

文章编号:0253 - 4339(2018) 06 - 0122 - 07

doi:10. 3969/j. issn. 0253 - 4339. 2018. 06. 122

基于蚕丝蛋白的低温保护剂用于梅山猪耳成纤维细胞的低温保存研究

滕芸 周新丽 张宵敏

(上海理工大学医疗器械与食品学院 上海 200093)

摘要 细胞低温保存为临床治疗和科学研究提供优质的细胞。体积分数为 10% 二甲基亚砜(DMSO)和体积分数为 20% 胎牛血清(FBS)是目前冻存细胞常用的保护剂。但 DMSO 对细胞具有毒性损伤, FBS 存在携带病毒、感染疾病的风险。本文以梅山猪耳成纤维细胞作为模型细胞进行冻存实验, 将蚕丝蛋白用于低温保护剂中, 用不同质量浓度的丝胶蛋白和不同体积分数的丝素蛋白来分别替代 FBS 和 DMSO, 验证其在细胞低温保存中的有效性。解冻复苏后用台盼蓝染色法、MTT 法、24 h 贴壁率等检测细胞的存活率和生长活力, 筛选出最佳的基于天然蚕丝蛋白的低温保护剂配方。结果表明: 含质量浓度为 1% 丝胶蛋白和含体积分数为 20% FBS 的低温保护剂对猪耳细胞的冻存效果无显著差异, 说明丝胶蛋白能有效替代 FBS。将体积分数为 10% DMSO 浓度降至 5%, 添加体积分数为 10% 丝素蛋白后, 细胞的存活率和贴壁率与对照组相比无明显差异, 说明丝素蛋白能降低 DMSO 的浓度。将质量浓度为 1% 丝胶蛋白与体积分数为 10% 丝素蛋白联用后, 能达到较好的冻存效果。

关键词 低温保护剂; 蚕丝蛋白; 无血清保护剂; 猪耳成纤维细胞

中图分类号: TB61⁺1; R318.52

文献标识码: A

Research on the Cryopreservation of Meishan Pig Ear Fibroblast Cells using Silk Protein

Teng Yun Zhou Xinli Zhang Xiaomin

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China)

Abstract Cell cryopreservation provides high quality cells for clinical application and scientific studies. Specifically, 20% (v/v) FBS supplemented with 10% (v/v) DMSO are widely used in cryoprotectants. However, high concentrations of DMSO are cytotoxic to cells, and FBS exhibits problems related to diseases such as bovine spongiform encephalopathy and viral infections. Silk protein is a type of natural macromolecule fiber protein with good biocompatibility. The aim of the study involved testing the effectiveness of the silk protein as cryoprotectant and developing a novel FBS-free and low concentration DMSO freezing medium. Meishan pig ear fibroblast cells were cryopreserved by using a freezing medium in the presence of various mass concentrations of silk sericin and various volume fractions of silk fibroin. The preservation efficiency was evaluated by trypan blue dye exclusion test, MTT assay, and the 24 h adherent rate after thawing. The results indicate that the survival rate of cryopreserved cells does not significantly differ when the cells are cryopreserved with a freezing medium containing 1% (w/v) sericin and 20% (v/v) FBS, and this indicates that sericin can substitute for FBS in the freezing medium. A significant difference is absent between 10% (v/v) fibroin protein with 5% (v/v) DMSO and 10% (v/v) DMSO, and thus the fibroin decreases the concentration of DMSO. Finally, 5% (v/v) DMSO supplemented with 1% (w/v) sericin and 10% (v/v) fibroin exhibit similar results as a control group.

Keywords cryoprotective agent; silk protein; FBS-free freezing medium; pig ear fibroblast cells

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一, 在临床治疗和科学研究中应用广泛。为了减少冻融过程对细胞造成的损伤和致死, 低温保护剂的组分及添加步骤至关重要^[1]。1959 年, J. E. Lovelock 等^[2]创新性地

以体积分数为 10% 二甲基亚砜(DMSO)作为冷冻保护剂, 同时加入体积分数为 5% ~ 90% 的血清作为冷冻储存液来保存细胞。至今这两种物质仍然作为主要成分出现在保护剂配方中。DMSO 能减少细胞脱

基金项目: 国家自然科学基金(51376132)资助项目。(The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51376132).)

