

人肺腺癌细胞 A549 低温保存优化研究

杜羽琨, 周新丽

(上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 人肺腺癌 A549 细胞广泛用于体外肺癌发病基因筛查、药物筛选等临床研究, 低温保存是保持样本库中的 A549 细胞高质量的有效方法。本文针对 A549 细胞低温保存方法, 通过使用非接触置核慢速降温程序减小降温过程中溶液的过冷度, 并在此基础上优化保护剂乙二醇 (ethylene glycol, EG)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, Me_2SO) 以及海藻糖的最佳浓度, 通过检测复苏后肺腺癌细胞的回收率、细胞凋亡情况以及凋亡相关基因表达, 对保存效果进行评估。实验结果表明, 非接触置核慢速降温程序相比传统慢速降温程序可有效降低低温保护剂过冷度, 并提高了细胞回收率。优化后最佳低温保护剂组合为 7.5% (体积分数) Me_2SO +2.5% (体积分数) EG+200 mmol 海藻糖, 使用该保护剂低温保存复苏后的细胞回收率 ($91.59\pm 1.51\%$) 高于使用传统低温保护剂 10% (体积分数) Me_2SO 的细胞回收率 ($86.72\pm 1.86\%$), 而且正常细胞比例高, 可以很好地抑制细胞凋亡。

关键词: 非接触置核; 低温保护剂; 肺癌细胞

中图分类号: TB 61; TB 63+2 **文献标志码:** A

Optimization of the cryopreservation for human lung adenocarcinoma cell lines A549

DU Yukun, ZHOU Xinli

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

Abstract: A549 cell is a good model for screening apoptosis-inducing drugs for lung adenocarcinoma in vitro research. It is of great significance to maintain high-activity and high-quality A549 cells in the biobank. In the paper, a non-contact ice-seeding slow cooling program were adopted to reduce the subcooling of the cryoprotectant (CPA) during the cooling process. The concentration of EG, Me_2SO and trehalose were optimized for the cryopreservation of A549 cells. The results show that the non-contact ice-seeding cooling program can effectively reduce the subcooling of the cryoprotectant compared to the traditional slow cooling program; the optimized cryoprotectant combination is 7.5%(V/V) Me_2SO +2.5%(V/V)EG+200 mmol trehalose. After cryopreservation and rewarming, the recovery rate of the cells using this CPA is higher than the traditional cryoprotectant of 10%(V/V) Me_2SO ($91.59\pm 1.51\%$ vs

收稿日期: 2020-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51376132)

第一作者: 杜羽琨 (1994-), 男, 硕士研究生。研究方向: 低温生物医学。E-mail: duyukunusst@163.com

通信作者: 周新丽 (1979-), 女, 教授。研究方向: 低温生物医学。E-mail: zjulily@163.com

86.72±1.86%). The proportion of normal cells is high, which indicates that the combined cryoprotectant can effectively inhibit apoptosis after cryopreservation.

Keywords: *non-contact ice-seeding; cryoprotectant; lung cancer cell*

人肺腺癌细胞 A549 既有肺泡上皮细胞的形态及特性,又表现出典型的肺腺癌恶性特征,广泛用于体外肺癌发病基因筛查、药物筛选等临床研究^[1-2],因此,临床研究工作对高质量肺癌细胞样本有较大的需求。低温保存是样本库长期储存大量肺癌细胞的常用方法,可以在需要时提供大量高质量样本用于临床基础研究,以及其他医学研究,例如,扩增生物样品、培养细胞微团、建立人源肿瘤异种移植模型(patient-derived tumor xenograft, PDX)或培养类器官。目前,样本库中大多数细胞样本采用传统慢速冷冻方法进行低温保存,具体方法是采用 10%(体积分数) Me₂SO 作为低温保护剂,将装有细胞悬液以及保护剂的冻存管放入程序降温盒中,再将程序降温盒放入-80℃冰箱中,24 h 后转移至液氮中保存。然而,使用这种方法,复苏后细胞回收率还不够高,细胞活力相对新鲜细胞较差,且不同的细胞所适宜的冷冻方法和条件有较大差异^[3-6],所以,有必要针对样本库中人肺腺癌细胞 A549,研究其适宜的低温保存方式以及低温保护剂。

