

文章编号:1001-1498(2012)01-0006-05

密度对黑腹果蝇胚细胞系 L-2/M delta 2-3 冻存效果的影响

丁伟峰, 冯颖*, 张欣, 李娴

(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: 使用双翅目昆虫黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster* Fallen) 胚细胞系 L-2/M delta 2-3 作为研究材料, 制备 10 个密度试验组 ($0.81 \times 10^6 \sim 2.88 \times 10^7$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 每组跨度大于 2.00×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 分别在冻后第 6、10、14 个月对各组细胞冻后活力、回复时间长短、以及生长状况进行观察和比较, 研究密度因素对细胞系 L-2/M delta 2-3 长期冻存效果的影响。结果表明: 冻存密度对细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力和状态恢复均有显著影响 ($P < 0.05$)。细胞冻后活力下降速率随冻存密度增高而减慢, 复苏后细胞状态恢复所需时间较短。将 L-2/M delta 2-3 的冻存密度提高至 1.3×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 以上有利于细胞活力的保持与冻后的恢复。

关键词: 冻存密度; 冻存时间; 昆虫细胞; 细胞活力

中图分类号: S789

文献标识码: A

Cryopreservation of Cell Line L-2/M delta 2-3 from Embryo of *Drosophila melanogaster*: The Effects of Cell Density on the Cytoactive

DING Wen-feng, FENG Ying, ZHANG Xin, LI Xian

(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 cell density on post-thaw cytoactives (including cell viability, recovery time, etc.) of insect cell line L-2/M delta 2-3 from embryo of *Drosophila melanogaster* Fallen, 10 test groups with different cell density (from 0.81×10^6 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ to 2.88×10^7 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$, the density span of each group was more than 2.00×10^6 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$) were prepared as the cryopreserved cultures preserved in liquid nitrogen separately during 14 months. The results showed that the post-thaw viability of each test group decreased with the cryopreservation time expended. The rate of post-thaw viability decline decreased with the cell density of cryopreserved cultures increased. Cultures frozen at above 1.3×10^7 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ could obtain a better effect of cryopreservation.

Key words: cell density; cryopreserving duration; insect cells; cell viability

昆虫细胞系是现代生物学研究极有价值的模型之一, 被广泛应用于医学、农林业以及生物学的各个领域, 在昆虫生理学、生物化学、媒介昆虫行为、化学药物和生物杀虫剂毒力测定; 抗癌药物的研究; 病毒、微孢子虫生物杀虫剂研究等许多方面得到应

用^[1-2]。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。

液氮低温保存是细胞系长期保存的重要手段。通常认为, 影响细胞系深低温保存效果的主要因素有冻存保护剂种类, 冻存速率, 冻存密度等^[3]。前期

收稿日期: 2011-09-12

基金项目: 林业公益性行业科研专项(4-38)

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

* 通讯作者: yingf@hotmail.com

对几种昆虫细胞系长期冻存效果的研究发现,冻存保护剂和冻存时间长短是影响这些细胞系冻存效果的重要因素,细胞冻后活力随冻存时间的增长而逐渐降低,不同种类来源的细胞系对保护剂的选择也存在差异^[4-5]。而冻存密度对昆虫细胞系的长期保存是否有影响,目前还没有相关报道。

有关冻存密度对细胞系冻存效果影响的相关报道很少,现有的研究对象主要为哺乳动物细胞系、生殖细胞、植物细胞,以及藻类细胞等,结果发现,密度因素对不同来源细胞的冻后生物学活性均有影响,但影响效果各有不同^[6-10]。可见,弄清密度因素对细胞冻存效果的影响是非常有必要的。为了研究密度对昆虫细胞系长期冻存的影响,本文使用模式昆虫黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster* Fallen)胚细胞系 L-2/M delta 2-3^[11]作为研究材料,通过观察和检测冻后细胞活力及恢复状况,比较不同密度对细胞系冻存效果的影响,为昆虫细胞系长期有效冻存提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试细胞系

