

传统及改良纱布包裹冻存法对人血管内皮细胞保护的比较*★

李 柳¹, 侯光辉², 吴 静³

Protective effects of traditional versus reforming cryopreserving methods on human vascular endothelial cells

Li Liu¹, Hou Guang-hui², Wu Jing³

Abstract

BACKGROUND: As for traditional cryopreserving method, cells are cooling by steps at 4 °C and -20 °C, which is complicated and a waste of time.

OBJECTIVE: To compare the protective effects of traditional and reforming cryopreserving methods on human vascular endothelial cells.

METHODS: The vascular endothelial cells were incubated with a freezing medium consisting of 10% dimethyl sulfoxide, 60% fetal bovine serum and 30% DMEM serum-free medium after digested with trypsin, and then the cell suspension were put into preserving tubes. Each group was intervened. In the experimental group, the tubes were packaged with gauze and then thawed into -80 °C refrigerator straightly. In the control group, the tubes were pre-cooling at 4 °C and -20 °C for 30 minutes and 1 hour, then thaw into -80 °C refrigerator. One month later, the endothelial cells were resuscitated.

RESULTS AND CONCLUSION: There were no significant difference in the survival rates and growth curves between experimental group and control group. The experimental group was significantly better than control group in adherence rates, morphological changes and proliferation. The reforming cryopreserving method is better than traditional cryopreserving method which is more convenient and easier to operate.

Li L, Hou GH, Wu J. Protective effects of traditional versus reforming cryopreserving methods on human vascular endothelial cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 867-870. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 传统的细胞冻存多采用 4, -20 °C 放置的阶梯式降温方法, 程序复杂且浪费时间。

目的: 比较传统法与改良冻存法对血管内皮细胞的保护效果。

方法: 将常规培养的人血管内皮细胞用胰酶消化后, 用配置好的冻存液(10%二甲基亚砷、体积分数 60%胎牛血清、30%DMEM 无血清培养基)调整浓度, 将细胞悬液吸入冻存管, 分组干预: 实验组以纱布包裹, 并直接投入-80 °C 冰箱; 对照组按常规冻存法, 4 °C 冰箱和-20 °C 冰箱分别预冷 30 min 和 1 h 后放入-80 °C 冰箱。1 个月后快速复苏冻存细胞。

结果与结论: 复苏后实验组细胞存活率及生长曲线与对照组比较差异无显著性意义; 复苏后实验组细胞贴壁率、形态学变化及增殖能力明显优于对照组。说明改良的纱布包裹法优于传统的细胞冻存法, 且更加方便快捷。

关键词: 冻存; 纱布; 血管内皮细胞; MTT; 保护效果

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.026

李柳, 侯光辉, 吴静. 传统及改良纱布包裹冻存法对人血管内皮细胞保护的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 867-870. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Clinical Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China;
²Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 519000, Guangdong Province, China;
³Department of Ophthalmology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Li Liu★, Studying for master's degree, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Clinical Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China
liliu-0711@163.com

Correspondence to: Hou Guang-hui, Doctor, Master's supervisor, Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 519000, Guangdong Province, China
houguanghui502@qq.com

Supported by: Zhuhai Municipal Science and Technology Program, No.PB20051014*

Received: 2011-11-05
Accepted: 2011-12-17

0 引言

细胞培养的传代及日常维持过程中, 在培养器具、培养液及各种准备工作方面都需大量的耗费, 而且细胞一旦离开活体开始原代培养, 它的各种生物特性都将逐渐发生变化, 并随着传代次数的增加和体外环境条件的变化而不断有新的变化, Qian等^[1]证明细胞冻存前后的生物学特性不变, 因此及时进行细胞冻存十分必要。传统细胞冻存方法可在一定程度上保持细胞生物学特性不变, 且应用广泛, 效果可靠, 但传统细胞冻存方法采取阶梯式降温法, 复杂且费时长。作者在长期的学习操作中, 新创了文中所提到的纱布包裹法, 进一步改善了传统的细胞冻存技术。

