



## 水凝胶包封及磁热复温优化卵巢组织玻璃化保存

曹裕坤<sup>1)</sup> 叶娜<sup>1)</sup> 李铮<sup>2)</sup> 周新丽<sup>1)\*</sup><sup>(1)</sup> 上海理工大学健康科学与工程学院, 生物系统热科学研究所, 上海 200093;<sup>(2)</sup> 上海交通大学附属第一人民医院临床泌尿外科中心/泌尿男科, 上海 200080)

**摘要** 目的 针对青春期前及急需治疗的恶性肿瘤患者, 卵巢组织的冷冻和移植是更合适的生育力保存方法。目前临床上通常采用高浓度的低温保护剂 (cryoprotectants, CPAs) 进行卵巢组织冷冻并采用水浴进行复温, 这会导致卵巢组织受到不同程度的毒性损伤和反玻璃化损伤。因此, 本文基于海藻酸钠水凝胶包封及磁热复温技术, 提出了优化卵巢组织玻璃化保存的方法。**方法** 首先研究了海藻酸钠浓度、水凝胶包封与保护剂加载的顺序对包封卵巢组织玻璃化冷冻效果的影响, 并验证了海藻酸钠水凝胶包封对 CPAs 浓度的降低作用。其次, 搭建了水浴结合磁热复温的平台, 在不同磁纳米粒子浓度及磁场强度条件下对卵巢组织进行复温, 评估了复温后卵泡存活率、抗氧化能力及卵巢组织完整性。**结果** 研究发现, 2% 浓度海藻酸钠水凝胶包封卵巢组织冷冻后的卵泡存活率最高。先加载保护剂再进行包封的方式更适合卵巢组织冷冻保存, 并将所需冷冻保护剂浓度降低至原浓度的 50%。8 g/L  $Fe_3O_4$  磁纳米粒子与 300 Gs 的交变磁场对卵巢组织的复温效果最佳。水浴结合磁热复温卵巢组织后卵泡存活率最高, 抗氧化能力最好且组织形态得到了良好的保持。**结论** 海藻酸钠水凝胶包封卵巢组织能够在冷冻环节中降低保护剂浓度, 磁热与水浴的结合使用能够更高效地实现卵巢组织的复温。本研究为卵巢组织玻璃化冷冻及复温的优化提供了新的方法。

**关键词** 卵巢组织, 玻璃化, 海藻酸钠, 水凝胶, 纳米粒子, 磁热复温

中图分类号 R318, R714, TB61

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0289

CSTR: 32369.14.pibb.20240289

随着现代医学的进步, 越来越多的癌症患者能够通过各种治疗手段实现长期生存。然而, 放疗和化疗等治疗手段往往会对生殖系统造成不可逆的损伤, 导致女性患者失去生育能力<sup>[1-2]</sup>。传统的生育力保护方法包括冷冻胚胎<sup>[3]</sup>和冷冻卵母细胞<sup>[4]</sup>, 但它们都有一定的局限性。冷冻胚胎需要配偶或精子的配合, 不适合青春期前的癌症患者。冷冻卵母细胞需要一定的时间进行激素促排卵, 不适合急需治疗的患者和激素敏感性患者, 并且卵子冷冻的复苏率、妊娠率也有待提高。在这种背景下, 卵巢组织冷冻保存和移植成为一种有前景的生育力保存方法。这种技术无需促排, 不会延误肿瘤治疗, 可以一次性保存大量原始卵泡, 并在卵巢组织自体移植后产生性激素, 恢复患者的内分泌功能, 进而有希望使患者恢复生育力并能够自然生育。

目前临床上应用的卵巢组织保存工艺包括慢速冷冻保存<sup>[5]</sup>与玻璃化保存<sup>[6]</sup>两种。在慢速冷冻保存中, 通常会产生较大的过冷度, 从而在冷冻过程

中形成胞内冰, 造成机械损伤。复温后卵巢组织中卵泡存活率低, 卵巢组织受损。而在玻璃化冷冻中, 组织孵育在高浓度的低温保护剂中, 在极快的降温速率下使细胞内外的水分子转化为介于固态与液态之间的玻璃化形态, 理论上避免了冰晶造成的机械损伤。1996年 Tanaka 等<sup>[7]</sup>首次将玻璃化冷冻运用于卵巢组织, 通过使用改良的 VS1 玻璃化冷冻保护剂冷冻保存了新生大鼠卵巢组织, 解冻后培养 4 d 评估卵泡存活情况, 观察到大量形态良好的卵泡。Chen 等<sup>[8]</sup>对传统的玻璃化冻存技术进行了改进, 采用一种新颖的低温保护剂配方, 该配方由二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和乙二醇 (ethylene glycol, EG) 组成。在实验中, 小鼠卵巢组织先被孵育于这种保护剂中, 然后放置在纱布上以去除多余的液体并转移到预先装满液氮的冻

\* 通讯联系人。

Tel: 13817547878, E-mail: zjulily@163.com

收稿日期: 2024-07-01, 接受日期: 2024-08-25

存管中, 立即浸入液氮中进行冷冻。研究表明, 这种改良的玻璃化方法在保持组织活性和结构完整性方面, 明显优于Ficoll70、蔗糖、乙酰胺和乙二醇组成的传统玻璃化方案。Asgari等<sup>[9]</sup>在由DMSO和EG组成的低温保护剂中孵育小鼠卵巢并采用针浸法在液氮中完成玻璃化冷冻, 结果表明, 高浓度低温保护剂玻璃化冷冻与低浓度低温保护剂慢速冷冻方案的卵巢组织中收获的健康卵泡数量没有差异。中国的首例卵巢组织玻璃化冷冻并进行卵泡体外激活及移植, 活产出生于2019年5月28日, 由中国福利会国际和平妇幼保健院李文团队完成<sup>[10]</sup>。由于成功案例数量不足, 国际上依旧没有统一的指导性卵巢组织玻璃化冷冻保存方案。

实现卵巢组织玻璃化保存需要较高浓度的低温保护剂 (cryoprotectants, CPAs), 这会对卵巢组织造成渗透损伤和毒性损伤, 影响卵泡存活率, 因此需要在保证卵泡存活率的前提下尽可能降低CPAs浓度。研究表明, 水凝胶包封有利于在低温保存过程中将冰晶生长限制在其三维网络中, 并保持CPAs渗入细胞时的微小变化率, 从而最大限度地减少细胞损伤<sup>[11-12]</sup>。海藻酸钠是从海藻中提取的天然多糖, 因其具有良好的生物相容性而成为常用的细胞包封材料。邱鹏<sup>[13]</sup>测试了不同浓度海藻酸钠水凝胶的性能, 表明海藻酸钠溶液的浓度会影响凝胶的性能, 进而影响生物样本冷冻或培养效果。Zhang等<sup>[14]</sup>采用低温显微镜和扫描量热法研究了海藻酸钠微胶囊 (~100  $\mu\text{m}$ ) 在低温保存过程中的形态变化和微胶囊中水分的生物物理变化, 与细胞外的大量溶液相比, 离子交联的藻酸盐水凝胶中的溶液更容易实现玻璃化, 表明海藻酸钠水凝胶具有降低高浓度CPAs的细胞毒性能力。杨静<sup>[15]</sup>利用可以模拟细胞外基质的磁性水凝胶微球, 结合CPAs实现了细胞冷冻后的长期存活。在卵巢组织玻璃化冷冻领域, 有关海藻酸钠水凝胶包封的工艺及对冷冻效果的影响还未见报道。

卵巢组织除了在冷冻过程中会受到损伤, 在复温过程也极易受到反玻璃化带来的损伤。目前采用的水浴复温是由外部向内部的热传递过程, 适用于细胞悬浮液和小型生物材料的快速复温<sup>[4, 16]</sup>, 当应用于较大体积的卵巢组织样本时, 样本内部和外部无法实现同步升温, 水浴复温带来的复温速率相较于能够抑制样本反玻璃化的最佳速率而言是远远不够的。磁热复温是一种利用磁场对冷冻保存或玻璃化的生物样品进行快速复温的方式, 磁热复温中

