

文章编号:0253 - 4339(2017) 05 - 0107 - 07

doi:10. 3969/j. issn. 0253 - 4339. 2017. 05. 107

海藻糖和胎牛血清对人乳腺细胞 HBL-100 低温保存的影响

王美霞 梁玮 叶萍 刘宝林

(上海理工大学生物系统热科学研究所 上海 200093)

摘要 建立高质量的生物样本库至关重要,低温保存过程中保护剂的种类和浓度对样本的冷冻效果有很大影响。本文以人乳腺细胞 HBL-100 为研究对象,在 Me_2SO 含量 10% 的 DMEM 溶液中分别添加不同浓度海藻糖(0 ~ 0.3 mol/L) 和不同体积分数 FBS(20% ~ 60%)。采用逐步降温法,先在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中慢速降温 4 h,再快速投入到液氮中($-196\text{ }^\circ\text{C}$),冻存 7 d 后,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中快速摇晃复温。分别用台盼蓝法、CCK 法和 24 h 贴壁率法检测细胞的成活率,结果表明:与对照组相比,海藻糖和 FBS 对细胞的冷冻效果都有显著影响。当海藻糖浓度一定时,FBS 体积分数越高,细胞的冷冻效果越好,但不添加海藻糖时,FBS 的作用不明显;当 FBS 体积分数一定时,三种检测指标在海藻糖浓度为 0.2 mol/L 时最优,且高浓度海藻糖可能会抑制 FBS 作用。考虑成本等因素,最适宜冻存人乳腺细胞 HBL-100 的冻存液为 10% Me_2SO + 40% ~ 60% FBS + 0.2 mol/L 海藻糖。

关键词 低温保存;存活率;海藻糖;胎牛血清

中图分类号:R318.52;TB61⁺1

文献标识码:A

Effects of Trehalose and Fetal Bovine Serum on Cryopreservation of HBL-100 Human Breast Cells

Wang Meixia Liang Wei Ye Ping Liu Baolin

(Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China)

Abstract Establishing a high-quality biobank is very important, but the cryoprotective agent (CPA) type and concentration have a considerable influence on the cryopreservation effect. In this paper, HBL-100 human breast cells were treated with 10% Me_2SO combined with trehalose (0-0.3 mol/L) and fetal bovine serum (FBS; 20% -60%) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Through gradual reduction of the temperature, the cells were cooled in a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ freezer for 4 h and then quickly transferred into liquid nitrogen. After storing for 7 days, the cells were shaken quickly at $37\text{ }^\circ\text{C}$. The cell survival rate was assessed using the trypan blue test, cell counting kit (CCK) assay, and the attached rations after 24 hours. The results show that, compared with the control group, the effects of the trehalose and FBS are very obvious. In particular, when the trehalose concentration is constant, a higher FBS volume fraction yields a better effect. The FBS has no significant effect without trehalose. Further, when the FBS volume fraction is constant, the optimal effect is obtained for 0.2 mol/L trehalose. A high trehalose concentration may weaken the effect of the FBS. Considering the cost and other factors, the most suitable CPAs for the cryopreservation of HBL-100 human breast cells are 10% Me_2SO + 40% -60% FBS + 0.2 mol/L trehalose.

Keywords cryopreservation; viability; trehalose; fetal bovine serum

乳腺细胞的研究始于 20 世纪 50 年代,乳腺细胞可用来研究乳腺生长、发育和泌乳的分子机理,还可用于转基因动物培养乳腺生物反应器的开发。近年来,建立健康细胞、组织样本库备受关注。保持样本库中健康细胞的活性,可以更加有效地保护细胞中的蛋白质、DNA、RNA 等生物信息免受损伤,为进一步研究细胞的结构和发育提供了保证。但是,不同类型

细胞和组织的适宜冷冻方法和条件存在较大差异,目前绝大多数的生物样本库不能很好的保持细胞的活性。所以,针对样本库中各种类型的细胞和组织,研究最有效的低温保存方法具有重要意义。