传统的慢速冷冻降温过程中,低温保护剂会出现过冷的现象,溶液结晶释放潜热使样品温度迅速回升,导致样品温度与冷源温度的温差较大,使溶液结冰速率过快,细胞没有足够长的脱水时间,形成胞内冰损伤,不利于细胞低温保存。“置核”是目前最有希望解决过冷问题的方法之一,通过人为的操作,在溶液内部形成小范围低温区,以此引发晶核的形成,消除溶液过冷。Huang 等^[7]通过在容器外形成局部冷点诱发成核的置核方法,并配合无 Me₂SO 低温保护剂对 NIH 3T3 小鼠成纤维细胞实现了成功的低温保存,复苏后细胞回收率为 78.1±4.8%,与传统慢速冷冻组复苏后的细胞回收率无显著差异。Zhang 等^[8]通过手工置核的方法,对牛卵巢组织进行低温保存,复苏后原始卵泡的存活率为 76.9%±3.5%。目前的置核方法大多需要手动植冰,增加了样本污染的风险,同时不便于进行大批量细胞的置核。非接触置核是采用瞬时改变冷源温度造成管壁外接触面局部过冷,在接触面内形成稳定的晶核,无需采

用手动植冰,改变冷冻设备的冷冻程序实现大批量的置核。Diener 等^[9]采用瞬时改变程序降温仪的降温速率的方法,先将箱体内温度以 2℃/min 降温至-8℃,再在 6 s 内将箱体温度降温至-28℃,在这期间冻存管内溶液实现了非接触置核,并使用该方法对肝实质细胞进行低温保存,复苏后细胞相对新鲜组存活率(86±5%)高于传统慢速降温组相对新鲜组存活率(79±5%)。

10%(体积分数) Me₂SO 是样本库中低温保存肺癌细胞的常用保护剂。虽然 Me₂SO 能够降低保存液的冰点,减少胞内冰晶形成^[10],但是, Me₂SO 单独使用对细胞具有毒性作用, Me₂SO 通过干扰细胞代谢、酶活性、细胞周期等影响细胞的生长和功能,导致细胞死亡^[11],因此,寻找更安全的冷冻替代方案越来越重要。Kasai 等^[12]通过对小鼠胚胎的研究表明乙二醇(EG)的毒性小于 Me₂SO,但对细胞膜的渗透性, Me₂SO 好于 EG^[13]。可将两种渗透性保护剂按一定比例联用,减小保护剂的毒性,该组合被广泛用于卵母细胞的深低温保存^[14],其效果明显优于单独使用 Me₂SO 和 EG^[15-16]。海藻糖是一种非渗透性保护剂,它的添加一方面可避免低温环境对细胞膜蛋白质和脂质的损伤,另一方面可将细胞膜的蛋白质分子进行包裹,使之不易变形,抑制细胞膜融合,降低细胞膜的通透性。

本文首先对肺癌细胞 A549 低温保存方法进行优化,在降温过程中通过快速改变程序降温仪的降温速率的方法实现非接触置核,并与传统的慢速冷冻降温程序的过冷度以及细胞冻存效果进行比较。再对肺癌细胞 A549 低温保护剂进行优化,筛选联用 EG, Me₂SO 的体积分数以及添加海藻糖的最佳浓度,通过检测复苏后肺腺癌细胞的回收率,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测细胞的凋亡相关基因表达,对肺癌细胞 A549 的低温保存方案进行评估。研究结果可为冻存大量肺腺癌细胞提供一种操作简便且效果好的冷冻方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肺癌细胞 A549、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶、DMEM 培养基(上海励瑞生物科技有限公司);二甲基亚砷(Me_2SO)(GIBCO 公司);乙二醇(EG)、海藻糖(中国医药集团上海化学试剂公司);青霉素、链霉素(Sigma 公司)。细胞凋亡检测试剂盒(上海元象医疗器械有限公司)、RNAiso Plus、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(宝日医生物技术(北京)有限公司)。

1.2 细胞培养

将肺癌细胞 A549 用含 10% FBS、1%(体积分数)青霉素的 DMEM 完全培养液接种于 T75 培养瓶中,置于 37℃, 5% CO_2 , 70%湿度的培养箱中培养。培养至细胞融合度达到 80%~90%时,进行消化传代,以备进行后续实验。

