



活体肺癌组织玻璃化保存的研究*

李嘉慧¹⁾ 杜羽琨¹⁾ 余科科²⁾ 邢杰²⁾ 周新丽^{1)**}⁽¹⁾ 上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093; ⁽²⁾ 上海交通大学附属胸科医院, 上海 200030

摘要 保存活体的肺癌组织将为肺癌发病基因筛查和靶向药物筛选等体外实验研究提供更完整的样本信息. 本文对活体肺癌组织的玻璃化保存方法进行研究, 首先采用针浸法玻璃化保存单块肺癌组织, 对所需低温保护剂的浓度和平衡时间进行了优化; 其次采用冻存管对多块肺癌组织样本进行玻璃化保存, 对低温保护剂溶液体积以及平衡时间进行了优化; 最后对慢速冷冻、不加低温保护剂快速冷冻、玻璃化冷冻3种冷冻方法的冻存效果进行比较并通过低温显微分析其冰晶损伤机理. 结果表明, 20% EG+20% DMSO+0.5 mol/L 海藻糖作为低温保护剂, 在平衡溶液和玻璃化溶液分别加载3 min和1 min时, 针浸法和0.25 ml冻存管内玻璃化冻存, 复苏后组织活力最高, 分别约为79.96%与80.44%. 免疫组化显示玻璃化保存肺癌组织经过复苏后, 相比慢速冷冻和无保护剂快速冷冻, 组织结构损伤较小, 组织内细胞TUNEL阳性表达较少. 低温显微结果表明, 玻璃化保存组织内部及周围只出现少量细小冰晶, 而慢速冷冻、快速冷冻组织皆出现明显冰晶.

关键词 肺癌组织, 玻璃化, 保护剂加载, 冷冻载体**中图分类号** Q6-33, Q813**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0009

近年来, 针对肺癌发病基因筛查和靶向药物筛选的研究越来越受到重视, 基于肺癌组织的体外实验在基础研究中起着重要作用. 临床上获得的新鲜肺癌组织保留了原始肿瘤完整的组织结构和异质性, 可以研究肿瘤细胞与宿主微环境间的相互作用与肿瘤的发生扩增之间的联系^[1-2]. 此外, 活体肺癌组织除了包含自身携带的生物信息如DNA、RNA之外, 还携带有患者医疗、饮食、甚至区域等各种复杂的社会信息, 是科学研究的理想载体^[3]. 因此, 保存活体的肺癌组织将最大限度地保存其样本信息, 增加体外实验的可靠性, 促进临床研究的发展.

目前, 在肿瘤组织样本库中用于长期保存样本的主要方法是组织切片与低温保存. 组织切片经过福尔马林的浸泡处理, 可以达到在室温下的长期保存, 但是样本活性会大大降低或者没有活性^[4]. 用于提取RNA的样本常保存在RNA稳定和储存溶液RNA later中, 然后放置在-20℃冰箱中长期保存; 血浆、血清和DNA等样本可长期保存在-80℃冰箱中. 这些方法主要保存了生物分子信息, 但是肿瘤组织具有异质性^[5], 仅“静态”和固定化的信息

并不能真实反映肿瘤的变化规律. 此外, 完整的冷冻组织样本应该包括正常组织、癌症组织和癌旁组织^[4], 但是肿瘤组织样本库中的组织块一般未经任何处理直接投入液氮或放入-80℃冰箱保存, 其组织复苏后的形态特征和功能特性都受到较大的影响^[6-7].

成功的肿瘤组织低温保存要对冷冻载体、低温保护剂、降温速率等因素进行综合考虑^[8]. 2001年Sorio等^[9]首先将新鲜胰管癌剪为1~2 mm³, 使用慢速冷冻进行低温保存, 复苏后异体移植成瘤率为21%. 2015年Alkema等^[10]将卵巢癌组织放入冻存管并加入低温保护剂DMSO, 然后把冻存管直接浸没液氮低温保存卵巢癌组织, 组织经过复温后进行人源肿瘤异种移植(patient derived tumor xenograft, PDX)建模^[11-13], PDXs的成瘤率达到了38% (8/21). 2017年Zeng等^[14]先将胆管癌组织切片浸入玻璃化溶液1 (80% DMEM+10%

* 国家自然科学基金(51376132)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-55270218, E-mail: zjulily@163.com

收稿日期: 2021-01-12, 接受日期: 2021-03-09

DMSO+3% BSA+1% 蔗糖+0.05% 甲基纤维素+0.25% 羟乙基淀粉) 和玻璃化溶液 2 (70% DMEM+18% DMSO+12% EG+3% BSA+20% 蔗糖+0.05% 甲基纤维素+0.25% PVP), 后采用直接浸没液氮的方法低温保存胆管癌组织, 解冻后组织形态无明显变化, 细胞的存活率达到了 80%, 异体移植后, 成瘤率达到了 68.2%.

