

长期冻存对昆虫细胞系 SL2 和 NIH-SaPe-4 活性的影响

丁伟峰, 马艳, 冯颖*, 张欣, 马涛

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:对 2 种双翅目昆虫细胞系(黑腹果蝇胚细胞系 SL2 以及麻蝇胚细胞系 NIH-SaPe-4)38 个月长期液氮深低温保存效果进行了研究,通过对冻存时间和保护剂对 2 种细胞系冻后活力、圆度以及恢复时间影响的测定,比较了 3 种不同配方冻存保护液的效果。结果表明:2 种昆虫细胞系冻后活性均随着冻存时间的增长而逐渐降低。长期冻存期中,使用 90% 胎牛血清(FBS) + 10% 二甲基亚砷(DMSO)冻存 SL2 效果较好,NIH-SaPe-4 使用 10% DMSO 即可满足冻存的需要,而无需额外添加高浓度 FBS。甘油不适用于这 2 种昆虫细胞系的长期保存。

关键词:冷冻保护剂;冻存时间;昆虫细胞;细胞活力;细胞圆度

中图分类号:S789

文献标识码:A

Effects of Long-term Cryopreservation on the Cytoactive of Two Insect Cell Lines SL2 and NIH-SaPe-4

DING Wei-feng, MA Yan, FENG Ying, ZHANG Xin, MA Tao

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: In order to evaluate the effects of different cryoprotectants and durations on post-thaw cytoactives (including cell viability, circularity and recovery time) of two dipteran insect cell lines, 3 kinds of cryoprotectants (Formula I: 10% DMSO + 90% FBS; Formula II: 10% DMSO; Formula III: 10% glycerol) were used to preserve the cells of SL2 from embryo of *Drosophila melanogaster* and NIH-SaPe-4 from embryo of *Sarcophaga peregrine* in liquid nitrogen separately. The results showed that the post-thaw viability of these two cell lines decreased with the cryopreservation time expended. In long-term cryopreservation, the effect of Formula I for preserving SL2 cells was better than the others. Formula II was suitable for NIH-SaPe-4. Using glycerol as cryoprotectant was unsuitable for these two insect cell lines.

Key word: cryoprotectant; cryopreserving duration; insect cells; cell viability; cell circularity

作为现代生物学研究极有价值的模型之一,昆虫细胞被广泛应用于医学、农业以及生物学的各个领域^[1]。20 世纪 80 年代,多种双翅目昆虫细胞系先后建立并用于医学和细胞遗传学等研究,为虫媒传染疾病以及生物发育机理等探索提供了理想的试验模型^[2]。广泛使用的模式昆虫黑腹果蝇(*Dro-*

sophila melanogaster Fallen) 细胞系 SL2 常被用于干细胞分化、系统发育、基因调控机理等方面的研究^[3]。近年来,从麻蝇(*Sarcophaga peregrine* Fallen) 幼虫体内分离提取到多种广谱抗菌肽^[4],研究发现这些抗菌肽几乎都能在离体培养的细胞系 NIH-SaPe-4 中被合成^[5],表明这 2 种昆虫细胞系具有广泛

收稿日期:2010-05-10

基金项目:林业公益性行业科研专项(4-38)、国家林业局 948 项目(2002-52)

作者简介:丁伟峰(1980—),男,新疆乌鲁木齐人,研究实习员,硕士。主要从事昆虫细胞工程相关研究。

* 通讯作者

应用前景。长期高效保存已建立的昆虫细胞系可为研究和应用这些细胞资源提供保证,但国内外针对昆虫细胞系冻存的相关研究报道不多,系统地进行长期冻存研究的报道更少。

通常认为 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮是理想的冻存温度,在保护剂的作用下可实现细胞系的长期保存。常用的保护剂有渗透型的甘油和二甲基亚砷(DMSO),使用时按照一定比例与培养基混合制成冻存保护液。此外,为了获得更好的保存效果通常会在保护液中添加胎牛血清(FBS),这已成为哺乳动物细胞冻存时的常规做法^[6]。本文采用3种不同的冻存保护液分别对黑腹果蝇胚胎细胞系 SL2 和麻蝇胚胎细胞系 NIH-SaPe-4 进行长期冷冻保存,比较不同保护剂的作用效果,评估长期冻存对细胞活性的影响,为这2种以及其他昆虫细胞系长期有效保存提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试细胞系

SL2^[7]:使用 Schneider 培养基添加 10% FBS (HyClone 南美胎牛血清)于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养;NIH-SaPe-4^[8]:使用 MM 培养基添加 3% FBS 于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。

