

微流控线性加载低温保护剂减少猪 MⅡ 期 卵母细胞的渗透损伤 *

杨 云^{1)**} 周新丽^{1)**,**} 戴建军²⁾ 张德福²⁾ 邵文琪¹⁾ 衣星越¹⁾ 陶乐仁¹⁾

(¹⁾上海理工大学生物热科学研究所, 上海 200093; (²⁾上海市农业科学院畜牧兽医研究所动物遗传工程实验室, 上海 201106)

摘要 在卵母细胞低温保存中, 通常需要加载冷冻保护剂来抑制冰晶对细胞的损伤, 但高浓度冷冻保护剂的加载会对细胞造成渗透损伤. 为了减小细胞的渗透损伤, 本文设计并制作了适合卵母细胞冷冻保护剂加载的微流体装置, 研究了微流控线性加载 30% (v/v) 二甲基亚砷(Me_2SO)低温保护剂时细胞内保护剂浓度变化、细胞体积变化, 以及对细胞存活率与发育率的影响, 并传统的加载方法(一步法、分步法)做了比较. 结果表明: 微流控法能够实现卵母细胞冷冻保护剂的连续线性加载, 避免了卵母细胞体积的骤变, 显著减小了细胞的渗透损伤, 提高了细胞的存活率. 其中细胞的最小渗透体积减小为 $0.86V_0$, 细胞的存活率达到 92.8%, 比一步法高 33%, 比两步法高 16.3%, 但与四步法之间无显著性差异. 经孤雌激活后体外培养, 细胞的卵裂率和囊胚率分别达到 75.8% 和 27.4%, 都显著高于一步法和分步法($P < 0.05$). 因此, 微流控线性加载低温保护剂能够显著减小细胞的渗透损伤, 为卵母细胞低温保存技术提供新思路.

关键词 卵母细胞, 微流体, 渗透损伤, 冷冻保护剂, 低温保存

学科分类号 Q2, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0009

卵母细胞的低温保存在人类辅助生殖领域和珍稀濒危物种的保存方面有着重要的意义^[1-2]. 目前细胞低温保存的方法主要有玻璃化冷冻法和慢速冷冻法. 玻璃化冷冻是指高浓度冷冻保护剂在超快速冻结过程中由液态直接变为玻璃态的过程, 其避免了胞内外冰晶的形成, 冷冻效果要优于慢速冷冻^[3]. 但是, 高浓度保护剂的使用又会给细胞带来很多副作用, 在冷冻保护剂加载和去除过程中, 由于胞外渗透压的急剧变化, 会引起细胞体积的急剧收缩或膨胀, 从而造成细胞膜结构和细胞骨架系统的损伤. 同时, 冷冻保护剂自身的化学毒性也会对细胞造成毒性损伤.

为了减小冷冻保护剂的渗透作用和化学毒性对卵母细胞的损伤, 目前通常采用分步加载与分步去除冷冻保护剂的方法^[4]. Mullen 等^[5]比较了一步法和分步法加载 6.4 mol/L 的乙二醇(EG)至人卵母细胞中, 结果表明分步法处理后细胞保存效果要明显优于一步法, 但分步步数并非越多越好, 以四步加载最为理想. 解政鼎等^[6]指出, 分步加载采用等渗

透压差、渗透时间间隔逐渐减小的方式时, 可以最大限度地降低加载过程对细胞的损伤. 尽管分步法对细胞的损伤小于一步法, 但是分步法的实际操作程序比较繁琐、所需的时间要比一步法有所延长、同时细胞在不同浓度的溶液间不断转移, 容易造成细胞丢失, 而且细胞仍然会经历多次的体积骤变. 为了弥补分步法操作的不足, 提高细胞低温保存的效果, 近几年, 有研究者提出连续法加载, 并将微流体技术引入了低温保存领域^[7-8].