目前, 针对肺癌组织低温保存的研究还较少, 开发更优的低温保存方法尤为重要. 在卵巢组织的保存中^[15-16], 常使用针头固定组织切片, 将其分步浸泡于高浓度低温保护剂中平衡, 之后直接插入液氮的低温保存方法. 该法可明显地增大冷却速率, 并大大降低低温保护剂的潜在毒性和渗透作用. 但该方法在肺癌组织中的应用还鲜为报道, 本文将借鉴针头固定组织切片的方法, 利用针灸针作为冷冻载体冻存肺癌组织. 此外, 肿瘤组织中并非单一癌细胞, 不同细胞所适合的保护剂种类、保护剂浓度、渗透时间等都不相同^[17], 组织受到低温保护剂的毒性损伤与组织内部中心到表面的距离成正比, 所需要的平衡时间比细胞的平衡时间更长, 所以筛选出最适合肿瘤组织的低温保护剂及其平衡时间至关重要^[18].

针对以上问题, 本文首先采用针灸针作为冷冻载体, 直接浸没液氮法玻璃化保存单块肺癌组织, 优化所适用的低温保护剂和平衡时间. 其次, 为了减少液氮直接接触的污染, 使用冻存管作为冷冻载体玻璃化保存多块肺癌组织, 对低温保存时溶液体积以及平衡时间进行优化. 最后比较慢速冷冻、无保护剂快速冷冻及玻璃化冷冻肺癌组织复苏后组织活性、组织内形态结构及组织内细胞的凋亡情况, 并运用低温显微镜观察不同方案下冰晶形成和生长, 反映不同冻存方法的冰晶损伤情况.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和药品

DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、CCK-8 试剂盒 (上海励瑞生物科技有限公司); 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO, APPLICHEM, 德国); 乙二醇 (ethylene glycol, EG)、海藻糖 (中国医药集团上海化学试剂公司); 无水乙醇、二甲苯、中性树胶、双氧水、甲醇、盐酸 (国药集团化学试剂有限公司); HE 染液、分化液、返蓝液、PBS 缓冲液、蛋白酶 K、破膜液、苏木素染液 (武汉赛维尔生物科技有限

公司).

1.2 人体组织标本

所有肺癌标本均来自上海市胸科医院生物样本库 (中国, 上海). 人体样品的采集程序已得到上海市胸科医院伦理委员会的批准. 为保证肿瘤组织切割大小的一致性, 我们特制了不锈钢排刀 (图 1a). 首先在超净台内组装无菌不锈钢排刀, 在室温下用无菌盐水冲洗肺癌组织块, 在超净台中将肺癌组织块切成 $1 \times 1 \times (5 \sim 10) \text{ mm}^3$ 组织块 (图 1b).

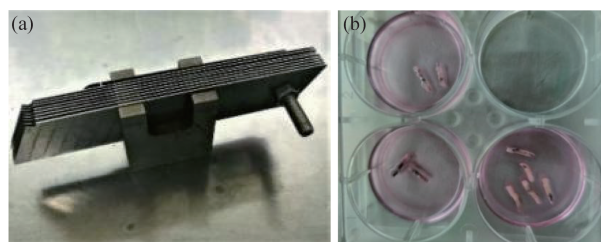


Fig. 1 Schematic diagram of a row of blades (a) and tumor tissue after cutting (b)

1.3 针浸法玻璃化保存肺癌组织

肺癌组织采用两组保护剂进行玻璃化冻存, 并用两步法进行保护剂的加载. 第一组保护剂: 平衡溶液 (equilibrium solution, ES) ES1 为含 7.5% DMSO+7.5% EG 的 DMEM 溶液, 加载时间分为 5 min、10 min、15 min, 与之对应的玻璃化溶液 (vitrification solution, VS) VS1 为含 15% DMSO + 15% EG + 0.5 mol/L 海藻糖的 DMEM 溶液, 加载时间分为 1 min、3 min; 第二组保护剂: 平衡溶液 ES2 为含 10% DMSO+10% EG 的 DMEM 溶液, 加载时间分为 1 min、3 min、5 min、10 min、15 min, 与之对应的玻璃化溶液 VS2 为含 20% DMSO+20% EG+0.5 mol/L 海藻糖的 DMEM 溶液, 加载时间分为 1 min、3 min. 将肺癌组织在各组平衡溶液中平衡一定时间, 然后在其对应的保护剂溶液中分别加载不同时间, 所有分组见表 1. 例如, 肺癌组织 VS1 保护剂溶液加载方案 5 min-1 min 组是指在 ES1 中平衡 5 min, 然后在 VS1 中加载 1 min.