使用的交变磁场是通过将交流电流加载到螺旋电磁感应线圈中产生的, 但由于能量转化效率较低, 往往需要加入磁性纳米粒子提高复温效率。Tian等<sup>[17]</sup>利用磁热复温技术解冻了小鼠腔前卵泡, 复温后的腔前卵泡在体外继续培养并于成熟后进行单精子注射, 最终产下二代小鼠。Gao等<sup>[18]</sup>为了延长供体心脏的保存时间, 在复温阶段引入了磁热复温, 复温后的心脏保持组织学外观和内皮完整性且通过灌注不同浓度玻璃化溶液VS55以去除心脏中的VS55和磁纳米粒子, 证实了磁热复温辅助大体积样本保存的意义。磁热复温技术可以通过超高速复温在冰晶显著生长之前到达熔点, 从而最大限度地减少重结晶, 保证细胞存活率<sup>[19]</sup>, 显著降低冷冻保护剂的毒性<sup>[20]</sup>, 有效地实现从细胞级别到组织乃至器官层次的加热过程。目前有关卵巢组织磁热复温过程的研究还不充分。

针对以上问题, 本文首先提出了海藻酸钠水凝胶包封卵巢组织并进行玻璃化冷冻, 优化水凝胶浓度参数, 研究水凝胶包封与保护剂加载的顺序对保护剂渗透的影响, 并验证海藻酸钠水凝胶包封对CPAs浓度的降低作用。其次, 搭建了水浴结合磁热复温卵巢组织平台, 研究 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子浓度、磁场强度和复温方式对复温后卵巢组织中卵泡存活率及卵巢组织抗氧化能力的影响。本研究对海藻酸钠水凝胶包封小鼠卵巢组织玻璃化冷冻保存方法以及复温工艺进行了优化, 旨在降低冷冻过程中的CPAs毒性损伤及复温过程中的反玻璃化损伤, 为临床上人卵巢组织的冷冻及复温提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与设备

DMSO、EG购自美国Sigma公司; 组织培养液 (tissue culture media, TCM199)、青链霉素、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国Gibco公司; 无水乙醇、无水氯化钙、蔗糖、海藻酸钠、柠檬酸三钠购自国药集团化学试剂有限公司; 总抗氧化能力试剂盒 (A015-2-1) 购自南京建成生物; E. vit载体由50  $\mu\text{m}$  尼龙筛网和0.25 ml 麦 (去掉棉花塞) 组成, 尼龙筛网 (LTS7520) 购自以色列Fertile SAFE公司, 麦管 ( $\phi 2 \times 133$  mm, 01128100) 购自日本FHK公司;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米粒子 (1317-61-9) 购自艾科试剂有效公司; 磁热效应仪 (DM100) 购自西班牙Nanoscale Biomagnetic公司; 多功能微孔板检测仪 (Synergy H1) 购自美

国 Biotek Instrument 公司。

溶液浓度除特别指出，均按照体积分数 (v/v) 配制。基础溶液 (base solution, BS): TCM199+20% FBS; 平衡溶液 (equilibrium solution, ES): BS+7.5% DMSO+7.5% EG; 低浓度平衡溶液 (1/2ES): BS+3.75% DMSO+3.75% EG; 玻璃化溶液 (vitrification solution, VS): BS+15% DMSO+15% EG+1 mol/L 蔗糖; 低浓度玻璃化溶液 (1/2VS): BS+7.5% DMSO+7.5% EG+1 mol/L 蔗糖; 柠檬酸钠蔗糖混合溶液: BS+0.075 mol/L 柠檬酸钠+0.5 mol/L 蔗糖; 0.5 mol/L 洗脱液 (BS+0.5 mol/L 蔗糖); 0.25 mol/L 洗脱液 (BS+0.25 mol/L 蔗糖)。

## 1.2 动物样本获取

所有动物实验均已获得上海市第一人民医院动物伦理审查委员会的批准 (伦理批准号 2022AWS0287)。选用 6~8 周无特殊病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 ICR (institute of cancer research) 系雌鼠, 平均体重 ( $18\pm 0.56$ ) g, 由浙江维通利华生物科技有限公司提供。小鼠饲养温度为 ( $22\pm 2$ ) °C, 相对湿度 40%~70%, 光照 12 h 明暗交替, 小鼠饲养的饮用水及食物均经灭菌。

小鼠在无菌手术台中被实施安乐死, 腹部备皮。剖开腹部, 剔除输卵管两侧多余脂肪, 取出输卵管与卵巢结合体。将其放入预热的磷酸盐缓冲溶

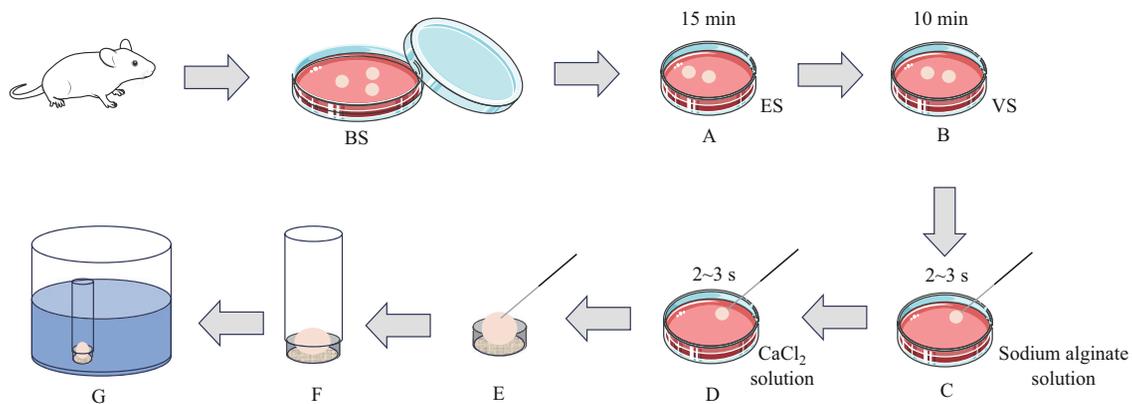
液 (phosphate buffered saline, PBS) 中清洗, 于恒温热台上分离出整个卵巢, 使用手术刀将卵巢均分为 4 块进行后续操作, 切分后的卵巢组织块直径约为 1 mm。

## 1.3 海藻酸钠水凝胶包封卵巢组织玻璃化保存

### 1.3.1 不同浓度海藻酸钠水凝胶包封卵巢组织冷冻

选取体积大小相同的卵巢组织块, 置于 37°C 热台上含 ES 的培养皿中。ES 恒温加载 15 min 后移至含有 VS 的培养皿中恒温加载 10 min。使用针灸针固定加载保护剂后的卵巢组织块, 浸没于 1%、2%、3% (w/v) 的海藻酸钠溶液中 2~3 s 后提起, 迅速浸没于 0.15 mol/L 氯化钙溶液中, 2~3 s 后海藻酸钠成胶, 得到载卵巢组织水凝胶微球。选取微粒大小相近的载卵巢组织水凝胶微球, 置于 E. vit 载体的筛网上, 取下针灸针, 将麦管固定于筛网上。镊子夹住麦管一端, 将载样本的筛网端迅速置于液氮中玻璃化, 停止沸腾后将 E.vit 整体置于液氮中维持 1 h 完成冷冻, 冷冻流程如图 1 所示。

复温过程, 将麦管取出置于 37°C 水浴复温 3 min, 取出载卵巢组织水凝胶微球, 置于含有柠檬酸钠蔗糖混合溶液的培养皿 3 min, 进行水凝胶解离与 ES 和 VS 的洗脱, 再移入 0.25 mol/L 洗脱液与 BS 中各洗脱 3 min。洗脱后的卵巢组织剥离卵泡检测卵泡存活率, 并进行 HE 切片染色。



**Fig. 1** Flowchart illustrating the encapsulation of ovarian tissue in sodium alginate hydrogel followed by vitrification

A: loading of equilibrium solution; B: loading of vitrification solution; C: immersion in sodium alginate; D: immersion in calcium chloride solution; E: placement in the E. vit carrier mesh; F: securing the straw on the mesh; G: plunging the E.vit into liquid nitrogen.