1.3 低温保护剂配置

配制 16 组不同的低温保护剂配方。1-4 组分别为 5%, 10%, 20%, 50%(体积分数) Me_2SO ; 5-8 组为 5%, 10%, 20%, 50%(体积分数)EG; 9-11 组为 7.5%(体积分数) Me_2SO +2.5%(体积分数)EG, 5%(体积分数) Me_2SO +5%(体积分数)EG, 2.5%(体积分数) Me_2SO +7.5%(体积分数)EG; 12-16 组为 7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数)EG 分别添加 100, 200, 300, 500, 1000 mmol 海藻糖。将配制好的低温保护剂用 0.22 μm 针式滤器过滤除菌,用封口膜封住瓶口,放置于 4℃冰箱备用。

1.4 细胞低温保存与复苏

肺癌细胞用胰蛋白酶消化后从培养瓶中吸出至离心管中,将离心管放置在离心机中以 200 g 离心 5 min,然后重悬于 3 mL 冻存液中,细胞密度为 1×10^6 个/mL,分别取 1 mL 细胞悬液加入 3 支 2 mL 冻存管中。

传统慢速冷冻方法:将装有细胞悬液的冻存管在 4℃平衡 10 min 后,放入程序降温盒(Nalgene, 上海励瑞生物科技有限公司),再放入-80℃冰箱。该程序降温盒在-80℃冰箱内的降温速率为 1℃/min, 24 h 后放入液氮中进行长期储存。

非接触置核慢速冷冻方法:在 Diener 等^[9]降温程序基础上进行修改,将装有细胞悬液的冻存管在 4℃下平衡 10 min,随后将冻存管放入程序

降温仪(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,上海)中,首先将样本以 1℃/min 降温至-9℃;随后仓体内温度以 50.0℃/min 降温至-50℃,再立刻以 15.0℃/min 升温至-25℃并平衡 3 min;再将样品以 1.0℃/min 降温至-50℃;样本以 10.0℃/min 降温至-90℃,最后放入液氮中进行长期储存。降温过程中使用程序降温仪内热电偶对舱体温度以及样本中心温度进行实时监测。

复苏时,从液氮中取出冻存管,在 37℃水浴锅中轻轻快速摇晃冻存管,直至管内细胞悬液完全融化。室温下轻轻吹打细胞悬液后,立即进行活性检测。

1.5 AO/PI 染色

将冻存前和复温后的细胞吹打混匀,取 15 μL 细胞悬浮液和 15 μL 吖啶橙、碘化丙啶(acridine orange/propidium iodide, AO/PI)溶液,混匀静置 1 min 后,滴加在细胞计数板上,放入细胞计数仪(Countstar Rigel S2, 睿钰生物科技有限公司,上海)进行统计。细胞回收率 A 按以下公式进行计算:

$$A(\%) = \frac{\alpha}{\beta} \times 100\% \tag{1}$$

式中: α 为复温后活细胞数; β 为冻存前活细胞数。

1.6 流式细胞术

将冻存前和复温后的细胞悬液离心,并用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗细胞 2 次以备使用。按照细胞凋亡检测试剂盒的操作说明添加试剂,1 h 内使用流式细胞仪(FACS Calibur TM, 碧迪医疗器械有限公司,上海)进行测试。流式细胞仪可根据荧光将正常细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞以及死细胞区分,并根据筛选细胞总数计算处于各个时期的细胞百分率。

1.7 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)

将冻存前和复温后的细胞悬液离心,并用 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次以备使用。按照 PCR TB Green[®] Premix Ex TaqTM II(宝日医生物技术有限公司,北京)试剂盒的操作说明,对样本的抑制细胞凋亡基因 Bcl-2 以及促凋亡基因 Bax, Bad 进行测定,以 β -actin 为内参基因。

1.8 数据分析

采用 SPSS 18.0 软件的 ANOVA(analysis of variance)对数据进行方差分析、Duncan 多重比较。使用 Excel 和 Origin 9.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 传统慢速冷冻与非接触置核慢速冷冻方法的比较