1.2 细胞的冻存

1.2.1 细胞悬液制备 收集进入对数生长期的细胞,通过离心调节其密度至 1.0×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,并检测细胞活性作为初始对照。

1.2.2 细胞冻存液制备 按照以下配方分别制备3组冻存保护液。

配方 I :90% FBS + 10% DMSO (北京索莱宝科技有限公司);配方 II :10% DMSO;配方 III :10% 甘油 (北京索莱宝科技有限公司)。

配方 I 将供试细胞液离心;弃培养基,用 FBS 重新悬浮细胞,添加 10% DMSO 后混匀并分装。配方 II 和 III 按比例将冻存液加入调整好密度的细胞悬液中。

1.2.3 细胞冻存 将分装好的待冻细胞置于程控降温仪(Cryologic 公司 FREEZE CONTROL CL-8000 降温控制器)中,先以 $3\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率降温至 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$,再以 $1\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率降温至 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$,最后转入液氮中保存。

1.3 冻后细胞活性检测

在 38 个月中取 5 个不同时期对 2 种冻存的细胞进行随机抽样复苏,使用 Beckman 公司 Vi-CELL 细胞活力分析仪检测相关指标,获得总细胞数、活细胞数、细胞活力、细胞圆度(定量描述细胞表面圆润程度)等特征量。

1.4 细胞的复苏培养

将复苏后的细胞液转移至 25 cm^2 细胞培养瓶(BD Falcon 细胞培养瓶 T-25),添加适量培养基于避光 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。每天观察细胞生长状况,定期检测并记录细胞活力恢复至冻前水平所需时间。

1.5 数据分析

使用 SPSS 对获取的数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 昆虫细胞系 SL2 长期冻存结果

分别在冻后第 1、9、12、28、38 个月时抽样检测,获得黑腹果蝇细胞系 SL2 冻后活性相关特征量(表 1)。

表 1 细胞系 SL2 冻后活性

冻存时 间/月	配方 I			配方 II			配方 III		
	活细胞数	细胞活力/%	细胞圆度	活细胞数	细胞活力/%	细胞圆度	活细胞数	细胞活力/%	细胞圆度
对照	1 246	83.71 ± 0.83	0.88 ± 0.03	1 246	83.71 ± 0.83	0.88 ± 0.03	1 246	83.71 ± 0.83	0.88 ± 0.03
1	783	91.70 ± 1.05	0.87 ± 0.03	806	89.45 ± 1.16	0.84 ± 0.03	719	93.60 ± 1.13	0.85 ± 0.03
9	636	78.30 ± 2.01	0.87 ± 0.03	1 042	72.17 ± 1.58	0.84 ± 0.03	828	64.13 ± 2.16	0.83 ± 0.03
12	863	89.80 ± 0.93	0.88 ± 0.03	878	88.38 ± 1.07	0.87 ± 0.03	638	81.82 ± 1.37	0.80 ± 0.03
28	779	91.14 ± 1.15	0.86 ± 0.03	906	82.67 ± 1.36	0.83 ± 0.03	432	62.50 ± 2.91	0.73 ± 0.03
38	394	73.10 ± 2.66	0.86 ± 0.03	430	62.56 ± 2.66	0.87 ± 0.03	225	50.67 ± 3.93	0.83 ± 0.03

注:细胞活力 = (活细胞数/总细胞数) × 100%。

表 1 表明:3 种细胞冻存液保存的 SL2 细胞经过 38 个月冻存,活力从冻前的 83.71% 分别降至 73.10%、62.56% 及 50.67%,说明长期冻存后细胞活力下降明显。采用 Pearson χ^2 验证冻存时间对细

胞冻后活力的影响(表 2),结果显示:在 3 种细胞冻存液条件下,冻存时间因素对细胞冻后活力均有显著影响($P < 0.05$)。

表2 冻存时间对细胞系 SL2 冻后活力影响的 Pearson χ^2 检验

配方	Pearson χ^2	<i>n</i>	T_{min}	Asymp. Sig. (2-sided)
I	137.719	4 701	56.07	0.000 *
II	225.606	5 308	80.85	0.000 *
III	305.396	4 199	74.82	0.000 *

注: $df=6,0(0\%)$ 个单元格预期计数小于 5, 使用 Pearson χ^2 ; * $P < 0.05$; n 为有效样本数; T_{min} 为检测单元格最小期望值; Asymp. sig. (2-sided) 为双侧近似概率; 下同。

