

研究简报

γ -聚谷氨酸在细胞冻存中的作用

陈焕芸, 应丹妮, 蔡海波*, 谭文松

(华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 无 DMSO、无血清细胞冻存液在临床级细胞产品的冷冻保存中具有重要的应用价值。本文以 K562 细胞为模型, 设置含 10% (v/v) DMSO 及胎牛血清的冻存液为阳性对照, 含 10% (v/v) 甘油的 RPMI 1640 培养基冻存液为阴性对照组, 含 10% (v/v) 甘油及 0.01% (w/v) γ -PGA 的 RPMI 1640 培养基冻存液为实验组, 考察了在无 DMSO、无血清细胞冻存体系中 γ -聚谷氨酸对细胞的冷冻保护作用。将 K562 细胞以 1×10^6 cells/mL 的密度分别悬浮在上述冻存液中, 置于液氮冻存 10 周, 检测复苏后 K562 的细胞复苏率、细胞形态以及复苏后细胞的扩增情况, 以评判 γ -聚谷氨酸在无 DMSO 无血清冻存液中对 K562 细胞的冷冻保护作用。结果显示, 实验组的细胞复苏率为 $(83.00 \pm 3.00)\%$, 明显高于阴性对照组的 $(70.33 \pm 5.51)\%$ ($p < 0.05$) 和阳性对照组的 $(71.00 \pm 2.65)\%$ ($p < 0.05$); 且实验组冻存后的细胞形态完整, 冻存前后细胞的平均直径及圆度基本一致, 细胞复苏后培养 24h 后的细胞活性为 $(88.83 \pm 14.29)\%$, 明显高于阴性对照组的 $(67.51 \pm 5.20)\%$ ($p < 0.05$), 与阳性对照组的 $(78.75 \pm 3.31)\%$ 没有显著性差异, 同时复苏后细胞扩增的延滞期明显缩短。可见, 在无 DMSO、无血清的甘油冻存体系中添加 γ -PGA 可显著提高细胞的冻存效果, 具有良好的实际应用价值。

关键词: 低温保存; 聚谷氨酸; 无 DMSO 细胞冻存液; 无血清细胞冻存液

尽管冷冻保存技术在基础研究和临床研究中都被广泛运用, 但仍存在一些局限性。传统的细胞冻存液是使用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)和培养基按照一定的比例进行混合配制而成的。其中, DMSO 对多种细胞具有毒性^[1~3], 临床使用会导致一系列的副作用, 如恶心、头痛、呕吐、休克等^[4,5]; 而 FBS 作为一种动物源性成份, 有较高的病毒、霉菌和支原体等污染的风险以及较大的批次差异。因此, 在细胞治疗得到了越来越多关注和应用的今天, 对于用于临床治疗的细胞保存应该尽量避免 DMSO 和血清的使用, 以一种更安全的冷冻保护剂予以替换。

目前的研究都试图用其它物质代替细胞冻存液中的 DMSO 和血清, 也取得了一些进展, 具体涉及的物质有甘油^[6]、海藻糖^[7,8]、海藻酸钠^[9]、羟乙基淀粉^[10]、小麦蛋白^[11,12]、依克多因^[13]、葡聚糖^[14,15]等。其中, 甘油是一种渗透型冷冻保护剂, 可以提高细胞膜对水的通透性, 减少细胞内冰晶的形成, 从而减少由于冰晶形成造成的细胞损伤。

聚- γ 谷氨酸(γ -Polyglutamic acid, γ -PGA)是一种天然聚合物, 它具有多种生物化学特性, 能够根据生物体及其环境发挥不同的作用来保护生物体免受外界伤害^[16]。Yokoigawa 等^[17]发现 γ -PGA 可以提高面包酵母菌的冷冻耐受性。然而, 目前 γ -PGA 对细胞的冷冻保护作用还待探索。

为了提高临床用细胞冷冻保护剂的安全性, 本文以 K562 细胞为研究对象, 探究了 γ -PGA 在无 DMSO、无血清冻存液中对细胞的冷冻保护作用。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.04.004

