

# 基于绿色冷冻保护剂的微小生命活体生物冷冻保存机理和研究

李亚洲<sup>1</sup>, 饶伟<sup>1,\*</sup>, 刘静<sup>1</sup>

(中国科学院理化技术研究所, 北京, 100080)

(Tel:010-82543719, Email:weirao@mail.ipc.ac.cn)

**摘要:** 生命活体的冷冻保存一直是低温生物界着力追求的目标。通过人为实验干预的手段和方法, 对微小生命活体实施低温驯化和饲喂低温冷冻保护剂, 突破生命体本身的生理极限, 提升其抗冻能力, 将为低温长期保存组织、器官及更加复杂的高级生命体的研究提供重要启示。本文首先利用差示扫描量热仪法对冷冻保护剂进行筛选, 确定了以脯氨酸为本次实验用冷冻保护剂。接着以非耐寒小动物日本弓背蚁为研究对象, 详细探究了冷冻时间、降温速率、冷却最低温度、复温温度等因素对蚂蚁存活率的影响, 提出合理的冷冻方案。在此研究的基础上, 进一步通过喂饲蚂蚁添加不同浓度脯氨酸的饲料, 对蚂蚁进行冷冻—复活实验。最后结合热分析技术、质谱分析等方法, 细致的研究了蚂蚁冷冻耐受的热响应, 明确了喂饲冷冻保护剂后蚂蚁体内冷冻物质变化规律及对其体内含水量的影响。结果表明: 理想的降温条件及复温温度有助于提高蚂蚁的冷冻复活率, 同时证明脯氨酸大大提升了蚂蚁的低温抗冻性。该研究为长期低温保存复杂生命体提供了重要技术支持和理论基础。

**关键词:** 冷冻保存 脯氨酸 差示扫描量热 质谱分析 热分析

## Cryopreservation Study of Living Creatures Based on Feeding Green Cryoprotectant

Yazhou Li, Wei Rao<sup>\*</sup>, Jing Liu

(Technical Institute of Physics and Chemistry CAS, Beijing, 100080)

**Abstract** The cryopreservation of living creatures is always the goal of cryobiology. By means of man-made experimental interventions and methods, the cryogenic domestication and feeding of cryogenic cryoprotectants to micro-living creatures, which broke through physiological limits of living creatures, enhanced antifreeze capacity, and will significantly enlighten the studies of long-term low temperature preservation of tissues, organs and more advanced living creatures. First of all, this paper screened cryoprotectants by differential scanning calorimetry and determined proline as the cryoprotectant for this experiment. Afterwards, by taking non-cold-resistant small animal Japanese *Camponotus leonardi* as the research objects, the influences of freezing time, cooling rate, minimum cooling temperature and re-warming temperature on the survival rate of ants was explored, so as to put forward reasonable freezing solutions. Based on this study, the freeze-revival experiment on ants was further carried out via feeding different concentrations of proline. Finally, combined with thermoanalysis techniques and mass spectrometry, ants' thermal response to freezing tolerance was studied specifically. In this way, the change law of freezing matters inside ants and corresponding effect on body water contents after feeding cryoprotectants were clarified. According to the results, ideal cooling condition and re-warming temperature are conducive to enhancing ants' freeze-revival rate, and proline is proved to greatly improve ants' freezing resistance. This study provides significant technical support and theoretical basis for long-term cryopreservation of complex living creatures.

**Keywords:** Cryopreservation, Proline, Differential scanning calorimetry, Mass spectrometry, Thermoanalysis

<sup>1</sup>\*基金项目: 国家自然科学基金 No. 51605472。

作者简介: 李亚洲, (1996-), 男, 大四本科生(推荐免试硕士研究生), 能源与动力工程专业。

## 0 前言

临床实践已经表明,低温冷冻保存技术是目前生物材料长期保存的唯一可行途径。该技术是用来研究冷冻保存过程中细胞、组织或是生物体的低温损伤规律(尤其是细胞内、外水在冷冻过程中的结晶现象<sup>[1,2]</sup>)的一门学科。自1949年C. Polge等人<sup>[3]</sup>发现精子可以在甘油溶液中冻存而不死亡到至今,经过半个多世纪的研究探索,低温保存技术已经取得了长足进展。在20世纪60年代到80年代,人类已经实现了血液、牛羊胚胎、胰岛细胞的冷冻保存<sup>[4]</sup>。现如今,研究人员已经成功实现了对绝大多数细胞,如精子、卵母细胞、人骨髓间充质干细胞、肝细胞等的长期冻存,在复杂组织器官如皮肤、角膜、卵巢、肝脏、肾脏等的短时冻存也取得了进展<sup>[5-10]</sup>,极大促进了现代临床医学的发展<sup>[1,11]</sup>。

尽管低温保存技术已经取得了很大进步,并已在食品科学、医学、生物学等诸多领域得以广泛应用,然而,当前对复杂细胞、组织、器官乃至活体生命在深低温作用下损伤机制的认识及技术存在严重不足,使得在攻克构成更复杂的生物对象的低温保存上面临重大挑战。现代最先进的低温冷冻保存技术即使对稍显复杂的细胞的冷冻保存尚难以确保百分之百成功率,更无法成功实现对非耐寒微小生命比如蚂蚁的冷冻保存。然而在自然界中,存在着许多可以在低温环境下生存的生命现象,例如在寒冷环境中,南极线虫可以在体内82%的水分冻结的情况下,复温后仍保持生命活性<sup>[12]</sup>;阿拉斯加木蛙可以在-4℃下忍受2个月的冷冻期<sup>[13]</sup>。近几年,研究人员通过给北极地区 *Chymomyza costata* 幼虫及以及热带地区冷敏感的 *Drosophila melanogaster* 幼虫喂食添加了脯氨酸的食物,增强其体内脯氨酸的含量后再进行冷冻保存实验,结果显示,两者均可以在低温环境下冷冻,并在复温后继续生存甚至留下正常后代<sup>[14,15]</sup>。由此我们可以知道,从仿生学角度出发,对自然界中能忍受低温冻结的生命现象的生物学机制进行研究,以探索生命活体的低温保存方法,将为今后组织、器官乃至人体的低温冷冻保存提供重要参考。