二甲基亚砜(Me_2SO)是目前冻存细胞最常用的保护剂,它可以降低保存液的冰点,减少胞内冰晶形成^[1]。但毒性较大,单独使用 Me_2SO 不仅对细胞有

损伤,而且不能很好的对细胞膜进行保护^[2]。海藻糖是一种非渗透性保护剂,不仅能在细胞外形成高渗,减少胞内冰的形成,还具有较高的玻璃化温度,易形成玻璃态,一方面避免了低温对细胞膜蛋白质和脂质的损伤,另一方面将细胞膜的蛋白质分子支撑包裹起来,使之不易变形,抑制细胞膜融合,降低细胞膜的通透性^[3]。有学者应用含不同浓度海藻糖的保护液,低温保存肝癌细胞^[4]、犬气管^[5]、卵巢癌细胞和宫颈癌细胞^[6]及小鼠受精卵^[7],均取得了良好的保存效果。胎牛血清(FBS)也有助于细胞的冷冻保存,且在肠道肿瘤组织原代细胞^[8]、牛成纤维细胞^[9]等低温保存中效果显著。

因此,本实验通过在 Me₂SO 含量 10% 的细胞培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)中添加不同浓度的海藻糖(0 mol/L, 0.2 mol/L, 0.3 mol/L)及不同体积分数 FBS(20%、40%、60%),采用逐步降温方式,研究了海藻糖和胎牛血清(FBS)对人乳腺细胞 HBL-100 冷冻效果的影响,为生物样本库的大量冻存提供了一种冷冻效果较好、操作简单、成本低廉的冷冻方法。

表 1 保护剂分组

Tab. 1 The groups of the cryoprotectants

编号	基础冻存液	保护剂
对照组 1	DMEM	—
对照组 2		10% Me ₂ SO
1	DMEM + 10% Me ₂ SO	20% FBS
2		40% FBS
3		60% FBS
4		0.2 mol 海藻糖 + 20% FBS
5		0.2 mol 海藻糖 + 40% FBS
6		0.2 mol 海藻糖 + 60% FBS
7		0.3 mol 海藻糖 + 20% FBS
8		0.3 mol 海藻糖 + 40% FBS
9		0.3 mol 海藻糖 + 60% FBS

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人乳腺细胞 HBL-100(中科院上海生命科学研究院);胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶(赛默飞世尔生物化学制品有限公司);DMEM 培养基(GIBCO 公司);二甲基亚砷(Me₂SO)(德国 APPLICHEM 公司);海藻糖

(中国医药集团上海化学试剂公司);台盼蓝染色液(2X)(碧云天生物技术公司);CCK-8 试剂盒(东仁化学科技有限公司);青霉素、链霉素(华北制药)。

1.2 仪器与设备

超低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司);二氧化碳培养箱(上海博讯实业有限公司);低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);程序降温盒(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司);酶标仪(英国柏楛有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 冻存液配制

配制 11 组不同的冻存液配方,如表 1 所示,配制前将 Me₂SO 4 °C 预冷^[10],将配制好的冻存液用 0.22 μm 针式滤器过滤除菌,用封口膜封住瓶口放置于 4 °C 冰箱备用。

1.3.2 细胞培养

将人乳腺细胞 HBL-100 接种于含 10% FBS、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 的 DMEM(高糖)完全培养液中,置于 37 °C、5% CO₂、70% 湿度的培养箱中培养。取生长于对数期的细胞进行消化传代,以备进行后续实验。