收稿: 2019-08-26; 修回: 2020-03-05;

作者简介: 陈焕芸(1994-), 女, 广东汕头人, 研究生, 从事生物化工方面的研究。Tel: +86 15800867726; E-mail: huanyun_chen@outlook.com;

* 通讯联系人: 蔡海波, Tel: +86-021-6425-1962; E-mail: caihaibo@ecust.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 材料

K562 人慢性髓原白血病细胞为实验室保存细胞株;RPMI 1640 培养基 (Gibco);FBS (Biosun);DMSO(Sigma);甘油(aladdin); γ -PGA(上海源叶生物科技有限公司);微丝绿色荧光探针、微管红色荧光探针、免疫荧光染色二抗稀释液、免疫染色洗涤液、免疫染色固定液、抗荧光淬灭封片液、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

本文中采用 3 种冻存液,分别为:含有 DMSO 及血清的冻存液(Dc),其配方为含有 10% (v/v) DMSO 的胎牛血清(FBS); 不含有 DMSO 及血清的冻存液(Df),其配方为含 10% (v/v) 甘油的 RPMI 1640 培养基;含有 γ -PGA 的冻存液(Df+ γ -PGA),其配方为含有 10% (v/v) 甘油、0.01% (w/v) γ -PGA 的 RPMI 1640 培养基。

1.2 方法

1.2.1 细胞冻存 取对数生长期的细胞,1500r/min 离心 5min,弃去上清液后用冻存液进行重悬,然后以 1×10^6 cells/mL 的密度接入 1.5mL 的冻存管中,每管 1mL,4℃下保存 30min,-20℃保存 2h 后转移到-80℃冰箱中,隔夜后放入液氮冻存 10 周。

1.2.2 细胞复苏 将细胞冻存管从液氮中取出,然后置于 37℃水浴锅中进行晃动使其快速解冻,将细胞悬液吸到预先装有 10mL 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基的离心管中,1500r/min 离心 5min 后,弃去上清液,再加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基进行重悬后用于检测或培养。

1.2.3 细胞复苏率、细胞活性检测 取刚复苏的、离心重悬后的细胞 50 μ L 于 1.5mL EP 管中,稀释一定倍数后加入等体积的台盼蓝染料进行染色,随后在光学显微镜下统计死、活细胞数。

细胞复苏率(%)=复苏后的活细胞总数/冻存前的活细胞总数 $\times$ 100%

细胞活性(%)=活细胞数/总细胞数 $\times$ 100%

1.2.4 细胞直径、圆度测量 细胞直径和细胞圆度均采用 countstar 智能细胞分析仪测量获取。

1.2.5 细胞生长曲线测定 将细胞以 1.5×10^4 cells/mL 的密度接种于 48 孔板,置于 5% CO₂、37℃培养箱中培养。每两天进行半量换液。每 1~2 天在固定时间取样进行台盼蓝染色计数,绘制细胞的生长曲线。

1.2.6 细胞骨架染色 取目标细胞 2×10^6 个,用 PBS 洗涤 2 次,然后用固定液重悬,将细胞密度调到 1×10^6 cells/mL。随后,将细胞悬液滴到载玻片上,置于 4℃冰箱中固定过夜。第二天用洗涤液清洗载玻片,将微丝绿色荧光探针、微管红色荧光探针和免疫荧光染色二抗稀释液以 1 : 1.3 : 100 的比例配制成染色工作液。将工作液滴到载玻片上,并在载玻片染色盒底部加水,置于室温孵育 45min,然后用洗涤液清洗载玻片,在载玻片自然干燥后使用封片液进行封片,使用荧光显微镜观察细胞骨架。

1.2.7 细胞凋亡与坏死检测 采用碧云天公司的 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行凋亡与坏死检测。取目标细胞 4×10^5 个,1000g 离心 5min 后弃去上清液。加入 390 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,随后加入 10 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀,然后加入 20 μ L 碘化丙啶染色液,轻轻混匀。室温(20~25℃)避光孵育 10~20min 后用流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学分析

用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。 $p<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 冻存后细胞复苏率及细胞活性

