

文章编号:0253-4339(2015)02-0095-06

doi:10.3969/j.issn.0253-4339.2015.02.095

# 人肝癌细胞 Hep-G2 的低温保存研究

姚岚 梁玮 刘宝林

(上海理工大学生物系统热科学研究所 上海 200093)

**摘要** 在细胞的低温保存中,低温保护剂的种类与浓度对复温后的存活率有着重要影响。本文以人肝癌细胞 Hep-G2 为研究对象,利用慢速冷冻法,筛选最佳的冻存液配方。通过配比不同浓度的甘油、Me<sub>2</sub>SO 以及在 Me<sub>2</sub>SO 中添加一定浓度的蔗糖、海藻糖,一周后复温细胞,对台盼蓝染色存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率三种检测结果进行比较分析,结果表明:以 Me<sub>2</sub>SO 作为低温保护剂时,冻存液浓度为 10% (v/v) 的 Me<sub>2</sub>SO 复温后细胞的三种检测指标最优;以甘油作为低温保护剂时,冻存液浓度为 20% (v/v) 的甘油复温后细胞的三种检测指标最优;再将以上分别得到的最佳浓度(即体积浓度 20% 甘油、10% Me<sub>2</sub>SO)与 5% Me<sub>2</sub>SO(v/v) + 0.3 mol/L 蔗糖、5% Me<sub>2</sub>SO(v/v) + 0.3 mol/L 海藻糖这四种低温保护剂进行冻存与比较,5% Me<sub>2</sub>SO(v/v) + 0.3 mol/L 海藻糖检测指标高于其他实验组,并且差异显著( $P < 0.05$ )。最终得到 5% Me<sub>2</sub>SO(v/v) + 0.3 mol/L 海藻糖为慢速冷冻保存 Hep-G2 细胞的最优保护剂配方。

**关键词** 低温保存;低温保护剂;糖类;存活率

中图分类号:TK124; R318.52

文献标识码:A

## Study on Cryopreservation of Human Hepatoma Hep-G2 Cell

Yao Lan Liang Wei Liu Baolin

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

**Abstract** It is well known that the type and concentration of cryoprotectant (CPAs) exerts a significant influence on the survival rate of cells following cryopreservation. The optimal cryoprotectant for human hepatoma Hep-G2 cell with slow cooling method was determined in the study. The Cells were frozen in Me<sub>2</sub>SO, glycerol, sucrose and trehalose at different concentration and combination, then stored in a -80 °C freezer for one week. The survival rate was assessed by trypan blue dye exclusion test, MTT assay and 24 h attachment assay. The results suggested that 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO provide effective protection among Me<sub>2</sub>SO groups; 20% (v/v) glycerol provide effective protection among glycerol groups; when sugars were added, 5% Me<sub>2</sub>SO(v/v) + 0.3 mol/L trehalose provide effective protection than the other groups( $P < 0.05$ ). In conclusion, 5% Me<sub>2</sub>SO (v/v) + 0.3 mol/L trehalose was the presumptive optimal cryoprotectant for human hepatoma Hep-G2 cell during slow freezing.

**Keywords** cryopreservation; cryoprotectants; sugar; viability

随着人类生活环境的恶化,恶性肿瘤的发病率越来越高,肿瘤的早期诊断和治疗是目前研究的热点。而临床样本作为研究肿瘤不可再生的宝贵资源,不仅对于探索新的治疗方法,发现新的诊断工具提供保障,对于制定新的诊断指标以及新药的研发也具有重要意义,所以建立肿瘤样本组织库势在必行。保持样本库中肿瘤细胞的活性,可以更加有效地保护细胞中蛋白、DNA、RNA 等生物信息免受损伤,从而使后续的肿瘤基础研究结果可信、准确。但是,目前绝大多