### 1.3.2 不同加载方式冷冻载卵巢组织海藻酸钠水凝胶球

为了研究水凝胶包封与保护剂加载的先后顺序对保护剂渗透的影响, 采用 3 种不同的处理程序对

载卵巢组织海藻酸钠水凝胶球进行保护剂加载。EVH 组: 按序加载 ES、VS 后包封水凝胶, HEV 组: 先包封水凝胶后按序加载 ES、VS, HEV+ 组: 先包封水凝胶后按序加载 ES、VS 但延长加载时间

至EVH组的两倍。具体程序如图2所示。各组都采用2%的海藻酸钠溶液包封, 冷冻和复温过程同

1.3.1, 洗脱后的卵巢组织剥离卵泡检测卵泡存活率, 并进行HE切片染色。

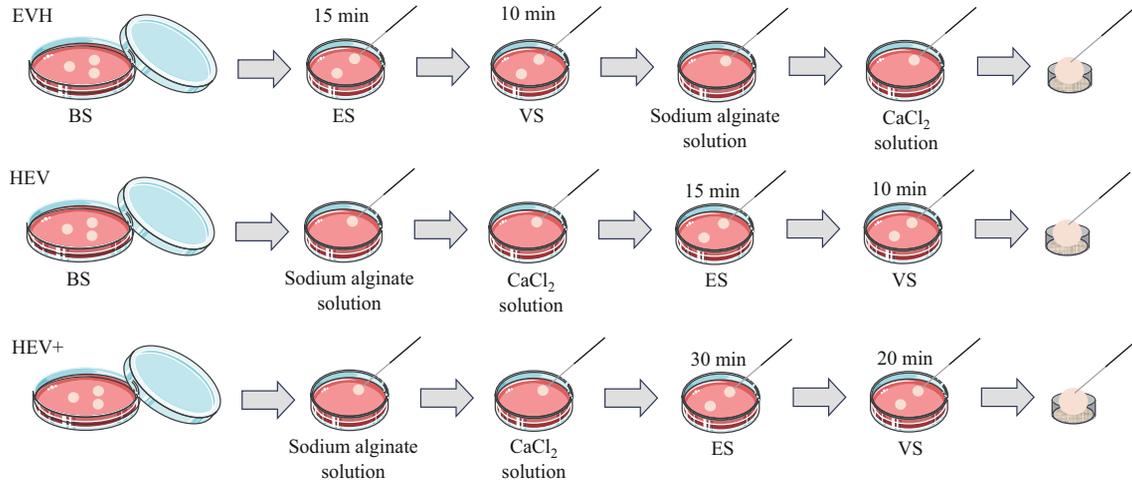


Fig. 2 Different protocols for hydrogel encapsulation and CPAs loading for ovarian tissue

### 1.3.3 不同浓度保护剂冷冻载卵巢组织海藻酸钠水凝胶球

设定4个对比组, W/O-1组: 按序加载ES、VS, 不包封水凝胶; W-1组: 先包封2%海藻酸钠水凝胶后按序加载ES、VS; W-1/2组: 先包封2%海藻酸钠水凝胶后按序加载1/2ES、1/2VS; W-0组: 只包封2%海藻酸钠水凝胶不加载ES和VS。各组冷冻和复温过程同1.3.1, 洗脱后的卵巢组织剥离卵泡检测卵泡存活率, 测定卵巢组织的抗氧化能力并进行HE切片染色。

## 1.4 卵巢组织磁热复温工艺优化

### 1.4.1 水浴结合磁热复温平台的搭建

为优化卵巢组织冷冻保存的复温工艺, 引入了 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子联合交变磁场加热的升温方式。搭建了水浴结合磁热复温卵巢组织的平台(图3)。复温平台主要包括: 电脑、磁热效应仪、冷凝水系统以及水浴复温系统。复温开始前, 先更换合适的线圈, 再开启冷凝水系统以保证系统不会过热。开启电脑配置线圈, 调整为实验所需的磁场强度, 开启磁热效应仪等待效应仪产生稳定的交变磁场。磁热效应仪工作时1 m之内不能存在金属制品, 因此水浴系统选择恒温的离心管, 实验开始前离心管放置在水浴锅中恒温, 复温开始时迅速移入线圈中, 形成了完整的水浴联合磁热复温系统。

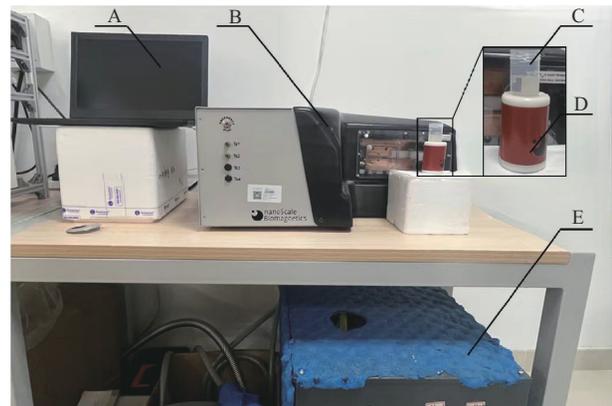


Fig. 3 A platform for warming ovarian tissue using a combination of water bath and magnetic induction nanowarming

A: computer; B: magnetic induction nanowarming device; C: centrifuge tube with water bath; D: magnetic heating coil; E: condensate system.

### 1.4.2 不同浓度磁纳米粒子和磁场强度复温卵巢组织

纳米粒子浓度和磁场强度都会影响加热系统的升温速率, 考虑到高浓度 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子具有毒性以及强磁场会造成机械损伤, 需要对纳米粒子浓度和磁场强度进行优化。

选择体积大小相等的卵巢组织置于ES中加载15 min, 然后转移至含6、8、10 g/L纳米粒子的

VS中加载10 min, 加载过程需不断摇晃以防止纳米粒子沉淀。加载完成后将卵巢组织置于麦管( $\phi 2 \times 133$  mm)口边缘, 打入200  $\mu\text{l}$ 含相同浓度纳米粒子的VS, 保证卵巢组织漂浮于VS中, 每个麦管存放一块组织, 直接投入液氮完成冷冻。

复温时迅速将麦管置于100、200、300 Gs磁场强度的复温平台离心管中, 停止沸腾后取出组织并依次转移到0.5 mol/L洗脱液、0.25 mol/L洗脱液和BS中分别洗脱3 min使得纳米粒子和保护剂被完全去除。洗脱液和BS均放置于37°C恒温热台上。复温完成后的卵巢组织剥离卵泡检测卵泡存活率。

#### 1.4.3 不同复温方式复温卵巢组织

卵巢组织按照1.4.2的方式进行冷冻, 分别采用水浴、磁热以及水浴结合磁热进行复温, 比较不同复温方式对卵巢组织的影响。

水浴组: VS中不加入纳米粒子。复温时将麦管从液氮中取出, 直接投入37°C水浴锅, 停止沸腾后将卵巢组织取出并依次转移到0.5 mol/L洗脱液、0.25 mol/L洗脱液和BS中分别洗脱3 min。

磁热组: VS中含浓度8 g/L  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子。复温时先启动磁热效应仪, 待仪器产生稳定的200 Gs交变磁场后, 将麦管从液氮中取出, 迅速置于仪器的线圈中, 待麦管中的液体完全融化后, 将卵巢组织取出并依次转移到0.5 mol/L洗脱液、0.25 mol/L洗脱液和BS中分别洗脱3 min。

水浴结合磁热组: VS中含浓度8 g/L  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子。复温时先启动磁热效应仪, 待仪器产生稳定的200 Gs交变磁场后, 将37°C恒温水浴内的离心管移入线圈中。迅速从液氮中取出麦管, 置于离心管中水浴, 停止沸腾后将卵巢组织取出并依次转移到0.5 mol/L洗脱液、0.25 mol/L洗脱液和BS中分别洗脱3 min。

#### 1.5 卵泡存活率测定

洗脱后的卵巢组织在显微镜下使用注射针头机械剥离其中的卵泡, PBS洗涤1次后, 移入培养皿中, 滴入50  $\mu\text{l}$  Calcein-AM/PI染料(2  $\mu\text{mol/L}$  Calcein/AM+1.5  $\mu\text{mol/L}$  PI), 于培养箱中37°C避光孵育45 min。染色结束后使用荧光显微镜观察卵泡颜色, 以判断卵泡的存活。显绿色荧光为阳性即卵泡存活, 显红色荧光为阴性即卵泡死亡。卵泡存活率=阳性数/(阳性数+阴性数) $\times 100\%$ 。

#### 1.6 抗氧化能力测定

2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵

(ABTS)作为显色剂会在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的ABTS<sup>+</sup>, 当存在抗氧化物时反应物的产生会被抑制, 在405 nm测定反应后溶液的吸光度( $A_{405}$ ), 同时引入一种具有抗氧化能力的标准物Trolox作为参考即可计算出样品的总抗氧化能力。Trolox的抗氧化能力为1, 样品的抗氧化能力表示为Trolox的倍数, 即Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), 单位为1。TEAC值越大, 抗氧化能力越强。