采用微流体装置进行冷冻保护剂的加载时, 保护剂溶液和缓冲溶液在微流体通道内以层流方式流动, 两流体通过扩散方式混合, 实现了沿着通道方向保护剂浓度的连续改变, 从而减小了由于渗透压

* 国家自然科学基金(51376132, 50906057), 上海市自然科学基金(13ZR1429200)和上海市国家重点实验室(1N15301101)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2016-01-13, 接受日期: 2016-03-16

急剧变化造成的渗透损伤. Heo 等^[9]设计了一个用于单个卵母细胞保护剂加载的微流体装置, 初步探究了保护剂连续加载的可行性及细胞体积的变化. 结果表明向卵母细胞中连续加载 1.5 mol/L 丙二醇 (PROH) 的时间小于 15 min, 细胞体积的改变量小于 10%. 但是, 对于微流体装置处理之后的卵母细胞的存活率与发育率并没有研究, 而且装置结构过于复杂. 为此, 本文重新设计并制作了一个用于卵母细胞冷冻保护剂连续加载的微流体装置, 比较了不同的保护剂加载方式(一步法、两步法、四步法、微流控线性法)下猪 M II 期卵母细胞的胞内浓度变化和体积变化, 最后比较了不同的加载方式对卵母细胞存活率和发育率的影响.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

组织培养液(TCM199)、磷酸盐缓冲液(PBS)、二甲基亚砷(Me_2SO)、蔗糖, 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司(美国). 实验中所用其他试剂除特别说明外, 均购自美国 Sigma 公司.

1.2 玻璃化冷冻/解冻液

实验中所用溶液的浓度均为体积比浓度. a. 基础液: TCM199 + 20% FBS. b. 一步法玻璃化冷冻液: 基础液 + 30% Me_2SO . c. 两步法玻璃化冷冻液: VS_1 , 基础液 + 15% Me_2SO ; VS_2 , 基础液 + 30% Me_2SO . d. 四步法玻璃化冷冻液: VS_1 , 基础液 + 7.5% Me_2SO ; VS_2 , 基础液 + 15% Me_2SO ; VS_3 ,

基础液 + 22.5% Me_2SO ; VS_4 , 基础液 + 30% Me_2SO . e. 微流控线性法玻璃化冷冻液: 基础液 + 30% Me_2SO . f. 解冻液: WS_1 , 基础液 + 1 mol/L 蔗糖; WS_2 , 基础液 + 0.5 mol/L 蔗糖.

1.3 猪卵母细胞的采集及 M II 期卵母细胞的获得

从上海市嘉定区某屠宰场采集新鲜猪卵巢组织, 放在 37℃ 含 1 000 mg/L 的双抗生理盐水中, 1 h 内运回实验室. 用生理盐水冲洗 2~3 次, 选择卵巢表面直径为 2~6 mm 的卵泡, 用 10 ml 的一次性注射器将卵母细胞复合体连同卵泡液一起吸出. 将抽出的液体置于 10 ml 的离心管中, 在 39.5℃ 的恒温水浴中静置 15~20 min, 移除上清液. 取胞质均匀且有 3 层以上致密卵丘细胞的卵丘卵母细胞复合体, 即 GV 期卵母细胞. 将 GV 期卵母细胞洗涤 3 次后, 置于已平衡 4 h 以上的成熟培养液中, 培养液为 TCM199 + 10% FBS + 10% 猪卵泡液 + 0.1% 血清促性腺激素(PMSG) + 0.1% 人绒毛膜促性腺激素(hCG), 然后再放入 CO_2 培养箱 (39℃ ± 0.5℃、5% CO_2 , BC-J160S, 上海博讯实业有限公司, 中国)中, 成熟培养 44~46 h, 得到 M II 期卵母细胞. M II 期卵母细胞用 0.1% 透明质酸酶消化以去除卵丘细胞, 再用 TCM199 洗涤 3~5 次备用.