将低温保护剂进行活体加载,人为加强低温保护剂在生命体中的参与活动,在进行冷冻保存的概念早在十几年前便有研究人员提出。低温保护剂(CPAs)是指用来帮助保护细胞免受低温伤害的物质,它可以通过减少零下温度下冰的形成来减少细胞脱水,在一定程度上保护生物材料不受低温的致死损伤。目前,已经有不同的冷冻保护剂被验证可以用于动物细胞的冷冻保存,常见的低温保护剂有二甲基亚砜(DMSO)、蔗糖、海藻糖和脯氨酸等。其中,DMSO 虽是目前最常用的低温保护剂,但其较高的毒性使得人们不得不转向其他绿色冷冻保护剂的探索和研发<sup>[16]</sup>。在各类探索过程中,研究人员逐渐注意到,多糖类和氨基酸类低温保护剂由于较好的生物相容性使其在冷冻保存中获得较大的关注。蔗糖和海藻糖均属于多糖类非渗透型低温保护剂,可以增大细胞外液粘度。其中海藻糖可以形成氢键促进生物大分子的水合作用,使细胞在失水状态下仍可保持形态及功能。在低温保存过程中,它们通过增加细胞外液粘度和渗透压,促使细胞脱水并减少细胞内冰晶形成。在解冻复温过程中,由于使增大了细胞外液粘性而阻止了水分快速渗入细胞内部,避免细胞的渗透性休克。而脯氨酸为氨基酸类渗透型低温保护剂,能够降低冰点,防止细胞脱水,同时它可以稳定生物大分子结构,降低细胞酸性,调节细胞氧化还原电位。在脯氨酸的冷冻保存研究方面,最早的尝试出现在1979年,Withers和King利用10%(w/v)的脯氨酸溶液成功的保存了玉米细胞<sup>[17]</sup>。接着1997年, Sanchez-Partida等人利用浓度为27mM的脯氨酸溶液成功保存了山羊的精子<sup>[18]</sup>。2011年, Freimark等人利用1%(w/v)的脯氨酸配合10%(w/v)的依克多因(ectoin)成功保存了人类干细胞<sup>[19]</sup>。同年, Košťál等人对于两种果蝇耐寒性的研究直接证明了脯氨酸可以作为一种低温保护剂来使用<sup>[14,15]</sup>。2012年, Huan Sun的研究表明,脯氨酸的添加使人类内皮细胞冷冻保存液中DMSO的浓度从10%降低至2.5%<sup>[20]</sup>。2014年,姚丹静等研究了脯氨酸对杉木胚性愈冷冻过程的影响,发现脯氨酸浓度为0.5g/L时,细胞存活率相对最高<sup>[21]</sup>。2016年, Lu Zhang等人<sup>[22]</sup>发现脯氨酸能保护线粒体功能,提高玻璃化冷冻保存卵母细胞的复活率,可作为新型低温保护剂用于小鼠卵母细胞玻璃化冷冻保存中。

本文利用人为干预的手段对蚂蚁进行冷冻保护剂的活体加载。通过喂食蚂蚁添加了不同浓度的低温保护

剂脯氨酸，人为的增加其体内脯氨酸含量，之后再对其实施低温冻存测试。通过系列冻存实验，摸索较为合理的冷冻和复温方案，并优化了蚂蚁的驯饲条件。这些重要的实验发现，将为复杂生命体的低温保存提供重要的启示。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

昆虫：日本弓背蚁，人工饲养；

试剂：脯氨酸、海藻糖、蔗糖、葡萄糖、DMSO，均由北京化学试剂公司提供；

饲料：通过以下配方将脯氨酸与标准饮食混合来制备脯氨酸增强的饲料：

Pro10: 10mg 脯氨酸/1g 标准饮食； Pro20: 20mg 脯氨酸/1g 标准饮食；

Pro30: 30mg 脯氨酸/1g 标准饮食； Pro40: 40mg 脯氨酸/1g 标准饮食。

### 1.2 实验方法及主要仪器

#### 1. 冷冻保护剂筛选

分别用磷酸缓冲液（PBS）配置 100mg/ml 的脯氨酸、海藻糖、蔗糖、葡萄糖及 DMSO 混合液，取各种溶液 12mg 在 DSC 200 F3 型差示扫描量热仪上进行热分析，以结冰温度为判断标准，对低温保护剂进行筛选。

#### 2. 冷冻—复温实验

对于不同冷冻条件下的蚂蚁进行分组，每一类实验均主要分为实验组及对照组，对照组蚂蚁可直接在设定的温度程序下进行冷冻复温实验，实验组蚂蚁首先需要在规定的条件下进行饲养，通过毒性检测后再进行冷冻实验。所有的蚂蚁均饲养在 2000 ml 的烧杯中，每天早晚喂饲两次。实验时取一定数量蚂蚁放入塑料培养皿后，再放入 Advantage 系列冻干仪中，在设定的温度程序下进行冷冻降温及复温，利用热电偶进行测温，Agilent 34902A 数据采集系统对数据进行收集。

#### 3. 脯氨酸含量变化分析

分别取普通蚂蚁与饲喂 Pro30 饲料的实验组蚂蚁各 10 只放入研磨缸中进行研磨，同时加入 10ml 去离子水以增大液体体积。将研磨后的混合物放入 15 ml 离心管后，再在离心机中以 1500 rpm 的转速下离心 20min，取上层清液后利用 22  $\mu$ m 的一次性过滤器进行过滤，得到澄清的体液与去离子水混合液后在 GCT Premier 型气相色谱/高分辨飞行时间质谱仪中进行分析，判断饲喂前后蚂蚁体内脯氨酸含量的变化。

#### 4. 降温过程的红外热分析

分别取饲喂标准饮食、Pro10、Pro20、Pro30 的蚂蚁各一只，同时固定在 BCS-196 型低温冷冻台上。利用温度控制软件 Linksys 32X 进行温度控制，取降温速率为 2  $^{\circ}$ C/min。在降温过程中利用 Therma Vision A40M 型 FLIR 红外热成像仪对各蚂蚁的热红外图像进行采集。

#### 5. 蚂蚁含水量及结冰水量

取一定数量规定组蚂蚁后，利用电子天平（AB135-S 型梅特勒-托利多）称量其重量记为全重  $M$ ；将称取的蚂蚁放入 90 mm 塑料培养皿，再放入真空干燥箱（DZF-6090 型）中，设定烘干温度为 80  $^{\circ}$ C，在真空环境下干燥两天取出干燥后的蚂蚁，称量此时的重量并记为干重  $M_g$ ，将全重减去干重就是所求含水量，测量三组求取平均值。