按照质量体积比(g/ml)1:9加入生理盐水, 冰水浴中将组织研磨匀浆, 充分破碎释放抗氧化物。随后放置于低温离心机中, 设置转速为12 000 r/min, 离心5 min后取上清液。得到的上清液取10  $\mu\text{l}$ 滴入96孔板中, 加入20  $\mu\text{l}$ 酶溶液和170  $\mu\text{l}$ 反应溶液。每个样品组设置6个平行孔。室温反应6 min后转移至多功能微孔板检测仪中, 波长设定为405 nm, 读取各孔 $A_{405}$ 。将 $A$ 值代入标准曲线中, 计算得出样品的TEAC。

#### 1.7 组织学分析

洗脱后的卵巢组织, 使用4%多聚甲醛固定24 h。然后使用梯度浓度的酒精进行洗脱, 脱水后需对组织进行透明化处理。透明后的组织浸蜡包埋, 切片烘烤3h后脱蜡。脱蜡后的切片分别用Harris氏苏木素染液和1%水溶性伊红染液染色。染色结束切片放入无水乙醇中脱水, 放入二甲苯中透明, 风干后用中性树胶封片。封好的胶片置于显微镜下, 观察卵巢组织致密程度, 判断各级卵泡及卵母细胞核形态是否正常。

#### 1.8 统计分析

数据采用GraphPad软件的ANOVA (analysis of variance)进行分析。每组实验重复3次, 采用单因素方差分析, 比较列于列之间的平均值, 数据以mean $\pm$ SD表示, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异评判标准, 具有统计学意义。

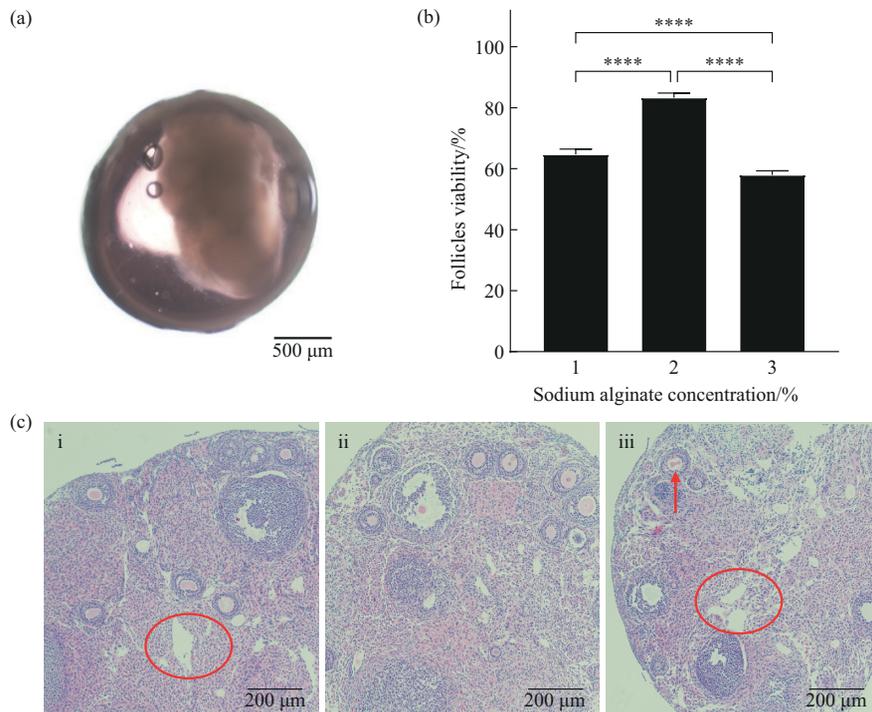
## 2 结果与讨论

#### 2.1 海藻酸钠浓度对包封卵巢组织冷冻的影响

采用1%、2%和3% (w/v)的海藻酸钠溶液包封, 制得的水凝胶包封卵巢组织微球的直径约为2 mm (图4a)。卵巢组织微球的冷冻及复温方式按照1.3.1所述, 检测复温后的卵巢组织卵泡存活率(图4b), 分别为64.68%、83.32%和57.97%。图4c反映了不同浓度海藻酸钠溶液包封卵巢组织冷冻后的组织形态, 1%的海藻酸钠溶液成胶后包封效果

较好, 卵泡形态保持良好, 但组织内部出现空腔, 如图中红色圆形所示。2% 的海藻酸钠溶液成胶后冷冻效果最好, 卵泡形态正常, 为圆形或椭圆形,

组织致密无松散。3% 的海藻酸钠溶液成胶后封装的卵巢组织在冷冻后出现明显组织松散以及大量空腔, 卵泡也产生了形态异常 (图中红色箭头)。



**Fig. 4** The effect of sodium alginate concentration on vitrification of encapsulated ovarian tissue

(a) Microscopic view of ovarian tissue encapsulated in sodium alginate hydrogel; (b) effect of different concentrations of sodium alginate on follicle survival, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; (c) HE staining of ovarian tissues encapsulated with different concentrations of sodium alginate. i: 1% sodium alginate; ii: 2% sodium alginate; iii: 3% sodium alginate. Red circles indicate the presence of cavities; red arrows indicate anisotropic follicles.

Abdi 等<sup>[21]</sup> 将小鼠卵巢放入含 40% (v/v) EG+30% (w/v) Ficoll70+1mol/L 蔗糖的 EFS40 中孵育 5 min 后投入液氮进行玻璃化冷冻, 这种高浓度的低温保护剂使得复温后卵泡存活率为 81.71%。Liu 等<sup>[22]</sup> 采用低浓度低温保护剂孵育小鼠卵巢组织并进行玻璃化冷冻, 将小鼠卵巢放入含 7.5% (v/v) EG+7.5% (v/v) DMSO+10% FBS 的 DMEM/F12 中孵育 30 min, 随后转移至含 15% (v/v) EG+15% (v/v) DMSO+10%FBS 的 DMEM/F12 中孵育 30 min 后移入注射器内并投入液氮进行玻璃化冷冻, 复温后的卵巢组织中各阶段卵泡的平均存活率为 (66.23±12.21) %。本研究采用低浓度保护剂加载卵巢组织并通过 2% 海藻酸钠水凝胶封装卵巢组织, 在降低保护剂浓度的同时也使得复苏后卵巢组织内卵泡的存活率提高至 83.32%。

海藻酸钠溶液与  $\text{CaCl}_2$  交联形成海藻酸钠水凝胶时, 可以通过调节海藻酸钠浓度使水凝胶的杨氏

模量小于 1 kpa 或者超过 1 000 kpa, 当海藻酸钠浓度过低时, 会影响氢键的形成, 进而影响海藻酸钠水凝胶的低温保护作用。林春燕等<sup>[23]</sup> 通过低温显微观察了不同浓度海藻酸钠溶液成交后的结晶现象。实验结果表明, 交联后的海藻酸钠水凝胶可以减缓冰晶的生长速度与体积, 海藻酸钠水凝胶浓度增大, 生成的冰晶则越细小, 对样本的冰晶损伤越少。本研究中, 1% 的海藻酸钠成胶后形成氢键数量有限, 抑冰效果过低, 因此不适合冷冻卵巢组织。此外, 海藻酸钠的浓度会影响成胶后的机械性能, Ouwerx 等<sup>[24]</sup> 探究了影响海藻酸钠水凝胶性能的各项因素, 结果表明水凝胶珠的杨氏模量随着藻酸盐浓度的平方而增加, 即  $E=KC^2$  ( $E$  为海藻酸钠水凝胶的杨氏模量,  $C$  为海藻酸盐浓度,  $K$  为海藻酸盐浓度  $C$  对杨氏模量  $E$  贡献效率的比例常数)。浓度过大的海藻酸钠溶液成胶后杨氏模量越大, 越不易产生形变, 对生物样本产生挤压应力, 造成冷

冻过程组织的机械损伤。3%的海藻酸钠成胶后杨氏模量大, 挤压应力大, 对卵巢组织产生了机械损伤。因此, 合理选择海藻酸钠溶液浓度对成胶后封装卵巢组织冷冻效果具有很大的影响。