图 1(a)为采用 Dc、Df 和 Df+ γ -PGA 冻存液冻存了 10 周的 K562 细胞复苏后的复苏率。Df+ γ -

PGA 组的复苏率为 $(83.00 \pm 3.00)\%$,明显高于 Dc 组的 $(71.00 \pm 2.65)\%$ 和 Df 组的 $(70.33 \pm 5.51)\%$ ($p < 0.05$)。鉴于 Df+ γ -PGA 和 Df 冻存液中只相差添加了 0.01% (w/v) γ -PGA,说明 γ -PGA 的加入显著提高了冻存细胞的复苏率。

图 1(b)、(c)分别为采用 Dc、Df 和 Df+ γ -PGA 冻存液冻存了 10 周的 K562 细胞复苏后的即时活性和复苏后培养 24h 后的活性,从中可以看出 3 组细胞复苏后的即时活性并无显著性差异,均在 90%以上。然而,在扩增 24h 后 Df+ γ -PGA 组的活性为 $(88.83 \pm 14.29)\%$,与 Dc 组的 $(78.75 \pm 3.31)\%$ 无显著性差异,但明显高于 Df 组的 $(67.51 \pm 5.20)\%$ ($p < 0.05$)。由此可见,在冻存液中添加 0.01% (w/v) γ -PGA 有助于维持细胞在培养过程中的细胞活性,可以避免出现细胞在初解冻时活性高而培养 24h 内活性下跌的现象。

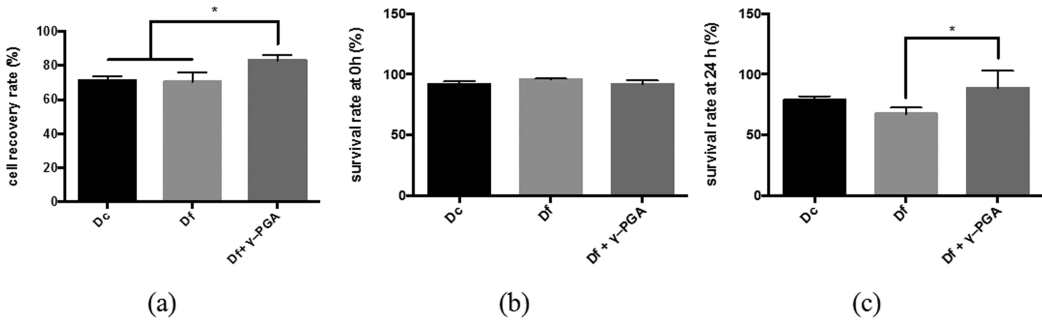


图 1 冻存 10 周后 K562 细胞复苏率及活性(n=3)

(a) K562 细胞的复苏率;(b) 复苏后 K562 细胞的即时活性;(c) 复苏后 K562 细胞培养 24h 后的活性
Figure 1 Recovery rate and survival rate of K562 cells after 10 weeks of cryopreservation (n=3)
(a) Recovery rate of K562 cells; (b) Immediate survival rate of K562 cells after resuscitation;
(c) Survival rate of K562 cells cultured for 24h after resuscitation(Mean±SD,n=3,* $P < 0.05$)

2.2 冻存对细胞形态的影响

将在 3 种冻存液中冻存了 10 周的 K562 细胞复苏后,立即置于显微镜下观察其形态的变化,并按照 1.2.4 所述的方法测量了细胞直径和细胞圆度,结果分别如图 2、图 3 所示。从图 2 中可以看出,采用 Dc 冻存的 K562 细胞复苏后形态较紊乱,大小不一(见图 2a);Df 冻存的 K562 细胞出现了“细胞空泡”现象(见图 2b),个别细胞的细胞膜膨胀变大(如白色箭头所示);而采用 Df+ γ -PGA 冻存的 K562 细胞形态较为均一,呈类圆形(见图 2c)。