1.3.3 细胞冻存

取生长处于对数期且细胞状态良好的细胞进行冷冻。去除培养皿中的完全培养液,加入 3 mL D-Hanks 液清洗细胞两次,加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化,静置 1 min 后,吸掉胰蛋白酶溶液,再加 2 mL 培养基终止消化。轻轻吹打皿壁,使细胞悬浮,然后吸入离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,倒掉上清液,每组分别加入配制好的冻存液 3 mL,轻轻吹打混匀,在 4 °C 下平衡 10 min 后,再将 3 mL 细胞悬液均分加入 3 支冻存管中(即设置 3 个重复组),并在各冻存管中标注细胞编号。使冻存管置于程序降温盒中(降温速率为 1 °C/min),采用逐步降温法,先放在 -80 °C 冰箱中慢速降温 4 h(降温速率为 1 °C/min),再将冻存管投放到液氮中冻存 7 d。

1.3.4 细胞复苏

7 d 后从液氮中取出冻存管,在 37 °C 水浴锅中快速摇晃进行复温,1 500 r/min 离心 5 min,并倒掉上清液,然后分别加入 1 mL 培养基吹打均匀,制备成细胞悬液。

1.3.5 细胞检测

1) 台盼蓝染色法检测细胞活力^[11]

将冻存前和复温后的细胞吹打混匀后,取 50 μL 于 1.5 mL 离心管中,再加入 50 μL 台盼蓝染液染色,混匀后静止 1 min,吸取少量混合液滴加于血球记数

板盖玻片旁,使液体进入记数室,细胞呈蓝色为死细胞,呈无色透明状为活细胞,统计四角大方格中的活细胞数,用式(1)计算细胞浓度:

$$\text{细胞浓度(个/mL)} = \frac{4 \text{ 个大方格的总细胞数}}{4} \times \text{稀释倍数} \times 10^4 \quad (1)$$

根据细胞悬液体积计算总细胞数,并用式(2)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{复温后活细胞数}}{\text{冷冻前活细胞数}} \times 100\% \quad (2)$$

2) CCK 法检测细胞活力^[12]

每组实验中,取复温后的细胞悬液(1×10^5 个/mL)置于 96 孔培养板中(边缘孔用无菌 PBS 填充),另加一组新鲜对照组(新鲜细胞且浓度接近于复苏后细胞),一组不含细胞的培养基组(调零空),每组设有三个平行。每孔加入 100 μL 待测液,将培养板放在培养箱中预培养,然后向每孔加入 10 μL CCK 溶液,将培养板在培养箱内孵育 1.5 h,用酶联免疫检测仪测定 450 nm 处的吸光度。按式(3)计算细胞活力^[13]。

细胞存活率 =

$$\frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}}{\text{新鲜对照 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}} \times 100\% \quad (3)$$

3) 24 h 贴壁率^[14]

复温后取等体积细胞悬液接种于培养皿中,加入 8 mL 培养基,置于二氧化碳培养箱中培养(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、70% 湿度),24 h 后收集培养瓶中培养基,并用 D-Hanks 液(2 mL)清洗两次,收集上清液,计数未贴壁细胞;然后用胰酶消化后加入培养基,1 500 r/min 离心 5 min,计数贴壁细胞,按式(4)计算细胞贴壁率:

24 h 贴壁率 =

$$\frac{\text{贴壁存活细胞数}}{\text{贴壁存活细胞数} + \text{未贴壁存活细胞数}} \times 100\% \quad (4)$$

1.4 数据分析

采用 SPSS18.0 软件中 ANOVA(Analysis of Variance)过程对数据进行方差分析、Duncan 氏多重比较和双因素分析。

2 结果与分析

2.1 FBS 对人乳腺细胞 HBL-100 低温保存效果的影响

冻存前,用台盼蓝染色得到新鲜细胞的存活率为(96.32 \pm 2.01)%。当海藻糖浓度分别保持恒定值时,不同体积分数 FBS 的细胞冷冻后细胞存活率和

24 h 贴壁率如表 2 所示。

由表 2 可以看出,三种检测方法得到的结果趋势一致。实验组 1~9、对照组 2 都与对照组 1 有显著性差异($P < 0.05$),说明加入低温保护剂(10% Me_2SO 、20%~60% FBS 和海藻糖)可以显著提高细胞的存活率。实验组 2~9 与对照组 2 相比也有显著性差异($P < 0.05$),说明在 10% Me_2SO 基础上添加适当体积分数 FBS 和适宜浓度的海藻糖有助于提高细胞存活率。

