

山羊乳腺组织块冷冻保存试验*

孙苏军, 安志兴, 彭新荣, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用快速冷冻方法冻存山羊乳腺组织块, 比较不同大小组织块、不同冻前预处理和每管冻存不同块数对冻存效果的影响。结果表明, 冻前预处理 0、6 和 12 h, 直径 < 0.3 mm 组织块的贴壁存活率分别为 63.0%、89.8% 和 81.5%, 直径为 $0.3 \sim 0.5$ mm 的贴壁存活率分别为 47.2%、63.0% 和 56.5%, 直径为 $0.5 \sim 1.0$ mm 的贴壁存活率分别为 27.8%、35.2% 和 29.6%; 每管冻存 6 块、9 块和 12 块对冻存效果影响不显著, 以 6 块最佳。结果显示, 以添加 100 mL/L DM SO 的 D-MEM/F12 为冷冻液, 将直径 < 0.3 mm 的组织块冻前预处理 6 h, 山羊乳腺组织块的保存效果较好。

[关键词] 山羊; 乳腺; 冷冻保存

[中图分类号] S827

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0005-04

组织冻存与复苏技术已在医疗、生物和优生学等领域得到广泛应用, 该技术不仅可以保存一些稀缺组织, 还可减少某些因需要重复进行和多次培养试验时反复取材的麻烦及浪费, 能够最大限度地利用材料。早在 20 世纪 50 年代, Carroll 等进行了卵巢组织冻存的研究, 并于 1993 年在羊卵巢冻存实验中获得成功, 得到 1 只健康子代羊^[1]。有关乳腺组织的冻存研究尚未见报道, 冻存复苏后的乳腺组织不但可以用于体外培养的细胞, 而且可将组织块直接接种到动物体内, 获得组织再生^[2]。本研究针对乳腺组织冻前预处理、不同冷冻方法和解冻程序等冷冻影响因素进行了试验, 通过改进组织冷冻保存条件, 以期获得高活性的复苏乳腺组织。

1 材料与方法

1.1 乳腺组织的准备

在无菌条件下获得奶山羊鲜活乳腺组织, 并于 30 min 内送至实验室, 用生理盐水冲洗干净, 在 D-MEM/F12 培养液中用解剖刀和解剖镊将其仔细切成小块, 按直径小于 0.3 mm, $0.3 \sim 0.5$ mm 和 $0.5 \sim 1.0$ mm 分成 3 组^[3]。

1.2 冻存方法

以添加 10 mL/L FBS 的 D-MEM/F12 为基础液, 每 1.8 mL 冻存管分装 1 mL, 冰上预冷 15 min,

待组织块加入后, 分 2 次添加 DM SO (二甲基亚砜), 终浓度为 100 mL/L^[4]。

方法 A: 将 3 种直径不同的组织块以每管 6 块放入预冷的冻存液中, 并作 4 个平行样, 0 平衡 1 h, -20 平衡 2 h, 直接投入到液氮中; 然后再以每管 9 块、12 块重复操作。

方法 B: 将 3 种直径不同的组织块分放在 25 mL 的基础液中, 室温下在摇床上轻摇平衡 6 h^[4,5], 然后再如方法 A 操作。

方法 C: 将 3 种直径不同的组织块分放在 25 mL 的基础液中, 室温下在摇床上轻摇平衡 12 h, 然后再如方法 A 操作。

将上述冻存组织块分别在 1、2、3 和 6 个月后复苏, 并以未冻存鲜活乳腺组织块分别平衡 0、6 和 12 h 为对照, 进行原代培养。

1.3 组织复苏与培养

从液氮中取出装有组织块的冻存管, 在空气中停留数秒, 投入到 40 水浴中解冻, 停留 1~2 min 后将组织块置于添加 300 mL/L FBS 的 D-MEM/F12 培养液中洗 2 次, 将其依次转移到添加 300、200 和 100 mL/L FBS 的 D-MEM/F12 培养液中, 室温下每步轻摇平衡 30 min^[3], 进行体外培养, 并以新鲜的乳腺组织块原代培养为对照, 于倒置镜下观察, 以组织块周围长出单层细胞为存活(图版 1), 统

* [收稿日期] 2004-10-11

[基金项目] 国家“863”高科技项目(2001AA 213081)