收稿日期: 2017 年 10 月 24 日

水和胞内冰的形成,维持细胞膜的完整性^[3],但高体积分数的 DMSO 会对细胞造成严重的毒性损伤。胎牛血清(FBS)常作为细胞低温保存的血清,其保护机制是通过改变渗透压,在冷冻时促使细胞脱水,解冻时抑制水分快速渗入并脱出胞内的保护剂,促进溶液玻璃化形成,保护细胞膜和细胞的完整性^[4]。但 FBS 具有携带病毒、感染疾病的风险,如异种动物传染病、疯牛病等,且价格昂贵,批次之间稳定性差^[5]。

蚕丝是一种天然的高分子材料,无污染且来源丰富,主要由丝胶蛋白和丝素蛋白组成。近年来,丝胶蛋白被应用于细胞的低温保存领域,发现其具有替代 FBS 作为冷冻介质的作用。据文献报道,基于丝胶蛋白的无血清保护剂相继成功冻存了仓鼠骨髓瘤细胞、杂交瘤细胞、卵巢细胞^[6],小鼠的杂交瘤细胞、大鼠胰岛瘤细胞^[7-9],人的肝细胞^[10],大鼠胰岛细胞^[11]及牛精子和胚胎^[12-13]。丝素蛋白被广泛地应用于药物释缓、骨组织修复、人工皮肤、血管等生物医用材料的制备,以及降血糖、抑菌等医疗保健方面^[14-15]。但将丝素蛋白加入低温保护剂中,探讨其是否具有低温保护作用的潜力,目前还未有相关的公开报道。

以梅山猪耳成纤维细胞作为实验材料,具有取材方便、效率高等优点,并且体细胞和生殖细胞同样具有全能型,可以作为动物活体保种的有利辅助方式^[16-17]。本文将蚕丝蛋白加入低温保护剂中,用于梅山猪耳成纤维细胞的低温保存。用丝胶蛋白替代 FBS,避免因血清带来的污染及病毒感染的风险,并在保护剂中添加丝素蛋白来降低 DMSO 的体积分数,减少对细胞的损伤。以期研发一种基于天然蚕丝蛋白的新型、低毒性的无血清低温保护剂,并应用于其他细胞、组织的低温保存实践中。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料:蚕茧(广西平果桑移天下丝绸有限公司),梅山猪耳成纤维细胞(上海市农业科学院)。

试剂:丝胶蛋白(日本和光纯药),HyClone 胎牛血清(FBS)(上海博升生物科技有限公司),二甲基亚砜(DMSO)(中国医药集团上海化学试剂公司)。

1.2 设备与耗材

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

1.3 方法

1.3.1 丝素蛋白的制备

参考文献^[18]的制备方法,将蚕茧除杂处理后,在质量浓度为 0.2% 的碳酸钠溶液中进行脱胶处理 30 min;得到的丝素纤维冲洗烘干后,60 °C 条件下用 9.3 mol/L 溴化锂溶解 4 h;将丝素蛋白溶液进行透析、离心、浓缩等处理,置于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3.2 细胞培养

将猪耳成纤维细胞接种于含体积分数为 20% FBS、1% 丙酮酸钠、1% 双抗、1% 非必需氨基酸的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂、饱和湿度条件下培养,待细胞生长至汇合,进行传代/冻存等操作。

1.3.3 低温保护剂的配制

丝胶蛋白实验:基础冻存液为添加体积分数为 10% DMSO 的 DMEM。对照组 1 和 2 分别为添加和不添加体积分数为 20% FBS 的低温保护剂,实验组 3~7 分别添加了质量浓度为 10%、5%、2%、1%、0.5% 的丝胶蛋白来替代体积分数为 20% FBS,配制基于丝胶蛋白的新型无血清低温保护剂。

丝素蛋白实验:基础冻存液为添加体积分数为 20% FBS 的 DMEM。对照组 1 为添加体积分数为 10% DMSO 的低温保护剂,实验组 2~19 将体积分数为 10%、8%、4%、2%、1% 及不添加丝素蛋白和体积分数为 10%、5%、2.5% 及不添加 DMSO 进行组合,配制基于丝素蛋白的新型低毒性低温保护剂。