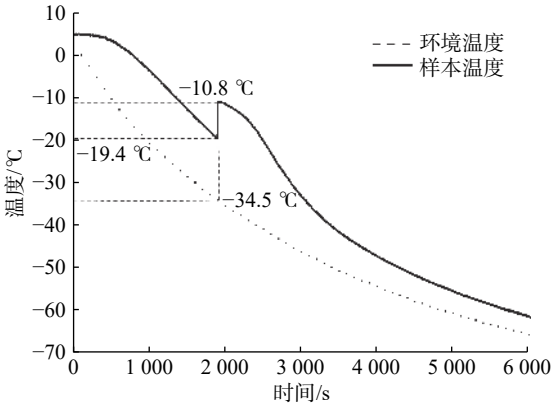
采用传统慢速冷冻与非接触置核慢速冷冻方法低温保存肺癌细胞 A549, 低温保护剂采用 10% (体积分数) Me₂SO, 复苏后细胞回收率如表 1 所示。使用传统慢速冷冻法冻存复苏后细胞回收率为 76.06±3.49%。使用非接触慢速冷冻程序冻存复苏后细胞回收率为 86.72±3.86%。结果表明, 使用非接触式置核慢速冷冻程序的细胞冻存效果明显好于使用传统慢速冷冻程序的细胞冻存效果。

表 1 不同低温保护剂的细胞回收率
Tab.1 Cell recovery rate with different cryoprotectants

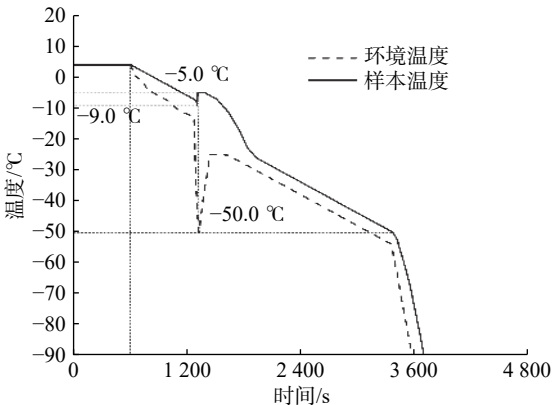
序号	组别	回收率/%
1	5% Me ₂ SO	83.60±4.86 ^{bc}
2	10% Me ₂ SO	86.72±1.86 ^{abc}
3	20% Me ₂ SO	63.44±3.93 ^f
4	50% Me ₂ SO	0.95±0.77 ^g
5	5% EG	73.22±2.40 ^e
6	10% EG	82.40±5.40 ^c
7	20% EG	75.32±1.52 ^d
8	50% EG	3.46±1.11 ^g
9	7.5% Me ₂ SO + 2.5% EG	88.47±0.61 ^{abc}
10	5% Me ₂ SO + 5% EG	84.44±2.23 ^{bc}
11	2.5% Me ₂ SO + 7.5% EG	83.37±3.98 ^{bc}
12	7.5% Me ₂ SO + 2.5%EG + 100 mmol海藻糖	88.75±1.99 ^{ab}
13	7.5% Me ₂ SO + 2.5%EG + 200 mmol海藻糖	91.59±1.51 ^a
14	7.5% Me ₂ SO + 2.5%EG + 300 mmol海藻糖	83.42±1.66 ^{bc}
15	7.5% Me ₂ SO + 2.5%EG + 500 mmol海藻糖	72.65±0.91 ^e
16	7.5% Me ₂ SO + 2.5%EG + 1000 mmol海藻糖	67.69±4.58 ^{ef}

注: 运用邓肯多重比较方法进行多重比较, 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 ($P>0.05$)。