1.4 微流控芯片的设计与制作

用于卵母细胞低温保护剂加载的微流控芯片主要包括流体混合通道、细胞分析腔体、细胞出入口通道等, 如图 1a 所示. 蛇形混合通道的尺寸为

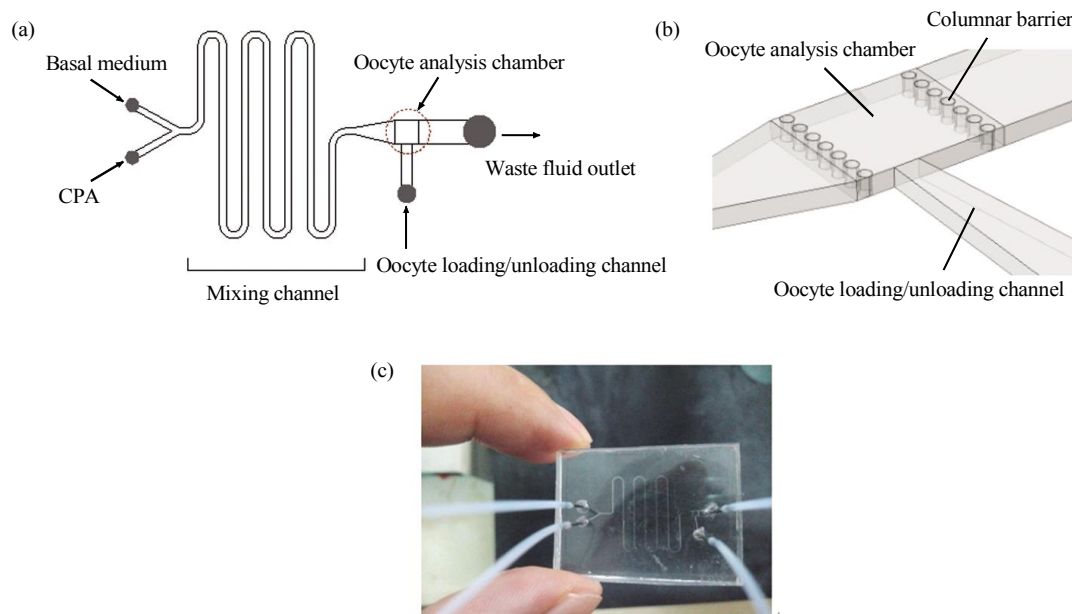


Fig. 1 The structure diagrams and photo of microfluidic chip

100 mm×150 μm ×150 μm , 通过低温保护剂和缓冲液的层流混合, 实现保护剂浓度的连续变化. 细胞分析腔体的尺寸为 1 200 μm ×1 000 μm ×150 μm . 卵母细胞经细胞通道导入细胞分析腔, 当加载低温保护剂时, 将细胞分析腔置于显微镜下, 时刻记录细胞体积的变化. 加载之后的废液从废液出口排出即可. 为了防止卵母细胞被流体冲走, 在细胞分析腔体的内部加工了若干直径为 100 μm 的柱状障碍物, 障碍物之间的间距为 50 μm , 如图 1b 所示.

微流控芯片是通过模塑法来制作, 首先在硅晶片上利用光刻胶得到微流控芯片结构的光刻模具, 接着将 PDMS 和固化剂混合均匀并浇注在模具上, 等完全固化后将 PDMS 材料从模具上剥落下来, 得到刻有微通道的微流控芯片基片, 将 PDMS 基片和 PDMS 盖片对齐复合完成封接, 然后放在 75℃ 的烘箱中加热 10 min, 得到牢固的 PDMS 芯片, 最后在芯片的指定位置处用钻孔器打 4 个直径为 0.6 mm 的孔, 用塑料管连接微流控芯片和注射

泵, 使流体和细胞进出微流控芯片, 如图 1c 所示.

1.5 用于冷冻保护剂连续性加载的微流控实验系统

图 2 是实现冷冻保护剂连续线性加载的系统图. 主要由微量注射泵(Pump 11 Plus 微量注射泵, Harvard, 美国)、微量进样器(1 ml 微量进样器, 上海高鸽工贸有限公司, 中国)、倒置荧光显微镜(TS100 倒置荧光显微镜, Nikon, 日本)、微流体芯片, 以及废液瓶等组成. 在导入卵母细胞之前, 先用基础液充满混合通道, 然后再将卵母细胞吹进细胞分析腔内并开启注射泵. 通过注射泵分别将基础液和高浓度的冷冻保护剂注入微流体芯片内, 控制基础液的流量从 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 减小到 0 $\mu\text{l}/\text{min}$, 同时保护剂的流量从 0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 增加到 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$, 保持混合通道内总流量 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 不变, 加载时间为 300 s, 两股流体在蛇形混合通道内扩散混合, 实现冷冻保护剂的连续线性加载. 在加载过程中, 连续记录细胞体积的变化. 加载结束后, 将卵母细胞从细胞腔体内吸出, 进行细胞存活率及发育率实验.