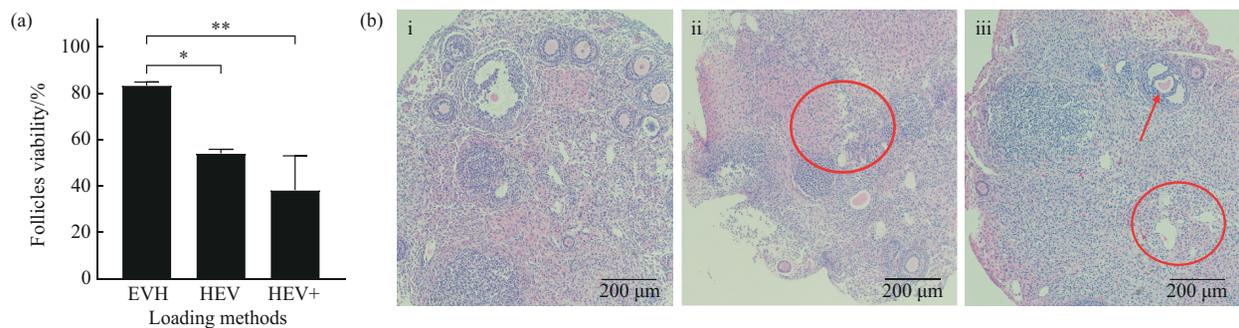
## 2.2 加载方式对冷冻载卵巢组织海藻酸钠水凝胶球的影响

水凝胶封装与保护剂加载的先后顺序对冷冻卵巢组织效果会产生影响, 设置了3个不同的水凝胶封装与保护剂加载程序冷冻卵巢组织, 测定了复温后卵巢组织卵泡存活率(图5a)。从图中可以看出, EVH组、HEV组和HEV+组卵巢组织复温后卵泡存活率分别为83.32%、54.05%和38.16%。存活率证明了先加载ES和VS后封装水凝胶的方式更适合卵巢组织冷冻保存。

图5b反映了不同加载方式冷冻后卵巢组织的形态学。先加载ES和VS后封装水凝胶组较好地保存了卵巢组织中的卵泡, 各级卵泡呈现圆形或椭圆形的正常状态。对于封装水凝胶后加载ES和VS组, 复温后的卵巢组织卵泡或出现空腔或形态出现

异常, 如图中红色标识所示。当卵泡为非规则的圆形或椭圆形无法保证在后续培养中正常发育。

姚剑波<sup>[25]</sup>使用海藻酸钠水凝胶封装红细胞冷冻保存, 将洗涤后的红细胞与CPAs溶液按照4:3混合至1 ml, 混合后室温下平衡10 min。然后通过静电喷雾装置生成核壳结构红细胞-水凝胶微胶囊冷冻保存, 复温后红细胞存活率最高可达到86.76%。李其焯等<sup>[26]</sup>使用海藻酸钠水凝胶封装HEK293T细胞冷冻保存, 先使用喷雾法将悬浮细胞封装于海藻酸钠水凝胶中, 而后加载CPAs冷冻保存, 玻璃化保存的HEK293T细胞的存活率由封装前的33.5%增至79%。由此可见, 在封装冷冻中, 水凝胶封装与CPAs加载的顺序需要根据细胞的具体要求进行选择。对于卵巢组织这样的大样品, 封装后CPAs很难完全渗入组织中, 这会导致一部分样本CPAs浓度过低, 冷冻过程中产生冷冻损伤, 复温后卵泡存活率下降。因此, 更适合卵巢组织这类大样本的水凝胶辅助冷冻的方式为先加载CPAs后封装水凝胶。



**Fig. 5 The effect of loading methods on vitrification of encapsulated ovarian tissue**

(a) Effect of different loading methods on follicle survival rate, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; (b) HE staining of freezing ovarian tissues with different loading methods. i: Group EVH (hydrogel encapsulation after loading with ES and VS); ii: Group HEV (hydrogel encapsulation before loading with ES and VS); iii: Group HEV+ (extended loading time of ES and VS following hydrogel encapsulation). Red circles indicate the presence of cavities; red arrows indicate anisotropic follicles.

## 2.3 海藻酸钠水凝胶封装对玻璃化冷冻卵巢组织保护剂浓度的降低作用

按照1.3.3的组别冷冻卵巢组织, 复温后的卵巢组织卵泡存活率如图6a所示。W/O-1组卵泡存活率为77.91%; W-1组卵泡存活率为81.57%; W-1/2组卵泡存活率为83.32%; W-0组卵泡存活率仅有51.34%。

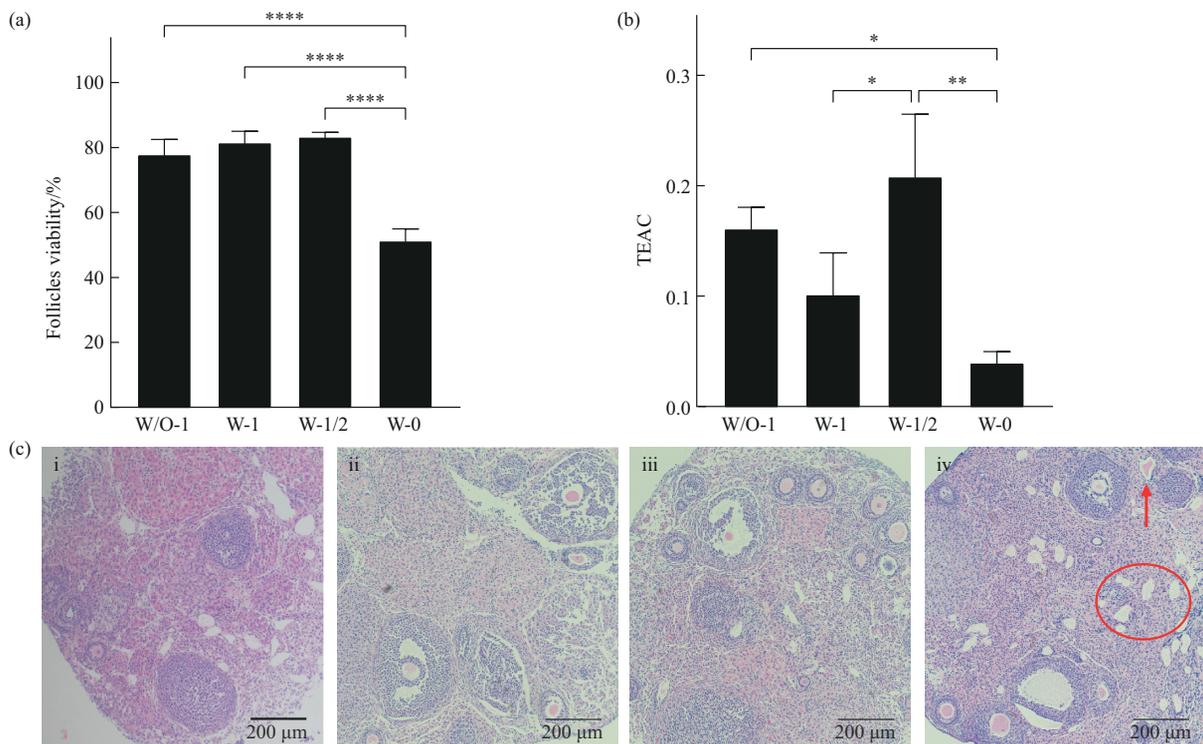
卵巢组织封装水凝胶并加载ES和VS的W-1组与不封装水凝胶的W/O-1相比, 冻后卵泡存活有

所提升, 但并没有显著性差异。当降低封装水凝胶组所用的ES和VS时, 即使仅使用1/2ES和1/2VS的W-1/2组冷冻卵巢组织, 冻后卵泡存活率依旧没有降低, 也即封装组有效地降低了在冷冻过程中所需要的保护剂浓度。当完全排除ES和VS的W-0组仅使用水凝胶封装时, 卵巢组织冷冻后卵泡存活率显著下降, 也就是说水凝胶无法替代CPAs单独使用, 但是可以联合CPAs降低毒性损伤, 达到更好的冷冻效果。

水凝胶的抗冻机制与水分子结合有关, 水分子与水凝胶网络之间具有强相互作用, 低温保护剂中的水分与水凝胶网络之间形成氢键, 以减少自由水的比例<sup>[27]</sup>, 从而减少冷冻过程中的冰晶生长, 有效地降低玻璃化过程中对低温保护剂的需求<sup>[28-29]</sup>。当使用较低浓度低温保护剂时, 水凝胶微球内部的水可以优先玻璃化避免细胞在冷冻过程中受到低温损伤。同时, 海藻酸钠水凝胶微球还能限制低温保护剂的运输, 通过缓慢的递送低温保护剂减少渗透损伤。