当海藻糖浓度一定时,随着 FBS 体积分数的增加,细胞的存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率均呈现增加趋势,且有显著性差异($P < 0.05$);但当海藻糖浓度为 0 mol/L 和 0.3 mol/L 时,实验 1 组和实验 7 组的存活率、24 h 贴壁率与对照组 2 相比略低,但差异性不显著($P > 0.05$),即此时的 20% FBS 对细胞冷冻没有促进作用;实验 1 组和实验 2 组的 CCK 存活率没有显著性差异($P > 0.05$),说明此时的 20% FBS 和 40% FBS 对细胞冷冻效果无差别。

2.2 海藻糖对人乳腺细胞 HBL-100 低温保存效果的影响

当 FBS 体积分数分别保持恒定时,不同浓度海藻糖的细胞冷冻后细胞存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率如表 3 所示。

由表 3 可以看出,当 FBS 体积分数一定时,随着海藻糖浓度的增加,细胞存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率都是先增加后减小,且差异显著($P < 0.05$);海藻糖浓度为 0.2 mol/L 时细胞低温保存效果最好。20% FBS 条件下,添加 0.3 mol/L 海藻糖的细胞存活率要低于 0 mol/L 海藻糖($P < 0.05$),CCK 存活率和 24 h 贴壁率略高,但差异不显著($P > 0.05$);而 40% FBS 和 60% FBS 条件下,0.3 mol/L 海藻糖的 CCK 存活率和 24 h 贴壁率要高于 0 mol/L 海藻糖,且差异显著($P < 0.05$)。说明高浓度海藻糖可能会抑制 20% FBS 的作用,但增加 FBS 体积分数一定程度上可以减少抑制作用。

2.3 双因素方差分析结果

在 A(海藻糖浓度)和 B(FBS 体积分数)两个因素下,细胞存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率的双因素方差分析结果如表 4 所示。

由表 4 可知,从整体上看,不同浓度海藻糖对 HBL-100 细胞存活率的影响是极其显著的($P < 0.01$),对 CCK 存活率和 24 h 贴壁率的影响是显著的($P < 0.05$);不同体积分数 FBS 对 HBL-100 细胞的存活率和 24 h 贴壁率是极其显著的($P < 0.01$),对 CCK 存活率影响是显著的($P < 0.05$);FBS 与海藻糖

表 2 不同体积分数 FBS 的细胞冷冻后存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 The survival rate, CCK assay and the attached rations after 24 h of cells with different volume fraction of FBS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	海藻糖浓度/(mol/L)	FBS 体积分数/%	细胞存活率/%	CCK 存活率/%	24 h 贴壁率/%
对照组 1	—	—	0.67 ± 0.03 ^b	0.78 ± 0.11 ^b	1.23 ± 0.37 ^e
对照组 2			44.43 ± 1.23 ^f	42.01 ± 0.66 ^e	52.13 ± 0.45 ^f
1		20	46.32 ± 0.32 ^f	44.81 ± 0.48 ^f	48.33 ± 0.51 ^f
2	0	40	53.33 ± 0.67 ^e	47.61 ± 0.81 ^f	55.72 ± 0.35 ^e
3		60	71.22 ± 0.79 ^b	61.07 ± 0.53 ^d	63.22 ± 0.15 ^d
4		20	63.45 ± 1.27 ^d	55.79 ± 1.03 ^e	65.38 ± 0.19 ^e
5	0.2	40	69.31 ± 1.08 ^b	70.78 ± 0.72 ^b	70.10 ± 1.45 ^b
6		60	87.93 ± 0.95 ^a	91.82 ± 0.62 ^a	88.01 ± 0.65 ^a
7		20	37.30 ± 0.78 ^e	47.56 ± 0.36 ^f	50.33 ± 1.34 ^f
8	0.3	40	53.00 ± 1.12 ^e	54.04 ± 0.72 ^e	66.58 ± 0.47 ^e
9		60	67.08 ± 1.46 ^c	64.09 ± 0.34 ^c	72.32 ± 0.45 ^b

