

保护剂和冻存时间对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后活性的影响

马艳 丁伟峰 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, 昆明 650224)

摘要 本文分别使用3种不同配方的冻存保护液对甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)5龄幼虫脂肪体细胞系 NIAS-MaBr-85 进行液氮低温冷冻保存,并在第1、3、9、17、20、28、38个月时检测细胞活力和圆度的变化情况,以评估不同冷冻保护剂和冻存时间对细胞活性的影响。研究发现,NIAS-MaBr-85 细胞的冻后活性随着冻存时间的延长而降低。短期冻存时,3种冻存保护液对 NIAS-MaBr-85 的冻后活性影响不明显,在长期冻存条件下,以10% DMSO 作为冻存保护剂的细胞冻后活力和圆度变化幅度明显小于以10%甘油为保护剂冻存的细胞。使用胎牛血清(FBS)替代培养基进行细胞冻存,对保持细胞冻后活性稳定的作用十分有限。因此,10% DMSO是长期冻存 NIAS-MaBr-85 细胞的优良冻存保护剂。通过对不同冻存时间的细胞活性比较发现,虽然冻存时间的长短对于细胞冻后活力和圆度变化有显著影响,但在昆虫细胞的长期低温保存过程中,冻存保护剂的差异是影响冻后细胞生物学活性的主要因素。

关键词 冷冻保护剂; 冻存时间; 昆虫细胞; 细胞活力

使用液氮进行深低温冷藏是长期保存细胞样品的一种有效方法^[1]。目前,关于细胞低温保存方面的研究多以哺乳动物细胞为研究对象,而针对昆虫细胞系冻存方面的研究报道相对较少。作为现代生物学上极有价值的研究模型之一,昆虫细胞被广泛的应用于医学、农业,以及生物学的各个领域。在农林业,利用昆虫细胞系进行新型生物杀虫剂的研究已成为农药研究的新方向^[2]。在基因工程领域,昆虫细胞杆状病毒表达系统由于具有安全性高,对外源基因克隆容量大,可高效表达外源基因等特点而倍受青睐^[3]。与此同时,已报道的昆虫细胞系仅有500个^[4],可用于研究和利用的细胞系数量更少,如何长期有效地保存这些珍贵的细胞资源已成为迫切需要解决的问题。

国内外针对细胞材料的超低温冻存的研究主要集中在冻存保护剂、降温速率、保存温度,以及复苏速率等方面^[5-7]。其中,筛选适合的冻存保护剂并配制合适的保护液对低温保存至关重要,也是目前研究最多的内容之一^[8]。常用于细胞冻存的保护剂主要有渗透型的甘油和二甲基亚砜(DMSO),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。但是,单独使用抗冻剂并不能满足细胞冻存所要求,通常还需要与培养基按照一定比例混

合制成保存液^[1,9]。此外,在冻存保护液中添加一定比例的胎牛血清(FBS)已成为哺乳动物细胞冻存的常规做法^[10],如张占英等^[11]使用90% FBS+10% DMSO对脐血造血干细胞进行低温保存。相比较而言,国内外针对昆虫细胞系冻存的相关研究报道较少,已有的研究主要涉及冷冻速率对昆虫细胞复苏效果和冻存细胞的简便方法等^[12-14],还未见系统研究昆虫细胞长期冷冻保存活力变化的报道。

甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)是一种杂食性农业害虫,危害多种农作物、蔬菜、水果等,其5龄幼虫脂肪体细胞系 NIAS-MaBr-85 在上世纪80年代建立^[5],可用于生物农药研究和其他基础生物学研究,是一种具有利用价值的细胞资源。为了有效保存 NIAS-MaBr-85 细胞系,本文分别采用3种不同配方的细胞冻存保护液对甘蓝夜蛾昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 进行了长期深度冷冻保存,并对冻后细胞活性特征进行分析和检测,以评估不同冷冻保护剂和冻存时间长短对其细胞活力和圆度的影响,以期能为 NIAS-MaBr-85 和其他昆虫细胞系的有效长期保存和应用提供科学基础。

收稿日期: 2009-11-13 接受日期: 2010-01-08

林业公益性行业科研专项(4-38)和国家林业局948项目(2002-52)资助

* 通讯作者。Tel: 0871-3860020, E-mail: yingf@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 供试细胞系