L-2/M delta 2-3:使用 Schneider 培养基添加 10% FBS (HyClone 南美胎牛血清)于 25 ℃ 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,通过培养基稀释和离心调节其密度,制成 10 个密度梯度试验组,冻前分别检测初始细胞活性。

1.2.2 细胞冻存液制备 使用 10% DMSO 作为冻存保护剂,加入 10 组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 ℃ · min⁻¹的速率降温至 0 ℃,再以 1 ℃ · min⁻¹的速率降温至 -50 ℃,最后转入液氮中保存。

1.3 冻后细胞活性检测

分别在 6、10、14 个月等 3 个不同时期对 10 组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细胞密度、细胞活力(活细胞数占总细胞数的百分比)等特征量,其原理是利用台盼蓝(Trypan Blue)染色法区分活死细胞,并由软件完成相关指标的统计分析。根据获得的细胞活力值计算各试验组不同时期的活力下降速率,其公式为:细胞活力下降率 = 初始活力 - 冻后活力。

1.4 细胞的复苏培养

将复苏后的细胞液转移至 25 cm² 细胞培养瓶(BD Falcon 细胞培养瓶 T-25),添加适量培养基,避光 25 ℃ 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情况。

1.5 数据分析

使用 SPSS 对获取的数据进行分析,Excel 绘制图表。

2 结果与分析

分别在冻后 6、10、14 个月时抽样检测,获得黑腹果蝇细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力值(表 1)。细胞冻存密度从 0.81 × 10⁶ 个 · mL⁻¹ 开始逐渐递增,第 10 组递增至 2.88 × 10⁷ 个 · mL⁻¹,相邻组之间跨度在 2.00 × 10⁶ 个 · mL⁻¹ 以上,对应的冻后细胞活力变化能够反映各组之间的差异。由表 1 结果可见,不同密度试验组细胞均随冻存时间的延长活力降低。

表 1 细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力

编号	冻存密度/ (× 10 ⁶ 个 · mL ⁻¹)	冻后细胞活力/%			
		初始	6 个月	10 个月	14 个月
1	0.81 ± 0.02	85.97 ± 1.83	73.97 ± 7.01	72.00 ± 4.84	68.73 ± 1.70
2	3.53 ± 0.17	80.70 ± 2.40	77.20 ± 0.83	72.45 ± 3.11	63.21 ± 3.81
3	5.74 ± 0.12	85.65 ± 1.00	83.98 ± 3.04	82.89 ± 1.63	69.86 ± 0.82
4	8.34 ± 0.04	89.22 ± 0.18	86.13 ± 1.34	81.31 ± 1.62	69.60 ± 0.97
5	10.39 ± 0.06	95.34 ± 0.37	89.25 ± 1.07	89.20 ± 0.47	79.29 ± 0.43
6	12.74 ± 0.18	94.05 ± 0.21	87.50 ± 0.77	84.43 ± 2.04	79.79 ± 0.30
7	13.94 ± 0.20	94.53 ± 0.65	92.36 ± 0.52	88.58 ± 0.02	85.66 ± 1.65
8	17.70 ± 0.14	95.50 ± 0.10	92.50 ± 0.00	87.91 ± 1.23	79.92 ± 1.92
9	19.12 ± 0.22	97.07 ± 0.03	93.83 ± 0.08	92.85 ± 1.19	88.36 ± 0.50
10	28.75 ± 0.24	86.25 ± 1.11	85.90 ± 1.40	76.37 ± 1.70	69.70 ± 1.50

注:细胞活力 = (活细胞密度/总细胞密度) × 100%。

为了消除各组初始细胞活力大小不同对分析结果的影响,本文采用活力下降率作为统计分析的对象(表2),活力下降率数值越大说明冻后细胞活力下降幅度越大。从表2结果同样可以看出,冻存时

间越长,每组对应的细胞冻后活力下降率越大,说明时间长短对昆虫细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力有影响。同时,各密度组之间,不同时间段细胞活力下降幅度也各不相同。