数的生物样本库均不能保持细胞的活性,所以,针对样本库中各种各样的细胞类型,研究其细胞及组织活体的低温保存方法,具有十分重要的意义。

细胞的低温保存有两种方法:慢速冷却法与玻璃化保存法<sup>[1]</sup>,这两种方法都需要添加低温保护剂<sup>[2]</sup>。而低温保护剂的种类以及浓度对细胞复温后的存活率是至关重要的。自从 1949 年 Polge C 等<sup>[3]</sup>利用甘油成功的冻存精子后,至今低温保护剂的种类已达上百种。由于甘油的局限性,人们继续在寻找低温保护

剂的路上进行探索;直到 1959 年, Lovelock 等人发现了二甲基亚砷( $\text{Me}_2\text{SO}$ )后,人们对低温保护剂的种类有了更多的发现。Jolanta K 等<sup>[4]</sup>利用甘油和羟乙基淀粉来冻存人体红细胞,发现羟乙基淀粉比甘油能更有效地保存红细胞的血红蛋白。Chesne C 等<sup>[5]</sup>通过比较得到, $\text{Me}_2\text{SO}$  较甘油有更好的保护作用。然而有研究表明, $\text{Me}_2\text{SO}$  对细胞膜有一定毒副作用,而利用非渗透性保护剂(如蔗糖、海藻糖等)与渗透性保护剂  $\text{Me}_2\text{SO}$  联合应用,不仅减小  $\text{Me}_2\text{SO}$  的浓度,又能达到理想的低温保存效果。Mohammed S 等<sup>[6]</sup>在冻存人体原代肝细胞时添加  $\text{Me}_2\text{SO}$  与  $\text{Me}_2\text{SO}$  + 葡萄糖这两种保护剂,两者对于复温后的存活率没有显著性差异,但通过检测相关指标得出利用后者保存后的肝功能更佳。目前,肿瘤细胞的低温保存也有较多的报导,Sui L 等<sup>[7]</sup>通过以人类卵巢癌细胞以及宫颈癌细胞为研究目标,得到海藻糖 +  $\text{Me}_2\text{SO}$  的最优保护剂配方。李慧等<sup>[8]</sup>探讨季德胜蛇药含药血清对人肝癌细胞 Hep-G2 增殖和凋亡的影响。陈光等<sup>[9]</sup>利用 10%  $\text{Me}_2\text{SO}$  + 高浓度血清的冻存液冻存胃肠道肿瘤组织原代细胞,成功率达到 100%。由以上可以看出,对于不同种类的细胞,选择合适的低温保护剂,可以更好的保护细胞及其功能。

建立肝癌组织样本库,从中筛选肝肿瘤生物标志物,利用各种组学方法来早期诊断、预测肝癌,具有重要意义<sup>[10]</sup>。因此,本文以人肝癌细胞 Hep-G2 为研究对象,以不同浓度的甘油、 $\text{Me}_2\text{SO}$  以及  $\text{Me}_2\text{SO}$  联合蔗糖、海藻糖作为低温保护剂,通过对复温后细胞的台盼蓝染色存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率三种监测指标进行对比、显著性分析等,探讨了不同保护剂对 Hep-G2 细胞的保存效果,优化保护剂配方,从而进一步提高低温保存 Hep-G2 细胞的存活率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验材料:人肝癌细胞 Hep-G2(购于中科院)。

实验试剂:HyClone 胎牛血清(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司);Dulbecco's Modified Eagle Medium 培养基(DMEM)(GIBCO 公司);台盼蓝染色液(2X),四唑盐(MTT)(碧云天生物技术公司);二甲亚砷( $\text{Me}_2\text{SO}$ )(德国 APPLICHEM 公司);甘油(丙三醇)(BIOSHARP 公司);蔗糖、海藻糖(中国医药集团上海化学试剂公司)。

### 1.2 仪器与设备

实验仪器: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(上海安亭科学仪器厂);程序降温盒(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 细胞培养