筛选出丝胶蛋白和丝素蛋白的最优浓度后,选择最优浓度进行联用,配制基于天然蚕丝蛋白的新型、低毒性的无血清低温保护剂。

1.3.4 细胞冻存

将消化后的细胞悬液转移至离心管中,离心去上清。每组加入 1 mL 配制好的低温保护剂,轻轻吹打均匀,转移至 2 mL 冻存管。将标记好的冻存管放入程序降温盒中,置于 -80 °C 深低温冰箱中冻存一周。

1.3.5 细胞复苏

从冰箱中取出冻存管,在 37 °C 水浴锅中快速摇晃冻存管,直至管内细胞悬液完全融化。室温下 5 min 内用 25 °C 含血清培养基稀释。离心去掉上清液,再加入 1 mL 培养液重悬细胞。

1.3.6 细胞活力检测

台盼蓝染色法^[19]:取 10 μL 体积分数为 0.4% 台盼蓝溶液和 10 μL 复水后的细胞悬浮液,混合均匀并静置 1 min 后,滴加在细胞计数板上,按式(1)进行计数:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\% \quad (1)$$

MTT 法^[19]:取复温后的细胞悬液置于 96 孔板中,每种低温保护剂设置 3 个平行样,另加一组新鲜细胞作为对照组,一组细胞培养基作为空白组。每孔加入 100 μL 实验样本,再每孔加入 20 μL MTT 溶液,低速震荡融合后置于培养箱中避光孵育 4 h。4 h 后吸除上层溶液,每孔加入 150 μL DMSO,再低速震荡 10 min。待结晶物充分溶解后,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光值,按式(2)进行计算:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}}{\text{新鲜对照 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}} \times 100\% \quad (2)$$

24 h 贴壁率:复温后的细胞接种于细胞培养瓶中,加入培养基后置于细胞培养箱中培养。24 h 后收集上层培养液,并用 D-Hanks 冲洗两遍后,收集所

有上清液,计数未贴壁细胞。贴壁细胞用胰酶消化后离心,取上清液,加 1 mL 培养基重悬,计数贴壁细胞。同时观察细胞的生长情况和形态变化。按式(3)计算细胞的贴壁率:

$$24 \text{ h 贴壁率} = \frac{\text{贴壁细胞数}}{\text{贴壁细胞数} + \text{未贴壁细胞数}} \times 100\% \quad (3)$$

1.4 统计学分析

所有实验数据都来自于至少 3 组平行独立实验,均采用平均值 \pm 标准差的形式,应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理、统计及显著性分析。

2 实验结果

2.1 丝胶蛋白冻存细胞的存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率

将基于丝胶蛋白的无血清低温保护剂应用于猪耳细胞的冻存实验,所得的细胞存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率如表 1 所示。

表 1 基于丝胶蛋白低温保护剂的细胞存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率

Tab. 1 The survival rate, MTT assay and 24 h adherent rate with various concentration of sericin protein

编号	保护剂	存活率/%	MTT 存活率/%	24 h 贴壁率/%
1	DMEM + 10% (v/v) DMSO + 20% (v/v) FBS	88.14 \pm 2.69 ^b	86.07 \pm 3.29 ^c	88.4 \pm 0.10 ^a
2	DMEM + 10% (v/v) DMSO	81.74 \pm 1.66 ^c	82.07 \pm 4.38 ^c	84.98 \pm 1.49 ^b
3	DMEM + 10% (v/v) DMSO + 10% (w/v) Sericin	73.78 \pm 2.41 ^d	74.93 \pm 5.49 ^d	78.42 \pm 2.66 ^c
4	DMEM + 10% (v/v) DMSO + 5% (w/v) Sericin	88.41 \pm 0.75 ^b	89.53 \pm 1.61 ^b	84.85 \pm 2.81 ^b
5	DMEM + 10% (v/v) DMSO + 2% (w/v) Sericin	85.86 \pm 3.92 ^b	83.95 \pm 2.89 ^c	79.65 \pm 1.56 ^c
6	DMEM + 10% (v/v) DMSO + 1% (w/v) Sericin	92.62 \pm 0.42 ^a	92.05 \pm 1.66 ^a	88.58 \pm 2.37 ^a
7	DMEM + 10% (v/v) DMSO + 0.5% (w/v) Sericin	76.37 \pm 2.16 ^d	75.76 \pm 3.75 ^d	84.39 \pm 2.10 ^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 ($P > 0.05$)。v/v 为体积分数;w/v 为质量浓度。下表相同。