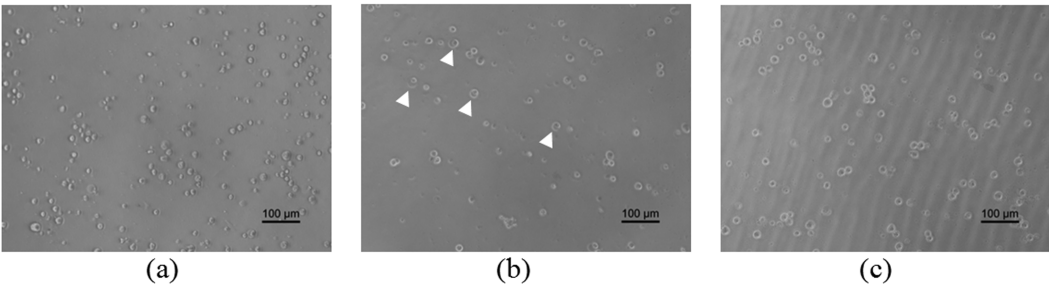


图 2 冻存 10 周后 K562 细胞形态
(a)Dc 组;(b)Df 组;(c)Df+ γ -PGA 组

Figure 2 K562 cell morphology after 10 weeks of cryopreservation
(a) Dc group; (b) Df group; (c) Df+ γ -PGA group

从图 3 中可以看出,与冻存前相比,Dc 组细胞的平均直径显著变小,Df 组细胞的平均直径显著变大,而 Df+ γ -PGA 组细胞的平均直径未发生显著性变化(见图 3a);Dc 组和 Df 组的细胞平均圆度均显著下

降,而 Df+ γ -PGA 组细胞的平均圆度未发生显著性变化(见图 3b)。由此可见, γ -PGA 可以起到维持细胞形态的效果。当 γ -PGA 作为冷冻保护剂冻干双歧杆菌时,会在双歧杆菌表面形成一层薄膜^[18],推测 γ -PGA 在冻存的 K562 细胞表面可能也会形成类似的薄膜结构来保护细胞。

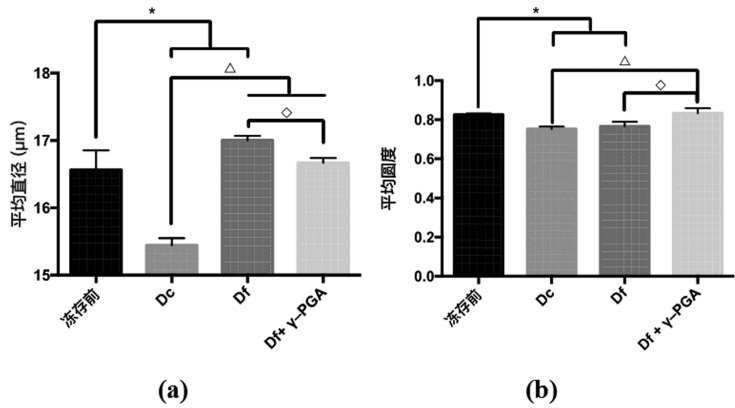


图 3 冻存前后的细胞平均直径、平均圆度变化(n=3)

(a)冻存前后的细胞平均直径变化;(b)冻存前后的细胞平均圆度变化

(*, Δ 、 $\diamond$ 分别表示与冻存前、Dc 组、Df 组相比存在统计学差异, $P<0.05$)

Figure 3 Average diameter and mean circularity of cells before and after cryopreservation(n=3)

(a) Mean cell diameter; (b) mean cell roundness

(Mean $\pm$ SD,n=3, *, Δ , $\diamond$ respectively showed statistical difference compared with pre-freezing, Dc group, Df group, $P<0.05$)