注:用 Duncan's multiple range test 法进行多重比较,同列标有不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同小写字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 3 不同浓度海藻糖的细胞冷冻存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 The survival rate, CCK assay and the attached rations after 24 h of cells with different concentration of trehalose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	FBS 体积分数/%	海藻糖浓度/(mol/L)	细胞存活率/%	CCK 存活率/%	24 h 贴壁率/%
1		0	46.32 ± 0.32 ^f	44.81 ± 0.48 ^f	48.33 ± 0.51 ^f
4	20	0.2	63.45 ± 1.27 ^d	55.79 ± 1.03 ^e	65.38 ± 0.19 ^e
7		0.3	37.30 ± 0.78 ^e	47.56 ± 0.36 ^f	50.33 ± 1.34 ^f
2		0	53.33 ± 0.67 ^e	47.61 ± 0.81 ^f	55.72 ± 0.35 ^e
5	40	0.2	69.31 ± 1.08 ^b	70.78 ± 0.72 ^b	70.10 ± 1.45 ^b
8		0.3	53.00 ± 1.12 ^e	54.04 ± 0.72 ^e	66.58 ± 0.47 ^e
3		0	71.22 ± 0.79 ^b	61.07 ± 0.53 ^d	63.22 ± 0.15 ^d
6	60	0.2	87.93 ± 0.95 ^a	91.82 ± 0.62 ^a	88.01 ± 0.65 ^a
9		0.3	67.08 ± 1.46 ^c	64.09 ± 0.34 ^c	72.32 ± 0.45 ^b

注:用 Duncan's multiple range test 法进行多重比较,同列标有不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同小写字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 4 细胞存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率的双因素方差分析结果

Tab.4 Results of double-factor analysis for the survival rate, CCK assay and the attached rations after 24 h

方差来源	细胞存活率/%		CCK 存活率/%		24 h 贴壁率/%	
	临界值 F	显著性 P	临界值 F	显著性 P	临界值 F	显著性 P
因素 A(海藻糖浓度)	51.05	0.00	11.95	0.02	16.36	0.01
因素 B(FBS 体积分数)	73.77	0.00	12.23	0.02	18.06	0.01
A × B(交互作用)	0.77	0.44	0	0.99	0.72	0.46

注: $P < 0.05$ 表示具有显著性; $P < 0.01$ 表示极其显著; $P > 0.05$ 表示不显著。

的交互作用不显著($P > 0.05$)。由最终结果来看,冷冻效果最好的冻存液组合是 10% Me₂SO + 60% FBS + 0.2 mol/L 海藻糖,细胞存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率分别为(87.93 ± 0.95)%、(91.82 ± 0.62)% 和(88.01 ± 0.65)%。

3 讨论

3.1 检测方法之间的关系

本实验采用了三种方法检测细胞的冻存效果。台盼蓝染色法是最常用的检测细胞活性的方法^[11]。实验组的细胞存活率指标基本上能够反映出海藻糖和 FBS 对细胞冻存效果的影响,但该方法操作误差偏大,一般还需要用 MTT 法或 CCK 法检测。有文献显示 CCK-8 法比传统 MTT 法灵敏度高、操作简便、结果准确可靠且重复性好^[15]。CCK 法的原理是试剂中的 WST-8 在电子载体的作用下能被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色甲臞物,用酶标仪在波长 450 nm 处检测样品吸光度^[12]。实验中 CCK 存活率结果从整体上看比台盼蓝检测的存活率略高,可能是因为在 CCK-8 试剂染色过程中,一部分细胞虽然细胞膜受损,但因具有酶的活性会被检测为“活细胞”。所以两种方法联合使用更能全面反映细胞活性。实验组中 24 h 贴壁率与前两种方法的结果相对应,它着重于检测细胞复温培养后的存活能力。