由表 1 可知,对照组 1 和对照组 2 的细胞存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率相比存在显著差异 ($P < 0.05$),说明添加体积分数为 20% FBS 后能显著提高细胞的存活率和贴壁率,添加 FBS 对细胞的低温保存具有一定的作用。去除 FBS 后,分别添加质量浓度为 10%、5%、2%、1%、0.5% 的丝胶蛋白,可以看出添加质量浓度 1% 丝胶蛋白的细胞存活率及 24 h 贴壁率最好,且显著高于对照组 1 ($P < 0.05$)。丝胶蛋白质量浓度从 10% 降至 1%,细胞的存活率和 24 h 贴壁率虽没有严格按照线性变化,但呈现增长的趋势。质量浓度继续降为 0.5% 时,冻存效果开始下降。说明添加质量浓度为 1% 丝胶蛋白能有效替

代 FBS,更好地冻存细胞。

2.2 丝素蛋白冻存细胞的存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率

将基于丝素蛋白的低温保护剂进行细胞冻存实验,分析细胞的存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率来验证细胞冻存效果。实验结果如表 2 所示。

实验组 1 为对照组,添加体积分数为 10% DMSO 细胞的存活率和 24 h 贴壁率都较高,说明 DMSO 对细胞冻存具有显著的保护作用。不添加丝素蛋白的情况下,DMSO 体积分数从 5% 降至 0,细胞的存活率和 24 h 贴壁率分别从 73.37%、78.55% 降至 11.88%、6.86%,呈现明显的下降趋势,且有显著性

差异 ($P < 0.05$)。说明 DMSO 体积分数的下降对细胞存活率和 24 h 贴壁率具有显著影响。降低 DMSO 体积分数且添加丝素蛋白后,随着其体积分数的不断增加,冻存效果也显著增强。当 DMSO 体积分数为 5% 时,分别添加体积分数为 1%、2%、4%、8%、10% 的丝素蛋白,细胞存活率和 24 h 贴壁率分别从 68.95%、69.19% 增长至 89.35%、88.94%,具有显

著性差异 ($P < 0.05$)。其中 5% (v/v) DMSO + 10% (v/v) 丝素蛋白组与对照组相比,细胞的存活率和 24 h 贴壁率均高于对照组,说明添加体积分数为 10% 丝素蛋白能有效补偿体积分数为 5% DMSO 的作用效果。但是当 DMSO 体积分数为 0 时,即使添加体积分数为 10% 丝素蛋白,细胞的存活率和 24 h 贴壁率均较低,说明丝素蛋白并不能完全替代 DMSO。

表 2 基于丝素蛋白低温保护剂的细胞存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率

Tab. 2 The survival rate, MTT assay and 24 h adherent rate with various concentration of fibroin protein