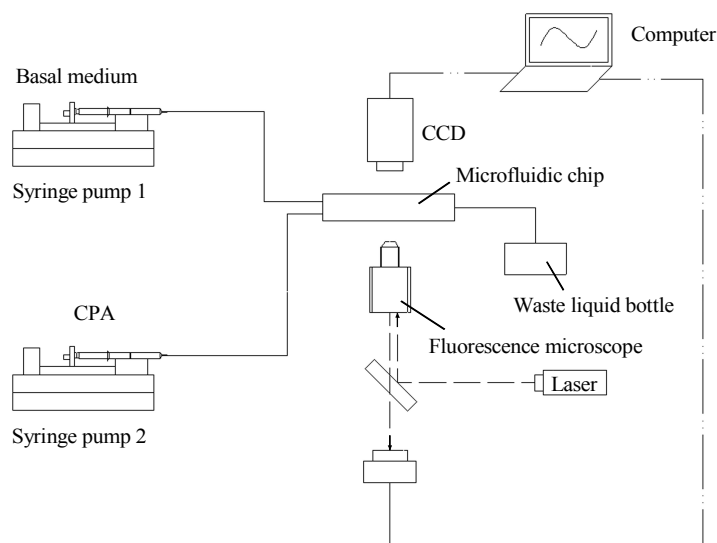


Fig. 2 The system diagram of CPA continuous loading

1.6 冷冻保护剂的四种加载方式

根据文献[9-11]中对细胞低温保护剂加载时间优化的结论, 室温下, 将浓度为 30% Me_2SO 冷冻保护剂采用一步法、两步法、四步法、微流控线性法载入猪 M II 期卵母细胞内, 具体的加载程序与加载时间如图 3 所示. 一步法: 将卵母细胞从基础液中移至 30% (v/v) Me_2SO 中平衡 120 s; 两步法: 将卵母细胞从基础液中移至 15% (v/v) Me_2SO 中平

衡 180 s, 然后移至 30% (v/v) Me_2SO 中平衡 30 s; 四步法: 将卵母细胞从基础液中移至 7.5% (v/v) Me_2SO 中平衡 120 s, 再移至 15% (v/v) Me_2SO 中平衡 60 s, 最后移至 22.5% (v/v) Me_2SO 中平衡 30 s, 然后移至 30% (v/v) Me_2SO 中平衡 30 s; 微流控线性法: 使卵母细胞外的保护剂浓度从 0 线性增加到 30% (v/v), 加载时间 300 s.

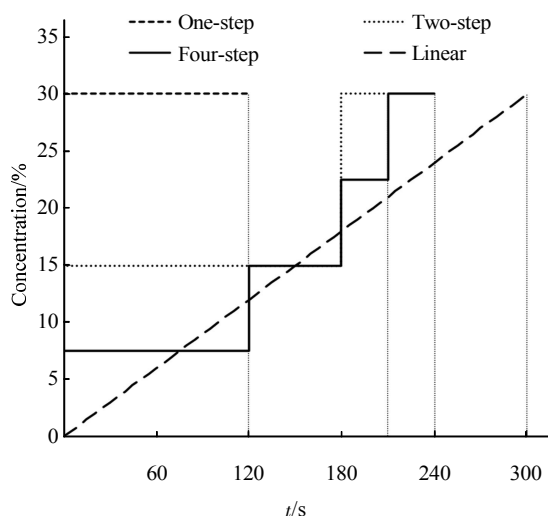


Fig. 3 Four different CPA loading protocols

1.7 卵母细胞内保护剂浓度的理论预测

为了使细胞在冷冻过程实现玻璃化, 减轻冰晶对细胞的损伤, 需要保证细胞内冷冻保护剂的浓度在每一种加载方式下都达到玻璃化要求^[12], 但实际上细胞内低温保护剂的浓度很难被直接测量. 因此文中采用经典的两参数模型(The two-parameter model)^[13]来进行预测. 在模型中, 水和保护剂的跨膜流量可以表示为:

$$\frac{dV_w(t)}{dt} = L_p A R T (M^i - M^e) \quad (1)$$

$$\frac{dN_s(t)}{dt} = P_s A (C_s^e - C_s^i) \quad (2)$$

$$V_c = V_w + V_s + V_b \quad (3)$$

$$V_s = N_s + V_{CPA} \quad (4)$$

式中变量的名称和单位分别为: V_w , 细胞内水的体积, μm^3 ; N_s , 细胞内保护剂物质的量, mol; A , 细胞的表面积, μm^2 ; R , 气体常数, $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$; T , 绝对温度, K; M^i 、 M^e , 分别为细胞内外的渗透压, mOsm/kg; C_s^e 、 C_s^i , 分别为细胞内外保护剂的浓度, mol/kg; L_p , 水的渗透系数, $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$; P_s , 保护剂的渗透系数, $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$; V_c , 卵母细胞的体积, μm^3 ; V_s , 低温保护剂的体积, μm^3 ; V_b , 细胞非渗透体积, μm^3 .