3.2 海藻糖和 FBS 的作用机制

实验中用三种方法检测的细胞存活率、CCK 存活率和 24 h 贴壁率的结果是一致的。在不加任何保护剂冻存后,细胞几乎全部死亡。而添加保护剂的实验组冷冻效果都显著($P < 0.05$)。甘油是最早被使用的低温保护剂,但有研究发现在同等条件下,甘油的冷冻效果远低于 Me₂SO^[9]。有学者研究出最适宜冻存人肝细胞的 Me₂SO 浓度是 10% ~ 12%^[16],人肝癌细胞 Hep-G2 为 10% ~ 20%^[17],293T 细胞为 5% ~ 10%^[18]。实验中以 10% Me₂SO 为基础冻存液,从实验结果来看,单纯的 10% Me₂SO 并不能很好的冻存细胞,而加入不同浓度海藻糖和不同体积分数 FBS 对细胞冷冻效果影响显著($P < 0.05$)。表 2 显示 FBS 体积分数越高,细胞的冷冻效果越好,这是因为 FBS 是培养细胞、保持细胞活性最重要的成分,还可以提供结合蛋白,结合有毒金属和热源物质,起解毒作用。表 3 显示随着海藻糖浓度的增加,存活率和 24 h 贴壁率先增加后减小,在 0.2 mol/L 时达到最大,说明海藻糖冻存细胞的确可以产生很好的效果,但需要控制浓度。浓度过高时,一方面会影响细胞膜

表面酶的活性,减少 Me₂SO 和 FBS 进入胞内,另一方面会使细胞过度脱水而死亡^[19];浓度过低时又起不到保护细胞膜和蛋白质的作用。这一点与 S. Blake 等^[4]的研究结果相吻合。实际上海藻糖的作用原理还包括:“水替代”假说、“玻璃态”假说、“优先排阻”假说,在红细胞、血小板及生殖细胞等的离体长期保存中,均表现出独特的功能^[20]。表 4 结果显示海藻糖和 FBS 的交互作用不显著($P > 0.05$),说明它们相互之间的影响不大;但从最终结果来看,实验 6 组的结果最好,说明它们协同作用可以产生更好的冻存效果。

在实际应用中,考虑到胎牛血清成本、细胞复温后贴壁生长速度等因素,由表 2 可知:实验 5 组、实验 3 组和实验 9 组比较,CCK 存活率较高且差异显著($P < 0.05$),台盼蓝检测存活率和 24 h 贴壁率略低但差异不显著($P > 0.05$)。即 10% Me₂SO + 40% FBS + 0.2 mol/L 海藻糖的冻存液组合也能实现很好的冻存效果。

3.3 冻存过程

目前大多数生物样本库采用 -80 °C 冰箱与液氮罐保存样本。液氮中可以实现长久保存^[21],因为在 -196 °C 下细胞的生命活动几乎完全停止。但冻存过程中的降温速率要严格控制^[22]。J. N. V. Reyes 等^[23]采用慢速降温和玻璃化对牛胚胎冷冻保存进行研究,证明玻璃化方式效果最好。由于实验条件等原因,本实验只研究了逐步降温法,为更进一步增强保存效果,还需要对不同降温方式进行实验研究。

本实验为研究其他乳腺类细胞的低温保存提供了一定的参考价值。但针对样本库中其他类细胞或组织,海藻糖是否适用、适宜浓度是多少、是否有更好的可替代保护剂、其他降温方式的效果等问题都有待探索。

