

· 基础研究 ·

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*

李 佳, 陆会平, 冯振博[△], 莫伟嘉

(广西医科大学第一附属医院病理科, 南宁 530021)

摘要:目的 筛选冻存慢病毒转染后稳转肝癌细胞株 HepG2 的最佳冻存液。方法 采用甘油和二甲基亚砷(DMSO)2 种不同冻存保护剂,以 4 种不同比例的冻存液分别冻存慢病毒转染后肝癌细胞 HepG2 及未转染的 HepG2 细胞,并对上述细胞复苏后的存活率及增殖能力进行比较分析。结果 采用甘油为冻存保护剂时,冻存液[DMEM:胎牛血清(FBS):甘油]比例为 0:9:1 的转染后细胞存活率最高($P=0.001$);未转染细胞存活率与冻存液比例无关($P=0.293$)。采用 DMSO 为冻存保护剂时,转染后细胞存活率为 0%;未转染细胞存活率在 60%及以上,且与冻存液比例无关($P=0.487$)。冻存液中血清含量越高,复苏后细胞的增殖能力越强($P<0.05$)。结论 冻存慢病毒转染后的稳转肝癌细胞株 HepG2 的最佳冻存液为 90%FBS+10%甘油。

关键词:慢病毒转染;肝肿瘤;细胞冻存

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3393-02

The optimal cryopreservation liquid of the stable transfected cell line named hepatic carcinoma HepG2 Transfected by Lentivirus*

Li Jia, Lu Hui ping, Feng Zhenbo[△], Mo Weijia

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the optimal cryopreservation liquid of the stable transfected cell line named hepatic carcinoma HepG2 transfected by lentivirus. **Methods** Glycerol and DMSO as cryopreservation liquid, The HepG2 transfected by lentivirus and HepG2 cells were both cryopreserved with four various proportion of cryopreservation liquid. After thawing, the survival rate of the two cells were observed by inverted contrast microscope and the viability and proliferation were detected with MTT assay. **Results** Using glycerol as cryoprotectant liquid, the survival rate of the HepG2 cells transfected by lentivirus was obviously higher than other 3 groups when the proportion of the cryopreservation liquid(DMEM:FBS:Glycerol) was 0:9:1($P=0.001$), whereas there was no significant difference among the groups of HepG2 cells with various proportion of cryopreservation liquid($P=0.293$). Using DMSO as cryoprotectant liquid, the survival rate of the cells transfected by lentivirus was 0%, whereas the survival rate of the HepG2 cells was higher than 60%, and there was no significant difference between groups of various proportion of cryopreservation liquid($P=0.487$). The MTT assay demonstrated that the higher the serum levels was, the better proliferation capacity those cells had($P<0.05$). **Conclusion** The optimal cryopreservation liquid for the hepatic carcinoma cell line HepG2 transfected by lentivirus is used glycerol as cryoprotectant solution, and the proportion of cryopreservation solution was 90% FBS + 10% Glycerol.

Key words: transfection by lentivirus; hepatic neoplasms; cell cryopreservation

在细胞培养过程中,经常需要冻存一部分细胞,避免培养细胞表型的改变而导致重复实验条件不一的状况,并为进一步的实验保存状态良好的细胞。细胞一般采用液氮低温保存,冻存及复苏时必须遵循“慢冻快融”的原则。本课题组在冻存慢病毒转染肝癌细胞株 HepG2 细胞时,尝试了多种不同配方的细胞冻存液,最后筛选出一种理想的可用于液氮保存慢病毒转染后 HepG2 细胞的冻存液。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 细胞株 HepG2 细胞及其慢病毒转染后稳转细胞株为本实验室保存。完全 DMEM 培养基由南京凯基生物科技发展有限公司提供,胎牛血清(FBS)由杭州四季青提供,胰酶由碧云天生物技术研究所提供,甘油和二甲基亚砷(DMSO)由北京索莱宝科技有限公司提供。-20℃冰箱由海尔电器公司提供,-80℃超低温冰箱由日本三洋公司提供,普通高速离心机由德国 Eppendorf 公司提供,酶标仪 Model-450 由美国 Bio-Rad 公司提供,液氮罐为本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 冻存方法 常规胰酶消化细胞,用完全培养基终止消化,轻轻吹打细胞成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 1 min 后弃去上清液,分组加入以下冻存液:分别采用甘油和 DMSO 为保护剂,按以下配方各配备 4 种比例冻存液。(1)A 液,DMEM:FBS:保护剂=7:2:1;(2)B 液,DMEM:FBS:保护剂=6:3:1;(3)C 液,DMEM:FBS:保护剂=5:4:1;(4)D 液,DMEM:FBS:保护剂=0:9:1。然后轻轻混匀,冻存前统一调整细胞密度到 1×10^6 个/毫升,将细胞悬液移至冻存管,每管 1.5 mL,梯度降温冻存,将冻存管置于 4℃ 冰箱 30 min, -20℃ 60~120 min 后转移至 -80℃ 过夜(16 h),转至液氮保存。