甘蓝夜蛾 5 龄幼虫脂肪体细胞系 NIAS-MaBr-85, 使用 MM 培养基添加 5% FBS (HyClone 南美胎牛血清) 于 25 °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/ml 左右, 并检测细胞相关生物学特性作为初始对照(control)。

1.2.2 细胞冻存液的制备 按照以下配方分别制备 3 组冻存保护液。

配方(formula) 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 °C/min 的速率降温至 0 °C, 再以 1 °C/min 的速率降温至 -50 °C, 最后转入液氮中保存。

1.3 冻后细胞活性检测

分别在冻存后 1、3、9、17、20、28 及 38 个月后, 从 3 组细胞中各取 2 管于 27 °C 水浴中解冻, 使用 Beckman 公司 Vi-CELL 细胞活力分析仪对细胞相关生物学特性指标进行检测, 其原理是利用台盼蓝(Trypan Blue)染色法区分活死细胞, 并由分析软件完成相关指标的统计分析。系统对每个样品抽样 100 次, 经过分析后获得活细胞数(viable cells count)、死细胞数(unviable cells count)、细胞活力(viability), 以及细胞圆度(circularity)等特征量。

1.4 数据分析

使用 SPSS 对获取的数据进行分析。不同保护剂配方和冻存时间对冻后细胞活力的影响使用 χ^2 独立性检验进行分析, 对冻后细胞平均圆度的影响使用多因素方差分析进行评估。

2 结果

在 38 个月长期冻存过程中, 分别在不同时期进行了 7 次抽样检测, 获得了昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 不同冻存期的冻后的相关细胞生物学特征量(表 1)。

2.1 冻存保护液对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后细胞活力的影响

由表 1 可见, 使用不同保护液冻存的细胞经过长期保存活力变化明显。其中, 使用 90% FBS+10% DMSO 作为保护液的细胞, 其冻后活力下降幅度最小, 经过 28 个月低温保存后其活力仍保持在 90% 以上。使用配方 II 冻存的细胞经过 28 个月长期冻存, 细胞活力可保持在 80% 以上。甘油作为冻存保护剂在最初的 9 个月其效果较好, 细胞冻后活力保持在 80% 以上, 但长期冻存后的细胞活力下降幅度大, 在第 28 个月冻后活力已下降至 40% 左右, 保护效果较差。

用 χ^2 独立性检验分别对 7 个时间段的 3 种不同配方保护液的效果进行检验(表 2)。结果显示, 使用配方 I 冻存的细胞与使用配方 II 相比, 在经过 1、3、9 以及第 38 个月的冻存后, 其细胞活力没有显著差异 ($P>0.01$)。但在第 17、20 以及 28 个月时, 使用配方 I 冻存的细胞其冻后活力极显著高于使用配方 II 冻存的细胞 ($P<0.01$)。对配方 I 与 III 的效果进行比较发现, 除第 1 个月没有显著差异之外, 使用配方 I 冻存的细胞其复苏后活力均极显著地高于使用配方 III

Table 1 Post-thaw biological characteristic of insect cell line NIAS-MaBr-85

Months	Formula I			Formula II			Formula III		
	Viable cells	Viability	Average circularity ¹	Viable cells	Viability	Average circularity	Viable cells	Viability	Average circularity
Control	3 215	96.72%	0.86±0.026	3 215	96.72%	0.86±0.026	3 215	96.72%	0.86±0.026
1	620	82.89%	0.83±0.082	504	83.58%	0.83±0.088	477	83.39%	0.76±0.11
3	440	95.24%	0.85±0.116	408	94.01%	0.85±0.114	272	86.35%	0.82±0.123
9	978	87.09%	0.85±0.049	790	83.07%	0.85±0.058	632	81.03%	0.85±0.059
17	966	91.56%	0.85±0.054	804	82.89%	0.84±0.06	545	76.87%	0.86±0.055
20	694	80.32%	0.86±0.057	595	66.11%	0.83±0.07	294	44.75%	0.83±0.078
28	872	93.26%	0.87±0.043	640	87.55%	0.86±0.058	108	40.75%	0.79±0.143
38	259	78.48%	0.82±0.12	228	86.69%	0.87±0.069	37	54.41%	0.75±0.192

¹Average circularity=Mean±Std. Dev., n=100

Table 2 Chi-Square tests of viability between 3 cryoprotectants¹

Months	Formula I with II		Formula I with III			Formula II with III		
	Value χ^2	Asymp. Sig. (2-sided)	Value χ^2	Asymp. Sig. (2-sided)		Value χ^2	Asymp. Sig. (2-sided)	
1	0.071	0.790	0.028	0.867		0.000	0.993	
3	0.446	0.504	18.163	0.000	*	11.906	0.001	*
9	6.293	0.012	12.526	0.000	*	1.086	0.297	
17	33.787	0.000	73.344	0.000	*	9.016	0.003	*
20	44.537	0.000	205.941	0.000	*	69.878	0.000	*
28	15.275	0.000	376.716	0.000	*	225.275	0.000	*
38	6.168	0.013	15.903	0.000	*	33.275	0.000	*

¹df=1, using Continuity Correction; *P<0.01.

