

海藻糖对生物人工肝用人永生化肝细胞系C3A细胞低温的保存**

秦佳升¹, 高毅¹, 潘明新¹, 汪艳², 蒋泽生¹, 麦燕兴³

Trehalose in C3A hepatocytes hypothermic preservation

Qin Jia-sheng¹, Gao Yi¹, Pan Ming-xin¹, Wang Yan², Jiang Ze-sheng¹, Mai Yan-xing³

Abstract

BACKGROUND: With the application of bioartificial liver in clinic, a convenient, effective, practical protection of bioreactor loaded cell viability and function method, and the design of proprietary bioartificial liver cells with hypothermic protective solution are urgently needed.

OBJECTIVE: To verify the effect of trehalose as cryoprotectant in 4 °C C3A hepatocytes hypothermic preservation.

METHODS: C3A hepatocytes were preserved in different hypothermic preservation solution for 24, 48 and 72 hours at 4 °C. The following preservation solutions were tested: 1) Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 2) Lactated Ringer's solution, 3) Lactated Ringer's solution with different concentration of trehalose, 4) University of Wisconsin (UW) solution. The viability of hypothermic preserved C3A hepatocytes, index of cellular damage, oxygen-derived free radicals metabolic capacity of hypothermic preserved C3A hepatocytes after warm-reperfusion, and the apoptosis was observed by dual fluorescent staining method.

RESULTS AND CONCLUSION: The viability of hypothermic preserved C3A hepatocytes, index of cellular damage, and apoptosis were different in different groups. The indexes in Lactated Ringer's solution with different concentration of trehalose were significantly better than Lactated Ringer's solution, but inferior to UW solution ($P < 0.01$). Such parameters in Lactated Ringer's solution with different concentration of trehalose and UW solution were no significant difference with Lactated Ringer's solution ($P > 0.05$). Trehalose in C3A hepatocytes hypothermic preservation can effectively lessen hepatocytes apoptosis and depressed the extent of ischemia-reperfusion injury, thus, trehalose is the effective and important component in hypothermic preservation solution.

Qin JS, Gao Y, Pan MX, Wang Y, Jiang ZS, Mai YX. Trehalose in C3A hepatocytes hypothermic preservation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(8):1405-1408. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

¹Second Department of Hepatobiliary, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China; ²Institute of Regenerative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China; ³Department of Geriatrics, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Qin Jia-sheng★, Studying for master's degree, Second Department of Hepatobiliary, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China qinchao1313@163.com

Correspondence to: Gao Yi, Professor, Doctoral supervisor, Second Department of Hepatobiliary, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China gaoyi6146@163.com

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02A141*

Received: 2010-12-01 Accepted: 2011-01-13

摘要

背景: 随着生物人工肝在临床上的应用, 需要有一种方便、有效、实用的保护生物反应器装载细胞活力及功能的方法, 设计有自主知识产权的生物人工肝用肝细胞的低温保护液迫在眉睫。

目的: 验证海藻糖作为低温保护剂在4 °C低温保存肝细胞的作用。

方法: 采用C3A人永生化肝细胞系在不同低温保存液(DMEM培养液, 乳酸钠林格氏液, 加有不同浓度海藻糖的乳酸钠林格氏液, UW液)4 °C保存24, 48, 72 h。复苏后行细胞活力、细胞损伤指标、氧自由基代谢相关指标等检测, 并通过荧光双染法观察细胞凋亡情况。

结果与结论: 不同低温保存液保存不同时间C3A细胞的活力、细胞损伤及细胞凋亡表现均有所不同, 其中同时间点不同浓度海藻糖组均优于单用乳酸钠林格氏液组, 但不如UW液组($P < 0.01$)。而保存24 h的不同浓度海藻糖组及UW液组与乳酸钠林格氏液组相比差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示海藻糖能有效减轻低温对肝细胞凋亡及缺血再灌注损伤的程度, 可成为低温保存液中有效及重要的保护剂组分。

关键词: 生物人工肝; 肝细胞; 低温保存; 海藻糖; UW液

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.08.018

秦佳升, 高毅, 潘明新, 汪艳, 蒋泽生, 麦燕兴. 海藻糖对生物人工肝用人永生化肝细胞系C3A细胞低温的保存[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1405-1408. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