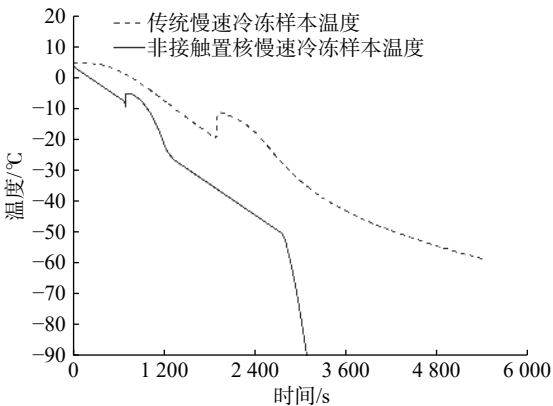
对传统慢速冷冻和非接触置核慢速冷冻法的温度变化进行测定。传统慢速冷冻法程序降温盒中的液体温度、样本温度如图 1(a) 所示, 当样品温度降温至-19.4 ℃ 时, 样本中低温保护剂出现结晶, 样本温度上升, 回温至-10.8 ℃, 溶液过冷度为 8.6 ℃, 此时环境温度为-34.5 ℃, 样品与冷源温差为 23.7 ℃。样本中溶液结晶后, 样本温度先快速降低后缓慢降低, 最后跟随环境温度逐渐降低。



(a) 传统慢速降温程序环境、样本温度变化



(b) 非接触式置核降温程序环境、样本温度变化



(c) 不同降温程序样本温度变化对比

图 1 温度变化曲线
Fig. 1 Temperature change curve

非接触置核慢速冷冻降温过程中的舱体温度、样本温度如图 1(b) 所示, 样品在 4 ℃ 停留 10 min 以加载低温保护剂, 之后以 1 ℃/min 降温至-9.0 ℃, 在该温度进行非接触置核。调整程序降温仪舱体降温速率, 将舱体迅速降温至-50 ℃, 在管壁接触面制造局部冷点, 在接触面形成稳定的晶核, 样本中溶液出现结晶并迅速回温至-5 ℃, 溶液过冷度为 4 ℃, 相对传统慢速冷冻, 低温保护剂的过

冷度较低,此时与样品温度差为 45 ℃。样本温度出现短暂停滞迅速下降,与此同时舱体温度上升至-25 ℃,避免样本因降温速率过快,导致细胞不能及时脱水而造成冰晶损伤。舱体温度在-25 ℃平衡 3 min,随后环境温度缓慢降低,样本温度先快速降低,在与环境温度不断接近后,跟随舱体温度缓慢降低。

传统慢速冷冻和非接触置核慢速冷冻法样本温度变化对比如图 1(c)所示。传统慢速冷冻方法低温保护剂在-19.4 ℃开始结晶,由于低温保护剂的过冷度较大,造成大量细胞外冰晶形成,且冰晶生长迅速,极有可能对低温保护剂中的细胞造成机械损伤^[17-18]。细胞外冰晶的快速形成,导致细胞内水分来不及脱出,造成细胞内溶液过冷形成冰晶对细胞造成损伤。温度的暂时升高也可能导致重结晶,加剧冰晶损伤^[19]。此外,随着环境温度接近-80 ℃,样本温度的降温速率不断降低,较慢的降温速率不利于细胞内的溶液非晶态固化。非接触式置核慢速冷冻下低温保护剂在-9 ℃开始结晶,由于过冷度较低,形成的冰晶数量少且生长较慢,从而使细胞内水分能够充分脱出,同时在样本温度达到-50.0 ℃后样本温度变化较快,较快的降温速率可使细胞内溶液实现或接近玻璃态固化,从而减少降温过程中的冰晶损伤。显然,非接触置核慢速冷冻法更符合两步法对细胞冻存的保护机理。

2.2 不同保护剂对肺癌细胞 A549 低温保存效果的影响

目前低温保护剂种类繁多,它们的毒性和渗透性有很大差别^[20],合理地选择和配制低温保护剂至关重要。使用 AO/PI 染色对复温后细胞回收率进行检测,用不同低温保护剂冻存细胞,复苏后细胞回收率结果如表 1 所示。在 DMEM 中只添加 Me₂SO 作为低温保护剂(1-4 组),Me₂SO 体积分数为 10% 时,细胞回收率为 86.72±3.86%,低温保存效果最佳。Me₂SO 体积分数在 20% 及以上时,细胞回收率显著降低($P<0.05$),Me₂SO 体积分数为 50% 时,细胞回收率为 0.95±0.77%。Me₂SO 含量越多,保护剂对细胞的渗透及毒性损伤越大,细胞受损越严重。在 DMEM 中只添加 EG 作为低温保护剂(5-8 组),EG 体积分数为 10% 时,细胞回收率为 82.40±5.40%,保存效果明显好于其他组($P<0.05$),EG 体积分数为 50% 时,回收率为 3.46±1.11%。