采用“针灸针”作为玻璃化冻存的载体. 用针灸针将组织块串起, 每根串 1 条组织块, 按照表 1 针浸法保护剂加载方案在对应的保护剂溶液中平衡对应时间, 加载完成后吸去多余保护剂溶液, 避免折叠以防止增大热阻、降低降温速率, 随后迅速投

入液氮. 1 h后将针灸针从液氮中取出, 放入37℃含1 mol/L蔗糖的DMEM溶液中平衡3 min, 随后转移到含0.5 mol/L蔗糖的DMEM溶液中平衡5 min, 再转移到含0.25 mol/L蔗糖的DMEM溶液中平衡10 min, 最后将组织块转移至培养基中, 使用排刀切割为1×1×1 mm³大小的小粒, 等待检测.

1.4 冻存管玻璃化保存肺癌组织

为了避免直接接触液氮存在的潜在污染, 并实现多个肿瘤组织样本的玻璃化, 我们采用冻存管作为冷冻载体, 将含有组织的CPA溶液装入2 ml冻存管中, 直接投入液氮进行组织冻存. 由于冻存管的传热限制使样本的实际冷却速率降低, 需要更高浓度的CPA以防止冰晶形成, 同时, 冻存管内溶液体积也是影响组织玻璃化程度的关键因素.

肺癌组织采用第二组玻璃化保护剂并用两步法进行保护剂的加载, 根据平衡溶液ES2的加载时间分为3组: 1 min、3 min、5 min; 保护剂溶液成分VS2的加载时间为1 min. 例如, 冻存管保存肺癌组织保护剂溶液加载方案0.25 ml-1 min-1 min组别是指在冻存管中加载0.25 ml溶液, 肺癌组织先在ES2中平衡1 min, 后在VS2中加载1 min, 所有分组见表2. 采用冻存管作为玻璃化冻存的载体. 将3~4条组织块放入冻存管, 按照冻存管保护剂加载方案在对应的保护剂溶液中平衡对应时间, 加载完成后分别保持冻存管内VS2溶液体积为0.25 ml、0.5 ml、1 ml, 随后迅速投入液氮保存. 1 h后将冻存管从液氮中取出, 复温程序与针灸法相同.

1.5 肿瘤组织活力测定

将新鲜以及复温后的组织铺板至96孔板中, 并加入100 μl完全培养基培养, 在培养箱(37℃, 5% CO₂)中孵育2 h. 将10 μl的CCK-8 (cell count kit-8)溶液添加到平板的每个孔中. 将板进一步温育1 h, 并使用酶标仪在450 nm处测量吸光度(A)值. 计算使用不同低温保存方法下肿瘤组织相对新鲜组织活力.

$$\text{组织块相对活力 (\%)} = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (1)$$

其中A_s为实验孔(含有复温后组织、培养基以及CCK-8溶液)的A值; A_c为对照孔(含有新鲜组织、培养基以及CCK-8溶液)的A值; A_b为空白孔(含有培养基以及CCK-8溶液)的A值.

1.6 肿瘤组织冻存后的免疫组化分析

对慢速冷冻、无保护剂快速冷冻、针灸针玻璃化冷冻、冻存管玻璃化冷冻后的肿瘤组织, 进行

HE染色和TUNEL染色分析. 慢速冷冻: 将肿瘤组织放入盛有10% DMSO的冻存管, 然后放入冻存盒并在-80℃内保存, 冻存盒的降温速率为1℃/min; 无保护剂快速冷冻: 将肿瘤组织放入冻存管中直接投入液氮; 针浸法玻璃化冷冻: 将肿瘤组织在ES2溶液浸泡3 min, VS2溶液浸泡1 min, 串在针灸针上投入液氮; 冻存管玻璃化冷冻: 将肿瘤组织在ES2溶液浸泡3 min, VS2溶液浸泡1 min, 放入含0.25 ml保护剂的冻存管中直接投入液氮.

肿瘤组织切片的制作: 将新鲜或者复苏后的肿瘤组织使用4%多聚甲醛固定24 h, 将固定好的组织装入组织盒内水洗, 转入8%乙醇中固定3~6 h, 浸入90%乙醇2 h、95%乙醇2 h、无水乙醇I 1 h、无水乙醇II 1 h、二甲苯I 15 min、二甲苯II 15 min使组织透明, 再浸入60~62℃石蜡液中60 min. 浸蜡后将组织置包埋框中并平放在其底部, 倒入石蜡制成石蜡组织块. 将石蜡组织块夹入切片机, 调整切片机角度, 设定切片厚度为4 μm, 连续切片, 将切下的组织片置于50℃温水中伸展, 贴附在防脱片载玻片上, 置于62~65℃干燥箱中烤片过夜, 将组织切片存放于干燥避光处.

