

• 实验研究 •

不同冻存保护剂对外周血单个核细胞的影响

王桂喜¹ 董磊² 李春红²

(1 铜陵市中心血站,安徽 铜陵 244000; 2 安徽医科大学 过敏与免疫研究中心及免疫学教研室)

摘要:目的 观察不同冻存保护剂对外周血单个核细胞(PBMC)冻存后生物学特性的影响。方法 新鲜血液分离和液氮冻存后 1、7、30 d 用 MTT法检测单个核细胞活性,同时用酶联免疫吸附法(ELISA)检测冻存后其在脂多糖(LPS)和刀豆蛋白(ConA)刺激下分泌 γ 干扰素($IFN-\gamma$),比较 DMSO 10% + FBS 90%、DMSO 10% + Dextran-40 10% + FBS 80%、DMSO 10% + HES 6% + FBS 84%、FBS不同冻存保护剂对 PBMC的保护作用。结果 不同低温保护剂冻存对 PBMC存活率的影响:二甲亚砜(DMSO) + 小牛血清(FBS); DMSO + FBS + 右旋糖苷-40(Dextran-40); DMSO + 羟已基淀粉(HES) + FBS; FBS分别为 65.3 ± 2.5 、 79.7 ± 1.5 、 71 ± 2.6 、 29.7 ± 0.58 ; 30 d细胞增殖活性的影响(OD值)分别为 0.21 ± 0.19 、 0.28 ± 0.15 、 0.23 ± 0.13 、 0.10 ± 0.17 。冻存的 PBMC对 LPS刺激产生 $IFN-\gamma$ 的量不同,而对 ConA 刺激产生 $IFN-\gamma$ 量的变化不明显。结论 DMSO + FBS + Dextran-40联合使用是一种较理想的外周血单个核细胞低温保护方法,并对其生物学特性产生一定影响。

关键词: 外周血单个核细胞;低温冻存;;冻存保护剂

中图分类号: R457.1⁺2 R331.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2010)05-0384-03

近年来对脐血干细胞、骨髓干细胞冷冻保存的研究颇多,而对外周血单个核细胞(PBMC)冷冻保存的研究较少。对于细胞冻存研究的经典理论认为,深低温(-196℃)能抑制细胞内酶的活性,细胞代谢十分缓慢,甚至停止,从而避免细胞遗传性状的改变^[1]。但冷冻产生冰晶将造成细胞内损伤,主要因素有冷冻速度、融解速度及冷冻保护剂种类。前两者受到工艺条件限制,短期无法取得较大进展。因此,冷冻保护剂的选择成了决定冷冻效果的最关键因素。我们通过冷冻技术对 PBMC冷冻保存,探讨不同冻存剂保护下外周血单个核细胞的存活率以及生物学特性(分泌 $IFN-\gamma$ 的量)的变化,从而评价 4种冻存剂的不同组合对外周血单个核细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 1)标本:取自安徽铜陵市中心血站无偿献血者血液,二甲亚砜(DMSO, Sigma公司),羟已基淀粉(HES Dupont公司),右旋糖酐-40(Dextran-40, Baxter公司),MTT试剂盒(Dupont公司), $IFN-\gamma$ 试剂盒(上海森雄科技实业公司)、RPM 11640培养液(GIBCO BRL公司),脂多糖(LPS)(华美公司),Ficoll分离液(Cedarlane公司),水平离心机,细

胞计数盘, anthos h²酶标仪。2)保护剂: 1组: DMSO(10%) + FBS(90%), 2组: DMSO(10%) + Dextran-40(10%) + FBS(80%), 3组: DMSO(10%) + HES(6%) + FBS(84%), 4组: FBS。

1.2 PBMC的分离 将新鲜采集的无偿献血者的血液 4℃垂直离心,把含有少量血浆和红细胞的白膜层(buffy coat)用压浆板挤入四联血袋的备用袋内,然后把白膜层按 1:2用 PBS稀释后慢慢贴壁加入到 Ficoll分离液中分离 PBMC。

1.3 PBMC的计数 用 RPM 11640培养液稀释分离的 PBMC,通过计数调节浓度使其为 2×10^6 个 /ml

1.4 PBMC冻存 分别取 PBMC悬液 1 ml离心去除 RPM 11640培养液,分别加入 1 ml冻存保护剂,放入无菌冻存管中,每组冻存 160支,然后将无菌冻存管快速放入 -80℃冰柜中,24 h后转入液氮罐,然后于 1、7、30 d每种随机抽取 3支进行台盼蓝试验和 MTT试验,随机抽取 2支进行生物学功能研究。

1.5 冻存细胞试验 分别取含有 4种冻存剂的上述冻存管 3支,放入 37℃蒸馏水大烧杯中快速解冻,洗涤后加入到 8 ml含有 10%小牛血清的 RPM 11640培养液中,置饱和湿度、5% CO₂培养箱 37℃培养 24 h后,离心去除 RPM 11640培养