比较表 2 中 3 组数据可见: 配方 I 的 Pearson χ^2 值小于配方 II 和配方 III 的, 说明配方 I 对长期冻存的细胞活力影响最小, 配方 II 居中, 配方 III 对冻存的细胞活力影响最大。采用 χ^2 独立性检验对 5 个时期 3 种保护液效果进行两两比较(表 3), 结果显示: 冻存 12 个月内配方 I 与 II 的效果无显著差异, 到 28 至 38 个月时二者效果差异极显著; 配方 I、配方 II 与 III 的效果均有显著差异。

表3 冻存保护液对细胞系 SL2 冻后活力影响的 χ^2 检验

冻存时间/月	配方 I 与 II		配方 I 与 III		配方 II 与 III	
	χ^2 值	Asymp. Sig. (2-sided)	χ^2 值	Asymp. Sig. (2-sided)	χ^2 值	Asymp. Sig. (2-sided)
1	2.085	0.149	1.716	0.190	7.807	0.005 *
9	7.499	0.006 *	33.915	0.000 *	13.472	0.000 *
12	0.763	0.382	19.241	0.000 *	12.405	0.000 *
28	25.159	0.000 *	145.840	0.000 *	64.442	0.000 *
38	9.949	0.002 *	30.670	0.000 *	8.119	0.004 *

注: $df=1$, 使用连续校正; * $P < 0.01$ 。

随着冻存时间的增长, 细胞冻后活力总体呈逐渐下降趋势。长期冻存时配方 I 对保持细胞活力效果最好, 配方 II 居中, 配方 III 效果较差。

圆度变化与活力变化有对应关系。圆度值越小表示细胞皱缩越明显, 说明受到的冻伤越严重, 活力降低。其中, 配方 I 对应的数据变幅较小, 说明它在维持 SL2 冻后细胞形态方面作用最好。

对 SL2 进行复苏培养观察发现, 使用配方 I 冻存的细胞复苏后活力恢复至 80% 以上所需时间为 6~9 d, 使用配方 II 和 III(除第 38 个月)冻存的细胞恢复时间为 7~12 d, 使用配方 III 冻存 38 个月的细胞经过 20 d 培养, 活力由复苏时的 50.67% 恢复至 80% 以上。由此可见, SL2 冻后恢复所需时间长短与冻后细胞活力大小有关, 当

活力低于某一范围时, 细胞恢复所需时间较长, 在此范围之内细胞的恢复所需时间较少且不同冻存配方间相差不大。

综上所述, 黑腹果蝇细胞系冻后细胞活性随冻存时间的增长而逐渐降低; 在长期冻存中, 使用配方 I(90% FBS + 10% DMSO) 作为保护液的 SL2 细胞冻后活力较高, 圆度变化小, 细胞冻后活力恢复时间短, 对于维持 SL2 冻后活性效果最好。

2.2 昆虫细胞系 NIH-SaPe-4 长期冻存结果

分别在冻存后第 9、17、20、28、38 个月时抽样检测, 获得麻蝇细胞系 NIH-SaPe-4 冻后生物活性相关特征量(表 4)。

表4 细胞系 NIH-SaPe-4 冻后活性

冻存时间/月	配方 I			配方 II			配方 III		
	活细胞数	细胞活力/%	细胞圆度	活细胞数	细胞活力/%	细胞圆度	活细胞数	细胞活力/%	细胞圆度
对照	2 436	92.41 ± 0.50	0.87 ± 0.03	2 436	92.41 ± 0.50	0.87 ± 0.03	2 436	92.41 ± 0.50	0.87 ± 0.03
9	600	41.47 ± 1.41	0.76 ± 0.03	766	74.08 ± 1.70	0.85 ± 0.03	389	55.89 ± 2.42	0.82 ± 0.03
17	508	60.33 ± 1.85	0.81 ± 0.03	674	68.64 ± 1.68	0.83 ± 0.03	340	46.01 ± 2.12	0.80 ± 0.03
20	564	71.30 ± 1.68	0.86 ± 0.03	594	68.28 ± 1.71	0.87 ± 0.03	326	47.18 ± 2.20	0.87 ± 0.03
28	485	70.91 ± 2.07	0.84 ± 0.03	587	70.22 ± 1.71	0.86 ± 0.03	201	39.57 ± 2.45	0.82 ± 0.03
38	250	75.08 ± 2.77	0.83 ± 0.03	269	67.93 ± 2.83	0.86 ± 0.03	118	45.74 ± 3.44	0.87 ± 0.03