2.3 冻存对细胞骨架的影响

采用 1.2.6 所述方法,对冻存复苏后细胞进行细胞骨架染色观察,结果如图 4 所示。Dc 组和 Df+ γ -PGA 组的细胞骨架状态相近,细胞的微丝和微管均保持了其基本形态。而在相同的细胞数量和染色条件下,Df 组的细胞骨架发出的荧光非常黯淡,虽然勉强可以看出其微丝形态,但微管却只剩下一些碎片,细胞骨架受损严重。由此可见,在 Df 细胞冻存液中添加 γ -PGA 可以有效维持细胞骨架的完整性。 γ -PGA 分子链上有大量的游离羧基,氨基和羰基官能团,在 γ -PGA 链之间还存在大量氢键,因此 γ -PGA 具有极强的亲水性。推测, γ -PGA 在维持细胞膜完整性的同时,因为其具有很强的亲水性,可以有效地帮助胞内的水分流出,减少细胞内冰晶的形成,从而维护细胞的内部结构。

2.4 细胞的早期凋亡与细胞坏死

采用 1.2.7 所述方法,对冻存前后的 K562 细胞进行凋亡与坏死分析,结果如图 5 所示,其中 Annexin V-FITC 阳性代表着细胞凋亡,PI 阳性代表着细胞坏死。由图 5 可见,冻存并不会引起 K562 细胞的凋亡,而是会导致由于细胞膜破损而引发的细胞坏死现象。冻存后 Dc 组的坏死细胞比例为 $(23.10\pm3.84)\%$,与 Df 组的 $(31.07\pm3.55)\%$ 相近,没有显著性差异。而加入了 γ -PGA 的 Df+ γ -PGA 组的坏死细胞比例仅为 $(14.36\pm5.27)\%$,显著低于 Df 组。由此可见, γ -PGA 的加入可显著降低冷冻保存对细胞膜的损伤(见图 6)。

2.5 冻存复苏后细胞的扩增

采用 1.2.5 中所示方法检测冻存复苏后细胞的扩增能力,结果如图 7 所示,可以看出 Df+ γ -PGA 组的细胞复苏后再培养需要经过 4d 的延滞期后进入快速生长期,远低于 Dc、Df、组的 9 和 12d;细胞从 1.5×10^4 个扩增到 1×10^6 个所需时间为 9d,也远少于 Dc、Df 组的 16 和 21d。可见,Df+ γ -PGA 冻存的细胞保持了更好的扩增能力。甘油作为一种渗透型冷冻保护剂,虽然其具有良好的促渗特性,但其对细胞的冷冻保护效果不如 DMSO,而具有超强亲水性的 γ -PGA 的加入可以进一步地帮助细胞排出水分,从而

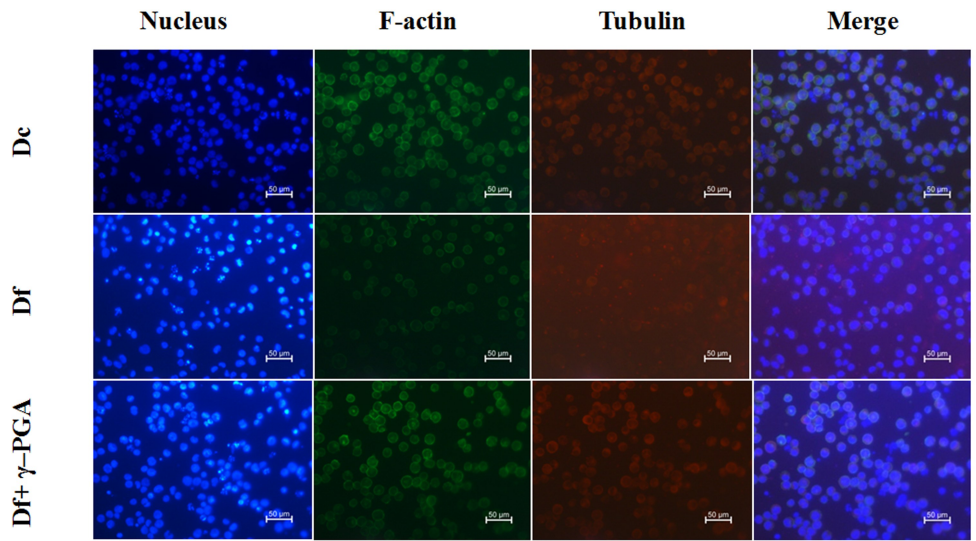


图 4 细胞骨架
细胞核(蓝色)、微丝(绿色)、微管(红色)
Figure 4 Cell skeleton
Nucleus (blue), F-actin (green), Tubulin (red)