生物人工肝支持系统和肝细胞移植在大量动物实验和一些临床实验中获得良好效果, 成为有前途的肝病治疗途径。随着其临床研究的不断深入, 迫切需要有效的细胞保存方法以促进生物人工肝和肝细胞移植在临床上的应用。

4 °C是器官及大规模细胞群的标准保存温度^[1-2], 而在4 °C保存过程中肝细胞损伤主要是低温损伤及复温再损伤, 类似于器官移植过程中的缺血再灌注损伤。实验尝试以海藻糖作为低温保护

剂成分在4 °C条件下对生物人工肝用人永生化肝细胞系C3A细胞行低温保存, 并从形态学和生物学性状方面进行比较, 以期验证海藻糖是否能作为生物人工肝用肝细胞4 °C低温保存液的有效组分。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计, 对比观察。

时间及地点: 实验于2009-01/2010-03在珠江医院肝胆二科再生医学研究所完成。

材料: 人永生化肝细胞系 C3A 细胞由课题

¹南方医科大学珠江医院肝胆二科, 广东省广州市510282; ²南方医科大学再生医学研究所, 广东省广州市510282; ³南方医科大学珠江医院老年医学科, 广东省广州市510282

秦佳升★, 男, 1980年生, 汉族, 广东省普宁市人, 在读硕士, 主要从事肝胆外科疾病及肝移植、生物人工肝方面的研究。qinchao1313@163.com

通讯作者: 高毅, 教授, 博士生导师, 南方医科大学珠江医院肝胆二科主任, 南方医科大学再生医学研究所所长, 广东省广州市510282。gaoyi6146@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)08-01405-04

收稿日期: 2010-12-01
修回日期: 2011-01-13
(20101201009/WL·L)

组购自美国标准生物品收藏中心(ATCC)。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
D-海藻糖、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)	美国 Sigma 公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	杭州四季青
乳酸钠林格注射液	浙江济民制药有限公司
丙二醛测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
CO ₂ 培养箱	德国 Heraeus 公司
倒置光学显微镜	日本 OLYMPUS 公司
台式高速冷冻离心机	美国 UNIVERSAL
超净工作台	上海净化设备厂
荧光显微镜	德国 Leica Dmil

实验方法:

细胞培养: 人永生代肝细胞系C3A细胞以DMEM与体积分数为10%胎牛血清作为基础培养基, 加入青霉素、链霉素各100 U/mL在37 °C, 体积分数为5%CO₂恒湿条件下培养。

实验分组: I组: 即对照组, 常规培养C3A细胞不经低温保存; 按保护液不同分6组, II组: DMEM培养基; III组: 乳酸钠林格氏液(RL); IV组: RL+0.1 mol/L海藻糖; V组: RL+0.15 mol/L海藻糖; VI组: RL+0.2 mol/L海藻糖; VII组: UW液。

肝细胞的低温保存及复苏: C3A细胞经0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 以3×10⁵个细胞接种于6孔培养板中常规培养48 h, 允许细胞贴壁生长。将细胞培养液弃去, 用预先冷却至4 °C的PBS涮洗细胞2次, 分别加入2 mL预先冷却至4 °C的各組保护液, 封口膜封口保持气密性, 快速置于4 °C冰箱中, 保存24, 48, 72 h后, 从4 °C冰箱中取出快速置入37 °C水浴锅中水浴复温15 min, 留取保护液待检。

指标检测:

MTT比色法检测细胞复苏后活力: 将1×10⁴个C3A细胞接种入96孔板中, 培养48 h弃去培养基, 漂洗, 分别加入各組保护液行低温保存后, 加入4 g/L的MTT液, 继续培养2 h, 吸出培养基, 加入DMSO液, 室温下振荡10 min, 酶标仪检测各孔吸光度(A)值(λ=570 nm)。