由表 4 可见: 使用 3 种保护液的 NIH-SaPe-4 细胞经过 38 个月冻存, 活力从冻前的 92.41% 分别降至 75.08%、67.93% 及 45.74%, 说明长期冻存后细胞活

力下降明显。采用 Pearson χ^2 验证冻存时间对细胞活力的影响(表 5)可知: 冻存时间的长短对使用 3 种保护液的 NIH-SaPe-4 细胞冻后活力均有显著影响。

表5 冻存时间对细胞系 NIH-SaPe-4 冻后活力影响的 Pearson χ^2 检验

配方	Pearson χ^2	<i>n</i>	T_{min}	Asymp. Sig. (2-sided)
I	1 271.089	6 733	93.48	0.000 *
II	490.438	6 754	83.73	0.000 *
III	1 337.061	5 528	80.18	0.000 *

注: *df* = 6, 0(0%) 个单元格预期计数小于 5, 使用 Pearson χ^2 ; * *P* < 0.05。

表6 冻存保护液对细胞系 NIH-SaPe-4 冻后活力影响的 χ^2 检验

冻存时间/月	配方 I 与 II		配方 I 与 III		配方 II 与 III	
	χ^2 值	Asymp. Sig. (2-sided)	χ^2 值	Asymp. Sig. (2-sided)	χ^2 值	Asymp. Sig. (2-sided)
9	257.955	0.000 *	38.774	0.000 *	61.214	0.000 *
17	13.339	0.000 *	31.901	0.000 *	88.264	0.000 *
20	1.657	0.198	88.471	0.000 *	69.963	0.000 *
28	0.056	0.812	115.915	0.000 *	121.112	0.000 *
38	4.162	0.041	52.016	0.000 *	30.937	0.000 *

注: *df* = 1, 使用连续校正值; * *P* < 0.01。

从 NIH-SaPe-4 冻后活力变化同样可以看出: 除使用配方 I 冻存的细胞外; 随着冻存时间的增长, 细胞冻后活力总体呈逐渐下降趋势。长期冻存中配方 I 和 II 对保持细胞活力效果较好, 配方 III 效果较差。

从 NIH-SaPe-4 冻后细胞圆度变化可见: 配方 II 对应的数据变幅较小, 说明它在维持 NIH-SaPe-4 冻后细胞形态方面作用最好。

对 NIH-SaPe-4 进行复苏培养观察发现: 使用配方 I (除第 9 个月) 和 II 冻存的细胞恢复所需时间最短, 为 4 ~ 6 d。使用配方 III 冻存的细胞恢复时间在 4 ~ 15 d 之间, 且冻存时间越长, 恢复所需时间也越长。使用配方 I 冻存 9 个月的细胞经过 12 d 培养, 活力由复苏时的 41.47% 恢复至 80% 以上。由此可见, NIH-SaPe-4 冻后恢复所需时间长短与冻后细胞活力大小有关, 活力低于某范围时细胞恢复所需时间明显变长。

综上所述, 麻蝇细胞系 NIH-SaPe-4 冻后细胞活性随冻存时间的增长而逐渐降低; 在长期冻存中, 使用配方 II (10% DMSO) 作为保护剂的 NIH-SaPe-4 细胞冻后活力较高, 圆度变化小, 冻后细胞活力恢复时间短, 对维持 NIH-SaPe-4 冻后活性效果最好。配方 I 中使用的高浓度 FBS 对提高细胞冻后活性的作用不明显。

3 结论与讨论

双翅目昆虫细胞系 SL2 和 NIH-SaPe-4 冻后活

比较表 5 中 3 组数据发现, 配方 II 的 χ^2 值明显小于配方 I 和 III, 说明配方 II 对长期冻存的细胞活力影响最小。使用 χ^2 独立性检验对 5 个时期 3 种保护液效果进行两两比较 (表 6)。结果表明: 17 个月的短期冻存中配方 I 与 II 的效果显著不同, 之后的 20 至 38 个月时二者效果相似; 配方 III 与其他 2 种保护液效果均有显著差异。

力变化的长期观测结果表明: 随着冻存时间的增长, 2 种细胞系冻后活性均逐渐下降; 通过比较 3 种冻存保护液的效果发现, SL2 使用 90% FBS + 10% DMSO 作为保护液效果较好, 不添加 FBS 的 10% DMSO 更适合 HIN-SaPe-4 的长期冻存, 甘油在 2 种细胞的长期冻存中效果均不理想。