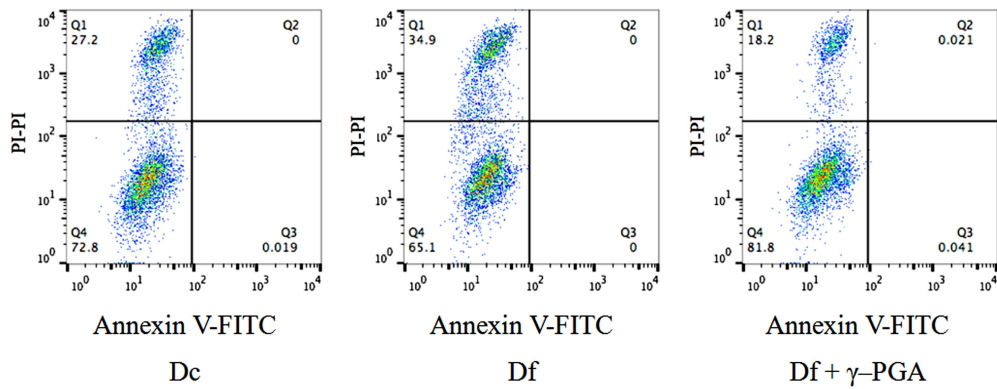


图 5 流式细胞仪检测 K562 细胞的坏死与凋亡情况示意图
Figure 5 Flow cytometry results of the necrosis and apoptosis of K562 cells

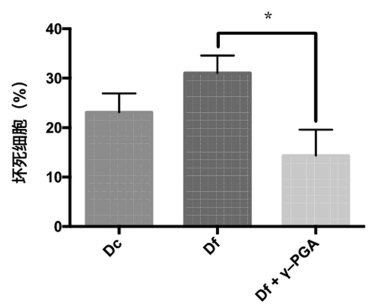


图 6 冻存前后 K562 细胞的坏死比例(n=3)
Figure 6 The proportion of necrosis cells before and after cryopreservation (n=3)
(Mean±SD,n=3,* $P<0.05$)

有效地弥补甘油的不足。

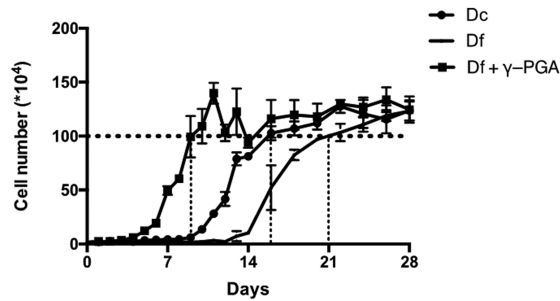


图 7 细胞生长曲线 (n=3)
Figure 7 Cell growth curve (n=3)

3 结论

本文以 K562 细胞为模型,研究了在无 DMSO、无血清的甘油冻存液中添加 γ -PGA 的冻存效果,细胞冻存 10 周后,仍可保持良好的细胞形态与完整的细胞骨架,细胞复苏率以及复苏后培养 24h 后的细胞活性分别可达到 $(83.00 \pm 3.00)\%$ 和 $(88.83 \pm 14.29)\%$,且复苏后再培养时可快速进入细胞对数生长期,有利于细胞的规模化制备。总之,本文获得了一款性具有良好应用前景、性能优于目前通用的含 DMSO 及血清的细胞冻存液的无 DMSO 无血清细胞冻存液。

参考文献:

[1] Zhang C, Deng Y, Dai H, Zhou W, Tian J, Bing G, Zhao L. Brain Res Bull, 2017, 128:34~39.

[2] Li X, Wang Y K, Song Z Q, Du Z Q, Yang C X. PLoS One, 2016, 11(6):e0158074.

[3] Yi X, Liu M, Luo Q, Zhuo H, Cao H, Wang J, Han Y. FEBS Open Bio, 2017, 7(4):485~494.

