

不同冻存条件下 HepG₂ 细胞存活率的比较^①

苏秀珍¹, 朱晓莹^{2②}, 姜艳², 曾怡²

(1. 右江民族医学院广西少数民族体质特征研究实验室, 广西 百色 533000

E-mail: 469217840@qq.com;

2. 右江民族医学院科学实验中心, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 探讨不同冻存条件下对 HepG₂ 细胞存活率的影响, 以提高复苏细胞的存活率。 **方法** 取对数生长期 HepG₂ 细胞, 分别配制传统冻存液 A、改良冻存液 B, 采用方法 1(人工梯度降温法)和方法 2(程序降温盒法)两种冻存方法进行冻存, 在冻存 1 个月、6 个月、12 个月分别对细胞进行复苏, 检测细胞的存活率并观察复苏细胞的生长状态。 **结果** 冻存 1 个月后复苏, 冻存液 A、B 两组细胞的存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 冻存 6 个月、12 个月后复苏, 冻存液 A 组细胞存活率显著低于 B 组 ($P < 0.01$); B 组细胞复苏的生长状态及增殖速度都明显优于 A 组, 两组细胞的数量差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 以方法 1、2 冻存的细胞, 在冻存 1 个月、6 个月、12 个月后复苏细胞, 方法 2 细胞的存活率均显著高于方法 1 ($P < 0.01$)。 **结论** 采用含高浓度血清的冻存液及缓慢降温有利于提高细胞复苏的存活率。

关键词: 细胞培养技术; 冷冻保存; 存活率

中图分类号: R394.26

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)03-0241-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.03.001

Comparing the effects of different conditions of cryopreservation on HepG₂ cell recovery rate

Su Xiuzhen¹, Zhu Xiaoying², Jiang Yan², Zeng Yi²

(1. Guangxi Laboratory of Ethnic Physical Feature Research, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China E-mail: 469217840@qq.com; 2. Science Experiment Center, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the influence of different cryopreservation conditions on HepG₂ cell recovery rate and to improve the resuscitation cell survival. **Methods** Logarithmic growth phase HepG₂ cells were cryopreserved by using two different cell freezing medium (conventional freezing medium A and modified freezing medium B were prepared, respectively) and by using two methods (Method 1, artificial gradient cooling method; Method 2, programmed cooling box). Cells were resuscitated at 1 month, 6 months and 12 months after cryopreservation, respectively. Then the cell recovery rate was measured and cells growth status was observed by microscope. **Results** The resuscitation cell recovery rate was compared between freezing medium A group and freezing medium B group at 1 month after cryopreservation and there was no statistical difference ($P > 0.05$). The cells were resuscitated at 6 and 12 months after cryopreservation, freezing medium A group had lower cell recovery rate than freezing medium B group comparison between the two groups showed statistically significant difference ($P < 0.01$); and the resuscitated cells growth status and proliferated speed in group B were superior to group A, comparing the cell count between the two groups showed statistical difference ($P < 0.05$). The cells cryopreserved by Method 1 and Method 2 were resuscitated at 1 month, 6 months and 12 months after cryopreservation. Method 2 had all higher cells recovery rate than Method 1, comparison

① 基金项目: 2014 年广西高校科学技术研究项目(YB2014298); 2014 年右江民族医学院校级课题[右医科学(2014)2 号]

② 通讯作者, E-mail: 417343600@qq.com

the recovery rate between the two methods showed statistically significant difference ($P < 0.01$). **Conclusion**

The resuscitated cell recovery rate will be raised with a higher serum levels and programmed controlled cooling.

Key words: cell culture; cryopreservation; recovery rate

细胞培养是从体内组织取出细胞,模拟体内环境进行离体培养,以便对单个细胞或细胞群的功能活性进行研究。为保持细胞各种生物学特性的稳定性,防止细胞在不断传代的过程中引起细胞老化、污染等,需对细胞进行超低温冷冻保存,活细胞在超低温条件下克服了分子间的热运动,能够长期保存且不影响其活力。但不同的冻存条件和方法将直接影响细胞的存活率,为探究提高细胞存活率的冻存条件和方法,对细胞进行不同冻存条件的分组设置,在冻存前及复苏后,通过计数方法来检测细胞的存活率^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 HepG₂ 细胞株购自中国科学院细胞库,由科学实验中心细胞技术平台保存。二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司),0.25%胰酶(北京索莱宝),RPMI-1640 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(FBS, Hyclone 公司),2 ml 冻存管(美国康宁),异丙醇(国产分析纯),台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒(碧云天)。