编号	丝素蛋白 (v/v)/%	DMSO (v/v)/%	存活 率/%	MTT 存活 率/%	24 h 贴壁 率/%
1	0	10	88.14 ± 1.69 ^a	86.07 ± 1.29 ^b	88.4 ± 0.10 ^b
2		5	73.37 ± 1.24 ^d	75.78 ± 3.76 ^c	78.55 ± 2.68 ^d
3	0	2.5	68.47 ± 1.30 ^e	69.23 ± 1.17 ^e	66.93 ± 1.69 ^f
4		0	11.88 ± 1.46 ^j	12.45 ± 2.12 ⁱ	6.86 ± 0.31 ^l
5		5	68.95 ± 1.5 ^e	67.91 ± 1.34 ^d	69.19 ± 2.82 ^e
6	1	2.5	58.99 ± 3.53 ^g	61.19 ± 0.74 ^f	59.44 ± 2.18 ^h
7		0	7.76 ± 0.71 ^k	7.70 ± 0.56 ^j	3.17 ± 0.12 ^m
8		5	72.90 ± 1.58 ^d	70.64 ± 1.85 ^d	72.95 ± 2.29 ^d
9	2	2.5	61.90 ± 1.09 ^f	63.95 ± 2.40 ^e	60.23 ± 1.2 ^h
10		0	13.77 ± 2.50 ^j	12.30 ± 0.58 ⁱ	5.23 ± 0.65 ^l
11		5	79.49 ± 1.14 ^b	75.57 ± 3.47 ^c	77.62 ± 2.99 ^e
12	4	2.5	64.23 ± 1.54 ^f	66.17 ± 2.37 ^e	64.37 ± 0.85 ^g
13		0	14.37 ± 1.66 ^j	12.75 ± 1.47 ⁱ	11.71 ± 0.57 ^k
14		5	86.28 ± 1.50 ^a	84.43 ± 0.81 ^c	86.35 ± 0.89 ^b
15	8	2.5	76.32 ± 2.42 ^c	74.33 ± 1.71 ^c	72.87 ± 2.31 ^e
16		0	24.24 ± 1.27 ⁱ	22.94 ± 1.61 ^f	23.78 ± 1.26 ^j
17		5	89.35 ± 0.79 ^a	89.22 ± 0.70 ^a	88.94 ± 2.00 ^a
18	10	2.5	78.47 ± 1.30 ^c	75.71 ± 1.31 ^c	76.08 ± 1.81 ^e
19		0	34.07 ± 1.85 ^h	33.47 ± 0.79 ^g	29.87 ± 1.43 ⁱ

注:基础液为添加体积分数为 20% FBS 的 DMEM。

图 1 所示为基于丝素蛋白低温保护剂对细胞的冻存活率影响,将保护剂 1、2、3、4、17、18、19 七组数据进行对比。分析保护剂 1、2、3 可知,DMSO 体积分数从 10% 降至 2.5%,细胞存活率虽呈下降趋势,但影响并不显著,说明体积分数为 2.5% DMSO 就能保障较好的冻存效果。在保护剂 2 和 3 的基础上添加体积分数为 10% 丝素蛋白即保护剂 17 和 18,细胞存活率分别从 73.37% 提高至 89.35%、68.47% 提高至 78.47%,与对照组 1 相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

说明 DMSO 体积分数高于 2.5% 时,DMSO 起主要保护作用,但添加丝素蛋白后效果更显著。分析保护剂 4 和 19 可得,当 DMSO 体积分数为 0 时,添加体积分数为 10% 丝素蛋白后,细胞的存活率从 11.88% 提高至 43.07%,说明无 DMSO 作用时,丝素蛋白对冻存的保护作用显著。体积分数为 5% DMSO 添加体积分数为 10% 丝素蛋白的细胞存活率与对照组相比无显著差异,说明体积分数为 10% 丝素蛋白能部分替代 DMSO 的作用效果,将原有 10% DMSO 体积分数

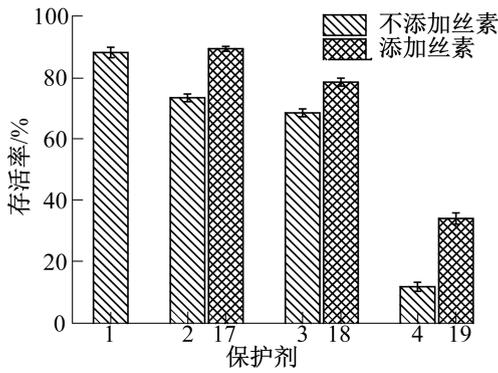


图 1 基于丝素蛋白低温保护剂对细胞的冻存存活率影响
Fig. 1 Effect of fibroin protein on cell cryopreservation

表 3 基于蚕丝蛋白低温保护剂的细胞存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率

Tab. 3 The survival rate, MTT assay and 24 h adherent rate with various concentration of silk protien