取饲喂 Pro0、Pro10、Pro20、Pro30 的蚂蚁各三只，用电子天平称取其质量并记录。对整只蚂蚁的热分析在 DSC 200 F3 差示扫描量热仪进行，每只蚂蚁密封在氧化铝坩埚内。所用程序分六步进行：（1）以 10  $^{\circ}$ C/min 的升温速率升温至 30  $^{\circ}$ C 并保持 1 min；（2）以 20  $^{\circ}$ C/min 的降温速率降温至 20  $^{\circ}$ C 并保持 1 min；（3）以 10  $^{\circ}$ C/min 的降温速率降温至 -5  $^{\circ}$ C 并保持 1 min；（4）以 1  $^{\circ}$ C/min 的降温速率降温至 -35  $^{\circ}$ C 并保持 1 min；（5）以 20  $^{\circ}$ C/min 的升温速率升温至 20  $^{\circ}$ C；（6）在该温度下保持 2 min 后在 40  $^{\circ}$ C 为保护温度的条件下，结束程序。所有蚂蚁在其过冷点（SCP）相对应的温度下自发冻结。使用 Proteus Thermal Analysis 热分析软件对所得 DSC 曲线

进行热分析，从降温曲线下面积可得释放的热焓，利用相关公式可得结冰温度下水的结冰焓，经过计算可得渗透活性水含量（OA），蚂蚁的含水量由之前的实验的平均值确定。非渗透活性水（OI）量通过总水量减去OA得到。

## 2 结果与讨论

### 2.1 低温保护剂筛选

为找到在后续实验中更加合适的冷冻保护剂，需要对常用冷冻保护剂进行筛选。通过对几种常见冷冻保护剂进行分析，选择了以下5种保护剂进行实验：蔗糖、葡萄糖、海藻糖、脯氨酸、二甲基亚砜（DMSO）。

首先，为对比单一冷冻保护剂之间抑制溶液结冰的作用，每种试剂均用磷酸缓冲液（PBS）配置成100mg/ml的溶液，根据差示扫描量热（DSC）分析，可以得到各组的结冰温度：葡萄糖、蔗糖和海藻糖的结冰温度分别为-19.5℃、-15.2℃、-17.7℃，明显高于脯氨酸的-20.9℃和DMSO的-22.4℃，见图1(A)；由于从相关文献了解到，生物体在冷冻过程中的低温保护，并非单一物质作用的结果，绿色冷冻保护剂的联合使用，可降低单一冷冻保护剂的毒性。因此为了将脯氨酸与复合冷冻保护剂进行比较，将脯氨酸与另一种冷冻保护剂按照1:1的质量比例进行混合，再配置成100 mg/ml的PBS缓冲液，经DSC热分析后，得到结果：脯氨酸与葡萄糖、蔗糖和海藻糖分别以1:1质量混合的100 mg/ml溶液的结冰温度分别为-20.4℃、-15.3℃、-18.7℃，明显高于脯氨酸的-20.9℃，见图1(B)。

由于冰晶晶核的形成取决于热学因素，其生长延伸依赖于动力学因素。为了产生液体相变到固相的自发过程，必须将液体冷却到低于 $T_f$ （溶液平衡结冰点）的温度 $T_s$ ，即结冰温度<sup>[1]</sup>。结冰温度在一定程度上反映低温保护剂对溶液冰晶成核和生长的抑制作用，温度越低，说明低温保护剂溶液越难被冻结，其低温保护的能力越强，有助于细胞内水分在冻结前渗出细胞，减少包内结冰的伤害；反之，说明低温保护剂溶液越容易被冻结，其低温保护的能力越弱。

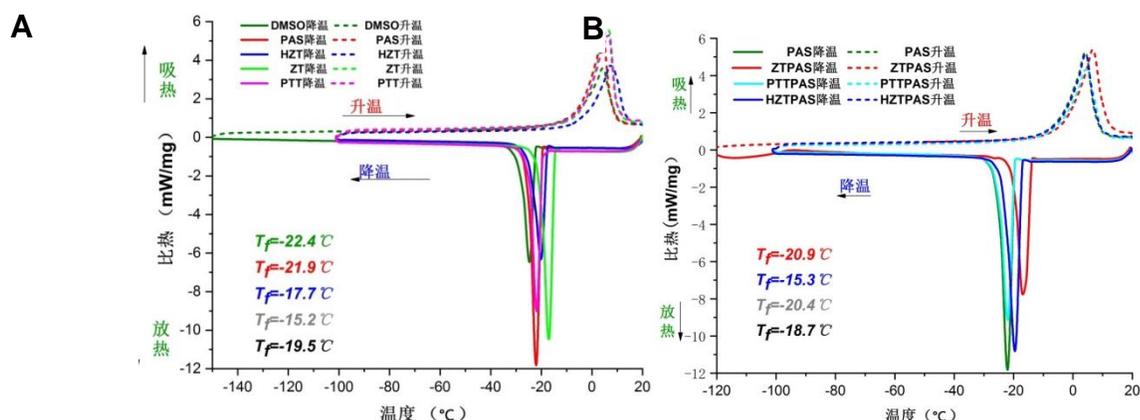


图1 (A) 不同种类低温保护剂的PBS溶液的升降温DSC曲线。其中，HZT代表海藻糖，PTT代表葡萄糖，ZT代表蔗糖，PAS代表脯氨酸。(B) 不同复合类型的低温保护剂PBS溶液的升降温DSC曲线。其中，PTPAS、ZTPAS、HZTPAS分别代表脯氨酸于葡萄糖、蔗糖、海藻糖按1:1质量混合。

本实验中，通过测量冷冻保护液的结冰温度来判断其对冰晶成核的作用<sup>[23]</sup>。通过实验数据对比可知，结冰温度最低的冷冻保护剂为脯氨酸与DMSO，而DMSO的生物毒性较强，不适合喂饲蚂蚁，因而本实验选择脯氨酸作为动物驯饲的冷冻保护剂。

### 2.2 脯氨酸的生物毒性

在其他的文献中了解到，脯氨酸可以对一些昆虫起到冷冻保护作用<sup>[24]</sup>，并且在植物的冷驯化过程中积累

<sup>[25]</sup>。为探索脯氨酸对蚂蚁的冷冻耐受性是否有较强的提升作用，试实验首先要摸索不同脯氨酸浓度对蚂蚁的生物毒性。将蚂蚁主要分为5个组，即0 mg/ml（对照组）、10 mg/ml（Pro10组）、20 mg/ml（Pro20组）、30 mg/ml（Pro30组）和40 mg/ml（Pro40组）。每组蚂蚁喂饲相应浓度的饲料或饮用水，每天早晚各喂饲一次。每隔一天对蚂蚁数量进行计数，通过计算成活只数占总只数的百分比，对不同浓度脯氨酸的生物毒性进行分析，整理数据如图2(A)所示。可以看出，随着饲喂时间的增长，在任何脯氨酸浓度下均有一等程度的生物毒性积累；且随着浓度的增加，脯氨酸的生物毒性也在不断增强，尤其是在40mg/ml浓度组，在第9天统计数据时，所实验蚂蚁已经全部死亡。由此可以看出，自接下来进行的冻存实验中，蚂蚁的最高浓度设置应不超过30mg/ml，且饲喂天数应以5-6天为上限。