表2 细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力下降率

编号	冻后细胞活力下降率/%			
	6个月	10个月	14个月	平均
1	12.01 ± 7.01	13.98 ± 4.84	17.25 ± 1.70	14.41 ± 4.55 a
2	3.50 ± 0.83	8.25 ± 3.11	17.50 ± 3.81	9.75 ± 6.75 b
3	1.67 ± 3.04	2.77 ± 1.63	15.79 ± 0.82	6.74 ± 7.20 c
4	3.12 ± 1.89	7.95 ± 2.28	19.64 ± 1.36	10.23 ± 7.74 b
5	6.09 ± 1.07	6.15 ± 0.47	16.06 ± 0.43	9.43 ± 5.16 b
6	6.56 ± 0.77	9.63 ± 2.04	14.26 ± 0.30	10.15 ± 3.61 b
7	2.17 ± 0.52	5.96 ± 0.02	8.87 ± 1.65	5.67 ± 3.10 c
8	3.00 ± 0.00	7.59 ± 1.23	15.58 ± 1.92	8.72 ± 5.78 b
9	3.24 ± 0.08	11.87 ± 2.98	8.72 ± 0.50	7.94 ± 4.13 b
10	0.35 ± 1.40	9.88 ± 1.70	16.55 ± 1.50	8.93 ± 7.38 b

注:平均为每组6、10、14个月细胞冻后活力下降率的平均值;a、b、c标示各组LSD多重比较结果,其中不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

采用方差分析对不同冻存密度和复苏时间的细胞活力下降率进行比较(表3),分析冻存密度和冻存时间2个因素对细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力的影响力大小。由线性回归的负相关系数 $R^2 = 0.921$,说明冻后细胞活力与冻存密度和时间这2个

因素存在显著的线性相关关系;根据不同冻存密度和时间,以及2个因素交互效应的显著性概率(Sig.)均小于0.05,可得出冻存密度、冻存时间长短,以及二者的交互效应都对细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后细胞活力下降有显著影响。

表3 细胞活力下降率主效应方差分析

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F	Sig.
矫正模型	1 805.717 *	29	62.266	12.094	0.000
截距	5 074.169	1	5 074.169	985.540	0.000
不同冻存密度	299.219	9	33.247	6.457	0.000
不同冻存时间	1 196.265	2	598.133	116.173	0.000
不同冻存密度 × 不同冻存时间	310.233	18	17.235	3.348	0.002
误差	154.459	30	5.149		
总计	7 034.345	60			
矫正总计	1 960.176	59			

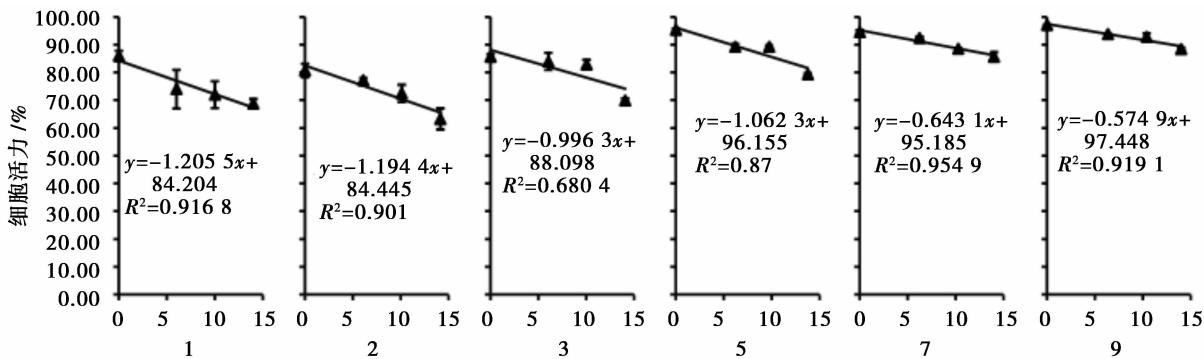
* $R^2 = 0.921$ (Adjusted $R^2 = 0.845$)。