4 结论与建议

本实验以人乳腺细胞 HBL-100 为研究对象,在 10% Me₂SO 的 DMEM 中添加 20% ~ 60% FBS 和 0 ~ 0.3 mol/L 海藻糖,研究海藻糖和 FBS 对细胞低温保存效果的影响。采用台盼蓝染色法、CCK 法和 24 h 贴壁率法检测细胞活性,得出结论:当海藻糖浓度一定时,随着 FBS 体积分数的增加,三种检测指标都显著增加;但当不添加海藻糖时,FBS 的促进作用不明显;当 FBS 体积分数一定时,细胞的存活率在海藻糖浓度为 0.2 mol/L 时最高。冻存液组合为 10% Me₂SO + 60% FBS + 0.2 mol/L 海藻糖时的三种检测指标最高。考虑到胎牛血清成本及复温后细胞生长

速度等因素,选择 40% FBS + 0.2 mol/L 海藻糖也能达到很好的冷冻效果。本文仅探讨了一种细胞在两种保护剂变化下冷冻效果的影响,对其他细胞或组织来说,保护剂的种类和用量有待进一步研究,以更好的完善生物样本库体系。

参考文献

[1] DABOS K J, PARKINSORT J A, HEWAGE C, et al. H-1 NMR spectroscopy as a tool to evaluate key metabolic functions of primary porcine hepatocytes after cryopreservation [J]. *NMR Biomed*, 2002, 15(3): 241-250.

[2] MOTTA J P, PARAGUASSÚ-BRAGA F H, BOUZAS L F, et al. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood[J]. *Cryobiology*, 2014, 68(3):343-348.

[3] 杨波,周燕,刘宝林,等. 肝细胞低温保存的实验研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2011, 30(2): 308-311. (YANG Bo, ZHOU Yan, LIU Baolin, et al. Studies on cryopreservation of human hepatocytes[J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2011, 30(2):308-311.)

[4] BLAKE S, QUINN O, DAVID G, et al. Cryopreservation of hepatocyte (HepG2) cell monolayers: impact of trehalose[J]. *Cryobiology*, 2014, 69(2):281-290.

[5] 王连召,周刚,王化冰,等. 深低温冷冻保存气管的实验研究[J]. *中华整形外科杂志*, 2002, 40(Suppl. 1): 636-636. (WANG Lianzhao, ZHOU Gang, WANG Huabing, et al. Study on cryopreservation of tracheal tube[J]. *Chinese Journal of Plastic Surgery*, 2002, 18(Suppl. 1): 636-636.)

[6] SUI L, NOMURA R, DONG Y, et al. Cryoprotective effects of D-allose on mammalian cells[J]. *Cryobiology*, 2007, 55(2):87-92.

[7] 孙燕香,姜国诚. 玻璃化冷冻保存小鼠受精卵的研[J]. *广西师范大学学报*, 2003, 21(3):77-79. (SUN Yanxiang, JIANG Guocheng. Study on the vitrification of mouse fertilized eggs[J]. *Journal of Guangxi Normal University*, 2003, 21(3):77-79.)

[8] 陈光,蔡慧云,魏晓军,等. 胃肠道肿瘤冻存组织原代细胞培养的实验研究[J]. *临床军医杂志*, 2011, 39(4):605-607. (CHEN Guang, CAI Huiyun, WEI Xiaojun, et al. Study on cryopreservation of primary cell of gastrointestinal tumor[J]. *Clinical Medical Journal*, 2011, 39(4): 605-607.)

[9] 程金华,朱化彬,孙秀柱,等. 冷冻保护剂和胎牛血清对牛成纤维细胞冷冻效果的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(21):12-14. (CHENG Jinhua, ZHU Huabin, SUN Xiuzhu, et al. Effects of cryopreservation and fetal bovine serum on the cryopreservation of bovine fibroblast cells [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2006, 42(21):

12-14.)

[10] 王亮,刘婷婷,彭涛,等. 荷斯坦奶牛耳组织成纤维细胞分离培养及冷冻保存方法研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(5):9-12. (WANG Liang, LIU Tingting, PENG Tao, et al. Study on isolation, culture and cryopreservation of holstein cattle-ear organization and fibroblasts[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006(5):9-12.)