### 2.3 不同温度条件对蚂蚁复活率的影响

动物在低温保存过程中，细胞内水分的调节是其成活的关键条件<sup>[26]</sup>。根据Storey<sup>[27]</sup>等人总结的动物成功冻存的相关条件可以知道，通过控制降温速率、最低温度及冷冻时间可以有效地提高动物的冷冻耐受性。为摸索蚂蚁对不同低温条件的抗冻性，以达到尽可能提高蚂蚁复活率的目的，本次实验从冷却最低温度、降温速率、冷却时间及复温温度几个方面对蚂蚁的耐温特性进行了系统测试，探究几种因素对蚂蚁复活率的影响。

在冷却最低温度方面，实验共分为4组，即-1℃（对照组）、-20℃、-25℃及-40℃组。将分好组的蚂蚁分别放入2000 mm烧杯中，在室温环境（约25℃）、阴暗背光的柜子中喂养，饲喂5天。将培养好的蚂蚁在冻干机中进行降温处理，主要程序I设定为：（1）从25℃降至10℃，用时15 min；（2）在10℃下保持10 min；（3）降温至相应最低温度（即-1/-20/-25/-40℃），用时15 min；（4）在该温度下保持60 min；（5）升温至18℃，用时20 min；（6）在18℃下保持24 h。利用热电偶检测温度，检测到的最低温度分别为-3.42℃、-21.46℃、-27.66℃及-42.48℃。实验结束后，需要统计蚂蚁成活只数，其中在个体水平（有生命迹象且可自发协调爬行）及细胞/组织水平（有生命迹象但不能协调爬行）的蚂蚁均分为成活蚁、无任何活动迹象的蚂蚁归为死亡。结果显示：结果显示，-1℃组，蚂蚁的复活率为96.39%；-20℃组，复活率为50.56%；-25℃组，蚂蚁复温后的存活率为37.5%；-40℃组，存活率为0，图2中(B)、(C)分别表示该组实验的降温曲线及蚂蚁的复活情况。由此可以得知，在-1℃至-40℃最低温度范围内，随着温度降低，蚂蚁复温后的存活率整体呈下降趋势（ $p<0.01$ ）。

在降温速率方面，将实验分为3组，即快速组（对照组）、中速组及慢速组。蚂蚁的饲养条件与上面相同，降温程序I有所改变，主要表现在：程序I（3）中降至最低温度为-25℃，用时分别为15 min、30 min及60 min。利用热电偶记录温度及时间，经处理后得到三组对应的降温速率分别为0.021℃/min、0.014℃/min及0.008℃/min。实验数据整理为表1，由表1可以看出，快速组蚂蚁的复活率为37.5%；中速组复活率为29.44%；慢速组为9.73%，图2中(D)、(E)分别表示该组实验的降温曲线及蚂蚁的复活情况。可以看出，随着降温速率的提高，蚂蚁复活率提升，但不存在统计学意义（ $p>0.05$ ）。

在冷却时间方面，实验主要分为4组，即0.5 h、1 h（对照组）、5 h及24 h组。实验条件与之前基本相同，在降温程序I上有所改变，主要体现：程序（3）中降至最低温度为-25℃，用时为15 min，并且在程序（4）中分别保持0.5 h、1 h、5 h及24 h。热电偶记录相关数据，整理为图2(F)，该组试验降温曲线，以及图2(G)，该组实验蚂蚁复活情况。结果显示，0.5h组，蚂蚁复活率为68.89%；1h组，复活率37.50%；5h组，复活率为14.44%；24h组，复活率为1.11%。由此推断，在0.5-24h内，随着冷冻时间的延长，蚂蚁复活率不断降低，两者呈负相关（ $p<0.01$ ）。并且当冷冻时间达到24h后，几乎没有成活只数。

在复活温度方面，主要进行两组实验，即在室温（25℃）下复温及在18℃下复温。实验条件仅需将降温程序I中的（3）中降至最低温度为-25℃，用时15min，（5）改为升温至18/25℃，用时20min，相应的（6）改为在18/25℃下保持24h。相应的数据整理为图2(H)。结果显示：室温下蚂蚁复活率为7.22%；18℃下蚂蚁复活率为37.5%。分析可知，相对于在室内较高温度下直接复温，蚂蚁在18℃条件下复活率更高。