吸除细胞培养瓶中的培养基(10% (v/v) 胎牛血清 + 90% (v/v) DMEM 培养基),加入 5 mL 的 D-Hanks 液,冲洗细胞两次,再加入 2 mL 的 0.25% 胰蛋白酶消化,之后于显微镜下观察,当细胞呈现圆粒状将要分离时,吸掉胰蛋白酶溶液,加 4 mL 培养基终止消化。反复吹打瓶壁上残留的细胞,并将已消化下来的细胞吹打均匀,然后吸入离心管中,1000 r/min 离心 10 min,吸除上清液,备用。

### 1.3.2 实验分组

根据保护剂配方种类,实验分为三组,第一组为  $\text{Me}_2\text{SO}$  组,对应表 1 中编号 1~3;第二组为甘油组,保护剂配方对应表 1 中编号 4~6,第三组为不同保护剂组,对应表 1 中编号 7~10。其中第三组的保护剂配方是根据第一、二组实验结果,选择  $\text{Me}_2\text{SO}$  和丙三醇浓度,再配以蔗糖和海藻糖。将上述配好的冻存液各取 3 mL,分别逐滴加入到处理好的细胞中,轻轻振荡混匀,在室温下平衡 5 min 后,再将 3 mL 细胞悬液均分三份滴入 3 支冻存管中,并在各冻存管中标注细胞的组号。表 1 中编号 0 为对照组,未加入任何保护剂。

表 1 保护剂分组

Tab. 1 The group of cryoprotectants

编 号	$\text{Me}_2\text{SO}/$ (% v/v)	丙三醇/ (% v/v)	蔗糖/ (mol/L)	海藻糖/ (mol/L)	完全 培养基/ (% v/v)	胎牛 血清/ (% v/v)
0	0	0	0	0	100	0
1	5	0	0	0	75	20
2	10	0	0	0	70	20
3	15	0	0	0	65	20
4	0	10	0	0	70	20
5	0	20	0	0	60	20
6	0	30	0	0	50	20
7	0	20	0	0	60	20
8	10	0	0	0	70	20
9	5	0	0.3	0.3	70	20
10	5	0	0.3	0.3	70	20

### 1.3.3 细胞冻存

将冻存管放入程序降温盒中,再放入 -80 °C 低温冰箱中,根据程序降温盒的参数,能实现的降温速率为 1 °C/min。细胞在 -80 °C 冻存 7 天。

### 1.3.4 细胞复苏

一周后从低温冰箱中取出冻存管,于 37 °C 水浴中快速震荡复温,1000 r/min 离心 10 min 并去除上清液,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) 台盼蓝染色检测细胞存活率<sup>[11]</sup>

冻存前以及复温后的细胞吹打混匀后,取 100 uL 于 2 mL 离心管中,再加入 100 uL 台盼蓝染液染色,混匀后静止 3 ~ 5 min,吸取 10 uL 于血球计数板计数,分别记录冻存前以及复温后活细胞和死细胞数量。按以下公式计算细胞存活率:

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

2) MTT 检测细胞活性<sup>[11]</sup>

每组实验中,取复温后的细胞悬液置于 96 孔培养板中,每种保护剂配方有三个平行,另加一组新鲜对照组(新鲜细胞且浓度接近于复苏后细胞),一组完全培养基组;每孔加入 100 uL,每组对应 4 个复孔,即第一、二组实验共 4 × 14 孔,第三组实验共 4 × 17 孔。待细胞铺满孔底后,每孔加入 20 uL MTT,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 4 h,4000 r/min 离心 10 min,吸掉上清,每孔加入 150 uL Me<sub>2</sub>SO,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h 后,置摇床上低速振荡 10 min,待结晶物充分溶解后,在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{样品复温后 MTT 检测值}}{\text{新鲜对照 MTT 检测值}} \times 100\% \quad (2)$$