液,分别加入 5 ml含有 10%小牛血清 RPM I1640培养液,与未冻存的 PBMC同时做下述试验:1)台盼蓝试验:计数 200个细胞的拒染率。2)MTT试验^[2]:计算细胞存活率。3)INF- γ 的测定:把 PBMC悬液各取 3 ml放入细胞培养板中,置饱和湿度、5% CO₂培养箱 37℃培养 24 h后,在培养液中分别加入 LPS(终浓度为 0.625 μ g/ml)和 ConA(终浓度为 0.1 μ g/ml)^[3],同时设溶媒对照,再在饱和湿度、5% CO₂培养箱 37℃培养 48 h后,收集上清液,根据试剂盒说明书绘制标准曲线检测其 INF- γ 的含量。

1.6 统计方法 采用区间组差异性比较采用方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冻存剂对 PBMC存活率的影响 DMSO +Dextran-40 +FBS保护剂保存的 PBMC的存活率较高,在单独 FBS冻存的情况下 PBMC的存活较低。同一种保护剂在不同时间对 PBMC存活率的影响无统计学意义,见表 1。

2.2 4种冻存剂对 PBMC增殖活性的影响 为了进一步证实不同低温保护剂对 PBMC存活的影响,我们做了 MTT试验。通过对 3个不同时间段比较无统计学意义。因此认为不同时间段对细胞存活率没有影响。结果发现 DMSO +Dextran-40 +FBS保护剂吸光值较高(表 2),该结果提示 DMSO +Dextran-40 +FBS保存的细胞活性较高,而以单独 FBS保存效果较差。

表 1 不同冻存保护剂在不同时间 对 PBMC存活的影响 (%)				
	DMSO +FBS	DMSO +Dextran-40 +FBS	DMSO +HES +FBS	FBS
1 d	65.2±1.4	81.3±3.2	73.6±1.8	30.2±0.9
7 d	68.1±2.1	80.2±1.9	70.2±3.2	29.6±1.2
30 d	62.7±2.0	77.7±2.7	69.5±1.7	29.4±0.8

注:不同保护剂比较 F=522.46, P<0.01

表 2 不同冻存保护剂对 PBMC在不同时间 对细胞增殖活性的影响 (OD值)				
	DMSO +FBS	DMSO +Dextran-40 FBS	DMSO +HES +FBS	FBS
1 d(n=3)	0.22±0.015	0.28±0.016	0.23±0.016	0.11±0.020
7 d(n=3)	0.23±0.013	0.27±0.021	0.24±0.011	0.10±0.019
30 d(n=3)	0.21±0.019	0.28±0.015	0.23±0.013	0.10±0.017

注:新鲜分离血液细胞增殖活性为 0.32±0.012,不同保护剂 F=329.3, P<0.01,不同时间比较 P>0.05

2.3 冻存保护剂对 PBMC功能的影响 LPS刺激后,新鲜和冻存的 PBMC分泌 INF- γ 的量都明增加,冻存的 PBMC分泌量(除保护剂 4)均超过新鲜分离的 PBMC。PBMC对 0.1 μ g/ml ConA 刺激反应不明显,虽然新鲜和冻存 PBMC分泌 INF- γ 的量都增加,但增量都不及 LPS刺激增量。同样,不同冻存时间对 ConA 的刺激效果也不明显,对 2组(DMSO +Dextran-40 +FBS)保护剂冻存的细胞,ConA 刺激的 INF- γ 量明显高于其它组。结果见表 3。

表 3 新鲜血液及 4组保护剂下 PBMC在不同刺激剂作用后分泌 INF- γ 的结果 ($\bar{x}\pm s$ pg/ml)									
	未刺激			LPS			ConA		
	1 d	7 d	30 d	1 d	7 d	30 d	1 d	7 d	30 d
1组 (n=15)	0.37±0.05	0.34±0.04	0.39±0.05	121±17	128±13	124±16	7.0±0.8	6.4±0.8	7.3±1.0
2组 (n=15)	0.46±0.05	0.47±0.05	0.43±0.05	152±16	143±17	157±20	11.4±1.4	14.6±1.3	13.8±1.5
3组 (n=15)	0.36±0.04	0.36±0.05	0.38±0.05	121±16	133±14	131±14	7.1±0.9	8.0±1.0	7.6±1.0
4组 (n=15)	0.16±0.02	0.15±0.02	0.16±0.02	41±6	55±7	50±7	3.6±0.5	3.8±0.6	4.0±0.5

注:新鲜分离血液细胞分泌 INF- γ 未刺激 0.6±0.050, LPS 84±10, ConA23±2.0,不同保护剂:未刺激 F=124.69, P<0.01, LPS F=178.37, P<0.01, ConA F=66.43, P<0.01