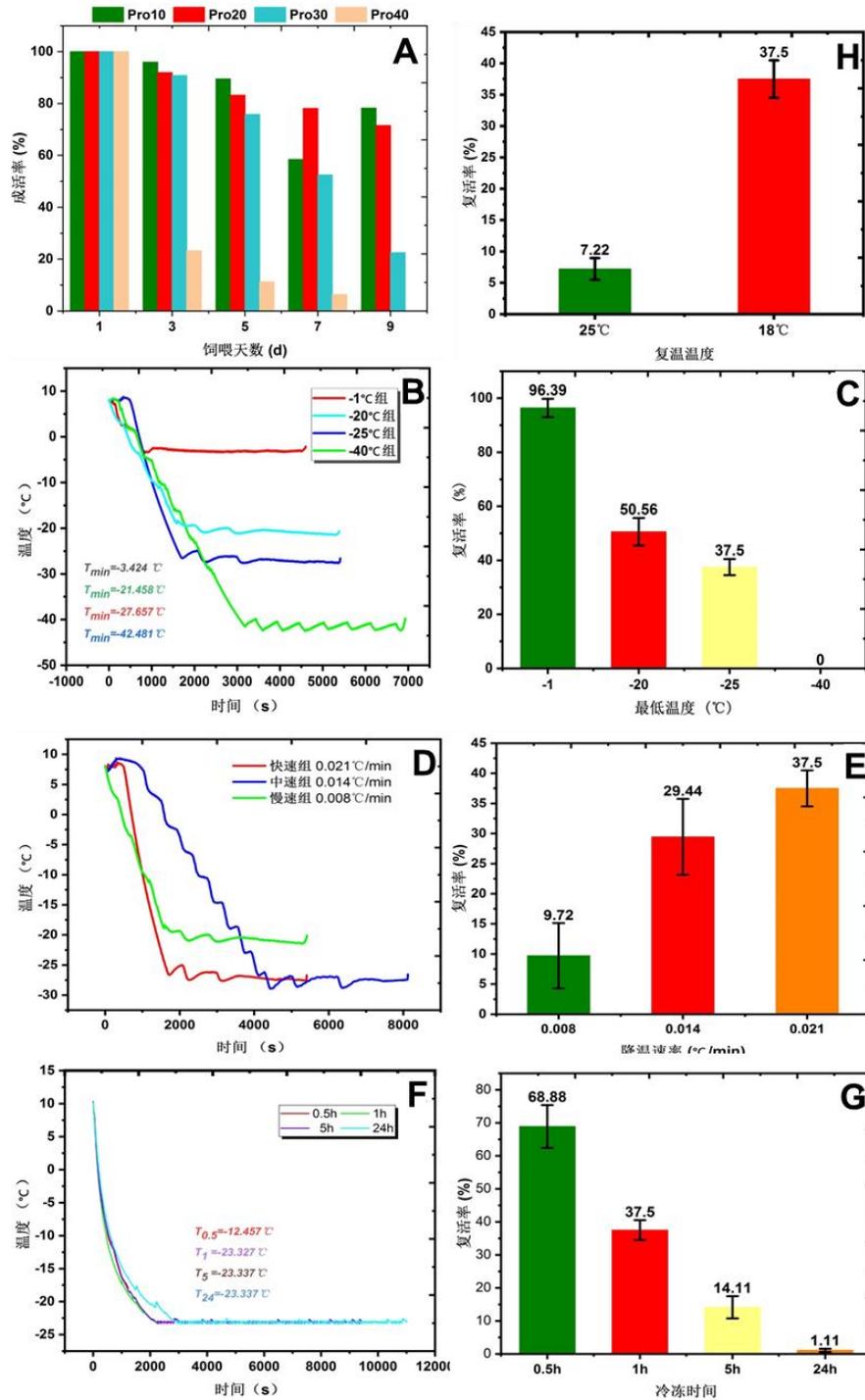


图 2 (A) 脯氨酸生物毒性实验; (B) 不同冷却最低温度组所对应的降温曲线; (C) 不同冷却最低温度组每组实验蚂蚁的存活率; (D) 不同降温速率组所对应的降温曲线; (E) 不同降温速率每组实验蚂蚁的存活率; (F) 不同冷却时间组所对应的降温曲线; (G) 不同冷却时间组每组实验蚂蚁的存活率; (H) 不同复活温度组每组蚂蚁的复活率。

表 1 降温速率对蚂蚁存活率的影响

组别	降温速率 /°C·min <sup>-1</sup>	组号	样本数 /只	存活数 /只	死亡数/ 只	存活率/%	平均/%
快速组 (对照 组)	0.021	第 1 组	120	49	71	40.83	37.50
		第 2 组	120	44	76	36.67	
		第 3 组	120	42	78	35.00	
中速组	0.014	第 1 组	120	30	90	25.00	29.44**
		第 2 组	120	32	88	26.67	
		第 3 组	120	44	76	36.67	
慢速组	0.008	第 1 组	120	5	115	4.17	9.72
		第 2 组	120	12	108	10.00	
		第 3 组	120	18	102	15.00	

注: \*\*为  $p < 0.01$

## 2.4 脯氨酸喂饲浓度对蚂蚁复活率的影响

在之前实验的基础上, 本实验将温度条件设定为: 在 0.021°C/min 的降温速率下, 将温度降低至 -25 °C 并保持 1h 后, 在 18°C 下复温 24 h, 其余条件与降温程序 I 相同。饲喂脯氨酸的浓度范围为 0-30mg/ml, 分别饲喂 5 天。

为摸索更佳脯氨酸喂饲浓度, 实验主要分为 4 组, 即 0 mg/ml (对照组, Pro0)、10 mg/ml (Pro10 组)、20 mg/ml (Pro20 组) 及 30 mg/ml (Pro30 组), 每一组又分别进行三组实验。所得数据结果如图 3(A)。结果表明: Pro0 组, 蚂蚁存活率为 37.5% ( $\pm 0.03$ ); Pro10 组蚂蚁复活率为 61.94% ( $\pm 0.04$ ); Pro20 组, 复活率为 55.56% ( $\pm 0.03$ ); Pro30 组, 蚂蚁复温后的存活率为 83.89% ( $\pm 0.06$ )。即从喂饲 Pro0 到喂饲 Pro10, 蚂蚁的复活率提升了 1.65 倍, 而从 Pro10 到 Pro20, 复活率又有了轻微下降, 但仍高于 Pro0 组; 当饲喂浓度提升为 Pro30 时, 蚂蚁复活率又有了大幅上升, 是标准喂饲组的 2.2 倍。由此可见, 在 0-30 mg/ml 的喂饲浓度范围内, 从整体趋上来看, 随着喂饲脯氨酸浓度的增加, 蚂蚁存活率有显著的增长 ( $p < 0.01$ )。

## 2.5 蚂蚁体内脯氨酸含量变化

在实验过程中, 为探究脯氨酸的生化参数与其耐冻性之间的关系, 尤其是脯氨酸是否进入蚂蚁内并起到抗冻作用, 需要对饲喂前后蚂蚁体液中脯氨酸的含量进行测试。实验选取饲喂 Pro0 组及 Pro30 组的蚂蚁各 20 只, 饲喂天数为 5 天。通过研磨缸研磨的方式将蚂蚁碾碎, 再加入 10 ml 去离子水, 经离心机及一次性过滤器后得到含有蚂蚁体液的去离子水溶液。通过气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 分析, 得到相应质谱图 (图 3(i)为饲喂前质谱图, 图 3(ii)为饲喂后质谱图), 通过对两组质谱图的对比分析, 所得脯氨酸离子流强度如图 3(B)所示, 可以得到饲喂前后蚂蚁体液中脯氨酸含量的变化并由此来判断脯氨酸是否在蚂蚁的冷冻保存中起到作用。结果表明, 饲喂前后, 蚂蚁体液中脯氨酸的含量从 9% 增加至 30% 左右, 有了明显的提升。结合上一组中。从饲喂 Pro0 到饲喂 Pro30, 蚂蚁的存活率从 37.50% 增加到 83.89%, 说明蚂蚁在低温冻存过程中, 体内脯氨酸浓度与成虫的存活率呈显著正相关。