1.2 仪器 二氧化碳(CO₂)培养箱(日本三洋),超低温冰箱(青岛海尔),低速离心机(上海安亭),倒置显微镜(德国莱卡),液氮罐(四川东亚),程序降温盒(美国 Nalgene)。

1.3 方法

1.3.1 HepG₂ 细胞的培养及传代 用含 10%FBS 的培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。显微镜下观察细胞的生长状况,当细胞的生长密度达到 90%左右时,用 PBS 漂洗两次,25 cm² 的培养瓶加入 1 ml 0.25%胰蛋白酶消化液,消化细胞 1~3 min。镜下观察细胞伪足收缩,细胞变圆形时,立即加入 2 ml 完全培养基终止消化,轻拍培养瓶身使细胞脱落,轻轻地吹打使细胞从培养瓶壁上脱落,收集细胞到离心管中,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清,加完全培养基重悬,制备成单细胞悬液,计数,以 1×10^5 个/毫升接种于培养瓶中,水平轻震使细胞均匀分散到 25 cm² 培养瓶各处,置于培养箱中继续培养。

1.3.2 不同冻存液对 HepG₂ 细胞冻存存活率的影响

选用对数生长期的细胞,胰酶消化后收集细胞,分别加入传统冻存液 A(20%FBS+10%DMSO+70%RP-MI-1640)、改良冻存液 B(90%FBS+10%DMSO),用无菌吸管轻轻吹打,调整细胞浓度为 5×10^5 个/毫升,分装入冻存管中(1.5 毫升/管),4℃放置 30 min,

-20℃放置 20 min,-80℃过夜后转入液氮罐中保存。

1.3.3 不同冻存方法对 HepG₂ 细胞冻存存活率的影响 选用对数生长期的细胞,胰酶消化后收集细胞,加入冻存液 B,用无菌吸管轻轻吹打,调整细胞浓度为 5×10^5 个/毫升,分装入冻存管中(1.5 毫升/管)。分别以下两种方法进行冻存:方法 1 人工降温法:4℃放置 30 min,-20℃放置 20 min,-80℃过夜后转入液氮罐中保存;方法 2 程序降温盒法:将冻存细胞放入含有异丙醇的程序降温盒内,直接放入-80℃冰箱过夜,再转入液氮罐中保存。

1.3.4 不同冻存方法冻存细胞的存活率 将上述细胞分别在冻存 1 个月、6 个月、12 个月后取出复苏:将冻存管从液氮中取出,直接置于 37℃水浴中迅速溶解(应于 1~2 min 内溶解),用吸管吸出细胞悬液,加入含有 5 ml 不含血清培养基的离心管中混匀,低速离心弃上清,加 1 ml 细胞重悬液重悬细胞,以台盼蓝染色 3 min,取少量染色细胞悬液,在光学显微镜下以血细胞计数板计算,细胞存活率=(细胞总数-蓝色细胞数)/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.5 不同冻存液对 HepG₂ 细胞生长的影响 分别将以冻存液 A 和冻存液 B 冻存 1 个月的 HepG₂ 细胞复苏,用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞,以 1×10^4 个/毫升浓度接种于 24 孔板中,每孔 1 ml,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。每种冻存液重复 3 次,实验期 8 d,绘制细胞生长曲线。

1.3.6 统计学方法 用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两样本间差异比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同冻存液对 HepG₂ 细胞存活率的影响 随着冻存时间的延长,以冻存液 A、B 冻存的细胞复苏后存活率有所差异。结果见表 1,冻存 1 个月时,两组间的存活率差异无统计学意义($P > 0.05$);冻存 6 个月及 12 个月时,A 组细胞存活率显著低于 B 组($P < 0.01$)。

2.2 不同冻存方法对 HepG₂ 细胞存活率的影响 在相同的复苏方法下,冻存 1 个月、6 个月、12 个月后,两种冻存方法的细胞存活率差异均有统计学意义($P < 0.01$),结果见表 2。

表 1 不同冻存液细胞在不同冻存时间后的存活率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

冻存液	n	1 个月	6 个月	12 个月
A 组	6	91.06±0.36	75.20±0.29	65.41±0.47
B 组	6	90.46±0.68	85.41±0.84 ^a	82.60±0.73 ^a