保护剂浓度的降低使卵巢组织所受的保护剂毒性损伤降低, 也因此提高了卵巢组织抗氧化能力。

卵巢组织移植后需要重新建立血氧环境, 在这个阶段往往会造成卵泡的死亡。卵巢组织的抗氧化能力影响组织结构增殖活性, 高抗氧化能力为移植后的组织提供良好的血管化环境, 减少该过程的卵泡死亡<sup>[30]</sup>。各组复温后测定卵巢组织抗氧化能力, 结果如图 6b 所示。W/O-1 组卵巢组织 TEAC 为 0.16; W-1 组卵巢组织 TEAC 为 0.10; W-1/2 组卵巢组织 TEAC 为 0.20; W-0 组卵巢组织 TEAC 仅有 0.03。数据显示包封水凝胶并加载低浓度保护剂的卵巢组织具有更好的抗氧化能力, 因为在加载过程中所受的保护剂毒性损伤更小, 这样的组织更适用于临床的移植。



**Fig. 6** The effect of sodium alginate hydrogel encapsulation on reducing cryoprotectant concentration for vitrification of ovarian tissue

(a) Effect of different encapsulation methods on follicle survival rate; (b) effect of different encapsulation methods on the antioxidant capacity; (c) HE staining of ovarian tissue with different encapsulation methods. i: Group W/O-1; ii: Group W-1; iii: Group W-1/2; iv: Group W-0. Red circles indicate the presence of cavities; red arrows indicate anisotropic follicles. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

各组冷冻后的卵巢组织形态学染色如图 6c 所示, W/O-1 组和 W-1 组都能较好的保存组织中的卵泡, 但卵巢组织出现了少量空腔, W-1/2 组卵巢组织冻后组织形态正常, 卵泡形态也规则, W-0 组卵泡出现异常, 细胞呈现折叠状, 如图中红色箭头所示。组织致密程度也受到较大影响, 呈现疏松多孔的异常形态。HE 结果再次印证, 水凝胶包封无法

独立于保护剂单独使用。

玻璃化冷冻可能带来低温保护剂的加载造成的渗透损伤, 以及保护剂的毒性。暴露于 CPAs 时毒性会导致细胞活力和功能的丧失, 因此需要最大限度地降低 CPAs 的浓度。Rodrigues de Freitas 等<sup>[31]</sup>通过水凝胶包封冷冻保存了斑马鱼卵巢组织, 实验结果表明海藻酸钠水凝胶包封技术在使用标准浓度

的CPAs时,不具有冷冻保护作用,但仍能保持膜的完整性。使用封装技术时同时使用低浓度CPAs不会影响斑马鱼卵巢组织的冷冻效果,这与本实验的实验结果一致。同时,海藻酸钠水凝胶封装可以有效防止卵母细胞在冷冻过程中从组织中脱落,对于后期的体外成熟也是可参考的工艺。

#### 2.4 不同浓度磁纳米粒子和磁场强度对卵巢组织复温效果的影响

采用纳米粒子浓度分别为6、8、10 g/L的玻璃化溶液冷冻卵巢组织,复温后的卵巢组织卵泡存活率为53.79%、80.82%和70.61% (图7a)。

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子具有良好的生物相容性,Wang等<sup>[32]</sup>将间充质干细胞和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子共同孵育3 d,通过CCK-8实验验证了纳米粒子不会影响细胞的线粒体功能。磁热复温是通过交变磁场激发磁性纳米粒子产热,纳米粒子数量少会影响产热效率,进而降低样本的复温效果。董一霖等<sup>[33]</sup>优化了动脉血管的磁热复温,测量不同浓度磁纳米

粒子在交变磁场中的复温速率。结果显示,体系的复温速率与纳米粒子的浓度成正相关。Zhang等<sup>[34]</sup>探究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁纳米粒子诱导自噬体的多种机制,包括溶酶体损伤、线粒体损伤和内质网应激等。体内研究结果表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米颗粒处理30 d的小鼠可导致自噬体在肾脏和脾脏中的积累。这种损伤随着离子浓度的增加而积累,所以需要在复温结束后立刻洗脱磁纳米粒子。分步法<sup>[33, 35]</sup>是一种常用的洗脱方式,冯海靠等<sup>[35]</sup>通过分步法将大鼠肾脏逐步暴露于不同浓度梯度的保护剂溶液中,在不同的渗透压环境下利用渗透压差对保护剂及纳米粒子进行逐步洗脱,并使用磁共振成像(MRI)验证洗脱的有效性。本实验同样使用分步法移除磁纳米粒子,并于移除后对卵巢组织采取普鲁士蓝染色<sup>[36]</sup>,染色结果表明组织内部几乎没有纳米粒子残留,组织外周有微量纳米粒子残留。因此,在同时保证低毒性与高复温效率的情况下8 g/L是最适合复温卵巢组织的磁纳米粒子浓度。

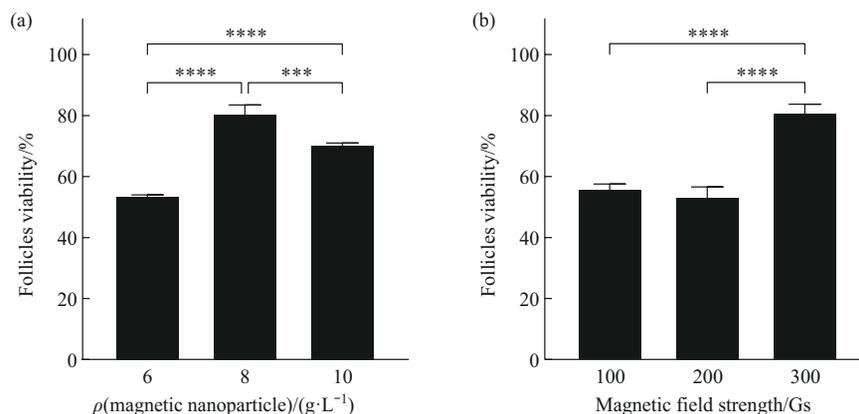


Fig. 7 The effect of magnetic nanoparticle concentration and magnetic field strength on the warming efficiency of ovarian tissue

(a) Effect of magnetic nanoparticles concentration on the follicle survival rate; (b) effect of magnetic strength on the follicle survival rate. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

采用100、200、300 Gs的交变磁场分别复温冷冻的卵巢组织,复温后卵巢组织卵泡存活率为55.91%、53.44%和80.82% (图7b)。交变磁场的强度越大产生的能量越大,由此带来更大的热传递,保证了卵巢组织的快速复温。冯海靠等<sup>[35]</sup>通过纳米磁热复温技术复温了大鼠肾脏,实验结果表明磁热性能随交变磁场的强度提升而增加。该结论与本实验结果是相同的,磁场强度的升高能够更快复温生物样本。由于本实验使用的磁热效应仪最高磁场强度为300 Gs,进一步提高磁场强度是否会提

升组织复温效果还需要验证。

#### 2.5 不同复温方式对卵巢组织复温效果的影响

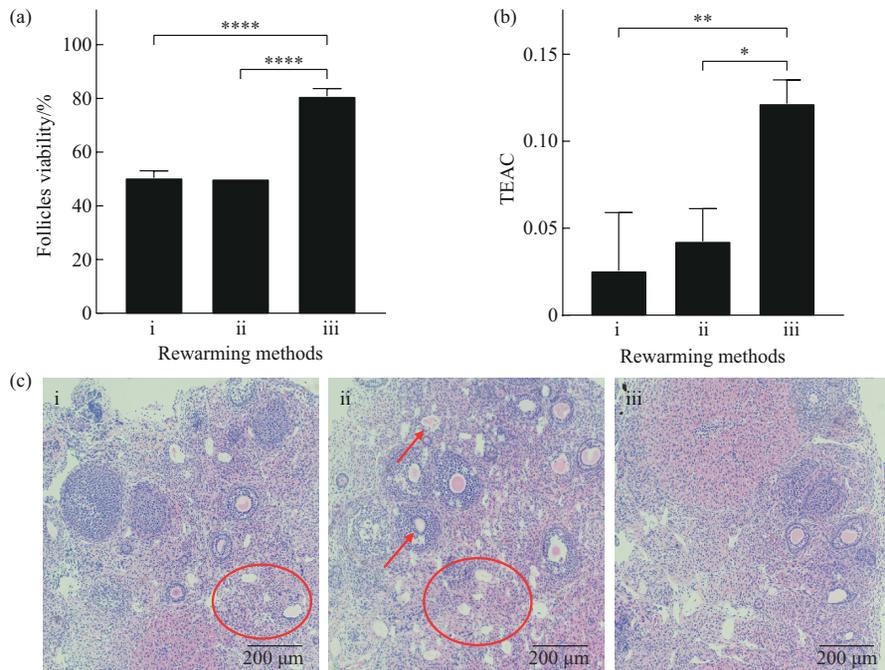
将优化好的水浴联合磁热复温工艺与水浴复温和磁热复温进行了对比,各组复温后卵巢组织卵泡存活率如图8a所示。水浴复温后卵巢组织卵泡存活率为50.44%;磁热复温后卵巢组织卵泡存活率为53.33%;水浴复温联合磁热复温卵巢组织卵泡存活率为86.50%。可以看出,水浴复温结合磁热复温能够达到最好的效果,最大限度保证卵泡的存活。