1.2.2 细胞的复苏 从液氮中取出冻存管,迅速置于 40℃ 水浴箱中快速摇动,使其迅速融化后,将细胞悬液加入已放置 4 mL 含 10%FBS 的完全 DMEM 培养基的培养瓶中,轻轻混匀后置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。

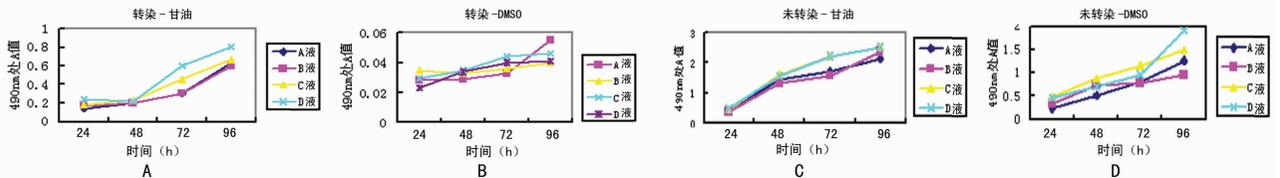
1.2.3 倒置相差显微镜下观察 复苏细胞 6~8 h 后换液,在倒置相差显微镜下观察复苏后细胞的存活情况,按已贴壁细胞即为存活细胞,未贴壁细胞为死亡细胞的原则,观察复苏后细胞的存活率。

1.2.4 MTT 法 将各组细胞接种于 96 孔板, 2×10^3 个/孔, 每组细胞均做 5 个复孔, 分别于种板后 24、48、72、96 h 加入 20 μ L MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 小心吸尽培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min 后上酶标仪检测 490 nm 处吸光度值, 绘制生长曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 倒置相差显微镜下观察的细胞存活率 采用甘油作为冻存保护剂时, 转染的细胞存活, 且冻存液比例为 0 : 9 : 1 (DMEM : FBS : 甘油) 时, 细胞存活率明显高于其他 3 组, 差异有统计学意义 ($F = 14.811, P = 0.001$); 未转染细胞的存活率均达到 60% 及以上, 不同比例的冻存液组间差异无统计学意义 ($F = 1.473, P = 0.293$)。采用 DMSO 作为冻存保护剂时, 转染组细胞存活率为 0%, 未转染细胞的存活率均达到 60% 及以上, 不同比例的冻存液组间差异无统计学意义 ($F = 0.890, P = 0.487$)。见表 1。



A: 转染的细胞以甘油为冻存保护剂冻存并复苏后 24~96 h 生长曲线; B: 转染的细胞以 DMSO 为冻存保护剂冻存并复苏后 24~96 h 生长曲线; C: 未转染的细胞以甘油为冻存保护剂冻存并复苏后 24~96 h 生长曲线; D: 未转染的细胞以 DMSO 为冻存保护剂冻存并复苏后 24~96 h 生长曲线。

图 1 各组细胞复苏后生长曲线图

3 讨 论

目前认为细胞处在对数生长期时最适合冻存, 而细胞冻存需要遵循“慢冻”的原则^[1]。除此之外, 冻存液的成分及其比例对细胞冻存、复苏效果也起着很重要的作用, 其中冻存保护剂和血清是在细胞冻存过程中最为重要的两个因素。

Wastts 等^[2]认为冻存细胞时一定要加入保护剂。如果直接冻存, 细胞内形成的冰晶会导致胞内蛋白质、酶变性, 溶酶体膜损伤, 细胞核内 DNA 受损^[3], 从而引起细胞死亡。因此, 减少细胞内冰晶的形成是减少细胞损伤的关键^[4]。冻存保护剂除了可以减少降温过程中胞内外冰晶的形成, 还可降低“溶质效应”。目前最常用的冻存保护剂有 DMSO、甘油、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。其中, DMSO 相对分子质量小、渗透性强, 通过降低冻存液冰点和细胞内外的电解质浓度, 改变细胞膜的通透性, 保护细胞免受冷冻损伤^[5-6]。Chesne 等^[7]报道, DMSO 与甘油等冻存保护剂相比较, 具有更好的保护作用。但 DMSO 具有一定的细胞毒性^[8], 高浓度不利于细胞的冷冻保护。Diener 等^[9]认为 10% DMSO 为最佳冻存剂浓度^[9]。然而, 于丽敏^[10]报道, 对耐药的肿瘤细胞株进行冻存时, 使用 10%~15% 的甘油(占冻存液百分比)作为保护剂, 细胞存活率明显高

