

技术方法

DOI: 10. 3969/j. issn. 0253-3626. 2012. 04. 011

普通冰箱 4 ℃ 短期保存小鼠骨髓单个核细胞的研究

王改琴, 张旭东, 李凯平, 贾书花

(山西省长治医学院组胚教研室, 长治 046000)

【摘要】目的: 建立小鼠骨髓单个核细胞短期保存简便有效的方法。方法: 采用密度梯度离心法获得小鼠骨髓单个核细胞, DMEM 培养液为小鼠骨髓单个核细胞冷藏营养液, 直接置骨髓单个核细胞于 4 ℃ 冰箱中保存, 分别在当天至 60 h 选择性观察细胞形态, 测其细胞回收率、活力及细胞周期。结果: 小鼠骨髓单个核细胞置 4 ℃ 冰箱保存 2 d, 活细胞率达 80% 以上; 细胞回收率达 70% 以上; 细胞周期与对照组相比无明显差别。结论: 4 ℃ 冰箱能在 2 d 内保存小鼠骨髓单个核细胞, 是一种简便易行的短期保存方法。

【关键词】小鼠; 4 ℃ 短期保存; 骨髓单个核细胞

【中国图书分类法分类号】R285.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-15

Research on short-term preservation of mouse bone mononuclear cell in the ordinary refrigerator at the temperature of 4 ℃

WANG Gaiqin, ZHANG Xudong, LI Kaiping, JIA Shuhua

(Department of Histology and Embryology, Changzhi Medical College)

【Abstract】Objective: To find a simple and effective way of preserving bone mononuclear cells at short-term. Methods: Bone mononuclear cells from mice were isolated by density gradient centrifugation. DMEM culture solution was employed as the nutrient solution and bone mononuclear cells were preserved in the refrigerator at the temperature of 4 ℃. The form, recovery rate, viability and cycle of bone mononuclear cells were observed and detected optionally from the time of being preserved to 60 h after the preservation. Results: The living cell rate was over 80% and the cell recovery rate was over 70% after being preserved in the refrigerator at the temperature of 4 ℃ for two days. Furthermore, the cell cycle was similar to that of control group ($P > 0.05$). Conclusion: Refrigerator at the temperature of 4 ℃ can safely preserve bone mononuclear cells within two days, which offers a simple and effective way of preserving.

【Key words】mouse; short-term preservation at the temperature of 4 ℃; bone mononuclear cell

骨髓单个核细胞包括造血干细胞和间充干细胞, 小鼠骨髓单个核细胞是实验血液学和分子生物学研究的主要对象和媒介之一, 短期保存小鼠骨髓单个核细胞对其应用研究非常重要。细胞冷冻保存常受机械性和渗透性的损伤, 如何最大限度的使细胞免受损伤是需要解决的课题。但小鼠骨髓单个核细胞保存的文献报道甚少, 本实验对小鼠骨髓单个核细胞 4 ℃ 低温短期保存进行探索, 为以骨髓单个核细胞作为靶细胞进行细胞和分子生物学的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

健康成年清洁级 BALB/c 小鼠, 雌雄各半, 8 ~ 12 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 由长治医学院实验动物中心提供。DMEM 培养液 (Hyclone 产品), 胎牛血清 (杭州四季青公司), 台盼蓝染料 (Hyclone 产品)。

1.2 单个核细胞的获取

①用 DMEM 冲出股骨及胫骨髓制成单细胞悬液。

②在试管中加入适量淋巴细胞分离液, 用滴管沿管壁缓慢将单细胞悬液叠加于分层液面上。水平离心 2 000 r/min × 20 min。

③用毛细血管插到白色云雾层, 吸取单个核细胞。置入另一短管中, 加入 5 倍以上体积的 DMEM, 1 500 r/min × 10 min, 洗涤细胞 2 次。

作者简介: 王改琴 (1980-), 女, 讲师, 硕士,

研究方向: 干细胞生物学。

通信作者: 贾书花, 女, 教授, Email: wjjshwy@126.com。

基金项目: 山西省高校科技资助项目 (编号: 20101101)。

1.3 4 ℃冰箱保存单个核细胞

将 1 × 10⁶ 个/ml 单个核细胞置于 EP 管中,每个 EP 管中细胞悬液为 1 ml,4 ℃冰箱保存细胞。

1.4 HE 染色显微镜下观察细胞形态

小鼠骨髓单个核细胞在 4 ℃冰箱中分别保存 12、24、36、48、60 h 后,HE 染色在光学显微镜下观察细胞形态结构的变化。

1.5 细胞活力检测

取 2 滴细胞悬液加 1 滴 2% 台盼蓝染液,2 ~ 3 min 后观察死细胞被染成蓝色,活细胞不着色。计数 200 个淋巴细胞,计算活细胞百分率。活细胞百分率 = (活细胞数/总细胞数) × 100% 。