1 材料和方法

设计: 对照实验。

时间及地点: 于2011-07/10在暨南大学医学院眼科实验室进行。

材料: 人血管内皮细胞由暨南大学医学院血液内科实验室馈赠, 细胞生长良好。胎牛血清(Hyclone公司); 二甲基亚砷(北京普博欣)、锥虫蓝粉剂购于Sigma公司; 高糖DMEM粉剂来自Gibco公司; MTT(四甲偶氮唑盐比色法)试剂盒购自广州凯基。

方法:

人血管内皮细胞的冻存: 将DMEM常规培养的人血管内皮细胞用胰酶消化, 用全培养基中止胰酶, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 将

¹ 暨南大学第一临床医学院眼科, 广东省广州市 510632; ² 暨南大学第三附属医院眼科, 广东省广州市 519000; ³ 暨南大学医学院眼科教研室, 广东省广州市 510632

李柳★, 女, 1988年生, 江西省南昌市人, 暨南大学在读硕士, 主要从事角膜及眼表疾病方面的研究。
liliu-0711@163.com

通讯作者: 侯光辉, 博士, 硕士生导师, 广东省广州市暨南大学第三附属医院眼科, 广东省广州市 519000
houguanghui502@qq.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2012)05-00867-04

收稿日期: 2011-11-05
修回日期: 2011-12-17
(20111015012/GW·C)

人血管内皮细胞用配置好的冻存液(10%二甲基亚砷、体积分数60%胎牛血清、30%DMEM无血清培养基)调至浓度为 $(1.0\sim 2.0)\times 10^9\text{ L}^{-1}$, 分装入冻存管各1.5 mL备用。随机分为实验组和对照组, 实验组以纱布包裹20层左右并直接放入 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱, 对照组采用传统的逐级降温方法: 先将冻存管在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置30 min, 然后放入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 放置1 h, 最后放入 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱长期保存。

人血管内皮细胞的复苏^[2]: 1个月后取出冻存管快速置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴1.0~2.0 min, 振荡直至细胞悬液完全融化, 然后用10倍体积的DMEM液稀释, 900 r/min离心5 min, 弃上清液。

锥虫蓝拒染法计细胞存活率: 混悬好的细胞悬液注入细胞计数板后倒置相差显微镜下观察, 100倍倒置显微镜下计数未蓝染细胞数与总细胞数的比值, 计5个不重叠视野并取其平均数, 所得值为存活率。

细胞形态学观察: 人血管内皮细胞接种后分别于2 h、12 h、2 d后在倒置相差显微镜下观察人血管内皮细胞的贴壁率(100倍倒置显微镜下计数已贴壁细胞数与总细胞数的比值, 计5个不重叠视野并取其平均数)、生长情况及形态变化。

细胞生长曲线的绘制: 取两种方法冻存的复苏后细胞及未冻存细胞, 用含血清培养基调整浓度为 $6\times 10^6\text{ L}^{-1}$, 接种至7块96孔培养板上, 每孔100 μL , 设6个复孔, 培养板于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱中培养。按下述方法于第2, 4, 6, 9, 11, 13, 15天各取出1块板同时测定实验组、对照组和未冻存组A值: 5×MTT溶液用试剂盒中的稀释液调整浓度为1×MTT, 96孔板换液后每孔中加入50 μL 1×MTT, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 孵育4 h后, 弃上清, 加入150 μL DMSO, 90 r/min 摇床常温下摇5 min, 用酶联免疫检测仪测定每孔的A值, 测定波长为570 nm, 以日期为横坐标, 当日孔板上6个复孔A值的平均值为纵坐标绘制生长曲线。