[作者简介] 孙苏军(1978-), 男, 山东聊城人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和细胞生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

E-mail: zhangyl@public.xa.sn.cn

计组织块贴壁存活率。

2 结果与分析

2.1 组织块大小对冷冻效果的影响

表 1 结果表明, 组织块大小对冷冻复苏效果有极显著影响($P < 0.01$); 以新鲜组织块作原代培养的对照表明, 组织块直径在 1 mm 左右对贴壁存活率没有影响。

2.2 冻前平衡时间对冷冻效果的影响

表 1 结果表明, 冻前平衡时间对相应大小组织

块的贴壁存活率影响不显著($P > 0.05$), 以平衡 6 h 的贴壁存活率最高; 同时, 平衡时间可影响组织块长出单层细胞的速度, 平衡 12 h 组比平衡 0 和 6 h 组慢 24~36 h, 但仍可形成良好的细胞单层(图版 2), 而平衡 0 和 6 h 组与对照组保持一致。对冻存组织块的进一步培养结果表明, 由复苏组织块获得的细胞可正常传代(图版 3), 与由鲜活乳腺组织块获得的细胞在形态和生长状况上基本相同(图版 4); 复苏组织块获得的细胞活力旺盛, 在第 6 代时无凋亡现象出现。

表 1 不同组织块大小、平衡时间对冷冻解冻后贴壁存活率的影响

Table 1 Effect of different recovered times and sizes of tissue fragments on the plating efficiency of tissue fragments after thawing

平衡时间/h Recovered time	组织块/mm Size of tissue fragments	冻存组织块总数 No. of freezing tissue fragments	组织块贴壁存活率/% Plating efficiency of tissue fragments				复苏组织贴壁存活率/% Plating efficiency of thawing tissue fragments
			a	b	c	CK	
0	< 0.3	108	66.7	55.6	66.7	100	63.0
	0.3~0.5	108	50.0	47.2	45.8	100	47.2
	0.5~1.0	108	33.3	27.8	25.0	100	27.8
6	< 0.3	108	100	88.9	85.4	100	89.8
	0.3~0.5	108	75.0	61.1	58.3	100	63.0
	0.5~1.0	108	41.7	33.3	33.3	100	35.2
12	< 0.3	108	91.7	83.3	75.0	100	81.5
	0.3~0.5	108	66.7	50.0	56.2	100	56.5
	0.5~1.0	108	37.5	27.7	27.1	100	29.6

注: a, b, c 分别表示每管冻存 6 块、9 块和 12 块组织; CK 为对照组。

Note: a, b, c means 6 masses per vial, 9 masses per vial and 12 masses per vial respectively; con means control

2.3 每管冻存组织块数对冻存效果的影响

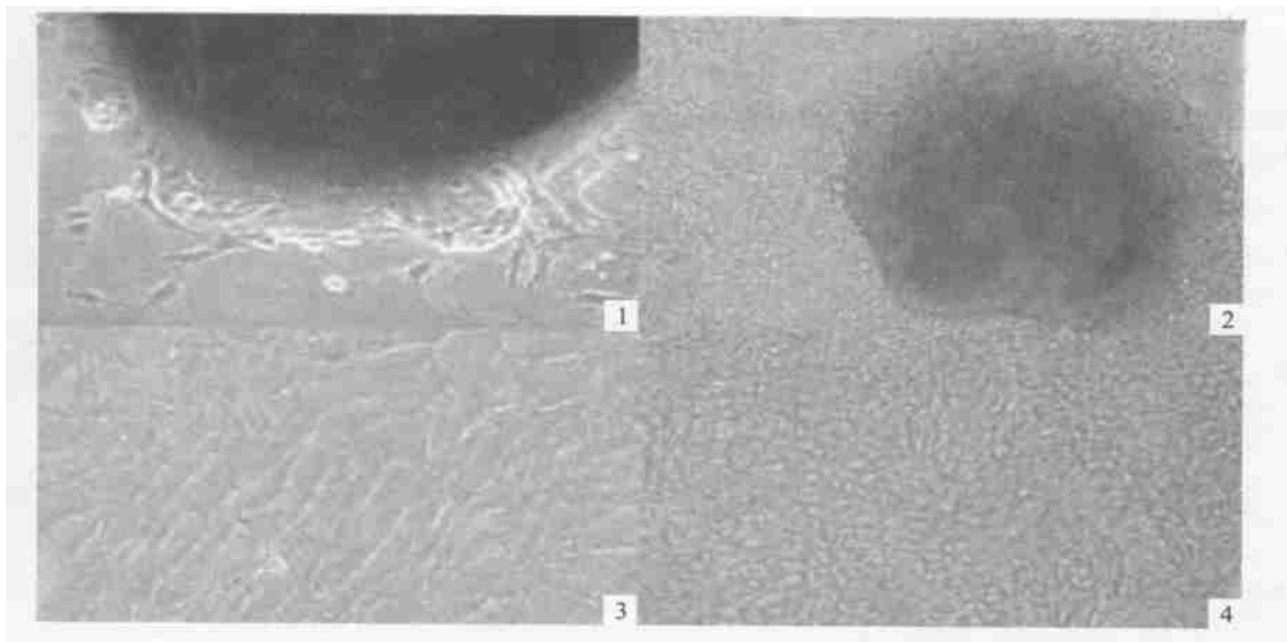
出于对组织块冻存效率的考虑, 对每管分别冻存了 6、9 和 12 块组织, 结果见表 1。表 1 结果表明, 每管冻存 6 块、9 块和 12 块对贴壁存活率影响不显著($P > 0.05$), 随每管冻存数目的增加, 贴壁存活率有所下降。从本试验可以看出, 山羊乳腺组织块冷冻保存以直径 < 0.3 mm, 每管不超过 6 块为佳, 采用方法 B 效果较好, 与其他报道结果相符合^[6]。