各复温工艺复温后的卵巢组织抗氧化能力如图8b所示。水浴复温后卵巢组织TEAC为0.03; 磁热复温后的卵巢组织TEAC为0.04; 水浴复温联合磁热复温卵巢组织TEAC为0.12。抗氧化能力进一步显示水浴结合磁热复温的工艺更适合卵巢组织。

图8c为3种复温方式复温后的卵巢组织HE染色。水浴复温后的卵巢组织卵泡形态良好, 但组织皮质产生部分空腔, 如图中红色圆形所示; 磁热复温后卵巢组织产生大量空腔, 卵泡形状异常, 如图中红色箭头所示, 大部分卵泡无法维持圆形或椭圆形形态; 水浴结合磁热复温后卵巢组织形态正常, 卵泡维持圆形或椭圆形。HE染色显示水浴结合磁

热复温能够更好地复温卵巢组织。

水浴结合磁热复温的工艺能够更快实现升温, 该工艺结合了两种发热方式, 在升温效率上更快。同时也是一种更均匀地复温方式。董一霖等<sup>[33]</sup>的研究表明, 当纳米粒子浓度为10 g/L, 磁场强度为300 Gs时, 复温速率最高可达175°C/min。但对于卵巢组织的复温, 塑料麦管为载体所含保护剂量少, 纳米粒子响应产热较少, 因此需要结合水浴复温与磁热复温。Tian等<sup>[17]</sup>结合了水浴复温、激光复温与磁热复温的方式对小鼠腔前卵泡进行了冷冻复温, 结果显示复合复温方式比单一水浴复温效率更高, 效果也更好。



**Fig. 8** The effect of different rewarming methods on the warming efficiency of ovarian tissue

(a) Effect of different rewarming method on follicle survival rate; (b) effect of different rewarming methods on the antioxidant capacity; (c) HE staining of ovarian tissue subjected to different rewarming techniques. i: Water bath warming; ii: magnetic induction nanowarming; iii: combined water bath and magnetic induction nanowarming. Red circles denote the presence of cavities; red arrows indicate anisotropic follicles. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

### 3 结 论

针对青春期前及急需治疗的恶性肿瘤患者和激素敏感型的患者, 卵巢组织冷冻和移植是更合适的生育力保存方法。临床上各中心使用的卵巢组织的冷冻工艺各不相同, 复温后的卵巢组织成功率和存活率波动较大。因此, 本研究通过对海藻酸钠水凝胶包封和磁热复温技术优化卵巢组织的玻璃化冷冻

及复温工艺的探索, 为临床提高卵巢组织玻璃化冷冻效果提供新方法。研究得到的结论如下:

a. 2%浓度的海藻酸钠水凝胶最适合包封卵巢组织冷冻保存。先进行水凝胶包封后加载保护剂会影响保护剂渗透, 先加载保护剂后进行水凝胶包封冷冻更适合卵巢组织。海藻酸钠水凝胶包封能降低冷冻过程使用的渗透保护剂浓度, 但不能完全取代渗透性保护剂。

b. 浓度为 8 g/L 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁纳米粒子最适合应用于卵巢组织的复温, 复温效率较高且粒子毒性较低。最适交变磁场强度为 300 Gs, 该强度能够满足更快地升温速率。对比了传统的水浴复温、磁热复温以及优化后的水浴联合磁热复温, 结果证实水浴联合磁热复温的方式能够更高效地实现生物样本的加热。

### 参 考 文 献

- [1] Meirou D, Biederman H, Anderson R A, *et al.* Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol*, 2010, **53**(4): 727-739
- [2] Sakamoto T, Eguchi H, Omoto Y, *et al.* Estrogen receptor-mediated effects of tamoxifen on human endometrial cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, **192**(1/2): 93-104
- [3] 石玉华, 潘焯, 谢燕秋. 胚胎冷冻保存技术及进展. *山东大学学报: 医学版*, 2022, **60**(9): 12-18  
Shi Y H, Pan Y, Xie Y Q. *J Shandong Univ Health Sci*, 2022, **60**(9): 12-18
- [4] Argyle C E, Harper J C, Davies M C. Oocyte cryopreservation: where are we now?. *Hum Reprod Update*, 2016, **22**(4): 440-449
- [5] Donnez J, Dolmans M M, Demylle D, *et al.* Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004, **364**(9443): 1405-1410
- [6] Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, *et al.* Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod*, 2015, **30**(3): 608-615
- [7] Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, *et al.* Characterization of the AT2 receptor on rat ovarian granulosa cells. *Adv Exp Med Biol*, 1996, **396**: 175-182
- [8] Chen S U, Chien C L, Wu M Y, *et al.* Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod*, 2006, **21**(11): 2794-2800
- [9] Asgari F, Valojerdi M R, Ebrahimi B, *et al.* Three dimensional *in vitro* culture of preantral follicles following slow-freezing and vitrification of mouse ovarian tissue. *Cryobiology*, 2015, **71**(3): 529-536
- [10] 孙宁霞, 李紫袁, 庞文娟, 等. 中国首例卵巢组织冷冻移植活产 2 年随访. *中华生殖与避孕杂志*, 2021, **41**(11): 1026-1030  
Sun N X, Li Z Y, Pang W J, *et al.* *Chin J Reprod Contracept*, 2021, **41**(11): 1026-1030
- [11] Chen W, Lisowski M, Khalil G, *et al.* Microencapsulated 3-dimensional sensor for the measurement of oxygen in single isolated pancreatic islets. *PLoS One*, 2012, **7**(3): e33070
- [12] Pravdyuk A I, Petrenko Y A, Fuller B J, *et al.* Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells. *Cryobiology*, 2013, **66**(3): 215-222
- [13] 邱鹏. 应用海藻酸钠建立猪卵母细胞体外成熟的三维培养方法[D]. 南宁: 广西大学, 2023
- Qiu P. Establishment of Three-dimensional Culture Method for *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes by Sodium Alginate[D]. Nanning: Guangxi University, 2023
- [14] Zhang W, Yang G, Zhang A, *et al.* Preferential vitrification of water in small alginate microcapsules significantly augments cell cryopreservation by vitrification. *Biomed Microdevices*, 2010, **12**(1): 89-96
- [15] 杨静. 细胞高效保存新方法的研究与开发[D]. 天津: 天津大学, 2018  
Yang J. Research and Development of a New Method for Efficient Cell Preservation [D]. Tianjin: Tianjin University, 2018
- [16] Fahy G M, Wowk B, Wu J, *et al.* Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*, 2004, **48**(2): 157-178
- [17] Tian C, Shen L, Gong C, *et al.* Microencapsulation and nanowarming enables vitrification cryopreservation of mouse preantral follicles. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 7515
- [18] Gao Z, Namsrai B, Han Z, *et al.* Vitrification and rewarming of magnetic nanoparticle-loaded rat hearts. *Adv Mater Technol*, 2022, **7**(3): 2100873
- [19] Jin B, Kleinhans F W, Mazur P. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology*, 2014, **68**(3): 419-430
- [20] Zhan L, Han Z, Shao Q, *et al.* Rapid joule heating improves vitrification based cryopreservation. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6017
- [21] Abdi S, Salehnia M, Hosseinkhani S. Kit ligand decreases the incidence of apoptosis in cultured vitrified whole mouse ovaries. *Reprod Biomed Online*, 2015, **30**(5): 493-503
- [22] Liu G, Li S, Yuan H, *et al.* Effect of sodium alginate on mouse ovary vitrification. *Theriogenology*, 2018, **113**: 78-84
- [23] 林春燕, 张宇琪, 周新丽. 海藻酸钠水凝胶包封卵母细胞结晶性质研究. *制冷学报*, 2025, **46**(1): 157-166  
Lin C Y, Zhang Y Q, Zhou X L. *Journal of Refrigeration*, 2024. <http://link.cnki.net/urlid/2011.2182.TB.20240227.20241201.20240002>
- [24] Ouwerx C, Velings N, Mestdagh M M, *et al.* Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polym Gels Netw*, 1998, **6**(5): 393-408
- [25] 姚剑波. 水凝胶微胶囊封装在人红细胞冷冻保存中的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2022  
Yao J B. Study on Encapsulation of Hydrogel Microcapsules in Cryopreservation of Human Red Blood Cells [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2022
- [26] 李其焯, 王世革, 刘宝林. 离子交联海藻酸盐水凝胶在细胞培养和冷冻保存中的研究. *制冷学报*, 2024, **45**(1): 158-166  
Li Q Y, Wang S G, Liu B L. *J Refrig*, 2024, **45**(1): 158-166
- [27] Chang T, Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Adv Sci*, 2021, **8**(6): 2002425
- [28] Zhao G, Liu X, Zhu K, *et al.* Hydrogel encapsulation facilitates rapid-cooling cryopreservation of stem cell-laden core-shell microcapsules as cell-biomaterial constructs. *Adv Healthc Mater*,