3 讨论

PBMC在人体中含量丰富,在人体生命活动中起着重要作用。目前它的长期保存为深低温冻存(-196℃),冻存剂以 DMSO为主,然后加 FBS或人血清(HAS)。本实验组采用在 DMSO的基础上加其它保护剂,通过对 4种冻存剂冻存后 PBMC生物学特性的比较,证实了 DMSO +Dextran-40 +FBS为 4种深低温冻存 PBMC中最佳保护剂,与陈汝光等^[4]报道的冻存脐血造血干细胞的条件一致。保存时间在 1个月内,细胞存活率可达 78%。Dextran-40为无色无味的白色粉末,小分子物质,易溶于水,微溶于酒精。在细胞冻存保护上 DMSO起主要作用,Dextran-40可能协助 DMSO渗透到有核细胞中,降低胞内冰晶对细胞的损害,具体机理不详,亦未见相关报道,有待进一步研究。

细胞冻存后对其生物学特性的影响,许多学者很早就进行了探讨。Kleeberger等^[5]对 PBMC进行 12年深低温冻存

研究后指出, PBMC冻存 12年后仍可进行细胞免疫表型分析和抗病毒研究,细胞活性不低于 90%。Sleaman等^[6]以 DMSO +FCS为冻存剂对 PBMC研究发现, PBMC长期冻存后仍能稳定表达不同抗原,细胞存活率>95%,可以进行传染病、移植、癌症和其它慢性病治疗。Weinberg等^[7]研究认为, PBMC功能与其存活率呈相关性,要求细胞活性>70%。Ausello等^[8]对 48个月大小的孩子的 PBMC进行百日咳抗原应答研究表明,新鲜和冰冻的 PBMC没有明显的区别。

Kleeberger等^[5]指出, PBMC总体是脆弱的,在冻存和溶解过程中的粗糙处理可破坏 PBMC的功能。其实细胞冻存后,由于表面超微结构的变化以及酶冻存溶解后构型可能发生一些变化,或者冷冻过程使某些对冷冻敏感的 T淋巴细胞(主要是抑制性 T淋巴细胞即 CD8⁺细胞)功能不可逆地丧失,而其它亚型的免疫活性细胞功能相对增强,产生大量的白细胞介素和细胞因子,因此对外来刺激因子的应答也可能发生微妙变化。本实验组仅对 LPS和 ConA进行试验,研

究发现:培养冻存后的 PBMC在 LPS刺激下比新鲜分离 PBMC同样条件下的产出 IFN- γ 高;但对于 ConA 刺激则不太明显,可能由于刺激浓度不足或本身 PBMC冻存后对 ConA 不敏感,有待与进一步探讨。Sleasman等^[6]对 3个健康人的 PBMC用 PHA作刺激剂研究认为,PHA对冻存 PBMC的增殖影响小。

总之,由于各个实验室条件、检测人员水平、处理方式以及检测 PBMC表面分子或因子不同,得出结果不尽一致。DMSO渗透到细胞内,对细胞的结构和酶的功能有一定的损伤,因此联合保护剂应为 PBMC有效冰冻保存的方向,减少单一成分的副作用。使 DMSO既能发挥其保护细胞的作用,又能降低其细胞毒性作用。徐振波等^[1]从南极鱼类研究发现的抗冻蛋白对细胞冻存研究开辟了新领域,在低温冻存中能非连续地降低液体冰点,这将成为冻存剂研究的热点。

参 考 文 献

[1] 徐振波,李彦媚.新型冷冻保护剂在细胞低温冻存中的选择.制冷,2004,23(4):19-24.
[2] 莉霞,侯青青.细胞活性测定方法研究进展.重庆工商大学学报(自然科学版),2006,23(6):564-567.

[3] 程晓霞,陈少莺.小鼠脾淋巴细胞转化试验最佳条件的测定.福建畜牧兽医,2003,25(4):7.
[4] 陈汝光,朱美玲.不同冻存剂对脐血造血干细胞生物学特性的影响.中华血液学杂志,2000,21(8):412-417.
[5] Kleeberger CA, Lyles RH, Manglick JB, et al. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. Clin Diagn Lab Immunol 1999, 6(1): 14-19.
[6] Sleasman JW, Leon BHL, Aleixo LF, et al. Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. Clin Diagn Lab Immunol 1997, 4(6): 653-658.
[7] Weinberg A, Zhang L, Brown D, et al. Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells. Clin Diagn Lab Immunol 2000, 7(4): 714-716.
[8] Ausiello CM, Lande L. Cell mediated immune responses in four-year-old children after primary immunization with acellular pertussis vaccines. Infect Immun 1999, 67(8): 4064-4071.

(2010-01-12收稿,04-03修回)

本文编辑:刘晓明