3) 24 h 贴壁率

复温后的细胞接种于细胞培养瓶中(500 uL),加入 4.5 mL 培养基后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 h 后换液并用 D-Hanks 液(2.5 mL)清洗两次,收集上清液,计数未贴壁细胞;接着用胰酶消化后加入培养基,1000 r/min 离心 10 min,计数贴壁细胞。同时观察培养肝细胞的生长情况及形态变化,按以下公式计算细胞贴壁率:

$$24 \text{ h 贴壁率}(\%) =$$

$$\frac{\text{贴壁存活细胞数}}{\text{贴壁存活细胞数} + \text{未贴壁存活细胞数}} \times 100\% \quad (3)$$

## 1.4 数据分析

应用 SPSS 软件对数据进行处理、统计以及显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Me<sub>2</sub>SO 组的细胞存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率

冻存前,用台盼蓝染色得到细胞的存活率为 (95.74 ± 3)%。

对照组以及保护剂浓度(v/v)为 5%、10%、15% 的 Me<sub>2</sub>SO 的细胞复温后,存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率结果如表 2 所示。

表 2 保护剂为 Me<sub>2</sub>SO 组的细胞复温后存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率

Tab. 2 Trypan blue dye exclusion test, MTT assay and the attached ratios after 24 h of cell with Me<sub>2</sub>SO (cryoprotectant)

编号	保护剂	存活率/%	MTT 存活率/%	24 h 贴壁率/%
0	无	1.02 ± 0.23 <sup>d</sup>	0.86 ± 0.42 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.14 <sup>c</sup>
1	5% Me <sub>2</sub> SO	77.93 ± 0.82 <sup>c</sup>	81.66 ± 0.65 <sup>b</sup>	83.70 ± 2.74 <sup>b</sup>
2	10% Me <sub>2</sub> SO	88.59 ± 1.52 <sup>a</sup>	85.19 ± 1.24 <sup>a</sup>	94.92 ± 1.35 <sup>a</sup>
3	15% Me <sub>2</sub> SO	83.03 ± 2.01 <sup>b</sup>	84.76 ± 1.41 <sup>a</sup>	93.84 ± 1.26 <sup>a</sup>

注:数据表示形式为平均值 ± SD(标准差);用 Duncan 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)。

从表 2 中可以得出,三个实验组的细胞存活率,MTT 存活率以及 24 h 贴壁率与对照组(编号 0)相比,均有显著性差异(P < 0.05),说明加入 5% ~ 15% (v/v) Me<sub>2</sub>SO 的低温保护剂能够显著提高细胞的存活率。10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO(编号 2)组的细胞存活率,MTT 存活率以及 24 h 贴壁率都较 5% 组高,且均具有显著性(P < 0.05);而 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO 的 MTT 存活率以及 24 h 贴壁率与 15% 组相比,略高但无显著性差异(P > 0.05),而细胞存活率差异有显著性(P < 0.05)。综上所述:添加 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO 的低温保护剂,对人肝癌细胞 Hep-G2 能产生较好的保护作用。

### 2.2 甘油组的细胞存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率

冻存前,用台盼蓝染色得到细胞的存活率为

(96.66 ± 2)%。对照组及保护剂浓度(v/v)为 10%、20%、30% 的甘油的细胞复温后,细胞存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率结果如表 3 所示。

表 3 保护剂为甘油组的细胞复温后存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率

Tab.3 Trypan blue dye exclusion test, MTT assay and the attached rations after 24 h of cell with glycerol (cryoprotectant)

编号	保护剂	存活率/%	MTT 存活率/%	24 h 贴壁率/%
0	无	0.75 ± 0.25 <sup>c</sup>	1.13 ± 0.52 <sup>c</sup>	1.25 ± 0.21 <sup>c</sup>
4	10% 甘油	69.42 ± 0.95 <sup>a</sup>	73.45 ± 1.24 <sup>a</sup>	84.13 ± 1.10 <sup>a</sup>
5	20% 甘油	71.83 ± 1.12 <sup>a</sup>	75.58 ± 0.86 <sup>a</sup>	86.72 ± 0.86 <sup>a</sup>
6	30% 甘油	64.32 ± 1.24 <sup>b</sup>	70.60 ± 2.41 <sup>b</sup>	79.46 ± 1.20 <sup>b</sup>