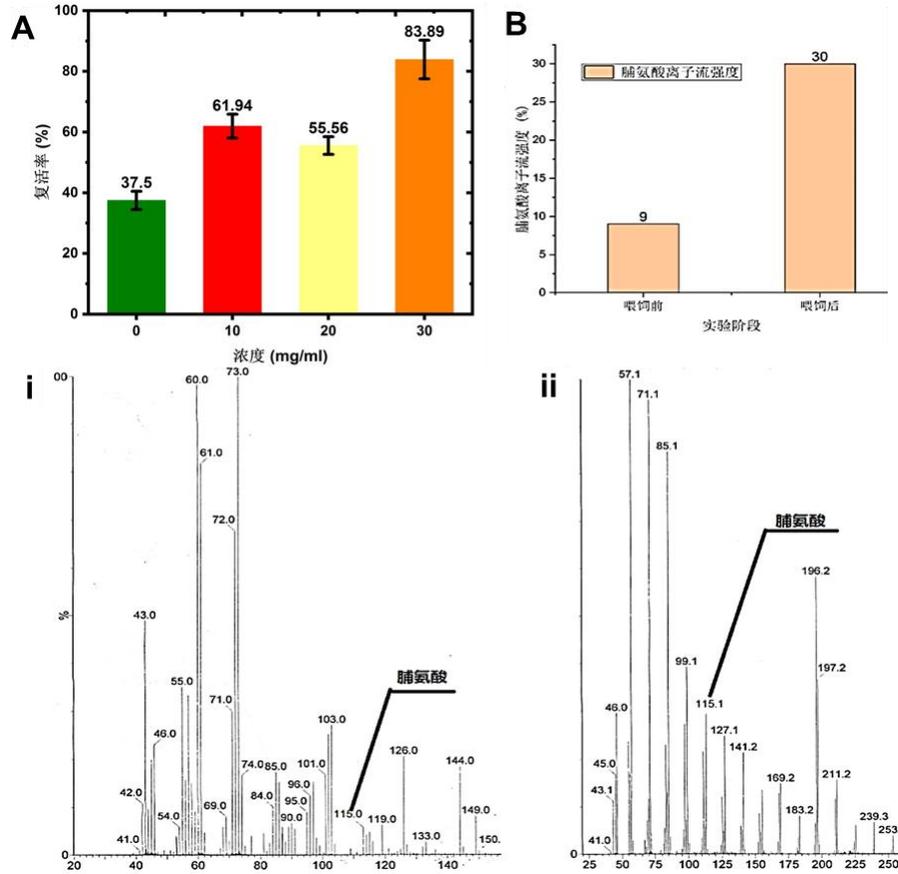


图3 (A) 喂饲不同浓度脯氨酸的蚂蚁的复活率; (B) 实验前后蚂蚁体内离子流强度; (i) 普通蚂蚁体液的部分质谱图; (ii) 饲喂5天Pro30后蚂蚁体液的部分质谱图

## 2.6 蚂蚁降温过程的红外分析

由前面几组实验已经得知脯氨酸进入了蚂蚁体内,并且在冷冻-复温实验中提升了蚂蚁的复活率。紧接着,为了更加直观地观察不同组蚂蚁在降温过程中的温度变化,利用低温生物冷台 BCS-196 及红外成像仪 ThermoVision A40M,对蚂蚁在降温过程中的红外热图像进行采集。取喂饲 Pro0、Pro10、Pro20 及 Pro30 组的蚂蚁各一只,在室温下 2°C/min 的降温速率进行降温,所得图像如图 4 所示。从图像可以看出,喂饲不同饲料的蚂蚁降温情况有着明显差异。在相同的降温时间及相同的降温速率条件下,没有喂饲脯氨酸的蚂蚁降温速率最快,在该时段的温度最低;并且随着脯氨酸浓度的提升,其对蚂蚁整体的降温抑制作用也在逐渐增强。可以推断,脯氨酸可以延缓蚂蚁体液的降温过程,抑制冰晶的形成。

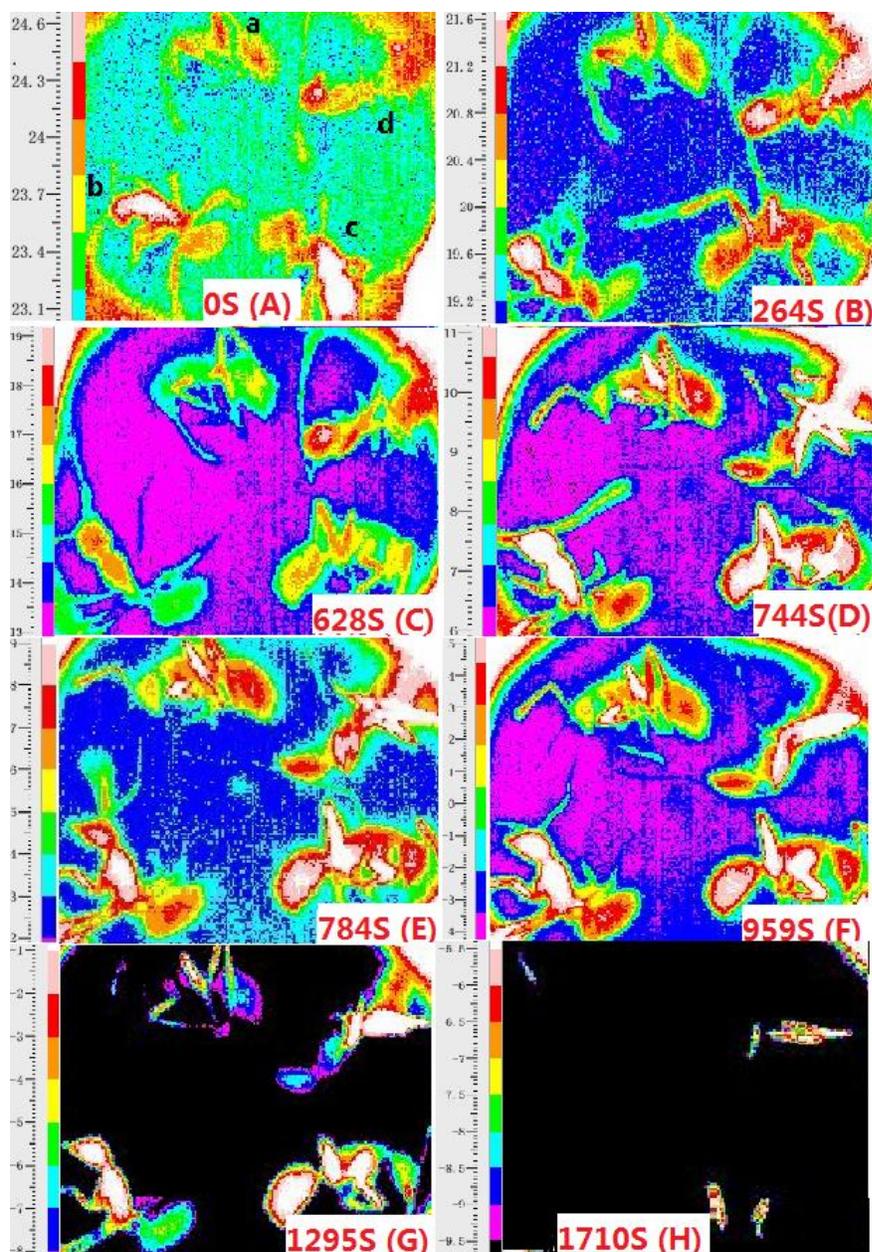


图4 降温过程中四种蚂蚁的温度变化

a-喂饲Pro0; b-喂饲Pro10; c-喂饲Pro20; d-喂饲Pro30;