冻存的细胞。配方 II 与 III 比较结果显示, 除第 1 和 9 个月之外, 使用配方 II 冻存的细胞其冻后活力均极显著高于使用配方 III 冻存的细胞。

结果表明, 3 种不同配方的冻存保护液对保持昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后活力的效果显著不同。其中, 使用 DMSO 作为保护剂(配方 I 和 II)冻存的细胞其复苏后活力变化幅度较小, 且能够维持较高水平。使用甘油(配方 III)的细胞在冻存 9 个月内, 冻后活力变化不大, 但随着冻存时间的延长, 活力下降较为明显。

2.2 冻存时间对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后细胞活力的影响

采用 χ^2 检验对经过不同时期冻存的细胞活力进行比较(表 3)。由于 3 组结果中有效样本数 n 均大于 40, 且所有检验单元格期望值 T 均大于 5, 因此选择 Pearson 卡方检验。结果可见, 无论使用 3 种配方中的任何一种冻存保护液对细胞进行超低温冻存, 其冻存时间的长短对细胞冻后活力均有显著影响。比较 3 组 Pearson 卡方值的大小可见, 冻存时间长短对使用配方 I 冻存的细胞活力影响最小, 而对使用配方 III 冻存的细胞影响最大, 对配方 II 冻存的细胞影响效果居中。

由冻后活力变化曲线(图 1)可直观看出, 不同冻存时期的细胞活力波动明显, 总体呈下降趋势, 其中 DMSO 作为保护剂的细胞活力波动较规律, 而使用甘油冻存的细胞在 1 至 17 个月中其冻后活力下降幅度在 10% 左右, 但之后其活力骤然下降, 曲线变化非常明显。可见, 在冻存时间和保存温度相同的情况下, 使用不同的冻存保护剂对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后活力变化有显著影响, 在长期冻存条件下, 冻存保护剂的差异是影响其冻后细胞活力的主要因素。

2.3 冻存保护液和冻存时间对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后细胞圆度的影响

Table 3 Chi-square tests of viability between different periods¹

Formula	Pearson χ^2	n	T_{min}	Asymp. Sig. (2-sided)	
I	149.825	5 517	41.15	0.000	*
II	215.823	4 852	47.86	0.000	*
III	467.539	3 366	20.22	0.000	*

¹df=6, 0 cells (0%) have expected count less than 5, using Pearson chi-square; *P<0.05.

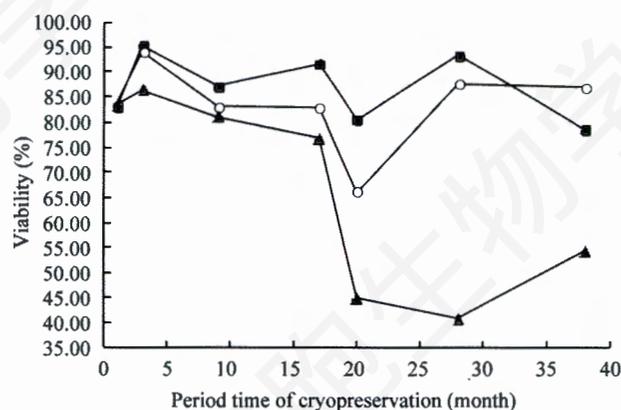


Fig.1 Variation curve of viability between different periods

●: Formula I; ○: Formula II; ▲: Formula III.