1.6 细胞回收率的计算

细胞回收率 = (细胞冻存一定时间后所得的细胞数/冻存前的细胞总数) × 100%

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

以 DMEM 基础培养基冲洗 3 次细胞后加入 70% 乙醇中固定,取细胞悬液除去固定剂,用 PBS 洗 3 次,调整细胞数目至 1 × 10⁶ 个/ml,以碘化丙啶染色,用流式细胞仪测定细胞周期。

1.8 统计学处理

应用 SAS 9.1 统计软件对所有的数据进行分析,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析检验,以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色显微镜下观察细胞形态

显微镜下可见 4 ℃冰箱中保存小鼠骨髓单个核细胞 12、24 h 后细胞形态无变化,但是随着保存时间的延长,死细胞和细胞碎片均增多(表 1)。

表 1 显微镜下 HE 染色观察小鼠骨髓单个核细胞形态

Tab.1 Form of bone mononuclear cells observed by HE staining and optical microscope

时间(h)	细胞形态	与冻存前比较
12	圆、亮	无差别
24	圆、亮	无差别
36	绝大部分细胞圆、亮	有差别,见到少量死细胞
48	大部分细胞圆、亮	有差别,死细胞量增多,见到少量细胞碎片
60	约 60% 细胞圆、亮	有差别,死细胞较多,见到大量细胞碎片

2.2 显微镜下台盼兰染色计数活细胞率

显微镜下可见 4 ℃冰箱中保存小鼠骨髓单个核细胞 12、24 h 后台盼兰拒染率与对照组相比无明显变化($P > 0.05$) ,

随着保存时间的延长台盼兰拒染率增高,但是 48 h 之内台盼兰拒染率仍高于 80% (表 2)。

表 2 不同保存时间对小鼠骨髓单个核细胞活细胞率的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Living cell rate of bone mononuclear cells detected at different tie points ($n=6, \bar{x} \pm s$)

时间 (h)	台盼兰拒染率(%)
0	95.50 ± 1.87
12	95.16 ± 2.32
24	95.17 ± 1.47
36	85.16 ± 2.64 *
48	80.17 ± 1.72 **
60	60.50 ± 3.39 **

注: *, 与对照组相比 $P < 0.05$; **, 与其他各组相比 $P < 0.05$

2.3 不同保存时间对小鼠骨髓单个核细胞回收率的影响

4 ℃冰箱中保存小鼠骨髓单个核细胞 12、24 h 后细胞回收率与对照组相比无明显变化($P > 0.05$) ,在 48 h 之内细胞回收率高于 75% ,随着保存时间的延长细胞回收率降低(表 3)。

表 3 不同保存时间对小鼠骨髓单个核细胞回收率的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Recovery rate of bone mononuclear cells detected at different time points ($n=6, \bar{x} \pm s$)

时间 (h)	细胞回收率(%)
0	93.51 ± 2.35
12	94.28 ± 1.67
24	92.94 ± 2.83
36	81.97 ± 1.27 *
48	75.28 ± 3.25 **
60	56.27 ± 1.36 **

注: *, 与对照组相比 $P < 0.05$; **, 与其他各组相比 $P < 0.05$

2.4 4 ℃短期保存对小鼠骨髓单个核细胞周期的影响

各组小鼠骨髓单个核细胞 G₀/G₁期、S 期和 S + G₂/M 期均较对照组差异无统计学意义(表 4)。

表 4 4 ℃短期保存对小鼠骨髓单个核细胞周期的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.4 Cycle of bone mononuclear cells detected optionally from the time of being preserved to 48 h after the preservation ($n=6, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)
0	63.96 ± 5.94	31.93 ± 6.67	7.16 ± 0.86
12	64.48 ± 6.68	33.40 ± 6.06	6.90 ± 0.97
24	64.03 ± 4.00	33.24 ± 4.67	7.33 ± 1.06
36	63.32 ± 5.06	31.07 ± 4.55	7.56 ± 1.20
48	62.42 ± 6.27	33.03 ± 5.00	7.41 ± 1.00