肿瘤组织的HE染色: 切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水, 使用清水洗10 min, 苏木素染液染10 min后使用水洗洗净, 在1%的盐酸乙醇分色切片, 自来水冲洗回蓝10 min, 再放入伊红染液5 min后水洗, 在80%乙醇、95%乙醇中调色脱水各10 min, 在95%乙醇、无水乙醇I、无水乙醇II脱水, 在二甲苯I、二甲苯II中透明, 最后使用中性感胶封片. 光学显微镜下观察并拍照, 观察冻存前后组织形态学特征.

原位杂交细胞凋亡检测: 采用TdT介导的dUTP缺口末端标记技术(TUNEL)检测细胞凋亡情况. 石蜡片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇浸洗, 使用PBS浸洗10 min, 再滴加100 μl蛋白酶工作液(10 mg/L, 溶于10 mmol/L Tris/HCl, pH 7.5) 10 min后PBS浸洗. 阳性对照组切片加入100 μl DNase I recombinant grade I (3 000 U/ml, 溶于50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L MgCl₂, 1 g/L BSA); 阴性对照加入50 μl TdT液, 经避光37℃水浴60 min, PBS浸洗15 min, 再滴加50 μl converter-POD后37℃水浴30 min、PBS浸洗, 然后再滴加100 μl DAB工作液, 直到呈现浅棕色背景, PBS浸洗, 使用苏木素复染1 min, 1%盐酸乙

醇分化, 氨水返蓝后使用自来水清洗, 之后进行脱水, 最后使用中性树胶封片. 光学显微镜下观察并拍照. 阳性细胞着色定位于细胞核, 呈棕黄色, 背景呈紫蓝色.

1.7 肿瘤组织降温过程的低温显微观察

为了探究慢速冷冻、不加低温保护剂快速冷冻、玻璃化冷冻3种冷冻方法在降温过程中冰晶形成情况, 使用低温显微镜 (BCD196, Linkam Scientific, UK) 对3种方法的降温过程进行观察. 慢速冷冻组: 取一小块肿瘤组织, 4℃在10% DMSO中浸泡10 min后, 将组织放在圆形盖玻片上放入低温显微镜腔室降温, 低温显微镜降温程序设置为: 1℃/min降至-80℃. 快速冷冻不加保护剂组: 取一小块肿瘤组织, 将组织放在圆形盖玻片上放入低温显微镜腔室降温, 低温显微镜降温程序设

置为: 100℃/min降至-150℃. 玻璃化组: 取一小块肿瘤组织在ES2中浸泡3 min后, 转移至VS2浸泡1 min. 将组织放在圆形盖玻片上放入低温显微镜腔室降温, 低温显微镜降温程序设置为: 100℃/min降至-150℃.

1.8 数据分析

采用SPSS 18.0软件中ANOVA (Analysis of Variance) 过程对数据进行方差分析、Duncan氏多重比较. 使用Origin 9.0对数据进行作图.

2 结果与讨论

2.1 针浸法玻璃化低温保存肺癌组织的结果

肿瘤组织在ES1、VS1与ES2、VS2溶液中浸泡不同时间后, 采用针浸法进行玻璃化冻存, 复温后相对新鲜组织的活力如表1所示.

Table 1 Relative vitality of lung cancer tissues after needle immersion vitrification and rewarming

CPA loading protocols in VS1 solution	Relative vitality to fresh group/%*	CPA loading protocols in VS2 solution	Relative vitality to fresh group/%*
		1 min-1 min	(37.33 ± 8.98) ^{ef}
		3 min-1 min	(79.96 ± 6.81) ^a
		3 min-3 min	(62.29 ± 2.94) ^{bc}
5 min-1 min	(42.10 ± 4.69) ^d	5 min-1 min	(64.58 ± 7.78) ^b
5 min-3 min	(55.03 ± 4.04) ^c	5 min-3 min	(53.01 ± 5.09) ^{cd}
10 min-1 min	(65.78 ± 12.14) ^b	10 min-1 min	(46.41 ± 8.53) ^{de}
10 min-3 min	(77.56 ± 7.69) ^a	10 min-3 min	(48.99 ± 9.96) ^d
15 min-1 min	(35.58 ± 4.53) ^d	15 min-1 min	(34.14 ± 2.86) ^f
15 min-3 min	(39.73 ± 5.21) ^d	15 min-3 min	(37.47 ± 6.96) ^{ef}

*indicates $\bar{x} \pm s$, and letters (a~f) indicate significant difference in Duncan's new complex range method ($P < 0.05$).