注：与 A 组同时段比较,a: $P<0.01$

表 2 不同冻存方法的 HepG₂ 细胞在不同冻存时间的存活率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

冻存液	n	1 个月	6 个月	12 个月
方法 1	6	89.88±0.43	80.33±0.53	70.70±0.55
方法 2	6	91.23±0.52 ^a	85.55±0.41 ^a	81.62±0.64 ^a

注：与方法 1 同时段比较,a: $P<0.01$

2.3 不同冻存液对 HepG₂ 细胞生长的影响 以冻存液 B 冻存的细胞,复苏后,细胞生长状态和增殖速度明显优于以冻存液 A 冻存的细胞。从培养第 3 d 开始,两组细胞数量上的差异有统计学意义 ($P<0.05$),且冻存 B 组细胞密度大,折光性好,具有良好的贴壁及生长趋势。生长曲线见图 1。

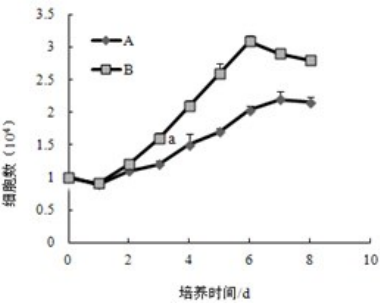


图 1 不同冻存液对 HepG₂ 细胞生长的影响
注：与 A 组细胞数比较,a: $P<0.05$

3 讨论

冻存细胞的复苏效果主要与细胞的生长状态、冻存液及冻存操作程序等因素相关^[2-3],用于冻存的细胞应尽量选取处于生长对数期的细胞,此时细胞生长最旺盛,能够提高复苏后细胞的存活率。此外,在众多影响因素中,冻存保护剂和血清是最为重要的两个因素。

目前最常用的细胞冻存保护剂是 DMSO,它是一种相对分子小、渗透性强的化学物质,通过降低冻存液的冰点和提高细胞膜对水的通透性,防止细胞内水分形成冰晶导致胞内蛋白质、酶变性,溶酶体膜损伤,细胞核内 DNA 受损,引起细胞死亡^[4]。DMSO 对细胞具有一定的毒性,FBS 可以中和 DMSO 的毒性,对细胞具有保护作用^[5],血清中的纤维黏连素对细胞贴壁

有促进作用,FBS 中还含有丰富的营养物质,是用于细胞培养最好的培养基^[6]。本实验结果也表明血清浓度对细胞的活力有一定的影响,冻存液中血清含量越高,细胞保存的时间越久,复苏后细胞的增殖能力越强。本实验中表 1 及图 1 的结果均与这一观点相符,表 1 实验结果表明,冻存 1 个月时,A 组与 B 组细胞的存活率差异无统计学意义;而当冻存 6 个月及 12 个月时,B 组细胞的存活率显著高于 A 组。说明当长时间冻存 HepG₂ 细胞时,使用冻存液 B 的效果显著优于冻存液 A。对两组细胞复苏后的生长状况进行观察,在细胞复苏的 1~2 d,两组细胞的形态及生长情况均与细胞冻存前基本一致,并保持了 HepG₂ 细胞的基本特点,在前 3 d 细胞生长缓慢,之后进入对数生长期,持续 3~5 d 符合细胞生长周期的对数生长期的规律,随后进入稳定期和衰亡期,整个过程符合细胞生长的 S 型曲线;但 B 组冻存细胞的生长状态和增殖速度都明显优于 A 组细胞,由图 1 的细胞生长曲线发现,从培养的第 3 d 开始,两组细胞数量差异有统计学意义,说明 FBS 能够满足细胞在冻存期间所需的营养物质,并保持良好的生理活性。

细胞冻存应遵循慢冻的原则,冻存时降温速率应控制在-1~-2℃/min,当温度降低到-25℃以下时,可增至-5~-10℃/min,达到-80℃时可迅速投入液氮罐中。如果降温过快将会影响细胞内水分的析出,从而对细胞造成损伤^[1,7]。表 2 实验结果中,方法 2 的冻存程序在三个冻存时间(1 个月、6 个月、12 个月)中细胞的存活率均显著高于方法 1,方法 2 通过程序降温盒中的异丙醇实现梯度降温(-1℃/min),使降温过程标准化,降低了温度对细胞的损伤。且操作相对简便,更有利于长期保存,是如今实验室中细胞冻存程序的首选方法之一^[8-9]。当然,如果实验室条件不允许也可选择方法 1 进行冻存,在细胞复苏培养一段时间后也可生长到对数生长期^[10]。