编号	保护剂	存活率/%	MTT 存活率/%	24 h 贴壁率/%
1	DMEM + 10% (v/v) DMSO + 20% (v/v) FBS	88.14 ± 2.69 ^a	86.07 ± 3.29 ^a	88.4 ± 0.10 ^a
2	DMEM + 10% (v/v) DMSO	81.74 ± 1.66 ^b	82.07 ± 4.38 ^b	84.98 ± 1.49 ^b
3	DMEM + 5% (v/v) DMSO + 1% (w/v) Sericin + 10% (v/v) Fibroin	82.60 ± 1.60 ^b	83.02 ± 1.68 ^b	88.03 ± 0.56 ^a

由表 3 可知,基于蚕丝蛋白的复合保护剂与对照组 1 相比,细胞存活率与 MTT 存活率较低,24 h 贴壁率无明显差异;与对照组 2 相比,细胞存活率与 MTT 存活率无显著差异,24 h 贴壁率较高。说明将质量浓度为 1% 丝胶蛋白与体积分数为 10% 丝素蛋白联用后,能达到较好的冻存效果。该新型低温保护剂,用天然生物材料蚕丝蛋白既替代了 FBS 又降低了 DMSO 的体积分数,同时保障了较高的细胞存活率和 24 h 贴壁率。

3 讨论

血清富含生长因子、激素、氨基酸和其他营养物质,含体积分数为 20% FBS 的培养基普遍应用于哺乳动物细胞的培养中^[20]。FBS 大多依靠进口,价格昂贵,还具有携带病毒、感染疾病的风险。丝胶蛋白是一种球状蛋白,由 18 种氨基酸组成,具有良好的亲水性和生物相容性,与 FBS 相比天然安全、来源丰富、价格低廉,并且丝胶蛋白经高压蒸气灭菌和过滤除菌后作用效果不变^[21],适用于细胞的无菌培养。据报道^[6-13],丝胶蛋白替代 FBS 制备的新型无血清低温保护剂,已经成功冻存多种哺乳动物细胞。说明在细胞的冻存中,丝胶蛋白能有效替代 FBS,并维持更高的细胞活性,这与本文实验得出的结论一致。但目前还未见珍稀和优良物种体细胞冻存研究的相关

降至 5%。但对比保护剂 1、4 和 19,发现丝素蛋白并不能完全取代 DMSO,单独作用时效果不如 DMSO。

2.3 蚕丝蛋白冻存细胞的存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率

结合 2.1 及 2.2 的实验结果可知,丝胶蛋白的最适质量浓度和丝素蛋白的最适体积分数分别为 1% 和 10%。将丝胶蛋白与丝素蛋白进行联用,制备基于天然蚕丝蛋白高效、低毒性的无血清低温保护剂 (DMEM + 5% (v/v) DMSO + 1% (w/v) 丝胶蛋白 + 10% (v/v) 丝素蛋白)。将该低温保护剂用于细胞冻存实验,从细胞的存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率进行分析,探究其冻存效果。结果如表 3 所示。

报道,本实验为研究其他物种体细胞的低温保存提供了一定的参考。S. Terada 等^[22]发现添加质量浓度为 0.25% ~ 0.5% 丝胶蛋白的抗冻剂能有效减少脂质过氧化有害影响,防止氧化应激,使解冻后精液质量显著提高,同时发现当丝胶蛋白质量浓度高于 1% 时,则不利于抑制脂质的过氧化,高浓度的渗透压也影响精液的质量。本实验中,丝胶蛋白质量浓度从 1% 提高至 10%,细胞的存活率和 24 h 贴壁率呈下降趋势,这与文献^[22]的结论一致。但丝胶蛋白质量浓度低于 1% 时,冻存效果显著下降。这可能与细胞的种类有关,对于猪耳成纤维细胞,丝胶蛋白浓度过高会抑制细胞表面分子进入胞内,引起渗透性胞内脱水,而浓度过低则起不到足够的保护作用。因此,针对不同的细胞类型需要筛选丝胶蛋白的最适质量浓度。

DMSO 是目前使用最广泛的低温保护剂,且体积分数为 10% DMSO 被认为是最适合细胞冻存的体积分数^[23-24]。但 DMSO 的毒性随着剂量的增加和温度的升高而升高,细胞冻存效果明显下降。有研究者通过添加糖类^[25-26]或氨基酸类^[27]物质来减弱 DMSO 的体积分数,并取得了一定成果。本文创新性的将丝素蛋白用于细胞的低温保存中,以期达到削弱 DMSO 体积分数或替代 DMSO 的作用。丝素蛋白含有丰富的氨基酸,其中甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸含量约占