细胞凋亡率: 两组细胞的凋亡率。

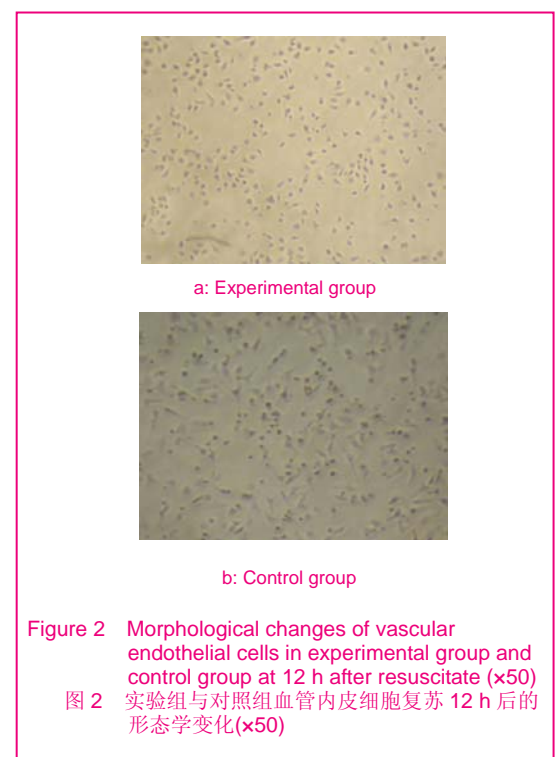
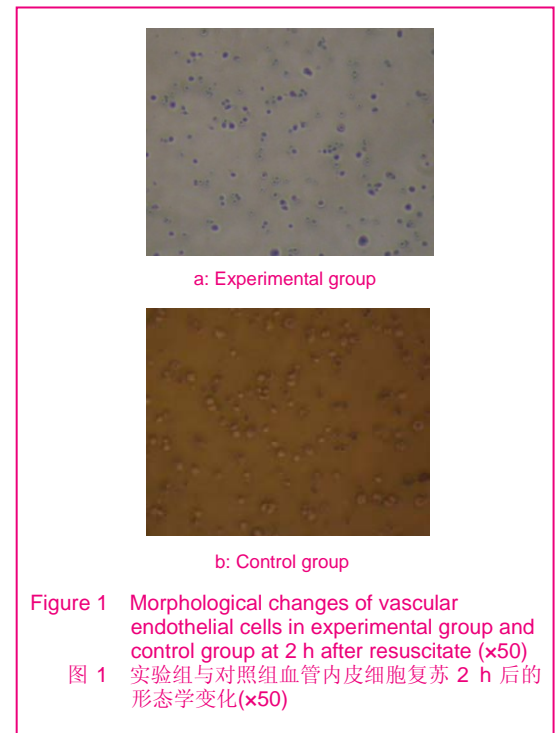
主要观察指标: 血管内皮细胞复苏后的存活率、生长曲线及形态学变化。

2 结果

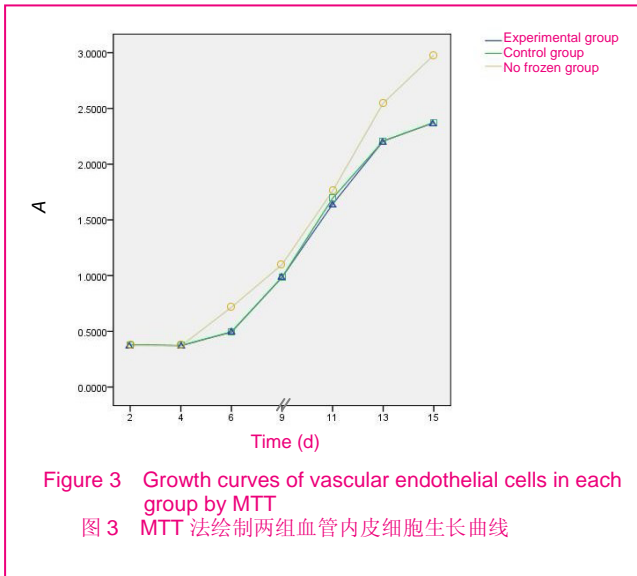
2.1 血管内皮细胞的存活率 实验组和对照组均未观察到蓝染, 蓝染率均为0, 存活率均为100%。