有关冻存时间长短对细胞冻后生物学特性影响的相关报道较少。通常认为, 在 -198 °C 液氮中保存的生物样品, 其代谢活动非常微弱并接近停止, 生物学活性得以保持, 从而达到长期保存的目的。徐磊等^[9] 对人同种瓣组织液氮保存效果的研究认为, 低温状态下的细胞仍有缓慢的无氧代谢, 其仍有可能进行离子交换, 从而改变胞内外渗透压平衡。随着保存时间的延长, 细胞代谢产物以及冻存液中各种物质浓度积累到有害程度, 造成细胞复苏后完整性被破坏, 导致其活力降低甚至死亡。本文的研究结果显示, 经过长期冻存后 2 种昆虫细胞冻后活性均有明显降低, 所以, 定期复苏检测细胞活力并及时回冻以保持较高的细胞活力对昆虫细胞系资源的长期保存非常必要。

为防止细胞在冷冻和复苏过程中发生胀裂死亡, 冻存时必须使用保护剂以确保降温时细胞内外压保持一致, 降低细胞脱水皱缩程度和速度, 并在复苏时缓解由于渗透性肿胀而引起的损伤。甘油和 DMSO 均为渗透型保护剂, 在降温时它们能够保持细胞内外压, 降低细胞脱水皱缩程度和速度, 而在复

苏时能够缓解由于渗透性肿胀而引起的细胞损伤^[10]。通过本文对比研究发现,作为 2 种昆虫细胞长期冻存的保护剂,DMSO 的效果明显好于甘油。Rasul 等^[11]在牛精子的冻存研究中针对甘油和 DMSO 进行了类似的比较试验获得类似结果,分析认为,虽然 DMSO 的毒性高于甘油,但其渗透力比甘油强,能最大限度地降低因复苏升温引起的细胞内外渗透压失衡,避免了细胞形态皱缩和死亡。FBS 是冻存保护液中常用的添加成分,根据不同的细胞种类,适量添加 FBS 对于保持细胞冻后生物学特性有一定作用^[12],如张占英等^[7]使用 90% FBS + 10% DMSO 对脐血造血干细胞进行低温保存效果较好。本文使用相同配方的冻存保护液进行了类似的比较发现,高浓度 FBS/DMSO 和常规 DMSO 对 NIH-Sa-Pe-4 冻后活性的影响不显著,但对于 SL2 的冻后活性影响较明显,说明不同种类来源细胞对冻存保护液成分的需求有所不同。

参考文献:

- [1] 宋德伟, 马 艳, 冯 颖, 等. 昆虫细胞工程研究进展[J]. 林业科学研究, 2004,17(1):116-124
- [2] Maramorosch K, McIntosh A H. Arthropod Cell Culture System [M]. Boca Raton: CRC Press, 1994
- [3] Agathos S N. Production Scale Insect Cell Culture[J]. Biotechnology Advances, 1991,9(1):51-68
- [4] 布冠好, 李宏基, 杨国宇, 等. 抗菌肽的作用特点及应用前景[J]. 动物医学进展, 2005,26(3):30-32
- [5] Imanishi S. Use of Insect Cultured Cells[J]. Farming Japan, 1996, 30(2):34-36
- [6] 张占英, 张澜生, 朱寿彭. 脐血造血干细胞的分离和冻存方法研究[J]. 中国核科技报告, 1999(00):406-419
- [7] Schneider I. Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Embryology & Experimental Morphology, 1972,27(2):353-365
- [8] Takahashi M, Mitsuhashi J, Ohtaki T. Establishment of A Cell Line From Embryonic Tissues of the Fleshfly, *Sarcophaga Peregrina* (INSECTA: DIPTERA) [J]. Development Growth & Differentiation, 1980,22(1):11-19
- [9] 徐 磊, 赵 晏, 张 鹏, 等. 液氮保存对人同种瓣组织代谢及活性的影响[J]. 西安医科大学学报, 2002,23(1):40-43
- [10] 李广武, 郑从义, 唐 兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998
- [11] Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. Antagonist Effect of DMSO on the Cryo-protection Ability of Glycerol During Cryopreservation on Buffalo Sperm[J]. Theriogenology, 2007,68(5):813-822
- [12] Marco-Jiménez F, Garzón D L, Peñaranda D S, et al. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) Spermatozoa: Effect of Dilution Ratio, Foetal Bovine Serum Supplementation, and Cryoprotectants[J]. Cryobiology, 2006,53(1):51-57