从表1中可以看出, 对于第一组保护剂, 肿瘤组织在平衡溶液ES1中浸泡时间相同时, 以5 min组为例, 随着在玻璃化溶液VS1中浸泡时间的延长, 复苏后组织的活力从在VS1中浸泡1 min时的42.10%, 增加为在VS1浸泡3 min时的55.03%. 对于在平衡溶液中浸泡10 min和15 min组, 也有同样的趋势. 说明在平衡溶液ES1中浸泡时间相同, 在VS1浸泡时间为3 min时低温保护剂渗透效果好于浸泡时间为1 min, 渗透至组织内部的低温保护剂浓度更高, 有利于在降温过程中对组织内细胞进行保护. 此外, 肿瘤组织在玻璃化溶液VS1中浸泡时间相同时, 以1 min为例, 随着在平衡溶液中浸泡时间增加, 组织复苏后的活力先增加后减小. 从在ES1中浸泡5 min时的42.10%增加到在ES1中浸泡10 min时的65.78%, 再减小到在ES1中浸泡

15 min时的35.58%. 对于在VS1中浸泡3 min组, 也有同样的趋势. 这说明在ES1溶液浸泡10 min, 低温保护剂在组织内渗透相对充分, 且此时低温保护剂的毒性作用对组织活力影响较小. 而在ES1溶液中浸泡15 min时, 不论组织在VS1溶液浸泡1 min还是3 min, 组织复苏后活力分别为35.58%、39.73%, 两者无显著性差异. 说明组织与ES接触时间过长, 毒性作用对组织内的细胞造成严重的损伤, 导致组织的活力降低.

对于第二组保护剂, 肿瘤组织在ES2浸泡时间1 min, VS2浸泡时间为1 min时, 组织活力为37.33%, 说明浸泡时间过短, 低温保护剂不能完全渗透至组织内部, 对组织在降温过程中进行保护. 肿瘤组织在平衡溶液ES2中浸泡时间相同时, 以3 min组为例, 随着在玻璃化溶液VS2中浸泡时

间的延长, 组织活力从在 VS2 平衡 1 min 时的 79.96% 降低为在 VS2 平衡 3 min 时的 62.29%, 说明组织与 VS2 接触时间过长, 毒性作用对组织内的细胞造成严重的损伤, 导致组织的活力降低. 对于在平衡溶液中浸泡 5 min、10 min 和 15 min 组, 也有组织活力降低趋势或无显著差异, 这与使用第一组保护剂时的情况相反, 说明随着溶液浓度的提高, 在玻璃化溶液中浸泡的时间应缩短. 此外, 肿瘤组织在玻璃化溶液 VS2 中浸泡时间相同时, 以 1 min 组为例, 随着在 ES2 中浸泡时间不断增加, 从 3 min 增加到 15 min, 复苏后组织的活力不断降低, 从在 ES2 溶液中浸泡 3 min 时的 79.96% 降低到在 ES2 溶液中浸泡 15 min 时的 34.14%. 在玻璃化溶液 VS2 中浸泡 3 min 组, 也有同样的趋势. 说明第二组保护剂浓度较高, 不适合在平衡溶液中加载时间过长.

综合上述讨论, 使用针浸法玻璃化保存的最佳保护剂加载方案为在 ES1 溶液浸泡 10 min, VS1 溶液浸泡 3 min, 复苏后组织相对活率为 77.56%, 或者在 ES2 溶液浸泡 3 min, VS2 溶液浸泡 1 min, 复苏后组织相对活率为 79.96%. 这与张源等^[19]将直肠癌肝转移活检穿刺组织样本加载玻璃化冻存液后浸于液氮玻璃化保存, 复苏后活细胞比例为 75.7% 的结果近似.

2.2 冻存管玻璃化保存肺癌组织的结果

将多块肿瘤组织在 ES2、VS2 溶液中浸泡不同时间后, 采用冻存管进行玻璃化冻存, 冻存管内装有不同体积 VS2 溶液, 复温后肿瘤组织相对活力如表 2 所示.

由表 2 可以看出, 在相同的保护剂加载方案情

Table 2 Relative vitality of lung cancer tissue after cryo-tube vitrification and rewarming

CPA loading protocols		Relative vitality to fresh group/%*
0.25 ml	1 min-1 min	(38.53 ± 7.67) ^c
	3 min-1 min	(80.44 ± 6.79) ^a
	5 min-1 min	(65.75 ± 7.67) ^b
0.5 ml	1 min-1 min	(47.53 ± 9.75) ^c
	3 min-1 min	(71.48 ± 8.10) ^{ab}
	5 min-1 min	(62.14 ± 13.72) ^b
1 ml	1 min-1 min	(44.56 ± 4.12) ^c
	3 min-1 min	(68.15 ± 8.59) ^{ab}
	5 min-1 min	(68.59 ± 7.77) ^{ab}

*indicates $\bar{x} \pm s$, and letters (a~c) indicate significant difference in Duncan's new complex range method ($P < 0.05$).