温度范围: (A) 23.1-24.6°C; (B) 19.2-21.6°C; (C) 13-19°C; (D) 6-11°C; (E) 2-9°C; (F) -4-5°C; (G) -8--1°C; (H) -9.5--5.5°C。

## 2.8 蚂蚁体内结冰水含量测试

最后为了确定喂饲不同饲料的蚂蚁以内的含水量及冷冻过程的结冰水含量, 利用真空干燥箱及差示扫描量热仪对不同组蚂蚁的含水量及结冰水含量进行测试及计算。根据喂饲的条件不同, 将蚂蚁分为 4 组, Pro0 组、Pro10 组、Pro20 组和 Pro30 组, 取喂饲 5 天的各组蚂蚁进行实验, 每组蚂蚁测试三组, 取平均值。

蚂蚁的含水量由蚂蚁总重减去干重得到。其中蚂蚁的总重  $M$  可经精密天平 AB135-S 直接称量, 干重  $M_g$  需要将之前称取的蚂蚁放入真空干燥箱中, 在 80 °C 下干燥 48 h 后再进行称量。将数据表格整理为表 2, 结果

见图 5。

表 2 不同喂饲条件蚂蚁的含水量

分组	总重 M(mg)	干重 $M_g$ (mg)	含水量(mg)	水百分比 (%)
Pro10 组	335.97	155.15	180.82	53.95
Pro 20 组	236.42	108.39	128.03	56.90
Pro 30 组	722.20	420.66	301.54	58.31
Pro0 组	123.78	36.41	87.37	70.50

水—冰相变过程中，特别是致命的细胞内冰晶的形成和冰晶造成的细胞外基质微妙结构的物理损伤，是对水合组织或整个生物体冷冻保存的重大挑战<sup>[28,29]</sup>。目前，只有少数生物，如昆虫胚胎<sup>[30]</sup>和海洋蝶螈幼虫<sup>[31]</sup>等在液氮中被成功冻存。在实验中，通过差示扫描量热技术，我们可以判断蚂蚁在实验中被冻结，同时蚂蚁的结冰水含量也需要借助 DSC 技术进行测定每次测试区抑制蚂蚁放入氧化铝坩埚内，测试结束后，利用 Proteus Thermal Analysis 热分析软件对所得曲线进行热分析，可以得到结冰温度  $t_f$  及降温曲线放热峰的焓值  $H_j$ 。结冰温度所对应的纯水的结冰焓可由以下公式进行计算<sup>[32]</sup>：

$$\Delta H (t_f) = -2.05 (t_f - 273.15) - 334 \quad (1)$$

其中，334 J/g 是水的平衡冻结温度点的相变潜热值。

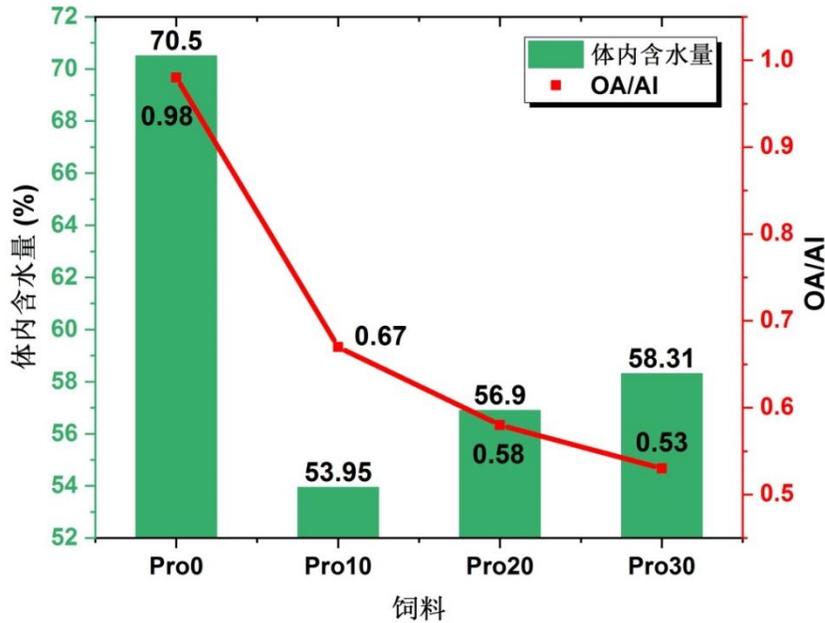


图 5 不同喂饲条件蚂蚁的含水量及 OA/OI 值

其中，绿色柱状图代表蚂蚁体内含水量；红色折线图代表蚂蚁 OA/OI 值

由此可得，蚂蚁的结冰水含量为：

$$m_j = m_h \times H_j / \Delta H (t_f) \quad (2)$$

其中， $m_h$  为蚂蚁的含水量，单位 mg，根据表 3 中不同喂饲条件蚂蚁体内含水量的百分比求得。

蚂蚁的结冰水量又称为其体内的渗透活性水量，即 OA，非渗透活性水量 (OI) 由含水量减去 OA 求得。相关数据整理为表 3，结果见图 5。从 Pro0 到 Pro30，蚂蚁的 OA/OI 值分别为 0.98、0.67、0.58、0.53，可以看出，随着喂饲浓度提升，蚂蚁整体结冰温度下降，且渗透活性水/非渗透活性水 (OA/OI) 呈明显的下降趋

势（从 Pro0 到 Pro30 减少了 45.9%），这说明脯氨酸增强的饮食改变了蚂蚁身体内水分的渗透状态并向有利于蚂蚁存活的方向转变。众所周知，冷冻耐受型动物通常依靠其细胞的脱水来抑制致死的细胞内冰晶形成及生长<sup>[27]</sup>，蚂蚁体内 OA/OI 值不断减小，说明渗透活性水 OA 所占体液的百分比减小，使得在任何温度下形成的冰晶量减少，因此降低了蚂蚁冷冻过程中细胞内液的潜在破坏<sup>[23]</sup>。