87%。丝素蛋白具有两性荷电的特殊性能,天然无毒,良好的人体亲和性和生物相容性等优良性能。虽然目前对于丝素蛋白能作为低温保护剂的作用机制尚不明确,但从丝素蛋白的内部结构研究发现,丝素蛋白通过酸、碱或酶彻底水解后形成丝素肽。丝素肽能与水分子之间形成较强的氢键作用,这些氢键的存在会减弱冰晶形成所需的相变驱动力,未冻结水分含量降低,从而对细胞起到保护作用^[28-30]。本实验得出体积分数为 10% 丝素蛋白能有效补偿体积分数为 5% DMSO 的作用效果,但并不能完全替代 DMSO,仅添加体积分数为 10% 丝素蛋白的作用还不明显。随着丝素蛋白体积分数的提高,细胞的存活率和贴壁率均有显著提高,说明高浓度的丝素蛋白作用更显著。但目前由于丝素蛋白制备工艺的限制,最高体积分数只能达到 10%。因此,在丝素蛋白的制备和浓度上还有一定的改进空间。

4 总结与展望

本文以梅山猪耳成纤维细胞为研究对象,探究蚕丝蛋白对细胞低温保存的效果。制备的复合型低温保护剂 1% (w/v) 丝胶蛋白 + 10% (v/v) 丝素蛋白 + 5% (v/v) DMSO 用于冻存猪耳成纤维细胞,实验结果所得的存活率、MTT 存活率及 24 h 贴壁率分别为 82.60%、83.02%、88.03%。该新型低温保护剂不仅替代了 FBS,部分降低了 DMSO 的体积分数,还能保证较好的冻存效果。本文建立的基于天然蚕丝蛋白的低毒性、无血清低温保护剂为其他哺乳动物细胞低温保存提供了一定的参考,但对于不同的细胞,丝胶蛋白和丝素蛋白的最优浓度和配比,能否完全替代 FBS 或降低 DMSO 体积分数还需要进一步研究,并且结合不同的降温和解冻方法,以提高细胞冻融后的存活率。

参考文献

[1] BAUST J G, GAO D, BAUST J M. Cryopreservation: an emerging paradigm change [J]. *Organogenesis*, 2009, 5 (3):90-96.

[2] LOVELOCK J E, BISHOP M W H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide[J]. *Nature*, 1959, 183(4672):1394-1395.

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

[4] HUANG W T, HOLTZ W. Effects of meiotic stages, cryoprotectants, cooling and vitrification on the cryopreservation

of porcine oocytes[J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2002, 15(4):485-493.

[5] HUNTER N, FOSTER J, CHONG A, et al. Transmission of prion diseases by blood transfusion[J]. *The Journal of General Virology*, 2002, 83(11):2897-2905.

[6] SASAKI M, KATO Y, YAMADA H, et al. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2005, 42(2):183-188.

[7] TOYOSAWA T, SASAKI M, KATO Y, et al. Development of a novel serum-free cryopreservative solution[C]// *Cell Technology for Cell Products*. Dordrecht: Springer, 2007:225-231.

[8] TOYOSAWA T, OUMI Y, OGAWA A, et al. Novel serum-free cryopreservation of mammalian cells using seric [C]// *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. Dordrecht:Springer, 2008:41-45.

[9] IKEDA K, OUMI Y, OGAWA A, et al. Cryopreservative solution using sericin[C]// *Cells and Culture*. Dordrecht: Springer, 2010:675-678.

[10] MIYAMOTO Y, TERAMOTO N, HAYASHI S, et al. An improvement in the attaching capability of cryopreserved human hepatocytes by a proteinaceous high molecule, sericin, in the serum-free solution[J]. *Cell Transplantation*, 2010, 19(6):701-706.

[11] OHNISHI K, MURAKAMI M, MORIKAWA M, et al. Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets [J]. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 2012, 19(4):354-360.

