緩減至 1%。兩相迫害之餘，幸而尚能在 $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 區間內發現約有 2—6% 細胞表現活存的現象，也就是說可能歸納出較適降溫速率區。

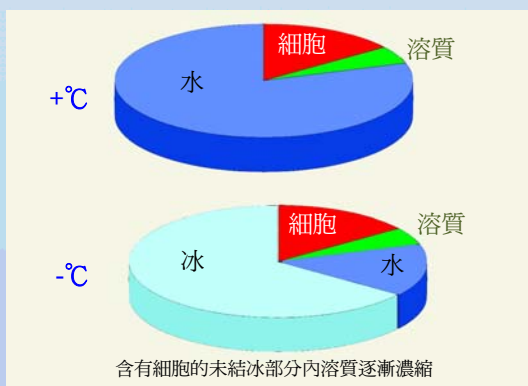


圖 1 細胞懸浮液因冷凍所產生的變化(圖片由 Locksley McGann 教授提供)

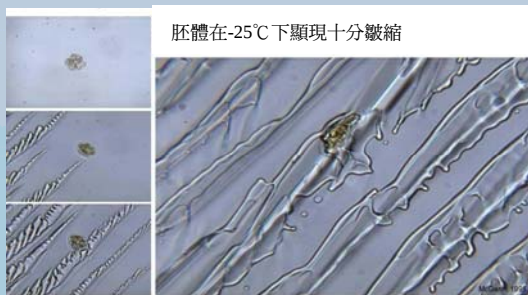


圖 2 在慢速降溫($0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)時的反應(圖片由 Locksley McGann 教授提供)

進一步討論為什麼冷凍保護劑可能發揮其功能，主要理由是在任何溫度下，冷凍保護劑都有助降低電解質濃度並減少冰晶形成量，特別是保護劑在低濃度時，化學毒性甚低，且能快速通過原生質膜。基本上，符合這些功能的有 Dimethyl Sulfoxide、Glycerol、Methanol、Propylene Glycol 等。以老鼠之 fibroblast cells 為例，若不添加 DMSO，在 -2°C 時，已百分之百結冰。若添加 1M、2M、3M、4M 的話，則結冰會降低為 71%、52%、35%、9%；但在 -4°C 時才提高為 80%、60%、42%、30%結冰。可見冷凍保護劑降低結冰率之功能十分明確。

其次就解凍後的細胞活存率而言，未添加冷凍保護劑時，僅在有限降溫速率範圍得到 6%以下活存率；加 0.5 M DMSO 時，最高可達約 33%的活存率；加 1 M DMSO 時，約 55%；加 2 M DMSO 時，則約 75%的活存率。可見冷凍保護作用一旦產生效果，經冷凍過之細胞仍可得高恢復率。可得最高恢復率之降溫速率範圍端視冷凍保護劑種類和濃度而定，其次也要考慮添加及去除冷凍保護劑所帶來的滲透壓緊迫與傷害。

超低溫冷凍工程科學家，能以模式圖推算低溫時細胞的滲透壓反應，包括量測細胞外溶液的濃度和滲透壓，細胞質之溶液特性，因溫度產生胞膜穿透運送性變化。唯有如此，才能預測在添加和去除冷凍保護劑時，以及以恆定速率降溫和升溫時，細胞之滲透壓的反應變化，以便進一步提供改進冷凍流程所需資訊。

以一般標準冷凍流程而言，首先使細胞於 10% DMSO 液中進行平衡，在降溫至 -5°C

前皆為液態，其後結成冰晶，樣品會因為散出潛伏熱而略微升溫，此時採 $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降溫，協助停止升溫現象，持續降至約 -35°C ，改以較快速降溫，直至 -60°C 上下，才轉置入 -196°C ，作定期探討活存率是否穩定和長期保存。

綜言之，一項最佳化的冷凍流程至少應包含下列條件：(1)可使細胞維持在細胞內超低溫的程度而又不至於傷害其復活功能性；(2)須符合維持欲冷凍細胞種類之滲透壓參數，其細胞質之溶液特性，及其胞外溶液之溶液特性所需；(3)須執行其達到可冷凍保存狀態之最快路線，以避免細胞內結冰傷害。

目前在加拿大已積極使用上述原則檢測既有之程式並改進之，因而成功地應用在動植物幹細胞和多種醫學用組織。台灣方面最佳應用實例在食品工業研究所的菌種保存。該菌種保存中心已因一再擴大增建而改名為生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Centre, BCRC)，其功能與研發標的包括：(1)多樣性生物及遺傳資源與資訊之收集、保存與提供；(2)智慧財產權相關之生物及遺傳資源之寄存與提供；(3)生物及遺傳資源之複核及鑑定；(4)生物及遺傳資源之研發與應用；(5)相關之技術服務或資訊服務。生資中心是經濟部產業用生物資源保存中心，也是政府指定之專利微生物寄存場所，並為農委會的農業微生物種原庫及國衛院的細胞庫核心設施。謹此以法國大文豪諾貝爾文學獎得主羅曼羅蘭的話深深期許年輕的低溫生物學者：今日的你，青年們！現在輪到你們了，把我們當作你們的墊腳石向前跑吧！願你們更偉大、更幸福！