表 1 倒置相差显微镜下观察的细胞复苏后的存活率

保护剂	冻存液比例		转染组细胞	未转染组细胞
	(DMEM : FBS : 保护剂)		存活率(%, $\bar{x} \pm s$)	存活率(%, $\bar{x} \pm s$)
甘油	7 : 2 : 1		22.00 \pm 13.51	74.00 \pm 9.62
	6 : 3 : 1		33.20 \pm 10.18	73.00 \pm 7.58
	5 : 4 : 1		38.00 \pm 5.70	77.00 \pm 10.37
	0 : 9 : 1		77.00 \pm 12.04*	87.00 \pm 2.74
DMSO	7 : 2 : 1		0	60.00 \pm 15.81
	6 : 3 : 1		0	74.00 \pm 5.48
	5 : 4 : 1		0	66.00 \pm 10.84
	0 : 9 : 1		0	68.00 \pm 11.40

* : $P < 0.05$, 与甘油其他 3 组比较。

2.2 MTT 法检测冻存细胞复苏后的生长情况 两组细胞在不同比例冻存液冻存复苏后的生长情况见图 1。图中结果显示转染后细胞以甘油作为冻存保护剂细胞存活(图 1A), 且冻存液中血清含量越高, 复苏后细胞的增殖能力越强 ($P < 0.05$); 而用 DMSO 作为冻存保护剂冻存的转染细胞复苏后存活率几近于 0% (图 1B)。无论是以 DMSO 还是以甘油作为冻存保护剂, HepG2 细胞复苏后都能存活, 且复苏后均具有较好的增殖能力(图 1C, 图 1D)。

于用 DMSO 作为保护剂的, 此结果与本实验结果相同。是否在肿瘤细胞受到外界损伤后(药物刺激、慢病毒感染等), 细胞对 DMSO 敏感性提高, 无法抵御其细胞毒性, 进而影响复苏效果, 这其中的机制仍有待研究。

FBS 中含有丰富的细胞生长所必需的营养物质, 是细胞培养中最天然的培养基^[11]。若含 DMSO 的冻存液中血清浓度低则细胞复苏后活力低, 原因可能是 FBS 可以中和 DMSO 的毒性, 以及血清中的纤维粘连素有助于细胞贴壁^[12-13]。本实验结果也表明血清浓度对复苏后细胞的活力有一定的影响, 冻存液中血清含量越高, 复苏后细胞的增殖能力越强。

总而言之, 细胞冻存对实验的顺利进展至关重要。由本实验结果可知, 冻存慢病毒转染后稳转肝癌细胞株 HepG2 的最佳冻存液为 90% FBS+10% 甘油。望本研究结果能给其他课题组的细胞冻存提供一种借鉴的方法。

参考文献:

- [1] 帅志强, 朱海, 吕自力, 等. 几种冻存细胞的方法比较[C]. 浙江: 中国畜牧兽医学动物繁殖学分会第 12 届学术研讨会, 2004: 155. (下转第 3397 页)

能^[10-13],从而进一步减轻踝关节肿胀。研究结果提示:地塞米松起效快,但蛇肽保健酒效果更为明显,且蛇肽含量对抑制肿胀影响较大。

3.2 蛇肽保健酒对 AA 小鼠体质量的影响 与对照组相比较,模型组与阳性对照组小鼠体质量均有下降趋势,且实验过程中发现阳性对照组小鼠不活跃,毛色暗淡,可见地塞米松在治疗关节炎的同时对机体也造成了一定的损伤,不良反应较大。

3.3 蛇肽保健酒对 AA 小鼠脾脏指数的影响 脾脏作为体内最大的淋巴器官,具有储血、调节血量和参与免疫等重要功能。类风湿性关节炎病例的一个特征就是脾脏肿大^[14]。蛇肽高、低剂量组小鼠脾脏肿大均显著减轻,效果与地塞米松组相当。同时酒基对降低脾脏肿胀也有效果,且与蛇肽低、高剂量组结果相似。

3.4 蛇肽保健酒对 AA 小鼠 CIC 的影响 CIC 是 RA 的一个重要检测指标^[9]。本研究发现:仅蛇肽低剂量组与阳性对照组小鼠 CIC 显著降低,并恢复为正常水平。提示蛇肽酒与地塞米松均对调节 AA 小鼠体液免疫发挥作用。