3 讨论

本试验采用常用的冷冻保护剂——DM SO (二甲基亚砜), 添加浓度采用细胞冻存的常用浓度, 即 100 mL/L, 与其他报道使用剂量相同^[4]。DM SO 属于低分子中性渗透性冷冻保护剂, 在溶液中易结合水分子, 发生水合作用, 使溶液粘性增加, 从而弱化水的结晶过程, 达到保护目的。对于不同类型的组织、细胞都有其最佳冷冻速率, 最佳冷冻速率可以相差很大^[5], 故而采用的冷冻方法也有所不同。M azur^[7]认为, 最佳的冷冻速率应是慢到足以防止

细胞内产生冰晶, 快到使细胞置于高电解质溶液中的时间缩短到最低程度。为了达到乳腺组织良好的冻存效果, 需将所使用的不同种类、浓度的 CPA (渗透性保护剂) 与要采用的冷冻程序有机结合。本试验采用的冷冻程序中, 相对延长了组织在冷冻保护液中的渗透平衡时间, 使组织细胞充分脱水, 并使 DM SO 充分进入细胞; 同时, 在组织进入冷冻保护液之前, 于基础液中体外轻柔振荡一段时间, 以使细胞更加适应体外环境, 这是本试验的关键步骤之一。

冷冻保护液进出组织细胞相对困难, 也是组织冷冻保存成功的关键。为此, 本试验方案控制了组织块的大小, 并在复苏过程中采用了梯度洗脱, 同时延长了洗脱时间, 使 DM SO 的细胞毒性降为最低, 保证了复苏组织的高活性。本试验结果显示, 组织块直径 < 0.3 mm, 每管冻存 6 块, 冻前室温下在基础液中平衡 6 h, 组织块冷冻复苏存活率为 89.8%, 与其他报道结果相近^[6,8]。对乳腺组织非渗透性保护剂的选择以及程序冷冻过程的控制, 还有待进一步研究。



图版 1~ 4 山羊乳腺组织块复苏培养

1. 冷冻保存 3 个月复苏培养 7 d 的山羊乳腺组织(400 ×); 2. 冷冻保存 3 个月复苏培养 12 d 的山羊组织(100 ×);
3. 冷冻保存 3 个月复苏培养 28 d 的第 6 代单层山羊乳腺细胞(400 ×); 4. 对照组培养传至第 6 代的山羊乳腺细胞(100 ×)

Plate 1- 4 The culture of goat mammary after cryopreservation

1. Goat mammary tissue cultured seven days after three-month cryopreservation (400 ×); 2. Goat mammary tissue cultured twelve days after three-month cryopreservation (100 ×); 3. Sixth passage monolayer goat mammary cell cultured twenty-eight days after three-month cryopreservation (400 ×); 4. Sixth passage monolayer goat mammary cell of contrast (100 ×)