细胞圆度是用来定量描述细胞表面圆润程度的特征量, 其取值范围在 0 到 1 之间, 值越小说明细胞皱缩越明显。以各个时间段检测的样本圆度数据为依据, 使用多因素的方差分析获得以下结果(表 4)。

通过齐性检查得到 $F(23, 2304) = 29.448$, $\text{Sig.} = 0.000$, 且各个组样本总体方差是齐性的, 满足方差检验的前提条件。由表 4 结果可知, 不同冻存保护液配方以及冻存时间长短对冻后细胞圆度有显著影响。进一步对不同配方的影响进行多重比较(表 5)后发现, 采用 LSD 和 Tukey 两种方法检验的结果是一致的: 配方 I 和 II 对冻后细胞圆度的影响极明显小于配方 III。

通过细胞冻后圆度变化曲线(图 2)可以清楚地看

Table 4 Tests of between-subjects effects of circularity

Source	Type III sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	2.027 ^a	23	0.088	12.574	0.000
Intercept	1 600.049	1	1 600.049	228 299.604	0.000
Formula	0.602	2	0.301	42.956	0.000
Months	0.740	7	0.106	15.088	0.000
Formula×Months	0.884	14	0.063	9.007	0.000
Error	16.148	2 304	0.007		
Total	1 659.787	2 328			
Corrected total	18.175	2 327			

^aR squared=0.112 (Adjusted R squared=0.103).

Table 5 Multiple comparisons of circularity between 3 cryoprotectants of insect cell line NIAS-MaBr-85¹

Formulae	Methods	Means±Std. Error
I	LSD and	0.8487±0.7664 ^A
II		0.8500±0.7309 ^A
III	Tukey HSD	0.8189±0.1093 ^B

¹Based on observed means; the error term is mean square (error) =0.007; the different superscript letter, A and B, showed the mean difference is significant at the 0.01 level.

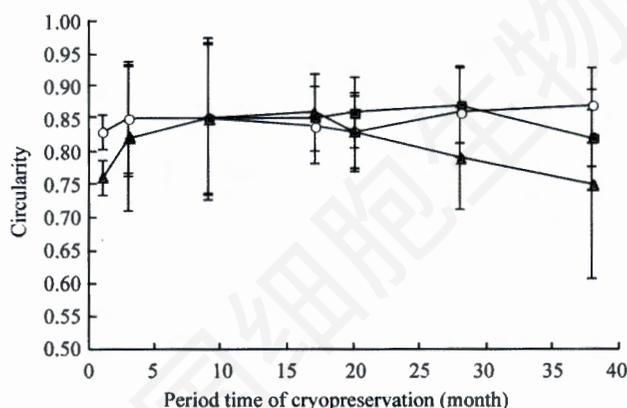


Fig.2 Variation curve of circularity between different periods

●: Formula I; ○: Formula II; ▲: Formula III.

出不同冻存保护剂和时间对冻后细胞圆度的影响。其中,使用DMSO作为保护剂的细胞冻后圆度波动较小,而使用甘油冻存的细胞经过长期保存,圆度下降较为明显。对照上述活力变化曲线发现,圆度的变化规律与其具有一致性。可见冻存保护剂的差异也是影响复苏后细胞圆度变化的主要因素。

综上所述,不同保护剂配方和冻存时间长短对昆虫细胞系NIAS-MaBr-85冻后生物学特性均有明显影响,在长期冻存中,保护剂的差异是影响细胞冻存活性的主要因素。

3 讨论

经过长期观测表明,使用10% DMSO作为保护剂长期冷冻保存昆虫细胞系NIAS-MaBr-85效果较好,而甘油作为短期保护剂效果较好但不适于长期冻存。研究也发现,使用FBS完全替代培养基进行冻存,对保持细胞冻后生物学特性稳定的作用十分有限。

甘油是最早用于细胞低温保存的冻存保护剂,早在1949年Polge等^[16]使用甘油作为保护剂进行动物精子的低温冻存试验并获得了成功。之后甘油、DMSO等保护剂被广泛应用于多种细胞的低温保存。通过本文对比研究发现,甘油与DMSO作为昆虫细胞系NIAS-MaBr-85的冻存保护剂其效果差异明显。此外,Rasul等^[17]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,结果表明,虽然DMSO的毒性高于甘油但其保护效果优于甘油,分析其原因是由于甘油的渗透力较DMSO弱,当进行复苏操作时会引起细胞内外渗透压失衡,导致细胞形态皱缩并裂解死亡。

目前,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℃液氮中保存的生物样品,其代谢活动非常微弱并接近停止,使其生物学活性得以保持,从而达到长期保存的目的。但是,从本文的研究结果可见,经过长期冻存的细胞,其复苏后的活力仍有明显损失,说明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,导致其死亡使活力降低。