肝细胞保存液谷草转氨酶检测: 复苏后各实验组上清液在杜邦全自动生化分析仪中检测谷草转氨酶。

氧自由基代谢相关指标检测丙二醛含量: 丙二醛含量测定采用硫代巴比妥比色法。

凋亡定性观察: C3A细胞低温保存不同时间后加入吖啶橙(AO)染液, 终浓度5 mg/L, 37 °C, 避光染色10 min, 继续加入碘化丙啶(PI)染液,

终浓度5 mg/L, 避光反应10 min, 1 h内置荧光显微镜下观察活细胞凋亡情况并摄片。

主要观察指标: 不同保存液组低温保存后细胞活力、谷草转氨酶、丙二醛的变化。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各組低温保存不同时间后细胞活力MTT比色结果 见表1。

Group	0 h	24 h	48 h	72 h
Control	0.40±0.02			
Dullbecco's modified Eagle's medium		0.03±0.01	0.01±0.00	0.00±0.00
Lactated Ringer's solution		0.13±0.03	0.08±0.01	0.01±0.00
0.1 mol/L trehalose		0.22±0.02 ^{ab}	0.15±0.03 ^{ab}	0.13±0.02 ^{ab}
0.15 mol/L trehalose		0.24±0.03 ^{ab}	0.17±0.01 ^{ab}	0.13±0.02 ^{ab}
0.2 mol/L trehalose		0.18±0.03 ^{ab}	0.13±0.02 ^{ab}	0.10±0.01 ^{ab}
University of Wisconsin solution		0.37±0.03	0.34±0.03	0.21±0.16

^a $P < 0.01$, vs. Lactated Ringer's solution group; ^b $P < 0.01$, vs. University of Wisconsin solution group

保存24~72 h不同浓度海藻糖组与乳酸钠林格氏液组相比细胞活力明显优于后者($P < 0.01$), 其中以0.15 mol/L浓度组较优。但不同浓度海藻糖组同UW液组比较仍有差距($P < 0.01$)。

2.2 C3A人肝细胞各組低温保存不同时间细胞上清谷草转氨酶变化 见表2。

保存24 h的不同浓度海藻糖组及UW液组与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$), 乳酸钠林格氏液组与不同浓度海藻糖组比较, 其中0.15 mol/L浓度组优于前者($P < 0.01$)。随着保存时间的延长, 至48~72 h, 不同浓度海藻糖组结果均明显优于乳酸钠林格氏液组($P < 0.01$)。除对照组外, UW液组同一时间点与其他各組差异均有显著性意义($P < 0.01$)。

表2 各组低温保存不同时间细胞上清谷草转氨酶变化结果
Table 2 Changes in aspartate aminotransferase levels at different time points in different concentration trehalose treated groups and control group ($\bar{x} \pm s$, nkat/L)

Group	0 h	24 h
Control	30.46±13.00	
Dullbecco's modified Eagle's medium		425.62±103.89 ^b
Lactated Ringer's solution		76.07±12.02 ^b
0.1 mol/L trehalose		54.18±8.42 ^b
0.15 mol/L trehalose g		42.64±7.13 ^{ab}
0.2 mol/L trehalose		61.76±7.22 ^b
University of Wisconsin solution		42.51±10.04

Group	48 h	72 h
Control		
Dullbecco's modified Eagle's medium	1 152.35±76.43 ^b	1 277.37±98.34 ^b
Lactated Ringer's solution	261.27±13.50 ^b	1 099.84±64.05 ^b
0.1 mol/L trehalose	133.69±16.15 ^{ab}	232.21±12.14 ^{ab}
0.15 mol/L trehalose	117.14±9.81 ^{ab}	223.16±21.80 ^{ab}
0.2 mol/L trehalose	137.66±17.94 ^{ab}	229.71±28.02 ^{ab}
University of Wisconsin solution	59.45±11.17	38.21±6.52

^a $P < 0.01$, vs. Lactated Ringer's solution group; ^b $P < 0.01$, vs. University of Wisconsin solution group

2.3 各组低温保存不同时间氧自由基代谢相关指标丙二醛含量变化 见表3。

表3 各组低温保存不同时间丙二醛含量变化
Table 3 Changes in malonaldehyde levels at different time points in different concentration trehalose treated groups and control group ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/g}$)