注:数据表示形式为平均值 ± SD(标准差);用 Duncan 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( $P > 0.05$ )。

从表 3 中可以得出,三个实验组的细胞存活率,

表 4 不同保护剂的细胞复温后存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率

Tab.4 Trypan blue dye exclusion test, MTT assay and the attached rations after 24 h of cell with different cryoprotectant

编号	保护剂	存活率/%	MTT 存活率/%	24 h 贴壁率/%
0	无	1.64 ± 0.21 <sup>d</sup>	1.38 ± 0.52 <sup>d</sup>	0.98 ± 0.65 <sup>d</sup>
7	20% 甘油	70.83 ± 1.32 <sup>c</sup>	77.81 ± 1.42 <sup>c</sup>	85.43 ± 0.95 <sup>c</sup>
8	10% Me <sub>2</sub> SO	87.20 ± 2.51 <sup>b</sup>	88.57 ± 1.49 <sup>b</sup>	91.45 ± 2.01 <sup>b</sup>
9	5% Me <sub>2</sub> SO + 0.3mol/L 蔗糖	86.54 ± 1.85 <sup>b</sup>	87.44 ± 0.96 <sup>b</sup>	89.24 ± 1.54 <sup>b</sup>
10	5% Me <sub>2</sub> SO + 0.3 mol/L 海藻糖	89.88 ± 1.00 <sup>a</sup>	92.35 ± 1.23 <sup>a</sup>	96.14 ± 1.13 <sup>a</sup>

注:数据表示形式为平均值 ± SD(标准差);用 Duncan 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( $P > 0.05$ )。

从表 4 中可以得出,四个实验组的细胞存活率,MTT 存活率以及 24 h 贴壁率与对照组(编号 0)相比,均有显著性差异( $P < 0.05$ ),这说明低温保护剂对细胞的低温保存有一定作用。

20% (v/v) 甘油组(编号 7)无论是细胞存活率,MTT 存活率以及 24 h 贴壁率都低于其他三组实验组,这说明在这四种保护剂冻存细胞中,20% (v/v) 甘油组的冻存效果最差。10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO 组(编号 8),无论是细胞存活率,MTT 存活率以及 24 h 贴壁率,都略高于 Me<sub>2</sub>SO + 蔗糖(编号 9)但差异不显著( $P > 0.05$ ),这说明两组实验冻存效果接近,但 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO 的冻存效果略好于 Me<sub>2</sub>SO + 蔗糖;由此得出:通过降低 Me<sub>2</sub>SO 浓度(v/v)加入蔗糖的低温保

护剂起到一定的保护作用,但保护效果并不如 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO。而 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO (编号 8),无论是细胞存活率,MTT 存活率以及 24 h 贴壁率,都低于 Me<sub>2</sub>SO + 海藻糖(编号 10),这说明 Me<sub>2</sub>SO + 海藻糖的冻存效果优于 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO,即 Me<sub>2</sub>SO 与海藻糖的联合保护作用优于 Me<sub>2</sub>SO 的单独作用。

### 2.3 复方保护剂组的细胞存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率

从前两组实验中分别选择最优保护剂,从而进行第三组复方保护剂组实验。

冻存前,用台盼蓝染色得到细胞的存活率为(95.06 ± 2)%对照组及实验组(保护剂分别为 20% (v/v) 甘油、10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO、5% (v/v) Me<sub>2</sub>SO + 0.3 mol/L 蔗糖、5% (v/v) Me<sub>2</sub>SO + 0.3 mol/L 海藻糖)的细胞复温后,存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率结果如表 4 所示。