[4] Fry L J, Querol S, Gomez S G, McArdle S, Rees R, Madrigal J A. Vox Sang, 2015, 109(2):181~190.

[5] Cox M A, Kastrop J, HrubisKo M. Cell Tissue Bank, 2012, 13(2):203~215.

[6] Su C, Allum A J, Aizawa Y, Kato T A. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476(4):359~364.

[7] Dovgan B, Barlic A, KnezEvic M, Miklavčič D. J Membr Biol, 2017, 250(1):1~9.

[8] Wen Y Z, Su B X, Lyu S S, Hide G, Lun Z R, Lai D H. Acta Trop, 2016, 164:297~302.

[9] Mohanty S, Wu Y, Chakraborty N, Mohanty P, Ghosh G. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 65:269~277.

[10] Naaldijk Y, Johnson A A, Friedrich A, Stolzing A. BMC Biotechnol, 2016, 16(1):85.

[11] Chow-Shi-Yée M, Grondin M, Averill-Bates D A, Ouellet F. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(7):1511~1521.

[12] Averill-Bates D, Grondin M, Chow-shi-yée M, Ouellet F. Cryobiology, 2016, 73(3):420.

[13] Ray S S, Pramanik K, Sarangi S K, Jain N. Biotechnol Lett, 2016, 38(8):1397~1404.

[14] Wang X, Xu H. Cryobiology, 2010, 61(3): 345~351.

[15] Halberstadt M, Böhne M, Athmann S, Hagenah M. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(12):5110~5115.

[16] Candela T, Fouet A. Mol Microbiol, 2006, 60(5):1091~1098.

[17] Yokoigawa K, Sato M, Soda K. J Biosci Bioeng, 2006, 102(3):215~219.

[18] Bhat A R, Irorere V U, Bartlett T, Hill D, Kedia G, Morris M R, Charalampopoulos D, Radecka I. AMB Express, 2013, 3(1): 36.

Cryoprotective Effect of γ -Polyglutamic Acid on Cells

CHEN Huan-yun, YING Dan-ni, CAI Hai-bo*, TAN Wen-song

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology,
Shanghai 200237, China)

Abstract: DMSO-free and Serum-free cell freezing medium has important application value in the cryopreservation of clinical grade cell products. In this paper, K562 cells were used as model cells to explore the cryoprotective effect of γ -PGA on cells in a DMSO-free and Serum-free system. The RPMI 1640 medium with glycerol content of 10% (v/v) was set as the negative control group, the fetal bovine serum with DMSO content of 10% (v/v) was set as the positive control group, the RPMI 1640 medium with glycerol content of 10% (v/v) and γ -PGA content of 0.01% (w/v) was set as the experimental group. K562 cells were suspended in the above cell freezing medium at a density of 1×10^6 cells/mL and placed in liquid nitrogen for 10 weeks. After resuscitation, cell recovery rate, cell morphology, and cell expansion ability of K562 were detected to analyze the cryoprotective effect of γ -polyglutamic acid on K562 cells in DMSO-Free and Serum-Free cell freezing medium. The results showed that the cell recovery rate of the experimental group was $(83.00 \pm 3.00)\%$, which was significantly higher than that of the negative control group $(70.33 \pm 5.51)\%$ ($p < 0.05$) and the positive control group $(71.00 \pm 2.65)\%$ ($p < 0.05$); the morphology of the cells in the experimental group was intact after freezing, the average diameter and roundness of cells were basically the same before and after freezing; the cell viability after culture for 24 h after resuscitation was $(88.83 \pm 14.29)\%$, which was significantly higher than that of the negative control group $(67.51 \pm 5.20)\%$ ($p < 0.05$), and was not significantly different from the $(78.75 \pm 3.31)\%$ of the positive control group; the lag phase in cell expansion after resuscitation was significantly shortened. It can be seen that the addition of γ -PGA to the glycerol cryopreservation system without DMSO and serum can significantly improve the cryopreservation effect of cells, and has good practical application value.

Key words: Cryopreservation; γ -Polyglutamic acid; DMSO-free cell freezing medium; Serum-free cell freezing medium