况下, 溶液体积量为 0.25 ml 时, 复苏后组织的相对活力好于溶液体积为 0.5 ml 和 1 ml 或没有显著差异. 这可能是由于溶液的玻璃化程度与溶液的体积和冷源温度有关, 在相同的冷源条件下, 溶液体积量越小, 溶液内部形成的玻璃化程度更高, 而溶液体积量过大, 会导致溶液玻璃化程度降低. 此外, 对比不同加载方案对于复苏后组织相对活力的影响, 可以发现不同保护剂体积情况下, 在 ES2 中浸泡 3 min、VS2 中浸泡 1 min 后, 进行低温保存复苏后组织相对新鲜组组织活力都较高. 这与针浸法玻璃化保存中所得到的最佳保护剂加载方案是一致的.

2.3 肿瘤组织冻存后的免疫组化结果

慢速冷冻、无保护剂快速冷冻、针灸针玻璃化冷冻、冻存管玻璃化冷冻复温后的肿瘤组织, HE 染色和 TUNEL 染色结果见图 2.

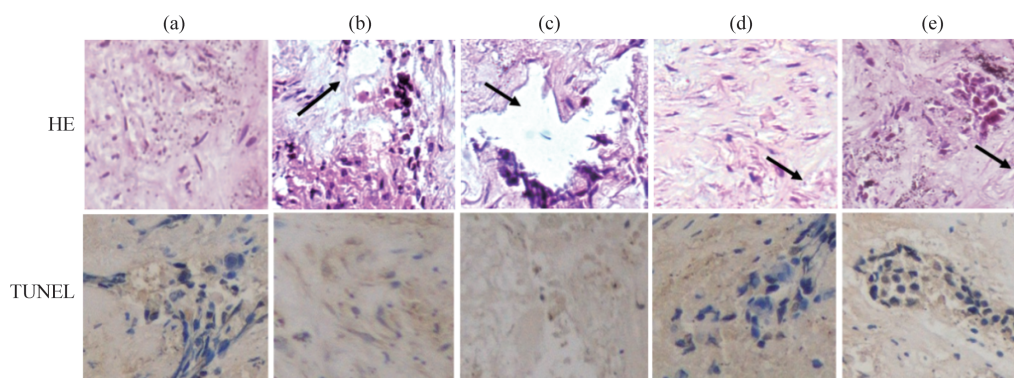


Fig. 2 Immunohistochemical results of fresh tissues and tissues cryopreserved by different freezing methods

(a) Fresh tissue; (b) Slow freezing group; (c) Rapid freezing without cryoprotectant group; (d) Needle immersion vitrification group; (e) Cryotube vitrification group. Arrows indicate the location of gaps in tissue morphology.

HE 染色中, 细胞核呈紫色, 细胞质呈粉红色, TUNEL 染色阳性细胞呈棕黄色、阴性细胞呈紫蓝色. 慢速冷冻组的组织形态相对较好, 但是细胞间形成少量裂缝, 可能是因为细胞间质中形成的冰晶使组织内细胞外部体积膨胀, 复温后留下较多空隙 (图 2b 组箭头). 同时可以发现产生裂缝处的细胞少量表达 TUNEL 阴性, 大部分细胞表达阳性, 即细胞发生凋亡, 说明慢速冷冻低温保存肿瘤组织, 组织内部可能由于保护剂渗透不充分, 降温阶段时出现结晶, 对组织内部结构和细胞进行破坏. 未添加低温保护剂快速冷冻组, 组织形态破坏严重, 内部出现大间隙 (图 2c 组箭头), 这是由于不添加任何保护剂, 组织内部在降温过程中形成较大冰晶, 大冰晶形成时, 导致组织结构从内部撕裂. TUNEL 结果显示, 组织内部几乎所有细胞表达阳性, 甚至

无细胞结构, 说明细胞受损严重, 且存在部分细胞膜结构遭到破坏. 然而使用针浸法玻璃化和冻存管玻璃化组, 可以发现组织结构都未受明显的破坏, 结构相对完整, 内部仅少量出现小裂缝 (图 2d、e 组箭头), 说明在降温过程中, 组织内部只有少量小而密的冰晶形成, 或无冰晶形成, 使得组织结构得到良好保存, 通过进一步 TUNEL 检测可以发现, 组织内部的细胞大多表达阴性, 只有少量细胞表达阳性, 即少量细胞凋亡. 以上结果说明使用玻璃化法低温保存组织优于慢速冷冻和无保护剂快速冷冻组.

2.4 肿瘤组织降温过程的低温显微结果

通过低温显微镜观察慢速冷冻、不加低温保护剂快速冷冻、玻璃化冷冻 3 种冷冻方法下肿瘤组织内及周围结晶情况 (图 3).