2.2 血管内皮细胞的形态学变化 复苏后的人血管内皮细胞以 $2\times 10^8\text{ L}^{-1}$ 的浓度, 每个培养

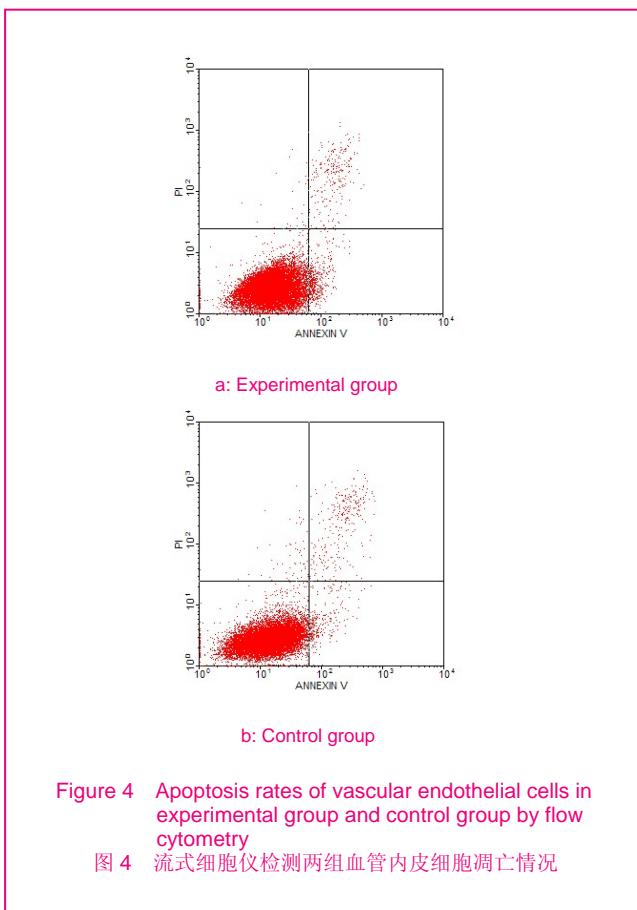
瓶2 mL种植于T25培养瓶, 2 h后实验组有50%左右贴壁, 对照组只有部分贴壁, 见图1。12 h后实验组有90%左右贴壁, 2 d后达到80%融合, 血管内皮细胞生长旺盛, 呈典型的六边形或多边形, 如铺路石状, 细胞膜完整, 胞浆内有丰富颗粒, 核仁清楚, 与未冻存细胞形态相似; 对照组只有50%左右贴壁, 2 d后才能达到60%贴壁, 4 d后达到80%融合, 显微镜下可见细胞形态不均一, 且有触角伸出, 见图2。



2.3 复苏后血管内皮细胞生长曲线 实验组和对照组均呈典型的S型,几乎完美契合,与未冻存组比较在第2,4天不明显,从第6天起可见区别(略低于未冻存组),见图3。



2.4 复苏后血管内皮细胞凋亡率检测结果 实验组细胞坏死占0.20%,早期凋亡占3.45%,晚期凋亡占1.78%,细胞存活占94.57%;对照组细胞坏死占0.43%,早期凋亡占2.25%,晚期凋亡占2.01%,细胞存活占95.32%,见图4。



3 讨论

锥虫蓝染色方法显示改良的纱布包裹法和传统方法均对锥虫蓝拒染,说明两组细胞都是正常的活细胞,胞膜结构完整,都能排斥锥虫蓝,使之不能够进入胞内,而流式细胞检测结果显示其中已有部分细胞发生早期凋亡或晚期凋亡,甚至是坏死。传统检测细胞活力的方法多采用锥虫蓝染色,其只适用于检测坏死细胞,但如细胞发生凋亡,仍有排除染料的能力,如本实验所显示复苏的实验组和对照组锥虫蓝染色均拒染,但是对比流式细胞仪检测结果,很显然其中已有部分细胞已经发生了凋亡,此与贾光等^[3]的研究结果一致;而且,随着时间的推移,存活的细胞亦会发生锥虫蓝染色,因此产生的计数差异非常大,故锥虫蓝不能作为鉴定细胞精确死亡的标准^[4]。因此作者在实验中同时对复苏细胞的形态学变化进行了观察,并进行了流式细胞仪的凋亡检测和以MTT法绘制了生长曲线。