由于 EG 的毒性小于 Me₂SO,使用 Me₂SO,EG 的最优体积分数同为 10%,所以,在渗透性保护剂体积分数恒定的情况下,考虑使用 EG 取代一部分 Me₂SO,以此减小低温保护剂的毒性。对比 2,6,9-11 组,在联用 Me₂SO,EG 添加在 DMEM 中作为低温保护剂时,7.5% Me₂SO + 2.5% EG 细胞回收率为 88.14±0.61%,保存效果优于其他配比。

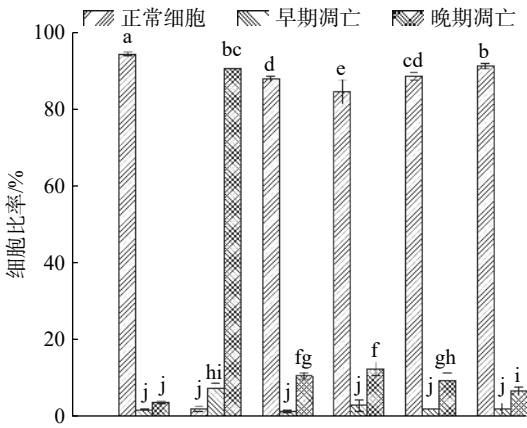
因使用 7.5% Me₂SO + 2.5% EG 配比的保护剂保存效果明显好于其他组,所以,在此基础上优化海藻糖浓度,进一步提升低温保存效果。对比 9,12-16 组,结果发现,随着海藻糖浓度的增加,细胞存活率无显著差异($P>0.05$),但细胞回收率先增大后逐渐减小。在海藻糖浓度为 100 mmol/L 时,细胞回收率为 88.75±1.99%,与不添加海藻糖组无显著差异($P>0.05$),说明低浓度海藻糖不能很好地发挥保护细胞膜的作用。在海藻糖浓度为 200 mmol/L 时,细胞回收率为 91.59±1.51%,显著高于其他浓度下的细胞回收率($P<0.05$)。

在自然界中,海藻糖是一种重要的小分子,通过维持渗透压平衡来保护细菌和植物在干燥环境中生存^[21-23],Kempf 等^[24]使用 10%(体积分数) Me₂SO+200 mmol 海藻糖作为低温保护剂,采用慢速冷冻方法低温保存人胚胎干细胞,得到了较高的细胞回收率,且使未分化基因得到很好保护。添加海藻糖,一方面,降低了 Me₂SO 体积分数,使得产生的毒性降低;另一方面,适当添加海藻糖有利于平衡渗透压,细胞的渗透性损伤和细胞结构及骨架的损伤较小,从而保护细胞膜不破裂,同时减少冰晶的形成。实验中发现,海藻糖浓度过低时,对细胞膜和蛋白质的保护作用不明显,添加 200 mmol 以上海藻糖时,细胞回收率显著降低,说明较高浓度海藻糖可能会影响细胞膜表面酶的活性,使 EG 和 Me₂SO 不易进入细胞,导致细胞脱水直至死亡^[25]。

2.3 肺癌细胞 A549 凋亡情况

选取新鲜组以及 DMEM,10%(体积分数) Me₂SO,10%(体积分数) EG,7.5%(体积分数) Me₂SO + 2.5%(体积分数) EG,7.5%(体积分数) Me₂SO + 2.5%(体积分数) EG +200 mmol 海藻糖这 5 组溶液保存的细胞进行流式检测,分析细胞凋亡情况。如图 2 所示,新鲜对照组的正常细胞比率为 94.44±0.43%,晚期凋亡和坏死细胞为 3.68±0.29%。经过冷冻后实验组的正常细胞比例都显著降低($P<0.05$),表明无论添加哪种保护剂,低温