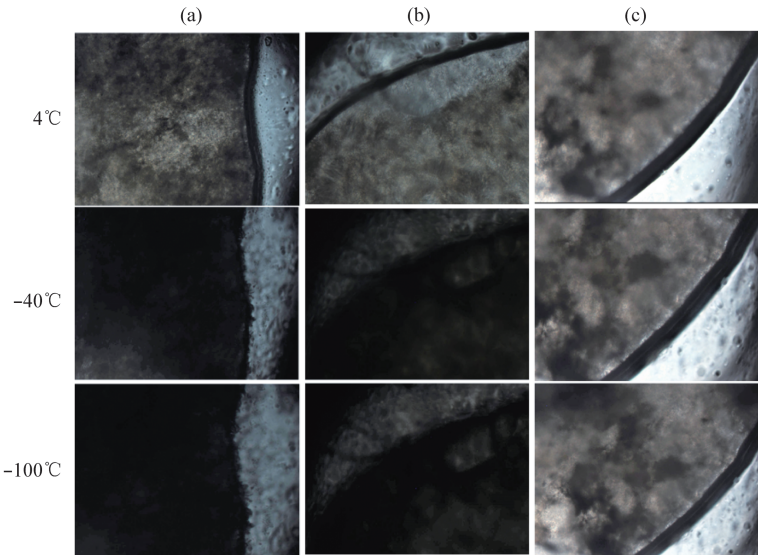


Fig. 3 Cromicroscopic images under different freezing methods

(a) Slow freezing group; (b) Fast freezing without cryoprotectant group; (c) Vitrification group.

可以发现, 10% DMSO 慢速冷冻组在降温过程中, 组织周围及内部出现冰晶, 但冰晶生长速度较为缓慢, 最终降温至 -100°C 时, 组织内完全冻结, 光镜下呈现黑色不透明状 (图 3a). 无保护剂直接浸入液氮快速冷冻组, 在降温过程中组织内部及周围都出现明显结晶, 且冰晶生长迅速, 最终温度降至 -100°C 时, 光镜下观察呈现黑色不透明状 (图 3b). 可观察到玻璃化组在降温过程中, 低温保护剂可有效地渗透至组织内部, 在组织内部及周围出现少量细小冰晶, 降温至 -100°C 时组织内部

仍然保持较高的透明度 (图 3c), 说明添加了高浓度保护剂直接浸入液氮的玻璃化保存方法在降温过程中有效地抑制了组织内部冰晶形成.

3 结 论

活体肿瘤组织保存对细胞生物学基础研究、组织形态学、疾病机制、药物的研发都具有重要的应用价值^[20]. 低温保存不仅能很好地保存肿瘤的活性及原始突变, 还可获得分子、细胞、组织及体内等多水平的全面肿瘤信息数据^[21]. 本文对活体肺

癌组织玻璃化方法进行了研究, 通过优化保护剂浓度及加载方案, 选择合适的冷冻载体, 提高低温保存后肺癌组织的活性. 结果证明针浸法和冻存管玻璃化冻存的肺癌组织, 复苏后组织活力高; 免疫组化和低温显微结果也证明针浸法和冻存管玻璃化冻存优于慢速冷冻和无保护剂快速冷冻. 研究结果也可以为其他肿瘤组织的玻璃化保存提供参考.