流式细胞仪检测结果显示改良的纱布包裹冻存法所得的人血管内皮细胞存活率与传统冻存法没有明显差异,说明在保存细胞这点上,改良的纱布包裹冻存法不逊于传统冻存方法。而改良冻存法的细胞贴壁能力、增殖能力明显优于传统冻存法,但MTT法显示在接种相同数量基础上两种方法获得的细胞总活力相同,考虑有两种可能:对照组虽然贴壁能力不如实验组,但经过长时间(2 d)的贴壁后,贴壁的细胞数与实验组没有明显差异;Kuczynski等^[5]在研究中发现,冷冻精液是一种有效的筛检过程,可淘汰掉衰老或畸形的精子,所以作者大胆设想细胞的冻存过程可以视为一种自然选择,淘汰掉了细胞活性差的细胞,只有那些活力较好、膜功能稳定、代谢旺盛、染色体正常的细胞才能经受住低温而得以保全,因此两组细胞的MTT实验结果无明显差异。就MTT绘制的生长曲线而言,实验组与对照组无显著差别,与未冻存组的生长曲线弧度相似,但整体略低于未冻存组,这表明内皮细胞进行冷冻保存是可行的,改良的冷冻保存法效果不逊于现有的冷冻保存方法,细胞冻存对细胞的活力仍有一定的损伤。

随着细胞低温保存技术的发展,目前已经可以在体外长期保存多种细胞^[6]。体外培养细胞冻存复苏后的生长状态,直接影响各种生物学实验的效果,而冻存复苏后的状态主要与冻存早期细胞内温度降低的程度与幅度有关。细胞冻存时,经历冰结晶形成、脱水、可溶性物质浓缩的3种过程。标准的冻存程序为缓慢冻存^[7]。如果温度下降缓慢,每分钟下降1℃,则细胞内并不出现冰结晶,冰结晶主要形成于细胞外,细胞本身只发生逐渐的脱水,并不遭受损伤^[8],如果降温速度过快,细胞内外同时形成冰晶,引起细胞器损伤、细胞内蛋白质变

性及细胞核内染色体空间构型改变等,最后也同样导致细胞死亡^[9]。因此,“缓慢冰冻”是保护细胞使之不发生严重损伤的关键因素。细胞内冰结晶的形成和电解质的浓缩主要发生在-10~-5℃之间,传统细胞冻存方法,细胞停留在-20~-4℃,时间长,温度下降较剧烈。作者采取的改良的纱布包裹冻存法,给细胞冻存管包裹上纱布,相当于给细胞冻存管穿上了一件“衣服”,可明显降低温度下降的速度,冻存管内细胞的温度平缓下降,实现前文中所述的“缓慢冰冻”,因此可以有效减轻细胞在低温冰冻中的损伤程度,方法简便有效。在低温冻存环境下,细胞生化反应与活力代谢基本是静止的,因此保存时间的长短对细胞无明显影响或影响较小,张延辉等^[10]证明了这个推论的正确性,Rigol等^[11]在对血管冻存的研究中也表明,存储时间对血管功能无明显影响,取得良好冻存效果的关键是冻存细胞所用的保存液及降温速率。因此作者在此只对细胞进行了1个月的冻存。

多个结果均说明,改良的纱布包裹法与传统的方法无显著差异,在诸如贴壁率、细胞形态学等方面改良的纱布包裹法甚至更优于传统的方法,且操作步骤更加简洁,所选用的纱布容易获得且价格低廉,适于推广。本实验仅在-80℃冰箱中进行细胞冻存,能否在液氮中使用,还需进一步实验研究。

4 参考文献

[1] Qian YX,Shu Q,Cai HX, et al.Surface marker changes in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and resuscitation.J Clin Rehabil Tissue Eng Res.2011;15(1):187-190.
 [2] Kusano T,Aoki T,Yasuda D,et al.Microencapsule technique protects hepatocytes from cryoinjury.Gastroent Hepatol.2008;38: 593-600.

