

微流控芯片用于卵母细胞冷冻保存的实验研究*

周新丽^{1)**} 郭莹莹¹⁾ 衣星越¹⁾ 戴建军²⁾ 张德福²⁾

(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, 上海 201106)

摘要 低温保存对卵母细胞造成渗透损伤、毒性损伤和冰晶损伤, 使得细胞冻后质量难以提高。本文首次提出将微流控法添加-去除保护剂分别与三种冷冻载体(OPS、QC及Cryotop)搭配使用, 对猪卵母细胞进行冷冻保存, 并与传统冷冻法进行比较; 然后, 首次选用透明陶瓷和玻璃制作集成一体化芯片, 对猪卵母细胞进行冷冻保存, 以冷冻保存后的细胞存活率和发育率为判断依据, 筛选出较好的方案; 最后, 对冻后卵母细胞的早期凋亡情况、胞内活性氧水平和线粒体膜电位水平进行分析。结果表明, 微流控添加-去除保护剂组卵母细胞冻后存活率以及卵裂率都显著高于传统冷冻组, 可以有效降低卵母细胞的早期凋亡率和胞内活性氧水平, 减小线粒体损伤, 提高细胞的冻后质量。透明陶瓷一体化芯片保存卵母细胞得到的存活率和卵裂率与传统OPS冷冻的保存结果无显著差异。微流控芯片技术为卵母细胞的低温保存提供新的思路, 有较好的应用前景。

关键词 微流控芯片, 卵母细胞, 添加-去除方案, 微流控一体化芯片

学科分类号 Q2, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0016

卵母细胞的低温保存是辅助生殖领域的重要方法, 也为优质家畜和濒危野生动物保种提供新途径。卵母细胞有着复杂的细胞器和超微结构, 它们对外界环境的改变非常敏感, 临床上所得到的冷冻卵母细胞的复苏率、受精率、胚胎率及分娩率还不高^[1-2]。

目前, 常用的卵母细胞低温保存技术是玻璃化保存。它是采用多步法将卵母细胞加入到高浓度的低温保护剂中, 然后通过冷冻载体, 如开放式拉长麦管(open pulled straw, OPS)^[3-4]、石英毛细管(quartz capillary, QC)^[5-7]及Cryotop法^[8-9]等投入液氮中, 以超快的冷却速度完成玻璃化, 复温时再采用多步法洗脱保护剂。传统的分步添加-去除保护剂的方法使细胞在不同浓度的溶液间转移, 细胞外溶液渗透压发生阶梯状突变, 卵母细胞将受到较大的渗透损伤。近年来, 有学者提出运用微流控技术来进行低温保护剂的添加和去除, 使细胞外的保护剂浓度呈连续性变化, 减少对细胞的渗透损伤和毒性损伤。Song等^[10]成功制作了水平三流的微流控装置, 用于添加和去除肝癌细胞的保护剂3 mol/L丙二醇, 结果证明经微流控技术处理后的细胞存活率比一步法高25%, 比两步法高10%。杨云等^[11]制

作了用于猪卵母细胞保护剂线性添加的微流体装置, 结果表明, 微流控芯片连续添加保护剂所得细胞存活率及卵裂率(92.8%, 75.8%)均显著高于一步法(59.8%, 36.6%)及两步法(76.5%, 51.6%)。微流控连续法有很多种变化线型, 衣星越等^[12]进一步优化了微流控连续添加并去除保护剂的线型, 设计了凸型、凹型以及直线型的添加去除方式, 组合出9种联用方案用于卵母细胞保护剂的添加和去除, 结果发现凹形添加-凸型去除联用方案所得卵母细胞存活率与囊胚率与新鲜组差异最小。但是以上研究仅优化了保护剂添加和去除的过程, 并未将卵母细胞进行冷冻, 离卵母细胞低温保存的临床应用还有一定的差距。

此外, 有研究者提出将细胞在微流控芯片中进行低温保存的一体化操作。Kondo等^[13]在微流控芯片上培养HeLa、NIH3T3及MCF-7细胞, 并将装有细胞的微流控芯片和对照组培养皿在-80℃下冷

* 国家自然科学基金(51376132)和上海市自然科学基金(13ZR1429200)资助项目。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2018-01-09, 接受日期: 2018-04-26