Me_2SO 作为一种传统的渗透型低温保护剂, 其渗透性优于其他保护剂, 因此文中将其用于猪 M II 期卵母细胞渗透损伤的研究, 并在前期通过实验测定了 25°C 时猪 M II 期卵母细胞的基本参数及对 Me_2SO 的渗透参数^[14], 如表 1 所示.

Table 1 Permeability parameters for porcine M II-stage oocyte to Me_2SO ($T=298\text{K}$)

Parameter	Unit	Value
L_p	$\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{atm}^{-1}$	0.81 ± 0.14
P_s	cm/min	$(1.93\pm0.63)\times10^{-3}$
V_b/V_0		0.28
C_0	mol/L	4.2
A	μm^2	931502.17
V_{cpa}	$\mu\text{m}^3/\text{mol}$	71.33×10^{12}

1.8 细胞图像采集与数据处理

在冷冻保护剂加载过程中, 用带有图像采集系统的显微镜连续记录细胞体积的动态变化. 假设卵母细胞为理想球体, 通过带有图像采集系统的显微装置获取整个实验过程中细胞($n=5$)体积的变化图片后, 利用图像分析软件测量细胞的二维投影面积, 再通过球体体积与投影面积的换算关系式($V=0.752 S^{3/2}$), 计算得到细胞的体积变化.

1.9 冷冻保护剂的洗脱及细胞存活率与发育率判断

将形态完好的成熟卵母细胞按照图 3 设计的加载方式分别进行冷冻保护剂加载. 加载完成后, 不经过冷冻, 直接将细胞转移至 37°C 的解冻液 WS_1 , 浸没时间 3 min, 然后再快速转移至 37°C 的解冻液 WS_2 , 浸没时间 3 min. 去除保护剂之后, 细胞转移入 M II 期卵母细胞培养液中, 放入 CO_2 培养箱孵育 1 h; 然后将一部分卵母细胞用荧光素双醋酸酯 (fluorescein diacetate, FDA) 染色 5 min, 再用 TCM199 洗 3 遍, 在倒置显微镜下观察是否着色. 有强荧光反应的为活卵, 无荧光反应或弱荧光反应的为死卵. 活卵数与细胞总数之比为存活率. 将另一部分卵母细胞进行孤雌激活, 激活后的细胞转移至胚胎培养液中, 然后放入 CO_2 培养箱培养. 分别在培养的第 2 天和第 7 天观察细胞卵裂率与囊胚率. 每组实验重复 2~3 次, 数据采用数据分析软件 SPSS Statistics 13.0 进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著性差异标准.

2 结果与讨论

2.1 不同加载方式下细胞内冷冻保护剂浓度及胞内外浓度差的理论分析

图 4a 表示不同加载方式下胞内保护剂浓度的变化. 从图中可以看出, 在实验设定的加载时间内, 一步法、两步法、四步法及微流体线性法所对应的胞内保护剂浓度分别为 3.95、4.01、4.02、

4.04 mol/L. 而卵母细胞低温保存过程中形成玻璃化的胞内保护剂浓度范围是 1.5~5.6 mol/L^[11,15]. 此结果说明 4 种加载方式下细胞内保护剂浓度均形成玻璃化的条件.

图 4b 表示不同加载方式下卵母细胞内外浓度差随时间的变化曲线. 由于跨膜传质阻力的影响, 胞内浓度的增加总是滞后于胞外. 与一步法加载相

比, 分步加载和微流体线性加载减小了细胞内外的初始浓度差, 但同时增加了加载时间, 可能会对细胞造成毒性损伤. 另外, 分步法加载时会出现一些浓度差峰值, 浓度差越小, 达到平衡的时间越长, 但微流控加载冷冻保护剂时, 细胞内外的浓度差较一步法和分步法加载有明显改善, 整个过程中浓度差变化平缓.