在方差分析的基础上,选择密度作为比较因子,使用LSD多重比较以判断各密度组间活力下降率的显著性差异(比较结果已标示在表2平均活力下降率数值上)。结果可见,在这10个密度梯度组中,1~3组两两之间均有显著差异,4~6组之间差异不显著,第7组与前后两组均有显著差异,8~10组之间又无显著差异。由此可划分出6个影响细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力的密度区间。为了确定这6个区间对细胞系冻后活力影响大小程度,以表1

中所列细胞活力值为基础,分别绘制第1、2、3、5(4~6组选取中间组5)、7、9(8~10组中选取中间组9)组活力变化的线性趋势线(见图1),获得各组直线斜率分别为 -1.2055 ($R^2 = 0.9168$)、 -1.1944 ($R^2 = 0.901$)、 -0.9963 ($R^2 = 0.6804$)、 -1.0623 ($R^2 = 0.87$)、 -0.6431 ($R^2 = 0.9549$)、以及 -0.5749 ($R^2 = 0.9191$)。其中,冻存密度较高的第7和9组的斜率值明显小于其他4个试验组,说明提高冻存密度对于保持细胞系 L-2/M delta

2-3 冻后活力具有积极作用。由此可见,在细胞系 L-2/M delta 2-3 长达 1 年半左右的冻存中,将细胞

密度提高至 1.3×10^7 个 \cdot mL⁻¹ 以上时,其冻后活力损失最小。

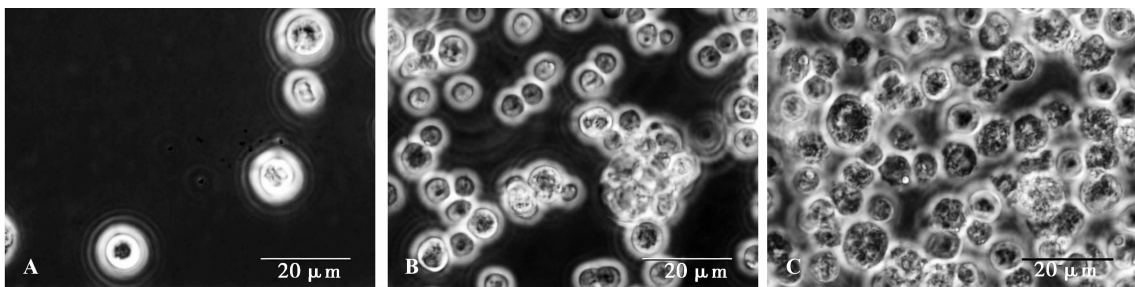


图下 1~9 编号表示对应的各密度分组,各图纵坐标比例及代表数值均相同,横坐标为冻存时间,单位为月。

图 1 细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力变化趋势线

对各组不同时期复苏的 L-2/M delta 2-3 细胞系进行培养和观察,比较冻存密度对细胞冻后恢复状况的影响。发现相对低密度试验组(1~5 组)在冻后第 6 和 10 个月复苏并培养 72 h 后,活力可达到 85.76%~94.51% 之间,在第 14 个月复苏的细胞,活力恢复至相同水平所需时间延长至 96 h 左右。高密度试验组(6~10 组)在冻后第 6、10,以及 14 个月复苏并培养 48 h 后活力达到 86.20%~96.12%,恢复所需时间少于低密度试验组,而细胞

密度明显高于前者,培养 72 h 后已达到传代的密度要求。对冻后细胞形态进行显微观察(图 2)发现,各组复苏后的细胞均有部分出现表面皱缩情况,但细胞形态保持完整无破裂碎片,培养 48 h 后细胞形态即可恢复冻前状态,各组之间在形态上的变化差异不明显。由此可见,对于细胞系 L-2/M delta 2-3 来说,在相同的复苏及培养条件下,细胞复苏密度越高,状态恢复所需时间越少。提高冻存密度有利于加快昆虫细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后恢复进程。



A 为第 1 试验组细胞在冻后 14 个月复苏当天拍摄的照片,B 为培养 1 周后形态照片,

C 为第 10 试验组细胞在冻后 14 个月复苏当天的形态照片。

图 2 细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后显微形态(400 倍)