### 3 讨论

目前,台盼蓝染色法做为最常用的检测细胞死活的方法之一,其原理是丧失活性或是细胞膜不完整的细胞由于膜的通透性增加,可被台盼蓝染成蓝色;通常认为细胞膜完整性丧失,即可认为细胞已经死亡<sup>[11]</sup>。四唑盐比色法(MTT)是利用活细胞线粒体中

的琥珀酸脱氢酶可将噻唑蓝 (MTT) 还原成紫蓝色 (Formazan) 颗粒的原理, 而二甲基亚砜 (DMSO) 能溶解细胞中的紫色结晶物, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值, 从而间接反映活细胞数量<sup>[11]</sup>。然而, 在 MTT 染色的过程中有的细胞虽有细胞膜的损害, 但仍有酶的活性, 仍属于“活细胞”, 不能存活下去; 并且台盼蓝染色法的误差偏大。所以这两种方法联合应用能更全面地反映细胞活性<sup>[12]</sup>。24 h 贴壁率是检测细胞复温后, 在 24 h 内的存活以及贴壁能力的一种方法; 与前面两种方法不同的是, 它着重于细胞复温培养后的存活能力。

细胞在降温过程中, 胞外溶液会先结冰, 由于冰晶的形成使细胞外的溶液浓度增大, 导致细胞脱水收缩, 引起细胞内原生质和细胞器的损伤。添加渗透性保护剂 (如甘油、Me<sub>2</sub>SO 等) 后, 通过结合溶液中的水分子从而弱化了水的结晶过程, 达到了保护细胞的目的。保护剂浓度的不同以及细胞膜渗透能力的差异等, 都会影响着细胞的冻存效果。所以本文通过前人的实验总结, 针对 Hep-G2 细胞, 筛选出最优的低温保护剂。

甘油作为最早发现以及使用的低温保护剂<sup>[1]</sup>, 60 多年来仍然被应用在细胞的低温保存中, 而甘油的浓度对低温保存效果有着重要的影响。华泽钊等<sup>[13]</sup>利用浓度为 15% (v/v) 的甘油冻存表皮细胞, 得到 92% 的存活率; 郝爱玲等<sup>[14]</sup>利用浓度为 4% (v/v) 的甘油对鲜精低温保存的效果达到最好, 由此可见不同的细胞在低温保存中对甘油的浓度要求并不相同。本文选用 10%、20%、30% 三种常用的甘油低温保护剂浓度, 研究得到 20% (v/v) 甘油浓度对 Hep-G2 细胞低温保存效果最佳。

Me<sub>2</sub>SO 作为渗透性保护剂, 是冻存肝细胞最常用的保护剂<sup>[15]</sup>, 常用浓度 (v/v) 为 5% ~ 20%。杨波等<sup>[16]</sup>利用浓度为 10% (v/v) 的 Me<sub>2</sub>SO 冻存人肝细胞, 存活率达到 89.95%; Andre Guillouzo 等<sup>[17]</sup>通过配比不同浓度的 Me<sub>2</sub>SO 得出: 冻存老鼠肝细胞的 Me<sub>2</sub>SO 最佳浓度 (v/v) 为 16%, 其他动物为 14%, 而人肝细胞的 Me<sub>2</sub>SO 浓度 (v/v) 为 10% ~ 12%。本文基于前人对于肝细胞的研究基础, 选用的 Me<sub>2</sub>SO 浓度 (v/v) 为 5% ~ 20%, 得到 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO 的冻存效果最优。

糖类作为非渗透性保护剂, 近些年越来越广泛的应用于低温保存中。当渗透性保护剂渗入细胞后, 与细胞内的水分子结合, 通过控制结晶过程而达到保护作用; 而非渗透性低温保护剂虽然不能进入细胞内, 但可形成细胞外的高渗, 减少胞内冰的形成, 虽然两