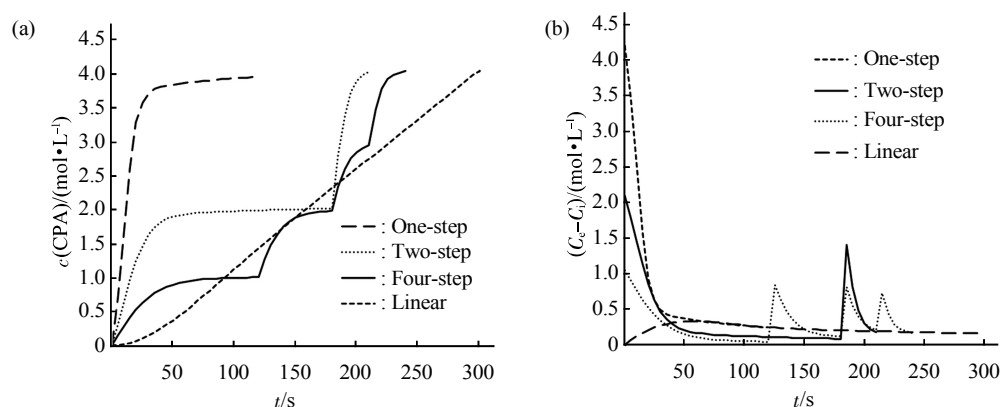


Fig. 4 Theoretical prediction of intracellular CPA concentration and concentration difference between intracellular and extracellular under different loading protocols
(a) Intracellular CPA concentration. (b) Concentration difference.

2.2 不同加载方式下卵母细胞体积变化的实验研究

图 5a 和图 5b 分别表示采用不同的方式加载 Me_2SO 时, 卵母细胞的体积变化与归一化最小渗透体积. 可以看出, 一步法、两步法、四步法和微流体线性法加载高浓度冷冻保护剂时, 细胞体积都会出现先减小, 然后逐渐增大的变化趋势, 同时不同加载方式所对应的细胞归一化最小渗透体积依次分别为 0.46 ± 0.02 、 0.68 ± 0.03 、 0.71 ± 0.02 、

0.86 ± 0.01 . 与一步法相比, 分步法和微流体线性加载冷冻保护剂时卵母细胞的体积变化曲线更平缓, 并且细胞的最小渗透体积明显减小, 说明分步法与微流体线性法加载可以减小冷冻保护剂对细胞的渗透损伤. 但分步加载冷冻保护剂时, 细胞体积会出现反复缩涨, 这样会对细胞膜结构造成一定损伤. 而且分步步数的增加对卵母细胞最小渗透体积的影响差别不大, 说明一味地增加冷冻保护剂的加载步

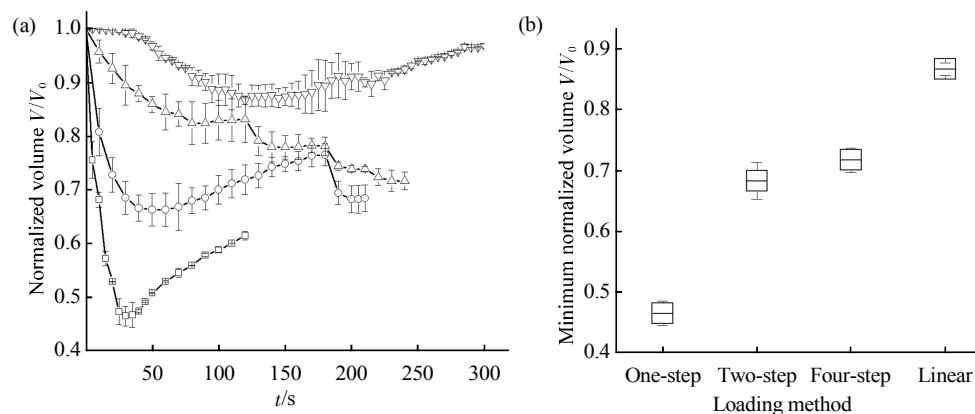


Fig. 5 Oocyte volumetric responses and the lowest normalized osmotic volume under four different CPA loading protocols
□—□: One-step; ○—○: Two-step; △—△: Four-step; ▽—▽: Linear.

数并不能无限地减小细胞的最小渗透体积, 这与文献[10]中模拟结论是一致的. 此外, 分步步数的增加也会增加细胞的丢失率, 实验的重复性差. 微流体线性法对细胞的渗透损伤小于一步法和分步法, 细胞体积不存在骤变, 而且细胞的体积可以恢复到原体积的 96%, 细胞恢复体积越接近其初始体积, 细胞低温保存的效果越好^[16]. 而对于一步法和分步法来说, 要使细胞恢复到原体积, 需要在高浓度溶液中暴露更长的时间, 这样冷冻保护剂又会对细胞造成毒性损伤.