造成的细胞损伤都是不可避免的。未添加保护剂, 只使用 DMEM 冷冻后的正常细胞比率为 $2.11 \pm 0.71\%$, 10%(体积分数) Me_2SO 实验组的正常细胞比率为 $88.32 \pm 0.57\%$, 晚期凋亡和坏死细胞比率为 $10.59 \pm 0.92\%$, 10%(体积分数) EG 实验组的正常细胞比率为 $84.61 \pm 3.16\%$, 晚期凋亡和坏死细胞比率为 $12.49 \pm 1.73\%$ 。7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数) EG 实验组的正常细胞比率为 $88.63 \pm 1.11\%$, 晚期凋亡和坏死细胞比率为 $9.36 \pm 2.06\%$, 7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数) EG + 200 mmol 海藻糖实验组的正常细胞比率为 $91.26 \pm 0.69\%$, 晚期凋亡和坏死细胞比率为 $6.66 \pm 1.12\%$, 与新鲜组相比差异较小。



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 ($P > 0.05$)。

图2 各个时期细胞比率

Fig.2 Cell ratio at various stages

2.4 肺癌细胞 A549 的凋亡相关基因表达

通过 RT-PCR 检测, 使用 7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数) EG + 200 mmol 海藻糖低温保护剂, 冷冻前、后肺癌细胞 A549 凋亡相关基因 (Bcl-2, Bax 和 Bad) 表达量的变化如图 3 所示。RT-PCR 分析结果表明, 低温保存处理组的 RNA 表达量的差异较大。Bcl-2 基因是一类抑制凋亡基因, 对肿瘤细胞的凋亡起抑制作用。如图 3 所示, 与新鲜组相比, Bcl-2 基因表达量显著增加 ($P < 0.05$)。Bax 基因和 Bad 基因是一类促凋亡基因, 与新鲜组相比, 冷冻后的各实验组 Bax, Bad 基因表达量显著增加 ($P < 0.05$)。

相对于新鲜组细胞, 7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数) EG + 200 mmol 海藻糖组低温保存后 Bax, Bad 基因表达量显著增加, 表明低温环境以及低温保护剂诱导细胞中 Bax, Bad 基因过表

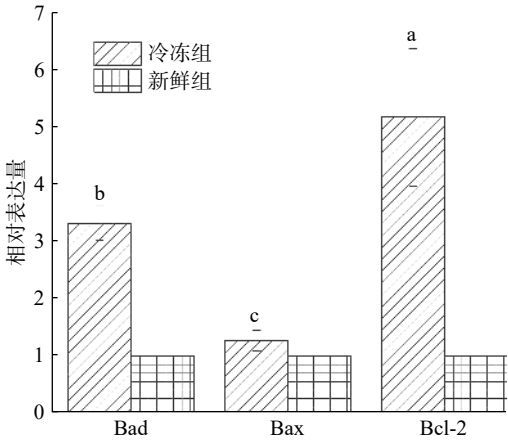


图3 细胞凋亡相关基因表达量

Fig.3 Apoptosis-related gene expression

达, 加剧了细胞凋亡。同时 Bcl-2 基因过表达, 且明显高于 Bax, Bad 基因。Joensuu 等^[26] 发现在癌变组织内 Bcl-2 的高表达可延长乳腺癌患者的生命。表明 7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数) EG + 200 mmol 海藻糖可以有效地抑制细胞凋亡, 提高 A549 细胞抗凋亡能力。

3 结 论

对肺癌细胞 A549 的低温保存方法及低温保护剂进行优化, 研究结果表明:

a. 非接触式置核慢速冷冻可将低温保护剂过冷度降低为 4 ℃, 使用该低温保存方法的低温保存效果优于传统的慢速冷冻, 非接触式置核慢速冷冻和传统慢速冷冻的细胞回收率分别为 $86.72 \pm 1.86\%$, $76.06 \pm 3.49\%$ 。

b. 7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数) EG + 200 mmol 海藻糖作为肺癌细胞 A549 低温保护剂的细胞回收率 ($91.59 \pm 1.51\%$) 高于使用 10%(体积分数) Me_2SO 作为肺癌细胞 A549 低温保护剂的细胞回收率 ($86.72 \pm 1.86\%$)。

c. 流式细胞、RT-PCR 结果显示, 使用 7.5%(体积分数) Me_2SO + 2.5%(体积分数) EG + 200 mmol 海藻糖作为低温保护剂, 正常细胞比例最高, 且可以很好地抑制细胞凋亡。