[3] Jia G,Liu SJ,Zhongguo Zhiye Yixue.2000;27(3):49.
 贾光,刘世杰.应用台盼兰拒染法与MTT法判断Cr(VI)细胞毒性的比较[J].中国职业医学.2000,27(3):49.
 [4] Yang JS.Beijing:Beijing Yixke Daxue、Zhongguo Xiehe Yike Dxue Lianhe Chubanshe.1990.
 杨景山.医学细胞化学与细胞生物学技术[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1990.
 [5] Kuczynski W,Dhont M,Grygoruk C,et al.The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa--a prospective randomized study.Hum Reproduction. 2001;16: 2109-2113.
 [6] Spurr EE,Wiggins NE,Marsden KA,et al.Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5-14 years) cryostorage.Cryobiology.2002;44: 210-217.
 [7] Zaman GJ,de Roos JA,Blomenrohr M,et al.Cryopreserved cells facilitate cell-based drug discovery. Drug DiscovToday.2007;12: 521-526.
 [8] Xue QS.Beijing:Kexue Chubanshe.2001.
 薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学出版社,2001.
 [9] Sarkis R,Benoist S,Honiger J,et al.Transplanted cryopreserved encapsulated porcine hepatocytes are as effective as fresh hepatocytes in preventing death from acute liver failure in rats. Transplantation.2000;70: 58-64.
 [10] Zhang YH,Li W,Li6 YX,et al.Zhongguo Yousheng yu Yichan Zazhi. 2011;19(4):98.
 张延辉,李伟,李永香,等.人胚胎冻存时间对妊娠结局的影响[J].中国优生与遗传杂志,2011,19(4):98.
 [11] Rigol M,Heras M,Martinez A,et al.Changes in the cooling rate and medium improve the vascular function in cryopreserved porcine femoral arteries.Vas Surg.2000;31: 1018-1025.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 珠海市科技计划资助项目(PB20051014)。

作者贡献: 实验设计为李柳,实验实施为李柳,实验评估为李柳,资料收集为李柳,李柳成文,侯光辉、吴静审核,李柳对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助

本文创新性: 与以往的细胞冻存法相比,改良的纱布包裹法更加简单快捷,且方便安全,能有效的改善复苏后细胞的贴壁率,为细胞冻存提供了新的方法。目前尚无使用纱布包裹冻存管简化冻存步骤的研究报道。

Mesh 词表主题词扩展: 热缺血- Warm Ischemia

In medicine, ischemia (from Greek, ischaimia; isch- root denoting a restriction or thinning or to make or grow thin/lean,haema blood) is a restriction in blood supply, generally due to factors in the blood vessels, with resultant damage or dysfunction of tissue. It may also be spelled ischaemia or ischaemia. It also means local anemia in a given part of a body sometimes resulting from congestion (such as vasoconstriction, thrombosis or embolism). 器官从供体供血停止到冷灌注(冷保存)开始的这段时间。这一期间对器官的损害最为严重,一般不应超过10分钟,这是因为,热缺血时(器

官离体后),虽然血流中断,但是器官组织仍继续进行代谢,此时,因氧和各种代谢底物供应缺乏而器官的代谢水平仍高,所以器官缺血损

害出现较快、程度较重,又因氧消耗完后,仍可进行无氧代谢,但代谢产物无法清除,可引起酸中毒,代谢必需的养料和酶系统亦有消耗。

英文主题词	Warm Ischemia
英文注释	A tissue or organ remaining at physiological temperature during decreased BLOOD perfusion or in the absence of blood supply. During ORGAN TRANSPLANTATION it begins when the organ reaches physiological temperature before the completion of SURGICAL ANASTOMOSIS and ends with reestablishment of the BLOOD CIRCULATION through the tissue.
中文主题词	热缺血
中文注释	组织或器官在血液灌注减少或缺少血液供给的时候维持生理学温度。在器官移植时,热缺血开始于外科吻合完成前器官达到生理学温度,以组织血液循环重建为结束。