3 结论与讨论

对 10 个不同密度的黑腹果蝇胚细胞系 L-2/M delta 2-3 冻后活力变化及恢复状态进行的研究与观察结果表明:冻存密度对 L-2/M delta 2-3 冻后活力和状态恢复均有显著影响,随着冻存时间的增长,采用不同密度冻存的细胞系其冻后活性均逐渐下降;细胞冻后活力下降速率随冻存密度增高而减慢,复

苏后细胞状态恢复所需时间较短。在实际应用中,通过离心将 L-2/M delta 2-3 的冻存密度提高到 1.3×10^7 个 \cdot mL⁻¹ 以上有利于细胞活力的保持与冻后的恢复。

通常认为密度达到 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹ 以上可满足多数生物样品的低温保存要求^[12],本文在设定的 10 个密度测试范围内所获得的结果也证实提高冻存密度有利于加速细胞冻后状态恢复进程。但并非所有来源的生物细胞或组织都符合这一结论。Jens

I. Find 等^[6]使用欧洲云杉(*Picea abies*)和西加云杉(*Picea sitchensis*)胚细胞悬液作为研究材料,发现冻存密度过高或过低均不利于冻后胚发育。沈华萍^[7]对脐血造血干细胞冷冻复苏过程的研究结果认为,当冻存密度高于某一阈值后细胞冻后回收率、活性等生物学特性指标呈下降趋势。针对莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的冻存研究发现冻存密度越高其冻后活力越低恢复所需时间越长^[9]。由此可见,冻存材料自身的生物学及生理生化特性是决定冻存密度高低的重要因素。

细胞在生长繁殖过程中需要消耗培养液中各种营养物质,同时释放大量代谢产物,包括能促进细胞生长的因子以及抑制细胞分裂甚至引起细胞凋亡的物质^[12]。复苏后为了修复由于低温所造成的损伤,细胞器会加快代谢过程,消耗更多营养物质并产生大量次生代谢物。当细胞密度过低时,胞间依赖生长促进作用减弱,细胞增殖缓慢导致恢复期延长且不易存活;密度过高时,会引起营养物质过度消耗有害物质过量积累,造成细胞生长受限^[13]。因此,最适密度范围实际为细胞冻后相互促进和抑制作用的平衡域,密度过高或过低会打破细胞间这种平衡作用,从而影响复苏效果。可见,研究不同细胞系的最适冻存密度对于提高冻存质量,节省复苏时间和成本十分必要。

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] 张 欣,冯 颖,丁伟峰,等. 常用农药对5种昆虫细胞系的毒力测定及分析[J]. 林业科学,2011,47(4): 182-189
- [3] 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
- [4] 丁伟峰,马 艳,冯 颖,等. 长期冻存对昆虫细胞系 SL2 和 NIH-SaPe-4 活性的影响[J]. 林业科学研究,2010,23(5): 666-670
- [5] 马 艳,丁伟峰,冯 颖,等. 保护剂和冻存时间对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后活性的影响[J]. 中国细胞生物学学报,2010,32(1): 154-158
- [6] Jens I F, Michel M H K, Jens V N, et al. Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway Spruce and Sitka spruce[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 53(1): 27-33
- [7] 沈华萍. 脐血造血干细胞冷冻复苏过程研究与评价[D]. 上海:华东理工大学,2003: 48-52
- [8] 杨银芬,考桂兰,侯先志,等. 不同细胞密度冻存对奶牛乳腺上皮细胞的影响[J]. 中国细胞生物学学报,2004,17(1): 116-124
- [9] Brian P P, Kenneth R D, Jerry J B. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density[J]. Cryobiology, 2009, 58(1): 103-109
- [10] 郭海平,郭冠萍,郝 鹏. BHK21 细胞冻存密度与复苏后活力的关系分析[J]. 畜牧与饲料科学,2010,31(3): 6-7
- [11] Paul D K, Rhonda F D, Donald C R. Drosophila P element transposase recognizes internal P element DNA sequences[J]. Cell, 1989, 59(2): 359-371
- [12] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2001
- [13] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:北京出版社,2001