肺癌组织研究价值极高, 将病变组织与新鲜组织的蛋白表达、基因序列进行检测, 可用于探究其发病机理以及制作类器官等研究。所以, 未来研究应更关注肺癌样本库中细胞微团、肿瘤组织的活性及质量, 这对样本库的建立具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 范传东. 氯代奎宁对 A549 细胞的增殖抑制作用研究 [D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [2] 田崇梅, 夏道宗, 邢梦, 等. 亚硒酸钠通过 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(2): 181–186.
- [3] BAUST J G, GAO D Y, BAUST J M. Cryopreservation: an emerging paradigm change[J]. *Organogenesis*, 2009, 5(3): 90–96.
- [4] FOWLER A, TONER M. Cryo-injury and biopreservation[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 1066(1): 119–135.
- [5] GAO D Y, CRITSER J K. Mechanisms of cryoinjury in living cells[J]. *ILAR Journal*, 2000, 41(4): 187–196.
- [6] HOFFMANN N E, BISCHOF J C. The cryobiology of cryosurgical injury[J]. *Urology*, 2002, 60(2): 40–49.
- [7] HUANG H S, ZHAO G, ZHANG Y T, et al. Predehydration and ice seeding in the presence of trehalose enable cell cryopreservation[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, 3(8): 1758–1768.
- [8] ZHANG J M, SHENG Y, CAO Y Z, et al. Effects of cooling rates and ice-seeding temperatures on the cryopreservation of whole ovaries[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2011, 28(7): 627–633.
- [9] DIENER B, UTESCH D, BEER N, et al. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics[J]. *Cryobiology*, 1993, 30(2): 116–127.
- [10] 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.
- [11] 睢晓洁, 潘超, 杨静, 等. 以氧化三甲胺作为细胞冻存保护剂的研究 [J]. *中国科技论文*, 2017, 12(12): 1341–1345.
- [12] KASAI M, NIWA K, IRITANI A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos[J]. *Journal of Reproduction & Fertility*, 1981, 63(1): 175–180.
- [13] 雷晓华, 曹宇静, 段恩奎, 等. 四种冷冻保护剂对小鼠 2-细胞胚胎渗透性和毒性作用的比较 [J]. *动物学报*, 2008, 54(4): 725–732.
- [14] 杨云. 微流体装置减少卵母细胞低温保存渗透损伤的理论与实验研究 [D]. 上海: 上海理工大学, 2016.
- [15] GAUTAM S K, VERMA V, PALTA P, et al. Effect of type of cryoprotectant on morphology and developmental competence of in vitro-matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes subjected to slow freezing or vitrification[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2008, 20(4): 490–496.
- [16] FUJIWARA K, SANO D, SEITA Y, et al. Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2010, 56(1): 169–175.
- [17] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [18] SARAGUSTY J, GACITUA H, ROZENBOIM I, et al. Do physical forces contribute to cryodamage?[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(4): 719–728.
- [19] PETERSEN A, SCHNEIDER H, RAU G, et al. A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature[J]. *Cryobiology*, 2006, 53(2): 248–257.
- [20] 杨云, 周新丽, 周楠峰, 等. 卵母细胞冷冻保存技术新进展 [J]. *生殖与避孕*, 2015, 35(3): 179–184, 195.
- [21] CROWE L M. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 131(3): 505–513.
- [22] LEE D H, RYU H, BAE H H, et al. Transgenic tobacco plants harboring the trehalose phosphate synthase TPS gene of *Escherichia coli* increased tolerance to drought stress[J]. *Research Journal of Biotechnology*, 2012, 7(2): 22–26.
- [23] GARG A K, KIM J K, OWENS T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(25): 15898–15903.
- [24] KEMPF B, BREMER E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 170(5): 319–330.
- [25] WU C F, TSUNG H C, ZHANG W J, et al. Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2005, 11(6): 733–739.
- [26] JOENSUU H, PYLKKÄNEN L, TOIKKANEN S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer[J]. *American Journal of Pathology*, 1994, 145(5): 1191–1198.

(编辑: 石 瑛)