[12] ISOBE T, IKEBATA Y, ONITSUKA T, et al. Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin[J]. *Cryobiology*, 2013, 67 (2):184-187.

[13] KUMAR P, KUMAR D, SIKKA P, et al. Sericin supplementation improves semen freezability of buffalo bulls by minimizing oxidative stress during cryopreservation [J]. *Animal Reproduction Science*, 2015, 152:26-31.

[14] HYUN C K, KIM I Y, FROST S C. Soluble fibroin enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134 (12): 3257-3263.

[15] PARK J H, NAM Y, PARK S Y, et al. Silk fibroin has a protective effect against high glucose induced apoptosis in HIT-T15 cells [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2011, 25(4):238-243.

[16] 张德福, 吴彩凤, 戴建军, 等. 梅山猪耳成纤维细胞体外培养及其克隆 [J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(7): 1188-1190. (ZHANG Defu, WU Caifeng, DAI Jianjun, et al. In vitro culture of Meishan pig ear fibroblast cells and

- cloning[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(7):1188-1190.)
- [17] WELLS D N. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed[J]. Theriogenology, 1998, 10(4):369-378.
- [18] ROCKWOOD D N, PREDA R C, YUCEL T, et al. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin[J]. Nature Protocols, 2011, 6(10):1612-1631.
- [19] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 2004. (SITU Zhenqiang, WU Junzheng. Cell culture[M]. Beijing: World Book Publishing Corporation, 2004.)
- [20] OZTURK S S, HU W S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies[J]. Taylor & Francis, 2005.
- [21] ARAMWIT P, KANOKPANONT S, NAKPHENG T, et al. The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(5):2200-2211.
- [22] TERADA S, NISHIMURA T, SASAKI M, et al. Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma [J]. Cytotechnology, 2002, 40(1/2/3):3-12.
- [23] VIOLANTE G D, ZERROUK N, RICHARD I, et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (dmsO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(12):1600-1603.
- [24] 王欣, 华泽钊, 刘宝林, 等. Me₂SO 浓度及预处理条件对组织工程化真皮活性的影响[J]. 上海理工大学学报, 2007, 29(4):311-314. (WANG Xin, HUA Zezhao, LIU Baolin, et al. Effects of Me₂SO and loading conditions on the cell viability of tissue-engineered dermal replacement [J]. Journal of University of Shanghai for Science & Technology, 2007, 29(4):311-314.)
- [25] SALIEM M, HOLM F, TENGZELIUS R B, et al. Improved cryopreservation of human hepatocytes using a new xeno free cryoprotectant solution [J]. World Journal of Hepatology, 2012, 4(5):176-183.
- [26] WEN Yanzi, SU Bixiu, LYU Shushen, et al. Trehalose, an easy, safe and efficient cryoprotectant for the parasitic protozoan Trypanosoma brucei [J]. Acta Tropica, 2016, 164:297-302.
- [27] FREIMARK D, SEHL C, WEBER C, et al. Systematic parameter optimization of a Me₂SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells[J]. Cryobiology, 2011, 63(2):67-75.
- [28] HYUN C K, KIM I Y, FROST S C. Soluble fibroin enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes [J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(12):3257-3263.
- [29] PARK J H, NAM Y, PARK S Y, et al. Silk fibroin has a protective effect against high glucose induced apoptosis in HIT-T15 cells [J]. Journal of Biochemical & Molecular Toxicology, 2011, 25(4):238-243.
- [30] 胡桐记, 高才, 周国燕, 等. 保护剂溶液水合和玻璃化性质的 DSC 研究 [J]. 上海理工大学学报, 2005, 27(5):381-384. (HU Tongji, GAO Cai, ZHOU Guoyan, et al. Hydration and glass transition properties of polyalcohols aqueous solution examined with DSC [J]. Journal of University of Shanghai for Science & Technology, 2005, 27(5):381-384.)

通信作者简介

周新丽, 女, 副教授, 博士, 上海理工大学医疗器械与食品学院, 13817547878, E-mail: zjulily@163.com。研究方向: 低温保存技术。

About the corresponding author

Zhou Xinli, female, associate professor, Ph. D., School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, +86 13817547878, E-mail: zjulily@163.com. Research fields: cryopreservation technique.