综合以上 5 个测量指标,低剂量蛇肽酒与地塞米松均对 AA 小鼠佐剂性关节炎具有显著的治疗效果,但低剂量蛇肽酒治疗效果更好,且未见不良反应。蛇肽酒对佐剂性关节炎的最佳治疗剂量及其他功效有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 余克强,罗仁.青藤碱对类风湿关节炎患者外周单核源性树突状细胞趋化因子分泌和受体表达的影响[J].南方医科大学学报,2009,29(4):635-637,641.
- [2] 刘彦虹,卢秀敏.类风湿关节炎自身抗体类风湿因子与抗瓜氨酸化蛋白抗体关系的研究进展[J].国际检验医学杂志,2011,32(9):973-975.
- [3] 王勇,方勇飞,周新,等.青藤碱对佐剂性关节炎大鼠腹腔

巨噬细胞表达细胞因子的影响[J].中华风湿病学杂志,2003,7(7):415-419.

- [4] 陈骏,李文胜,罗兴菊,等.复方蚂蚁酒对大鼠佐剂性关节炎的防治作用及其机制[J].中国医药导报,2013,10(10):12-13,16.
- [5] 刘岱岳,刘鹤华.蛇与蛇毒[N].中国中医药报,2004-03-03.
- [6] 张春荣,余晓东,和七一,等.“蛇毒活性酒”功效的动物实验研究[J].检验医学与临床,2010,7(14):1416-1418.
- [7] 孙晓迪,李银清,赵雨,等.鹿筋胶原对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用[J].中国中药杂志,2009,34(23):3135-3138.
- [8] 张黎明,陈志龙,赵杰,等.眼镜蛇毒素抗类风湿性关节炎实验研究[J].药学实践杂志,2000,18(4):209-211.
- [9] 杨晓军,苗文丽,裴林,等.天星健骨方对佐剂性关节炎大鼠关节指数的影响[J].中医临床研究,2012,4(2):5-6.
- [10] Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system[J]. Alcohol,2008,42(4):237-247.
- [11] Mendenhall CL, Theus SA, Roselle GA, et al. Biphasic in vivo immune function after low- versus high-dose alcohol consumption [J]. Alcohol,1997,14(3):255-260.
- [12] Romeo J, Warnberg J, Nova E, et al. Changes in the immune system after moderate beer consumption [J]. Ann Nutr Metab,2007,51(4):359-366.
- [13] Romeo J, Warnberg J, Diaz LE, et al. Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults [J]. J Physiol Biochem,2007,63(2):153-159.
- [14] 文浩平,和七一,邓疆渝,等.五步蛇毒素对大鼠佐剂性关节炎的影响[J].毒理学杂志,2010,24(4):306-308.

(收稿日期:2013-05-26 修回日期:2013-06-10)

(上接第 3394 页)

- [2] Watts P, Grant MH. Cryopreservation of rat hepatocyte monolayer cultures[J]. Hum Exp Toxicol,1996,15(1):30-37.
- [3] Novicki DL, Irons GP, Strom SC, et al. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes[J]. In Vitro,1982,18(4):393-399.
- [4] 杨景山.医学细胞化学与细胞生物技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1990:430-441.
- [5] Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, et al. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine(Bos indicus) ovarian tissue [J]. Theriogenology,2004,61(6):1101-1114.
- [6] Cuello C, Sanchez-Osorio J, Alminana C, et al. Effect of the cryoprotectant concentration on the in vitro embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts[J]. Cryobiology,2008,56(3):189-194.
- [7] Chesné C, Guillouzo A. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes:a critical evaluation of freezing and thawing

conditions[J]. Cryobiology,1988,25(4):323-330.

- [8] Li Y, Lu RH, Luo GF, et al. Effects of different cryoprotectants on the viability and biological characteristics of porcine preadipocyte[J]. Cryobiology,2006,53(2):240-247.
- [9] Diener B, Oesch F. Cryopreserved and hypothermically stored rat liver parenchymal cells as metabolizing system in the Salmonella mutagenicity assay [J]. Mutat Res,1995,335(3):309-316.
- [10] 于丽敏.二甲基亚砜与甘油两种冻存保护液对细胞保护作用的比较[J].大连医科大学学报,1995,17(1):6-7.
- [11] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].4版.西安:世界图书出版公司,2001:44.
- [12] 鄂征.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1994:54-55.
- [13] 王亨,韩超,邱昌伟,等.体外培养奶牛乳腺上皮细胞的形态学观察[J].中国兽医杂志,2007,43(6):15-17.

(收稿日期:2013-05-03 修回日期:2013-06-07)