者机制不同, 合用可以产生协同效应, 因此目前一致认为, 非渗透型和渗透型保护剂混合使用的保护效果最好。并且有文献显示, 糖类添加到低温保护剂中, 会产生更好的保存效果。阿洛糖作为一种罕见的单糖, 在某些人类细胞的保存连同 Me<sub>2</sub>SO 加入后, 复温后的存活率有所提高<sup>[7]</sup>; Me<sub>2</sub>SO 中加入一定浓度的海藻糖可以提高胰岛细胞的存活率<sup>[18]</sup>; 在人肝细胞的低温保存中, 在保护剂 Me<sub>2</sub>SO 中添加不同浓度的蔗糖与海藻糖, 分别得到 Me<sub>2</sub>SO + 蔗糖、Me<sub>2</sub>SO + 海藻糖的最佳浓度配比<sup>[16]</sup>。而本文选用蔗糖、海藻糖这两种常用的糖类作为保护剂添加到 Me<sub>2</sub>SO 中, 一方面可以通过降低 Me<sub>2</sub>SO 的浓度来减小对细胞的毒性<sup>[19]</sup>, 另一方面利用糖类对细胞膜的保护性。与蔗糖相比, 海藻糖具有较高的玻璃化温度、更低的引湿性, 并不具有还原性, 所以在低温保护剂中应用更好。因而实验数据得出浓度为 5% (v/v) Me<sub>2</sub>SO + 0.3 mol/L 海藻糖的冻存效果最佳; 虽然浓度为 5% (v/v) Me<sub>2</sub>SO + 0.3 mol/L 蔗糖的冻存效果不如浓度为 10% (v/v) Me<sub>2</sub>SO, 但两者差异并不显著, 这说明蔗糖仍起到一定的保护作用。实际上, 海藻糖的浓度将影响保存效果, 浓度过高会抑制细胞表面分子 (酶等) 活性、减少 Me<sub>2</sub>SO (渗透性保护剂) 进入胞内、引起渗透性胞内脱水; 而浓度过低起到的作用效果不够明显, 所以选择最优的海藻糖浓度还有待更多的探讨。

## 4 结论

本文以人肝癌细胞 Hep-G2 为研究对象, 利用慢速冷冻的低温保存程序, 选取了不同浓度的 Me<sub>2</sub>SO、甘油以及一定浓度的 Me<sub>2</sub>SO 联合蔗糖、海藻糖作为低温保护剂, 对比复温后细胞的存活率和 24 h 贴壁率, 结果表明: 添加浓度为 5% (v/v) Me<sub>2</sub>SO + 0.3 mol/L 海藻糖的细胞, 复温后台盼蓝染色存活率、MTT 存活率以及 24 h 贴壁率分别达到 89.88%、92.35%、96.14%, 高于其他保护剂组, 并且差异显著。所以浓度为 5% (v/v) Me<sub>2</sub>SO + 0.3 mol/L 海藻糖的保护剂冻存效果最佳。

### 参考文献

- [1] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 150-152.
- [2] Watts P, Grant M H. Cryopreservation of rat hepatocyte monolayer cultures [J]. Human & Experimental Toxicology, 1996, 15(1): 30-37.
- [3] Polge C, Smith A U, Parkes A S. Revival of spermatozoa