Group	0 h	24 h
Control	4.83±1.33	
Dullbecco's modified Eagle's medium		29.86±1.30 ^a
Lactated Ringer's solution		22.81±1.54 ^a
0.1 mol/L trehalose		12.67±1.66 ^{ab}
0.15 mol/L trehalose		12.92±2.03 ^{ab}
0.2 mol/L trehalose		14.92±1.98 ^{ab}
University of Wisconsin solution		7.71±1.50 ^a

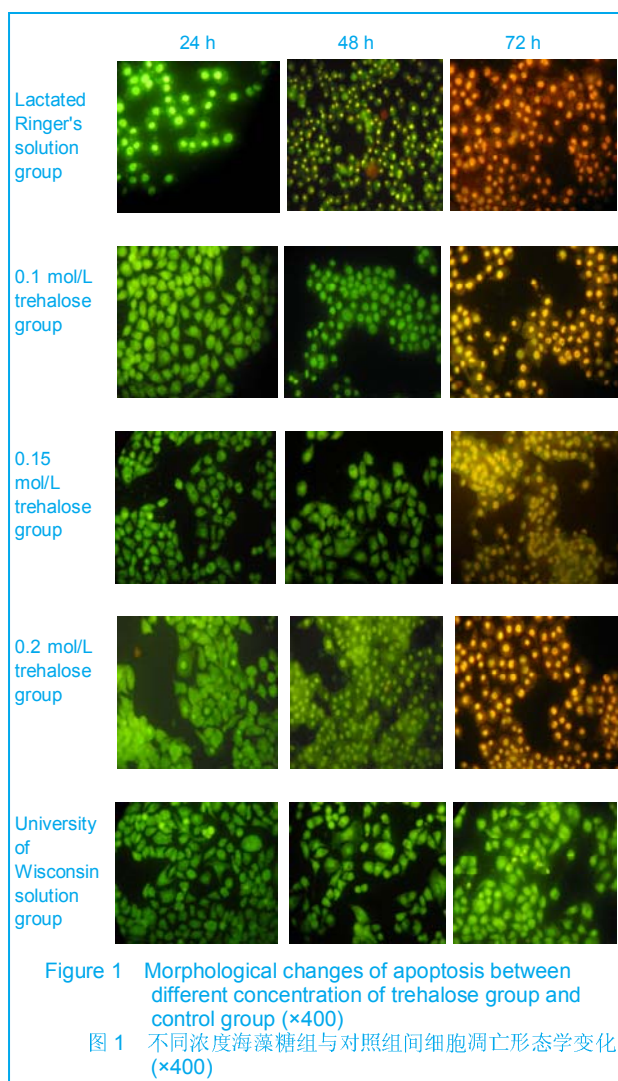
Group	48 h	72 h
Control		
Dullbecco's modified Eagle's medium	33.93±2.09 ^a	33.78±2.19 ^{bc}
Lactated Ringer's solution	30.54±2.61 ^a	34.44±2.10 ^{bc}
0.1 mol/L trehalose	22.71±2.22 ^{ab}	33.44±1.70 ^{bc}
0.15 mol/L trehalose	23.72±2.90 ^{ab}	33.25±2.44 ^{bc}
0.2 mol/L trehalose	24.18±2.46 ^{ab}	33.71±2.26 ^{bc}
University of Wisconsin solution	11.01±1.92 ^a	14.21±2.23 ^a

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. Lactated Ringer's solution group; ^c $P < 0.01$, vs. University of Wisconsin solution groups

保存24~72 h的各实验组中丙二醛含量均较对照组明显升高($P < 0.01$); 保存24~48 h乳酸钠林格氏液组与不同浓度海藻糖组比较升高明显($P < 0.01$); 保存72 h后各实验组丙二醛含量均明显升高, 除对照组及UW液组外各组差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.4 低温保存不同时间肝细胞形态学改变及细胞凋亡光镜下观察低温保存8 h后DMEM组及乳酸钠林格氏液组肝细胞均已出现细胞肿胀变圆, 细胞间隙增宽。24 h