2.3 冷冻保护剂加载方式对卵母细胞存活率与发育率的影响

将浓度为 30% Me₂SO 冷冻保护剂分别按一步法、两步法、四步法和微流体线性法加载 M II 期卵母细胞内, 细胞不经过冷冻保存, 直接通过两步法去除保护剂, 然后继续培养. 通过对卵母细胞经 FDA 染色后的荧光照片和囊胚期照片进行观察和计算, 得出不同加载方式处理后细胞的存活率与发

育率, 结果见表 2. 与一步法相比, 两步法和四步法加载之后细胞存活率分别增加 16.7%、31%, 卵裂率分别增加 15%、27.1%, 囊胚率分别增加 7.1%、7.2%. 细胞存活率与发育率的结果与渗透损伤的分析结果是一致的, 一步法加载细胞渗透压平衡时间较短, 体积变化加剧, 对细胞的渗透损伤较大. 分步加载时细胞膜两侧的渗透压差减小, 细胞体积变化相对平缓, 分得步数越多, 细胞体积反复缩涨的幅度越小. 微流体法加载冷冻保护剂后卵母细胞的存活率为 92.8%, 分别比一步法和两步法高 33%和 16.3%, 但与四步法之间无显著性差异 ($P>0.05$). 经孤雌激活后体外培养, 其卵裂率和发育率分别为 75.8%和 27.4%, 显著高于一步法和分步法. 这也证明了微流控技术用于卵母细胞冷冻保护剂添加的可行性和有效性, 能够避免细胞体积的骤变, 减小细胞的渗透损伤, 从而显著提高卵母细胞的存活率和发育率, 为临床上卵母细胞低温保存技术提供新思路.

Table 2 The effect of different CPA loading methods on the survival rate and developmental rate of porcine M II -stage oocytes

	Survival rate /%	Cleavage rate/%	Blastocyst rate/%
One-step (n=119)	37/59 (59.8±4.2) ^a	22/60 (36.6±3.5) ^a	5/60 (8.3±7.0) ^a
Two-step (n=141)	57/81 (76.5±2.8) ^b	31/60 (51.6±2.1) ^b	9/60 (15.4±5.3) ^b
Four-step (n=123)	59/65 (90.8±0.8) ^c	37/58 (63.7±1.0) ^c	9/58 (15.5±0.9) ^b
Linear (n=122)	58/60 (92.8±1.0) ^c	47/62 (75.8±1.2) ^d	17/62 (27.4±1.0) ^d

a~d: Values with different superscripts in the same column are significantly different($P<0.05$).

3 结 论

本文设计并制作了一个适合卵母细胞冷冻保护剂加载与去除的微流体装置, 实现了冷冻保护剂浓度的连续变化, 主要结论如下:

- a. 采用微流控法连续加载冷冻保护剂, 避免了卵母细胞体积的骤变, 细胞的归一化最小渗透体积降低到了 0.86, 显著低于一步法和分步法, 减轻了细胞的渗透损伤.
- b. 微流控法对猪 M II 期卵母细胞进行冷冻保护剂的线性加载, 处理后卵母细胞的存活率达到了 92.8%, 显著高于一步法和两步法($P<0.05$), 细胞的卵裂率和囊胚率分别为 75.8%和 27.4%, 都显著高于一步法和分步法.

参 考 文 献

[1] Karlsson J, Szurek E, Higgins A, *et al.* Optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes. *Cryobiology*, 2014, **68**(1): 18-28

[2] Clark N A, Swain J E. Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. *J Assist Reprod Genet*, 2013, **30** (7): 865-875

[3] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994: 149-152

Hua Z Z, Ren H S. Beijing: Science Press, 1994: 149-152

[4] Wang X, Naib A, Sun D W, *et al.* Membrane permeability characteristics of bovine oocyte and development of a step-wise cryoprotectant adding and diluting protocol. *Cryobiology*, 2010, **61**(1): 58-65