参 考 文 献

- [1] Naipal K A T, Verkaik N S, Sánchez H, *et al.* Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *Bmc Cancer*, 2016, **16**(1): 78-90
- [2] Egeblad M, Nakasone E S, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*, 2010, **18**(6): 884-901
- [3] Holliday D L, Moss M A, Pollock S, *et al.* The practicalities of using tissue slices as preclinical organotypic breast cancer models. *Journal of Clinical Pathology*, 2013, **66**(3): 253-255
- [4] 梁玮, 姚岚, 王欣, 等. 肿瘤组织样本库的现状 & 低温保存技术的应用//上海市制冷学会. 上海市制冷学会 2013 年学术年会论文集. 上海: 上海市制冷学会, 2013: 5
Liang W, Yao L, Wang X, *et al.* Status quo of tumor tissue sample bank and application of cryopreservation technology//Shanghai Refrigeration Society. Proceedings of 2013 Annual Conference of Shanghai Refrigeration Society. Shanghai: Shanghai Refrigeration Institute, 2013: 5
- [5] 赖红锦, 林锋, 陈楠, 等. 肺癌干细胞作为靶点的肺癌治疗策略研究进展. *中国肺癌杂志*, 2018, **21**(1): 57-62
Lai H J, Lin F, Chen N, *et al.* Chinese Journal of Lung Cancer, 2018, **21**(1): 57-62
- [6] 郑培永, 杨佳泓, 范锦立. 生物样本库. *科学(上海)*, 2014, **66**(3): 26-29
Zheng P Y, Yang J H, Fan J L. *Science(Shanghai)*, 2014, **66**(3): 26-29
- [7] 郑杰. 肿瘤的细胞和分子生物学. 北京: 军事医学科学出版社, 2014: 1-434
Zheng J. Cellular and molecular biology of tumor. BeiJing: Military Medical Science Press, 2014: 1-434
- [8] 梁玮, 王美霞, 刘宝林. 低温保存对生物样本及其生物大分子的影响. *中国生物医学工程学报*, 2017, **36**(5): 615-621
Liang W, Wang M X, Liu B L. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2017, **36**(5): 615-621
- [9] Sorio C, Bonora A, Orlandini S, *et al.* Successful xenografting of cryopreserved primary pancreatic cancers. *Virchows Arch*, 2001, **438**(2): 154-158
- [10] Alkema N G, Tomar T, Duiker E W, *et al.* Biobanking of patient and patient-derived xenograft ovarian tumour tissue: efficient preservation with low and high fetal calf serum based methods. *Sci Rep*, 2015, **5**: 14495
- [11] Gock M, Kühn F, Mullins C S, *et al.* Tumor take-rate optimization for colorectal carcinoma patient-derived xenograft models. *BioMed Res Int*, 2016, **2016**: 1715053
- [12] Murakami T, Igarashi K, Kawaguchi K, *et al.* Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R regresses an osteosarcoma in a patient-derived xenograft model resistant to a molecular-targeting drug. *Oncotarget*, 2016, **8**(5): 8035
- [13] Swick A D, Stein A P, McCulloch T M, *et al.* Defining the boundaries and expanding the utility of head and neck cancer patient derived xenografts. *Oral Oncology*, 2017, **64**: 65-72
- [14] Zeng M, Yang Q R, Fu G B, *et al.* Maintaining viability and characteristics of cholangiocarcinoma tissue by vitrification-based cryopreservation. *Cryobiology*, 2017, **78**: 41-46
- [15] Xiao Z, Wang Y, Li L, *et al.* Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril*, 2010, **94**(6): 2323-2328
- [16] Klocke S, Bündgen N, Köster F, *et al.* Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Archives of Gynecology & Obstetrics*, 2015, **291**(2): 419-426
- [17] Von B A, Elsässer A, Ritschl L M, *et al.* Cryopreservation of endothelial cells in various cryoprotective agents and mediavitrification versus slow freezing methods. *PLoS One*, 2016, **11**(2): e0149660
- [18] Zhang Q, Zhao G, Liu Y, *et al.* Progress and applications of minimum volume vitrification in biomedicine. *Scientia Sinica Vitae*, 2018, **49**(1): 41-58
- [19] 张源, 杨秋蕊, 张洪丹, 等. 新型玻璃化冻存技术在活肿瘤组织样本库建设中的应用. *中国组织工程研究*, 2018, **22**(4): 587-592
Zhang Y, Yang Q R, Zhang H D, *et al.* Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2018, **22**(4): 587-592
- [20] Kolenda T, Kapalczyńska M, Przybyła W, *et al.* 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science Ams*, 2018, **14**(4): 910-919
- [21] 赵佐舜, 刘宝林. 低温保存技术在生物样本库中的应用. *制冷技术*, 2020, **40**(1): 66-71
Zhao Z S, Liu B L. Chinese Journal of Refrigeration Technology, 2020, **40**(1): 66-71

Study on Vitrification of Living Lung Cancer Tissue*

LI Jia-Hui¹⁾, DU Yu-Kun¹⁾, YU Ke-Ke²⁾, XING Jie²⁾, ZHOU Xin-Li^{1)**}

¹⁾Institute of Biothermal Science, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

²⁾Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract Preservation of living lung cancer tissues will provide more complete sample information for *in vitro* experimental studies, such as lung cancer genetic screening and targeted drug screening. This article studied the vitrification method of living lung cancer tissue. Firstly, the needle immersion method was used to vitrify a single piece of lung cancer tissue, and the concentration and equilibrium time of the required cryoprotectant were optimized. Secondly, multiple lung cancer tissues were vitrified in cryotubes, and the volume of cryoprotectant solution and equilibrium time were optimized. Finally, the effects of the traditional slow freezing, rapid freezing without cryoprotectant, and vitrification methods were compared, and low-temperature microscope was used to analyze the damage mechanism of ice crystal. The results showed when 20% EG+20% DMSO+0.5 mol/L trehalose was used as the cryoprotectant, the equilibration solution and the vitrification solution are loaded for 3 min and 1 min, respectively, the needle immersion method and vitrification in a 0.25 ml cryotube have the highest tissue viability (79.96% and 80.44%) after recovery. Immunohistochemistry showed that the tissue structure of lung cancer after vitrification was less damaged, only a few positive expression of TUNEL in the cells, compared with slow freezing and fast freezing without cryoprotectants. Low-temperature microscopy showed that only a few small ice crystals appeared in and around the vitrified tissue, while obvious ice crystals appeared in slow freezing and rapid freezing.

Key words lung cancer tissue, vitrification, CPA loading, cryocarrier

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0009

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (51376132).

** Corresponding author.

Tel: 86-21-55270218, E-mail: zjulily@163.com

Received: January 12, 2021 Accepted: March 9, 2021