FBS是慢速低温冻存中常用的保护液添加成分,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。针对冻存中FBS使用量的研究也时有报道,如张占英等^[10]使用90% FBS+

10% DMSO 对脐血造血干细胞进行低温保存, 并认为其效果最好。本文使用相同配方的冻存保护液(配方 I)进行了类似的比较发现, 高浓度 FBS/DMSO 和常规 DMSO 对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后活性的影响差异不显著, 而 FBS 的价格昂贵, 因此不宜作为 NIAS-MaBr-85 细胞的大规模冻存。

参考文献(References)

- 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998; 57-9.
- 程东美, 张志祥, 胡美英, 徐汉虹. 昆虫细胞在杀虫剂研究上的应用. 世界农药 2002; 24(4): 28-30.
- 宋德伟, 马艳, 冯颖, 陈晓鸣. 昆虫细胞工程研究进展. 林业科学研究 2004; 17(1): 116-24.
- Lynn DE. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001; 37(6): 319-21.
- Katkov II. Introduction to the field of cryobiology and overview of selected papers. *Int J Refrigeration* 2006; 29(3): 341-5.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48(2): 146-56.
- 杨琼霞, 张绍志, 俞雅芳, 胡军祥. 动物组织细胞玻璃化冻存方法的研究进展. 科技通报 2007; 23(2): 202-6.
- Elmoazzen HY, Elliott JA, McGann LE. Cryoprotectant equilibration in tissues. *Cryobiology* 2005; 51(1): 85-91.
- Mitsuhashi J. *Invertebrate tissue culture methods*. Tokyo: Springer-Verlag, 2002; 421-34.
- Marco-Jiménez F, Garzón DL, Peñarandab DS, Perez L, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, *et al*. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. *Cryobiology* 2006; 53(1): 51-7.
- 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. 中国核科技报告 1999; (00): 406-13.
- 黎路林, 陈曲侯. 一种贮存昆虫细胞系的简便方法. 华中师范大学学报(自然科学版) 1995; 29(4): 511-2.
- 金立杰, 薛伟钢, 张士安. 有效冻存昆虫细胞的新方法. 生物技术 1996; 6(3): 40.
- 汪小瑛, 王美爱, 吴冰珊, 沈晓娜. 不同冷冻速率冻存 C6/36 细胞复苏效果比较. 海峡预防医学杂志 2006; 12(5): 37-8.
- Mitsuhashi J. Establishment and some characteristics of a continuous cell line derived from fat bodies of the cabbage armyworm (Lepidoptera, Noctuidae). *Dev Growth Differ* 1981; 23(1): 63-72.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164(4172): 666.
- Rasul Z, Ahmed N, Anzar M. Antagonist effect of DMSO on the Cryo-protection ability of glycerol during cryopreservation on buffalo sperm. *Theriogenology* 2007; 68(5): 813-9.

Effects of Cryoprotectants and Durations of Cryopreservation on Post-thaw Cytoactive of Insect Cell Line NIAS-MaBr-85

Yan Ma, Wei-Feng Ding, Ying Feng*, Xin Zhang, Tao Ma

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

Abstract In order to evaluate the effects of different cryoprotectants and durations on post-thaw cytoactive of insect cell line NIAS-MaBr-85, 3 kinds of cryoprotectants (Formula I: 10% DMSO + 90% FBS; Formula II: 10% DMSO; Formula III: 10% glycerol) were used to preserve cells in liquid nitrogen. The post-thaw viability and circularity of cells were examined at 1, 3, 9, 17, 20, 28, and 38 months separately. The results showed that the post-thaw viability of cells decreased with the time of cryopreservation expended. In short-term cryopreservation, the effects of different cryoprotectants on post-thaw cytoactive of NIAS-MaBr-85 were not significant. In long-term cryopreservation, the effect of preservation of 10% DMSO was better than that of 10% glycerol. The effect of supplement of 90% FBS on preserving the post-thaw biological characteristics of cells was not obvious. Comparing the influence of the length of cryopreserved time, different cryoprotectants had a statistically significant influence on the post-thaw biological characteristics of NIAS-MaBr-85 cells.

Key words cryoprotectant; cryopreserving duration; insect cells; cell viability

Received: November 13, 2009 Accepted: January 8, 2010

This work was supported by the Special Research Fund for Non-Profit Trade of Forestry (4-38) and "948" Program of State Forestry Administration (2002-52)

* Corresponding author. Tel: 86-871-3860020, E-mail: yingf@hotmail.com