- after vitrification and dehydration at low temperature [J]. Nature, 1949, 164: 666.
- [4] Jolanta K, Agnieszka G, Agnieszka R, et al. Evaluation of two distinct cryoprotectants for cryopreservation of human red blood cell concentrates [J]. Cryoletters, 2014, 35 (1): 15-21.
- [5] Chesne C, Guillouzo A. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes; A critical evaluation of freezing and thawing conditions [J]. Cryobiology, 1988, 25(4): 323-330.
- [6] Mohammed S, Frida H, Bergstrom T R, et al. Improved cryopreservation of human hepatocytes using a new xenofree cryoprotectant solution [J]. World Journal of Hepatology, 2012, 4(5): 176-183.
- [7] Sui L, Nomura R, Dong Y, et al. Cryoprotective effects of d-allose on mammalian cells [J]. Cryobiology, 2007, 55 (2): 87-92.
- [8] 李慧, 姚建华, 田芝奥, 等. 季德胜蛇药含药血清对人肝癌细胞 Hep-G2 增殖和凋亡的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(1): 32-37. (Li Hui, Yao Jianhua, Tian Zhi'ao, et al. Effects of Jidesheng Sheyao medicated serum on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell Hep-G2 [J]. Combine Traditional Chinese and Western Medicine Liver Disease, 2012, 22(1): 32-37.)
- [9] 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 primary cell culture of gastroenteric cancer tissues after cryopreservation [J]. Clinical Journal of Medical Officer, 2011, 39(4): 605-607.)
- [10] 王晨, 卫建平, 李育民. 建立标准化规范化肿瘤生物样本库是转化医学的重要保障 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(9): 1176-1178. (Wang Chen, Wei Jianping, Li Yumin. Establish a standardized tumor biological sample library is the important guarantee of translational medicine [J]. Chinese Remedies & Clinics, 2013, 13(9): 1176-1178.)
- [11] 司徒镇强. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版社, 2004: 3.
- [12] 成惠林, 王祎芳, 史继新, 等. 用四甲基偶氮唑盐比色法测定 5 种冷冻保存液对大鼠垂体细胞的保存效果 [J]. 江苏医药, 1998, 24(5): 329-330. (Cheng Huilin, Wang Huifang, Shi Jixin, et al. With tetramethyl azo-
- azole salt colorimetry determination of five kinds of cryopreservation on the preservation effect of the rat pituitary cells [J]. Jiangsu Medical Journal, 1998, 24(5): 329-330.)
- [13] 华泽钊, 冯世杰. 皮肤低温保存的方法和工艺研究 [J]. 中国生物医学工程学报, 1991, 10(2): 118-126. (Hua Zezhao, Feng Shijie. Skin cryopreservation method and technology of the research [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 1991, 10(2): 118-126.)
- [14] 郝爱玲, 阿淑艳, 郑伟. 不同甘油浓度对牛鲜精低温保存的影响 [J]. 中国奶牛, 2007(10): 33-34. (Hao Ailing, A Shuyan, Zheng Wei. The influence of different glycerol concentration of NiuXian sperm cryopreservation [J]. China Dairy Cattle, 2007(10): 33-34.)
- [15] Naik S, Santangini H A, Trenkler D M, et al. Functional recovery of porcine hepatocytes after hypothermic or cryogenic preservation for liver support systems [J]. Cell Transplantation, 1997, 6(5): 447-454.
- [16] 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 cryopreservation of human hepatocytes [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2011, 30(2): 308-311.)
- [17] Andre G, Laure R, Alain F. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation [J]. Chemico-Biological Interactions, 1999, 121(1): 7-16.
- [18] Beattie G M, Crowe J H, Lopez A D, et al. Trehalose: A cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage [J]. Diabetes, 1997, 46(3): 519-23.
- [19] Li Y, Lu R H, Luo G F, et al. Effects of different cryoprotectants on the viability and biological characteristics of porcine preadipocyte [J]. Cryobiology, 2006, 53(2): 240-247.

#### 通信作者简介

刘宝林, 男, 教授, 博士, 上海理工大学医疗器械与食品学院, 13636524955, E-mail: blliuk@163.com。研究方向: 低温生物。

#### About the corresponding author

Liu Baolin, male, Ph. D./professor, College of Medical Equipment and Food, University of Shanghai for Science and Technology, + 86 13636524955, E-mail: blliuk@163.com. Research fields: cryobiology.