表 3 喂饲不同浓度脯氨酸蚂蚁体内OA/OI表

实验组	质量 m (mg)	含水量 m <sub>h</sub> (mg)	结冰温度 (°C)	计算冻结焓 t <sub>j</sub> (J/g)	放热焓 H <sub>j</sub> (J/g)	OA 质量 (mg)	OI 质量 (mg)	OA/OI
Pro0 组	16.01	11.29	-18.3	263.47	130.53	7.93	8.08	0.98
Pro10 组	13.40	6.30	-25.50	260.81	111.25	3.59	5.35	0.67
Pro20 组	17.14	12.08	-25.51	278.23	102.10	6.29	10.85	0.58
Pro30 组	25.86	18.23	-26.30	279.87	96.41	8.91	16.95	0.53

### 3 小结

随着对深低温作用下机体细胞及组织相变过程中损伤机制的逐渐认识，如何主动对机体低温冷冻损伤进行调控，使其在低温保存中削弱低温损伤，给低温生物医学界提出重大挑战。本文以日本弓背蚁为研究对象，通过实验手段考察其冷冻复活率与冷冻时间、降温速率、最低温度及复活温度之间的关系，得到合适的冷冻复温条件：取在 0.021 °C/min 的降温速率下降温至 -25°C 并保持 1h，复温温度设置为 18 °C。同时通过喂饲蚂蚁天然冷冻保护剂脯氨酸，人为提升了蚂蚁组织中的脯氨酸含量，并证明这一实验方式对蚂蚁冷冻耐受性有显著性提升作用。最后，根据差示扫描量热（DSC）结果，我们认为高浓度的脯氨酸使得蚂蚁在饲喂及冷冻过程中脱水并降低了渗透活性水含量，这可能有助于蚂蚁在低温过程中存活。尽管试验数据仍有待完善，但有望为低温冷冻保存技术提供更多启示。

### 参考文献

- [1] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 刘静. 低温生物医学工程学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [3] C. Polge, A. U. Smith, et al. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures[J]. Nature, 1949, 164(4172): 666.
- [4] 张素清, 周一欣等. 温度、时间及葡萄糖加载对深低温(-15°C附近)冻存蚂蚁复活的影响[J]. 科技导报, 2007, 25(5):34-37
- [5] H. E. Broxmeyer, G. W. Douglas, G. Hangoc, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989, 86(10): 3828-3832.
- [6] V. Pallotta, G. M. D'Amici, A. D'Alessandro, et al. Red blood cell processing for cryopreservation: from fresh blood to deglycerolization[J]. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2012, 48(4): 226-232.
- [7] T. Justice, G. Christensen. Sperm cryopreservation methods[M]. Humana Press, 2013.
- [8] B. J. Fuller, A. Y. Petrenko, J. V. Rodriguez, et al. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification[J]. Cryoletters, 2013, 34(4): 432-452.
- [9] S. Gaucher, C. Elie, O. V árola, et al. Viability of cryopreserved human skin allografts: effects of transport media and

---

cryoprotectant[J]. *Cell and Tissue Banking*, 2012, 13(1): 147-155.

[10] Y. Liu, X. Xu, X. Ma, et al. Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions[J]. *Biotechnology Progress*, 2010, 26(6): 1635-1643.

[11] 刘金刚, 刘作斌. 低温医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.

[12] Raymond M R, Wharton D A. The ability of the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*, to survive intracellular freezing is dependent upon nutritional status[J]. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systemic & Environmental Physiology*, 2013, 183(2):181-188.

[13] Costanzo J P, Reynolds A M, Amaral M C F D, et al. Cryoprotectants and Extreme Freeze Tolerance in a Subarctic Population of the Wood Frog[J]. *Plos One*, 2015, 10(4):e0117234.

[14] V. Košťál, H. Zahradníčková et al. Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(32): 13041-13046.

[15] V. Košťál, P. Šimek, et al. Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(9): 3270-3274.

[16] Arakawa T, Carpenter J F, et al. Basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis[J]. *Cryobiology*, 1990, 27(4):401-415.

[17] L. A. Withers, P. J. King. Proline: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L[J]. *Plant Physiology*, 1979, 64(5): 675-678.

[18] L. G. Sanchez-Partida, B. P. Setchell, et al. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 1997, 10(4): 347-357.

[19] D. Freimark, C. Sehl, et al. Systematic parameter optimization of a Me2SO and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells[J]. *Cryobiology*, 2011, 63(2): 67-75.

[20] H. Sun, B. Glasmacher, and N. Hofmann. Compatible solutes improve cryopreservation of human endothelial cells. *Cryo Letters*, 2012,33(6): 485-493

[21] Danjing, C. Jinhui, et al. Effects of proline on cryopreservation of embryogenic callus of *Cunninghamia lanceolata*. *Hubei Forestry Science and Technology*, 2014. 43(3): 30-31.

[22] Lu Z, Xu X, et al. L-proline: a highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:26326.

[23] 薛旭. 基于绿色化低温保护剂脯氨酸的卵母细胞冻存机理研究[D]. 中国科学院大学, 2014.

[24] Morgan T D, Chippendale G M. Free amino acids of the haemolymph of the southwestern corn borer and the European corn borer in relation to their diapause[J]. *Journal of Insect Physiology*, 1983, 29(10):735-740.

[25] Nanjo T, Kobayashi M Y, Kakubari Y, et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*.[J]. *Febs Letters*, 1999, 461(3):205-10.

[26] 于丽娜, 刘静. 突破生物材料低温保存技术瓶颈的仿生学途径评价[J]. *科技导报*, 2005, 23(11):69-72.

[27] Storey K B, Storey J M. Freeze tolerance in animals[J]. *Physiological Reviews*, 1988, 68(1):27-84

[28] Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos.[J]. *Cell Biophysics*, 1990, 17(1):53-92.

[29] Taylor M J, Song Y C, Brockbank K G M. *Vitrification in Tissue Preservation: New Developments*[M]. 2004.

[30] Leopold R A, Rinehart J P. A template for insect cryopreservation[J]. 2010.

[31] Olive P J W, Wang W B. Cryopreservation of *Nereis virens* (Polychaeta, Annelida) Larvae: The Mechanism of Cryopreservation of a Differentiated Metazoan[J]. *Cryobiology*, 1997, 34(3):284-294.

[32] S. Glasstone. *Textbook of Physical Chemistry*[M]. Mc Millan Press, 1962.

[33] Block W. Water or ice?--the challenge for invertebrate cold survival[J]. *Sci Prog*, 2003, 86(1/2):77-101.