后见细胞开始脱落坏死, 锥虫蓝染色见大片蓝染细胞。保存24 h后不同浓度海藻糖组及UW液组细胞间隙同样出现增宽, 但细胞却以皱缩为主。吖啶橙/碘化丙啶双染结果可见, 乳酸钠林格氏液组在保存24 h后即见较多细胞凋亡, 胞核固缩状、呈增强的、明亮的绿色荧光, 并随着时间的延长, 胞核呈固缩状、团块状结构, 甚至呈现出“黄”色。48, 72 h可见坏死或晚期凋亡, 核为较大的圆形结构着橘红色, 或橘红色并呈固缩状或圆珠状。而不同浓度海藻糖组在保存24 h及48 h中同样观察到细胞凋亡现象, 在同时间点与乳酸钠林格氏液组比较明显优于后者, 见图1。



3 讨论

猪肝细胞作为生物反应器装载细胞经深低温冻存-复苏后细胞存活率及肝细胞特有功能均明显下降, 显著限制了人工肝的治疗效果^[2-7]。因此, 装载细胞扩增完成后, 在长距离运输过程中或短时间保存(0~3 d)需要有一种方便、有效、实用的保护装载细胞活力及功能的方法。

Belzer等^[6]根据低温下器官的各种病理生理特点, 提

出了一种有效的器官低温保护液的成分, 必须具备以下5个特点: ①减少因低温导致的细胞水肿。②防止细胞的酸化作用。③防止灌洗过程中细胞间隙的肿胀。④防止氧自由基的损伤, 尤其在再灌注过程中。⑤提供再生高能磷酸化合物的底物。⑥保持细胞内环境稳定。UW液是目前世界范围内应用最为广泛且有效的一种多器官灌注保存液^[8-10], 但是它仍然有许多不足, 它的高渗性引起细胞皱缩、高粘滞性影响原位灌注、高钾不符合生理、缺乏保护肝脏低温保存的药物、价格昂贵。随着生物人工肝支持系统及器官移植在中国迅速开展, 促使器官移植工作者寻找一种高效、性价比更高且符合中国国情的细胞/器官保护液。

海藻糖具有稳定细胞膜和蛋白质结构的作用, 在病毒、抗体、脂质、酶和卵细胞等生物活性物质的疫苗保存以及食品、药品添加剂等方面已有广泛的应用^[11-18]。由于它是一种安全无毒、无不良反应, 并且对人体无潜在危害的物质, 尤其近年来在器官组织保存中的成功应用, 取得令人振奋的效果^[17-20]。在添加了海藻糖冻存液对人原代肝细胞的深低温保护已取得较好的结果^[21], 但是否同样对肝细胞在低温(0~4 °C)保存中有保护作用尚未见报道。为探讨海藻糖对生物人工肝用人永生代肝细胞系 C3A 在4 °C 条件下是否有保护性作用, 实验将 C3A 细胞用添加海藻糖的乳酸钠林格氏液 4 °C 条件保存 24, 48, 72 h, 观察海藻糖对 C3A 细胞的保护作用, 结果显示: 细胞经添加了不同浓度海藻糖保存后, 细胞复苏后细胞活力、肝功能损伤指标及反映低温后的缺血再灌注损伤程度的脂质过氧化物代谢指标均较对照组明显减轻。同时采用 AO/PI 对低温保存后细胞凋亡情况进行研究, 结果显示: 对照组乳酸钠林格氏液组在保存 24 h 后即明显见肝细胞在低温状态下出现凋亡, 胞核呈固缩状、团块状结构, 呈增强的、明亮的绿色荧光, 甚至呈现出“黄色”。随着保存时间的延长细胞见大量坏死或晚期凋亡, 核为较大的圆形结构着橘红色, 或橘红色并呈固缩状或圆珠状。而海藻糖实验组在保存 24, 48 h 后凋亡细胞明显较对照组少, 这表明海藻糖能有效减轻低温对肝细胞凋亡及缺血再灌注损伤的程度。同时根据对不同浓度间的比较, 观察到 0.15 mol/L 海藻糖组优于其他两组。

实验结果表明, 海藻糖作为低温保护剂在生物人工肝用人永生代肝细胞系 C3A 细胞 4 °C 保存具有较好的保护作用。在低温保存过程中海藻糖稳定了肝细胞膜减少了肝内特异性酶的释放, 提高了复苏后细胞活力, 同时明显抑制低温导致的细胞凋亡。但形成一个完整的器官或细胞保存液还要考虑到保存液不同组分浓度的配比问题, 及其因组分相互影响而出现的 pH 值、渗透压、黏滞度等变化的问题, 这些都是后续研究需要解决的问题。

4 参考文献

[1] Meng Q. Hypothermic preservation of hepatocytes. *Biotechnol Prog*. 2003;19(4):1118-1127.