根据本实验结果,选择 90%FBS+10%DMSO 作为冻存液,将细胞以 5×10⁵ 个/毫升的浓度置于程序降温盒中,于-80℃放置 24 h 后迅速转移到液氮中保存,这一冻存方法是 HepG₂ 细胞冻存的最佳冻存方案。但该方法在实际操作过程中也存在一定的缺陷,如要求实验室备有程序降温盒,还要定期更换程序降温盒中的异丙醇,且异丙醇具有一定的毒性,用过的异丙醇需要经过特殊的处理后方可丢弃,两种方法各有利弊。因此,在实验过程中可以根据实验的需要来选择最适合的操作方法。本实验通过对 HepG₂ 细胞在不同冻存条件下细胞存活率的研究,探讨培养细胞最佳的冻存条件,以期获得更高的细胞存活率,更好的长时间冻存细胞,为细胞体外培养提供可靠保障。

参考文献:

- [1] 李洁,刘斌,李焰,等.不同条件下细胞冻存效果比较[J].临床口腔医学杂志,2004,20(2):84—85.
- [2] 曹宇,张春军,葛红岩.改良 hela 细胞冻存与复苏方法的实验研究[J].牡丹江医学院学报,2008,29(3):1—4.
- [3] 李罡灿,宋艳萍,杜明珠,等.不同冻存条件对造血干细胞保存效果的影响[J].第四军医大学学报,2006,27(15):1438—1440.
- [4] 李佳,陆会平,冯振博,等.不同冻存液冻存慢病毒转染后稳转肝癌细胞株 HepG₂ 的效果比较[J].重庆医学,2013,28:3393—3394,3397.
- [5] 李喜艳,王加启,魏宏阳,等.奶牛乳腺上皮细胞体外培养条件优化的初步研究[J].华北农学报,2010,S1:80—85.
- [6] 温慧兰,罗以娟,谭永恒,等.浅谈朗格汉斯细胞组织细胞增生症的 ICD 编码[J].右江民族医学院学报,2014,36(5):781—782.
- [7] 姚岚,梁玮,刘宝林.人肝癌细胞 HepG₂ 的低温保存研究[J].制冷学报,2015,36(2):95—100.
- [8] 韩春卉,赵熙,张靖,等.YAC—1 细胞冻存方法的研究[J].中国医疗前沿,2007,1(2):6—7.
- [9] 李正民,宫璀璨.人脐带间充质干细胞不同冻存方法探讨[J].国际检验医学杂志,2012,33(12):1414—1416.
- [10] 徐文鑫,梅序桥.支气管哮喘患者外周血 Th17 细胞及相关趋化因子表达水平检测[J].右江民族医学院学报,2015,37(4):533—535.

收稿日期:2016—04—20;修回日期:2016—06—07

《右江民族医学院学报》采编系统启用通告

为适应信息化时代期刊发展的需要,缩短审稿流程,加快稿件处理速度,方便作者投稿和专家审稿,本刊自 2015 年 10 月 1 日起至 2015 年 10 月 31 日期间试运行期刊采编系统,2015 年 11 月 1 日起正式投入使用。

登录本刊网站 <http://yjmzyxy.cnjournals.com/> 即可进入采编系统平台进行投稿或审稿。该采编系统平台由作者在线投稿、专家在线审稿、主编在线办公和编辑在线办公四部分组成。作者进行在线投稿并可查询稿件的处理进度,审稿专家从专家登录口进入审稿中心可进行稿件审阅。试运行期间作者可使用原学报投稿邮箱 yyxb1979@126.com,自 2015 年 11 月 1 日起正式启用期刊采编系统后,学报投稿邮箱停止使用投稿功能。敬请广大读者、投稿作者、审稿专家使用本系统,并向编辑部反馈意见,以不断对系统进行改进。如您在操作上遇到任何问题,请与编辑部联系:0776—2843414。感谢您对本刊的关注与支持! 欢迎踊跃投稿!



扫一扫

《右江民族医学院学报》编辑部