[参考文献]

- [1] Carroll J, Gosden T G. Transplantation of frozen thawed mouse primordial follicles[J]. Hum Reprod, 1993, 8: 1163
- [2] 庞 龙, 王燕蓉, 沈新生, 等. 小鼠卵巢组织的超速冻存法研究[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(3): 142- 147.
- [3] Sugimura Y, Cunha G R, Donjacour A A. Morphogenesis of thuetal networks in the mouse prostate[J]. Biol Reprod, 1986, 34: 961- 971.
- [4] Simon W. A simple method for freezing and storing viable tissue fragment[J]. In Vitro Cell Dev Biol Animal, 1998, 34: 28- 29
- [5] Hayward S, Cox S, Mitchell L et al. The effects of interferons on the activity of α -glycerophosphate dehydrogenase in benign prostate hyperplasia cells in primary culture[J]. Urol, 1987, 138: 648- 653
- [6] Hallows R C, Cox S, Hayward S, et al. Effects of flutamide and hydroxy flutamide on the growth of human benign prostatic hyperplasia cells in primary culture: a preliminary report[J]. Anticancer Res, 1991, 11: 1799- 1806
- [7] Mazur P. The freezing of biological systems[J]. Science, 1970, 168: 939
- [8] Deshpande N, Hallows R C, Cox S, et al. Divergent effects of interferons on the growth of human benign prostatic hyperplasia cells in primary culture[J]. Urol, 1989, 141: 157- 160

The research of cryopreservation goat mammary tissue

SUN Su-jun, AN Zhi-xing, PENG Xin-rong, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northw est A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Various tissue sizes, different recovered times and varied numbers of tissue fragments in each vial were analyzed using overspeed method of cryopreservation of goat mammary tissue. With the diameter

of tissue fragments less than 0.3 mm, the recovered times 0, 6 and 12 hours, their plating efficiencies after thawing were 63.0%, 89.8% and 81.5% respectively; With the diameter of tissue fragments between 0.3 mm to 0.5 mm, the recovered times 0, 6 and 12 hours, their plating efficiencies after thawing were 47.2%, 63.0% and 56.5% respectively; With the diameter of tissue more than 0.5 mm, the recovered times 0, 6 and 12 hours, their efficiencies after thawing were 27.8%, 35.2% and 29.6% respectively. However, 6 masses, 9 masses and 12 masses per vial respectively had no remarkable effect on the plating efficiency, and 6 masses per vial was the best. The study showed, with 100 mL/L DMSO added to DMEM/F12 as cryoprotectants, 6 hours' equilibration of the diameter of tissue fragment less than 0.3 mm before freezing had better effect on the freezing of goat mammary tissue.

Key words: goat; mammary; freezing cryopreservation

(上接第 4 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)04-0001-EA

Construction of hepatitis C virus E1E2 envelope protein gene vaccine and its humoral immune response in BALB/c mice

XU Xin-gang^{1,2}, HU Jian-he^{2,3}, ZHANG Yan-ming¹, DENG Hong-kui²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

3 Department of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxing, Henan 453003, China)

Abstract: Hepatitis C virus (HCV) H77 strain E1E2 gene vaccine was constructed by inserting full-length cDNA of HCV E1E2 into an eukaryotic expression vector pcDNA4.0. The recombinant plasmid was transferred into eukaryotic cells 293T by calcium phosphate transfection method and transiently expressed. E1E2 envelope protein was analyzed by FACS. BALB/c mice were injected intramuscularly with the recombinant plasmid. Anti-HCV E1E2 antibody was screened by FACS, with cells SP2/0 which expressed protein HCV E1E2 as antigen. Moreover, the antibody was also analyzed by Western blot and the antigen was E2 protein which was expressed in *E. coli*. The results showed that protein HCV E1E2 was expressed transiently in cells 293T. Specific anti-E1E2 antibody could be detected in DNA-immunized mouse serum by FACS and the antibody could react specially to cells SP2/0 which expressed protein HCV E1E2. Western blot analysis showed that DNA-immunized mouse serum could react specially to protein E2 which was expressed by *E. coli*.

Key words: hepatitis C virus; envelope protein; gene vaccine; humoral immune response