3 讨 论

骨髓单个核细胞在临床检验、诊断、治疗以及实验研究方面具有重要的意义。小鼠骨髓单个核细胞分离的方法比较成熟,操作简单易行^[1~3]。小鼠骨髓单个核细胞如何长时间保存,对于提高实验效率和成功率都非常关键。低温保存分为两大类:① $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 深低温冻存;② $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存^[4,5]。为获得较高的细胞存活率及延长低温保存时间,许多学者对多种冻存保护剂进行了研究,但是“细胞内冰晶”、“渗透性休克”、“二甲基亚砷复温引起的细胞膜损伤及“细胞凋亡”是深低温冻存无法逾越的障碍^[6,7]。细胞膜及细胞内细胞器质膜的完整性程度是影响细胞功能的重要因素。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 常规低温保存细胞没有经过冷冻损伤,没有冷冻保护剂,可以避免“细胞内冰晶”、“渗透性休克”等,减轻了细胞膜的损伤^[8,9],并且操作简单,不需要离心操作,也不需要特殊的仪器设备。还节约资源,液氮罐通常是实验室的紧张资源,而且通常需要填充液氮。最后,方便实验。研究工作通常会出现研究时间变动,实验试剂购买等待和研究预料外结果出现等,导致研究进展受到暂时的停滞。

细胞活力常用百分比表示,活力的大小对实验结果有很大影响。细胞活力的测定有许多方法,最简便常用的方法是台盼蓝染色法。台盼蓝又称锥蓝,是一种阴离子型染料,这种染料不能透过活细胞正常完整的细胞膜,故活细胞不着色,但死亡细胞的细胞膜通透性增加,可使染料通过细胞膜进入细胞内,使死细胞呈蓝色。实验结果表明小鼠骨髓单个核细胞在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 48 h 后其活细胞率大于 80%,细胞回收率大于 75%。细胞增殖动力学研究证实,小鼠骨髓单个核细胞在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 48 h 后 G_1 期、S 期、 G_2 和 M 期细胞百分数与对照组无明显差别。

总之, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 常规低温保存小鼠骨髓单个核细胞与深低温冷冻保存比较具有简便、经济等优点,将为此而进行的基础和临床研究奠定了基础。但此方法保存时间短,仅 2 d 活细胞率大于 80%,可以根据实验需求选择不同的保存方法。

参 考 文 献

- [1] 郝素珍,王桂琴. 实用医学免疫学[M]. 北京:高等教育出版社,2005:178.
- [2] Hao S Z, Wang G Q. The utility of medical immunology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2005:178.
- [3] Hu J, Feng M, Wu H, et al. Hematopoiesis reconstruction in mice of hematopoietic aplasia by transplanting hematopoietic stem/progenitor cells mobilized by Angelica polysaccharides[J]. Journal of Third Military Medical University, 2007, 23(29): 2236-2239.
- [4] 金伯泉,李恩善. 医学基础免疫学实验指导[M]. 北京:世界图书出版社,1990:46.
- [5] Jin B Q, Li E S. Experimental guidance of basic medical immunology[M]. Beijing: World Book Publishing House, 1990:46.
- [6] Lin H, Li Q Y, Jiang Z X, et al. The effect comparison of hypothermic UW, Celsior and HTK solution for the storage of C3A hepatocytes[J]. Chongqing Medical, 2011, 40(28): 16-19.
- [7] Jiang X R, Xiao J, Ren Y S, et al. The influence of 4 degree centigrade conservation on cells activity of rats' olfactory bulbs derived olfactory ensheathing cells[J]. Progress of Anatomical Sciences, 2011, 17(5): 124-127.
- [8] Fleming K K, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic and nonhematopoietic stem cell[J]. Transfus Apher Sci, 2006, 34(3): 309-315.
- [9] Cole M D, Poulsen D, Marzo J M, et al. Chondrocyte viability in press-fit cryopreserved osteochondral allografts[J]. Journal of Orthop Res, 2004, 22(4): 781-787.
- [10] 杨军英,秦 丹,徐存拴. 大鼠外周血单个核细胞保存方法研究[J]. 河南科学, 2009, 27(2): 183-186.
- [11] Yang J Y, Qin D, Xu C S. Research cell preservation method of rat peripheral blood mononuclear[J]. Henan Science, 2009, 27(2): 183-186.
- [12] Katenz E, Vondran F W, Schwartlander R, et al. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent[J]. Liver Transpl, 2007, 13(1): 38-45.

(责任编辑:唐秋姗)