- 2017, **6**(23): 10.1002/adhm.201700988
- [29] Liu X, Zhao G, Chen Z, *et al.* Dual suppression effect of magnetic induction heating and microencapsulation on ice crystallization enables low-cryoprotectant vitrification of stem cell-alginate hydrogel constructs. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(19): 16822-16835
- [30] 张莉媛. 静磁场辅助复温对低温保存卵巢组织抗氧化损伤影响的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2023
- Zhang L Y. Effect of Static Magnetic Field-assisted Rewarming on Antioxidant Damage of Cryopreserved Ovarian Tissue [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2023
- [31] Rodrigues de Freitas T, Giannotti Galuppo A, Santos Marques L, *et al.* Hydrogel encapsulation as a handling and vitrification tool for zebrafish ovarian tissue. *Theriogenology*, 2023, **198**: 153-163
- [32] Wang J, Zhao G, Zhang Z, *et al.* Magnetic induction heating of superparamagnetic nanoparticles during rewarming augments the recovery of hUCM-MSCs cryopreserved by vitrification. *Acta Biomater*, 2016, **33**: 264-274
- [33] 董一霖, 胥义, 臧传宝, 等. 磁热复温对玻璃化保存脐动脉力学特性的影响. *医用生物力学*, 2021, **36**(1): 22-29
- Dong Y L, Xu Y, Zang C B, *et al.* *J Med Biomech*, 2021, **36**(1): 22-29
- [34] Zhang X, Zhang H, Liang X, *et al.* Iron oxide nanoparticles induce autophagosome accumulation through multiple mechanisms: lysosome impairment, mitochondrial damage, and ER stress. *Mol Pharm*, 2016, **13**(7): 2578-2587
- [35] 冯海靠, 张森, 毛宇, 等. 纳米磁热复温玻璃化低温保存大鼠肾脏的研究. *真空科学与技术学报*, 2021, **41**(9): 883-890
- Feng H K, Zhang M, Mao Y, *et al.* *Chin J Vac Sci Technol*, 2021, **41**(9): 883-890
- [36] 武昊安. 可注射温敏磁性凝胶及其肿瘤介入磁感应热疗研究[D]. 南京: 东南大学, 2019
- Wu H A. Study on Injectable Temperature-sensitive Magnetic Gel and Its Tumor Interventional Magnetic Induction Hyperthermia [D]. Nanjing: Southeast University, 2019

## Optimization of Ovarian Tissue Vitrification Using Hydrogel Encapsulation and Magnetic Induction Nanowarming

CAO Yu-Kun<sup>1)</sup>, YE Na<sup>1)</sup>, LI Zheng<sup>2)</sup>, ZHOU Xin-Li<sup>1)\*</sup>

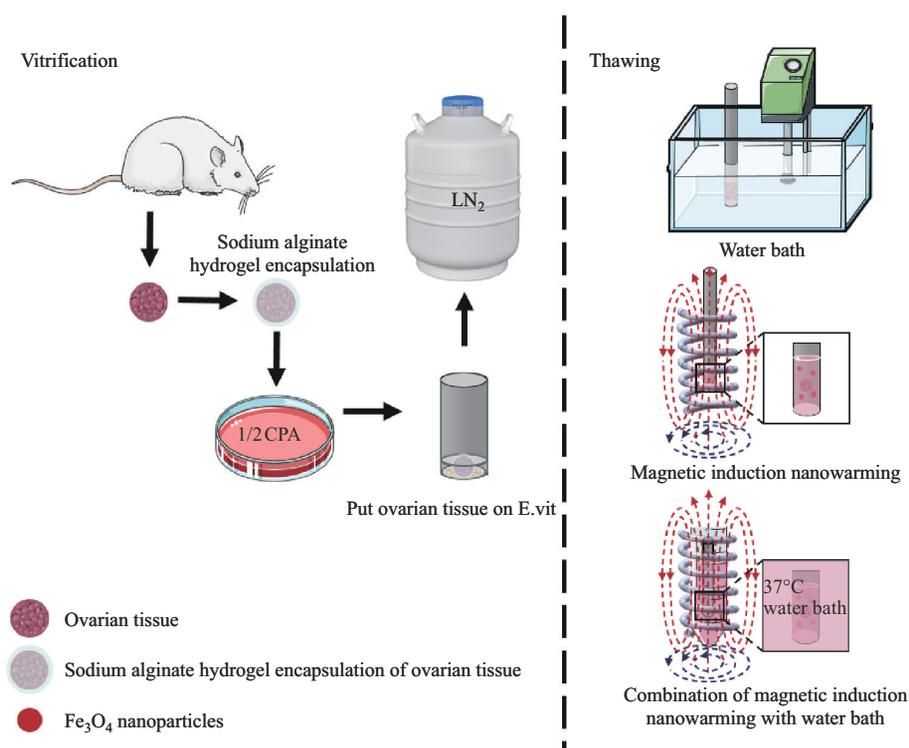
<sup>1)</sup>Institute of Biothermal Technology, School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology,

Shanghai 200093, China;

<sup>2)</sup>Department of Andrology, Clinical Center of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine,

Shanghai 200080, China)

### Graphical abstract



**Abstract Objective** For prepubertal and urgently treated malignant tumor patients, ovarian tissue cryopreservation and transplantation represent more appropriate fertility preservation methods. Current clinical practices often involve freezing ovarian tissue with high concentrations of cryoprotectants (CPAs) and thawing with water baths. These processes lead to varying degrees of toxicity and devitrification damage to ovarian tissue. Therefore, this paper proposes optimized methods for vitrification of ovarian tissues based on sodium alginate hydrogel encapsulation and magnetic induction nanowarming technology. **Methods** Firstly, the study investigated the effects of sodium alginate concentration, the sequence of hydrogel encapsulation and CPAs

\* Corresponding author.

Tel: 86-13817547878, E-mail: zjulily@163.com

Received: July 1, 2024 Accepted: August 25, 2024

loading on vitrification efficiency of encapsulated ovarian tissue. Additionally, the capability of sodium alginate hydrogel encapsulation to reduce the required concentration of CPAs was validated. Secondly, a platform combining water bath and magnetic induction nanowarming was established to rewarm ovarian tissue under various concentrations of magnetic nanoparticles and magnetic field strengths. The post-warming follicle survival rate, antioxidant capacity, and ovarian tissue integrity were evaluated to assess the efficacy of the method.

**Results** The study found that ovarian tissue encapsulated with 2% sodium alginate hydrogel exhibited the highest follicle survival rate after vitrification. The method of loading CPAs prior to encapsulation proved more suitable for ovarian tissue cryopreservation, effectively reducing the required concentration of CPAs by 50%. A combination of 8 g/L  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles and an alternating magnetic field of 300 Gs showed optimal warming effectiveness for ovarian tissue. Combining water bath rewarming with magnetic induction nanowarming yielded the highest follicle survival rate, enhanced antioxidant capacity, and preserved tissue morphology.

**Conclusion** Sodium alginate hydrogel encapsulation of ovarian tissue reduces the concentration of CPAs required during the freezing process. The combination of magnetic induction nanowarming with water bath provides an efficient method ovarian tissue rewarming. This study offers novel approaches to optimize ovarian tissues vitrification.

**Key words** ovarian tissue, vitrification, sodium alginate, hydrogel, nanoparticles, magnetic induction nanowarming

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0289

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240289