[5] Mullen S F, Li M, Li Y, *et al.* Human oocyte vitrification: the

- permeability of metaphase II oocyte to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. *Fertility and Sterility*, 2008, **89**(6): 1812–1825
- [6] 解政鼎, 马学虎, 艾丹婷, 等. 低温保护剂对神经干细胞球加载过程的模拟分析. *化工学报*, 2013, **64**(11): 3956–3967
Xie Z D, Ma X H, Ai D T, *et al.* *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2013, **64**(11): 3956–3967
- [7] Song Y S, Moon S J, Hulli L, *et al.* Microfluidics for cryopreservation. *Lab on a Chip*, 2009, **9**(13): 1874–1881
- [8] Clara M, Ellen K L, David H M, *et al.* Experimental study of diffusion-based extraction from a cell suspension. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2008, **5**(4): 529–540
- [9] Heo Y S, Lee H J, Hassell B A, *et al.* Controlled loading of cryoprotectants (CPAs) to oocyte with linear and complex CPA profiles on a microfluidic platform. *Lab on a Chip*, 2011, **11**(20): 3530–3537
- [10] 马学虎, 范文霞, 潘广生, 等. 冷冻保护剂加载细胞过程的模拟和优化. *热科学与技术*, 2008, **7**(4): 324–330
Ma X H, Fan W X, Pan G S, *et al.* *Journal of Thermal Science and Technology*, 2008, **7**(4): 324–330
- [11] Almasi-Turk S, Roozbehi A, Aliabadi E, *et al.* Developmental consequences of mouse cryotop-vitrified oocyte and embryo using low concentrated cryoprotectants. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2009, **7**(4): 181–188
- [12] Lawson A, Mukherjee I N, Sambanis A. Mathematical modeling of cryoprotectant addition and removal for the cryopreservation of engineered or natural tissues. *Cryobiology*, 2012, **64**(1): 1–11
- [13] Chen H, Shen H, Heimfeld S, *et al.* A microfluidic study of mouse dendritic cell membrane transport properties of water and cryoprotectants. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2008, **51**(23–24): 5687–5694
- [14] 杨云, 周新丽, 戴建军, 等. 猪 MII 期卵母细胞膜渗透特性的实验研究. 上海: 上海制冷年会, 2015
Yang Y, Zhou X L, Dai J J, *et al.* Shanghai: Shanghai Refrigeration Annual Meeting, 2015
- [15] Bhat M H, Sharma V, Khan F A, *et al.* Comparison of slow freezing and vitrification on ovine immature oocytes. *Cryoletters*, 2014, **35**(1): 77–
- [16] Karlsson J M, Szurek E A, Higgins A Z, *et al.* Optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes. *Cryobiology*, 2014, **68**(1): 18–28

Linear Loading Cryoprotectants (CPAs) With Microfluidic Method Reduces Osmotic Damage to Porcine M II -stage Oocytes*

YANG Yun^{1)**}, ZHOU Xin-Li^{1)**,**}, DAI Jian-Jun²⁾, ZHANG De-Fu²⁾,
SHAO Wen-Qi¹⁾, YI Xing-Yue¹⁾, TAO Le-Ren¹⁾

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

²⁾ Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract Loading cryoprotectants (CPAs) into oocytes is critical to restrain ice formation during cryopreservation. However, high concentration of CPAs may cause osmotic and toxic damage to oocytes. In order to minimize the osmotic damage, a microfluidic device for loading CPAs into oocytes was designed and fabricated in this study. 30% (*v/v*) Me₂SO was linear loaded into porcine M II -stage oocyte with the microfluidic device, the intracellular CPA concentration, the cell volumetric changes and the effect on the survival rate and developmental rate of oocytes were investigated and compared with the traditional methods including the one-step method and the step-wise methods. The results showed that the microfluidic method can realize continuous CPA loading to oocytes, reduce the osmotic shock to cells and enhance the cell viability. The lowest penetration volume of oocyte reached 0.86V₀. The cell viability was 92.8% with the microfluidic method, ~33% higher than one-step method, ~16.3% higher than two-step method, and no significant difference with four-step method. After parthenogenetic activation and cultured *in vitro*, the cleavage rate and the blastocyst rate of oocytes were 75.8% and 27.4%, which were significantly higher than the one-step method and the step-wise methods (*P* < 0.05). In conclusion, linear loading CPAs with the microfluidic method can significantly alleviate the osmotic damage to oocytes, which may provide a new path for oocyte cryopreservation.

Key words oocyte, microfluidics, osmotic damage, CPA, cryopreservation

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0009

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (51376132, 50906057), The Natural Science Foundation of Shanghai of China (13ZR1429200) and The National Key Laboratory of China (1N15301101).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

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

Received: January 13, 2016 Accepted: March 16, 2016