[11] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版社, 2004. (SITU Zhenqiang. *Cell culture*[M]. Beijing: World Book Publishing House, 2004.)

[12] TOMINAGA H, ISHIYAMA M, OHSETO F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay[J]. *Analytical Communications*, 1999, 36(2): 47-50.

[13] 孙健,梅晶,赵晓红,等. 植物活性成分对细胞存活率的影响及其测定方法的比较研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(19):119-123. (SUN Jian, MEI Jing, ZHAO Xiaohong, et al. Effects of bioactive plant components on cell viability and comparison of cell viable assays[J]. *Food Science*, 2012,33(19):119-123.)

[14] 姚岚,梁玮,刘宝林. 人肝癌细胞 Hep-G2 的低温保存研究[J]. *制冷学报*, 2015,36(2):95-100. (YAO Lan, LIANG Wei, LIU Baolin. Study on cryopreservation of human hepatoma Hep-G2 cell[J]. *Journal of Refrigeration*, 2015,36(2):95-100.)

[15] 熊建文,肖化,张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5): 559-562. (XIONG Jianwen, XIAO Hua, ZHANG Zhenxi. A comparison of test conditions for the cell activity by MTT and CCK-8 methods[J]. *Journal of Laser Biology*, 2007, 16(5):559-562.)

[16] GUILLOUZO A, RIALLAND L, FAUTREL A, et al. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, 121(1): 7-16.

[17] NAGAHARA Y, SEKINE H, OTAKI M, et al. Use of high concentrations of dimethyl sulfoxide for cryopreservation of HepG2 cells adhered to glass and polydimethylsiloxane matrices[J]. *Cryobiology*, 2016, 72(1):53-59.

[18] 李佳佳,程腾,贺小英,等. 二甲基亚砜和胎牛血清对 293T 细胞冷冻效果的影响[J]. *信阳师范学院学报*, 2013, 26(2):217-220. (LI Jiajia, CHENG Teng, HE Xiaoying, et al. Effects of DMSO and fetal bovine serum on the cryopreservation of 293T cells[J]. *Journal of Xinyang Normal University*, 2013, 26(2):217-220.)

[19] LEE Y A, KIM Y H, KIM B J, et al. Cryopreservation in trehalose preserves functional capacity of murine spermatogonial stem cells[J]. *Plos One*, 2013, 8(1):e54889.

- [20] KANIAS T, ACKER J P. Trehalose loading into red blood cells is accompanied with hemoglobin oxidation and membrane lipid peroxidation [J]. *Cryobiology*, 2009, 58 (2): 232.
- [21] 于颖彦, 刘炳亚, 朱正纲. 肿瘤组织库建立的进展及意义 [J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8 (1): 9-11. (YU Yingyan, LIU Bingya, ZHU Zhenggang. Advances in the establishment of tumor tissue bank and significance [J]. *Journal of Diagnostics Concepts & Practice*, 2009, 8 (1): 9-11.)
- [22] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1995. (HUA Zezhao, REN Hesheng. *Low temperature biomedical technology* [M]. Beijing: Science Press, 1995.
- [23] REYES J N V, JARAMILLO L C. Cryopreservation meth-

od and composition of the vitrification solution affect viability of in vitro bovine embryos [J]. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, 2016.

通信作者简介

刘宝林, 男, 教授, 上海理工大学医疗器械与食品学院, 13636524955, E-mail: bliiuk@163.com。研究方向: 细胞、组织和器官的低温保存、食品冷冻冷藏、食品药品的冷冻干燥技术等。

About the corresponding author

Liu Baolin, male, professor, School of Medical Devices and Food Science, Shanghai University of Science and Technology, + 86 13636524955, E-mail: bliiuk@163.com. Research fields: the cryopreservation of cells, tissues and organs, food freezing and cold storage, food and drug refrigeration and drying technology.