[2] St Peter SD, Imber CJ, Friend PJ. Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet*. 2002;359(9306):604-613.

[3] Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, et al. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact*. 1999; 121(1):7-16.

[4] Swales NJ, Luong C, Caldwell J. Cryopreservation of rat and mouse hepatocytes. I. Comparative viability studies. *Drug Metab Dispos*. 1996; 24(11):1218-1223.

[5] Rubinsky B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev*. 2003;8(3):277-284.

[6] Zhang Z, Wang FS. *Zhonghua Yixue Zazhi*. 2003;83(10):890-893. 张政, 王福生. 肝脏细胞移植的基础与应用研究现状与展望[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(10): 890-893.

[7] Zhang XJ, Sun JB, Sun HC, et al. *Zhonghua Gandan Waiké Zazhi*. 2003;9(2):107-109. 张先杰, 孙家邦, 孙海晨, 等. 低温条件下肝细胞研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(2): 107-109.

[8] Olinga P, Merema M, Slooff MJ, et al. Influence of 48 hours of cold storage in University of Wisconsin organ preservation solution on metabolic capacity of rat hepatocytes. *J Hepatol*. 1997;27(4): 738-743.

[9] Sumimoto R, Jamieson NV, Kamada N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW sol. *Transplantation*. 1990;50(4):573-576.

[10] Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, et al. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation*. 1991;51(3): 589-593.

[11] Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, et al. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*. 2001;43(2):89-105.

[12] Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril*. 2002; 77(1):152-158.

[13] Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. Supplementation of conventional freezing medium with a combination of catalase and trehalose results in better protection of surface molecules and functionality of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003;12(5):553-564.

[14] Omasa M, Hasegawa S, Bando T, et al. Application of ET-Kyoto solution in clinical lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2004; 77(1):338-339.

[15] Yoshida H, Okuno H, Kamoto T, et al. Comparison of the effectiveness of ET-Kyoto with Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in cold renal storage. *Transplantation*. 2002; 74(9):1231-1236.

[16] Crowe JH, Tablin F, Wolkers WF, et al. Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. *Chem Phys Lipids*. 2003;122(1-2):41-52.

[17] Beattie GM, Crowe JH, Lopez AD, et al. Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. *Diabetes*. 1997;46(3):519-523.

[18] Lliou Z, Nakamura T, Webb M, et al. Comparison of University of Wisconsin and ET-Kyoto preservation solutions for the cryopreservation of primary human hepatocytes. *Transplant Proc*. 2008;40(5):1706-1709.

[19] He H, Liu BL, Hua ZZ, et al. Intracellular trehalose improves the survival of human red blood cells by freeze-drying. *Cryobiology*. 2007;55(3):336-337.

[20] Ren YS, Yue WB, Tian YL, et al. Effects of trehalose in semen diluents on function and membrane integrity of goats spermatozoa. *Acta Laser Biol Sinica*. 2007;16(3):293-298.

[21] Katzen E, Vondran FW, Schwartlander R, et al. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver Transpl*. 2007;13(1):38-45.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA02A141)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为第一、五作者, 实验评估为第一、二作者, 资料收集及成文为第一作者, 第二、三、四作者审核, 第一、二作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: 在添加了海藻糖冻存液对人原代肝细胞的深低温保护已有报道, 但是否同样对肝细胞在低温(0~4 °C)短时间保存有保护作用尚未见报道。实验选用非渗透性保护剂海藻糖, 起到对细胞膜的保护作用, 稳定细胞膜, 减轻低温状态下细胞水肿。