冻保存, 结果表明低温保存后微流控装置内的细胞存活率显著高于对照组. Li 等^[14]运用聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 及玻璃制作了 PDMS- 玻璃可控温微流控芯片, 对酵母菌细胞进行低温保存, 酵母菌细胞在有温控芯片内的存活率 (74%) 显著高于无温控芯片 (27%), 但与传统保存方法所得存活率无显著差异. Zou 等^[15]将未添加保护剂的精子置于微流控芯片投入液氮保存, 冷冻后的精子存活率与发育能力与对照组无显著差异. 对于卵母细胞的冷冻保存, 如果将保护剂添加、冷冻保存、复温、保护剂去除整合在一个微流控芯片上, 将大大简化实验步骤, 防止转移过程中的细胞丢失和对细胞造成额外的机械损伤. 目前关于这方面的研究还未见报道.

针对以上问题, 本文首先将传统分步添加 - 去除保护剂法和微流控凸型添加 - 凹型去除方案分别与 3 种冷冻载体及方法 (OPS 法、QC 法、Cryotop 法) 搭配使用, 对卵母细胞进行冷冻保存实验, 验证微流控芯片添加保护剂 - 冷冻载体冷冻 - 微流控芯片去除保护剂这一整套方案的有效性; 然后选择传热性能较好的透明陶瓷和玻璃制作一体化芯片, 将卵母细胞在一体化芯片上进行添加 - 冷冻 - 去除实验, 以冷冻保存后的细胞存活率和发育率为判断依据, 筛选出较好的方案; 最后对冷冻后卵母细胞的早期凋亡情况、胞内活性氧水平和线粒体膜电位水平进行分析, 考察其冷冻后的质量. 本研究是微流控芯片用于卵母细胞低温保存的全新尝试, 提出了卵母细胞低温保存的新思路, 在临床方面将有较好的应用前景.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和溶液

组织培养液 (tissue culture media 199, TCM199)、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、乙二醇 (ethylene glycol, EG)、蔗糖、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司 (美国). 本实验中所用其他试剂未特殊说明均购自 Sigma 公司 (美国).

本实验中用到的溶液温度均为 37℃, 浓度为体积比浓度. 培养液: TCM199+10%猪卵泡液+10%FBS+激素; 低温保护剂 1: TCM199+7.5%EG+7.5%DMSO+20%FBS; 低温保护剂 2: TCM199+15%EG+15%DMSO+20%FBS+0.4 mol/L 蔗糖; 去除溶液 1: TCM199+20%FBS+0.3 mol/L 蔗糖; 去

除溶液 2: TCM199+20%FBS+0.15 mol/L 蔗糖.

用于检测细胞早期凋亡水平、胞内活性氧水平以及线粒体膜电位水平的试剂盒均购自中国碧云天生物科技有限公司.

1.2 猪卵母细胞的采集和体外成熟培养

自上海市嘉定区某屠宰场采集新鲜的猪卵巢, 放置于 37℃ 含有 500 U 青链霉素的生理盐水中, 在 1 h 内运回实验室. 用带有 18G 针头的 5 ml 注射器在卵巢表面吸取直径为 2~6 mm 卵泡的卵泡液后注入 15 ml 的离心管中, 静置沉淀后, 在体视显微镜下拾取胞质均匀且表面包被 3 层或以上的致密卵丘细胞的卵丘卵母复合体 (cumulus oocyte complexes, COCs). 洗涤后将细胞移入四孔培养板进行培养, 每孔含 500 μ l 培养液, 并覆上灭菌矿物油. 放入 (39 $\pm$ 0.5)℃、95% 空气、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱. 培养 42~46 h 后, 得到 M II 期卵母细胞. 实验前, 用 0.1% 透明质酸酶反复吹打以去除卵丘细胞, 后用 TCM199 洗涤 3~5 次, 备用.

1.3 微流控芯片的制作及微混合系统的搭建

用于低温保护剂添加和去除的微流控芯片主要由 Y 型流体入口通道、蛇形溶液混合通道、细胞进出通道及细胞分析腔组成. 微通道横截面的尺寸为宽 100 μ m $\times$ 高 100 μ m, Y 型流体入口通道每条长为 10 mm, 蛇形混合通道每条长为 17 mm, 微通道总长约 135 mm. 细胞分析腔的尺寸为长 2 000 μ m $\times$ 宽 1000 μ m $\times$ 高 150 μ m, 为防止细胞在保护剂添加和去除过程中被溶液冲走, 在操作腔的左右两侧各设一排柱状障碍物, 其直径为 100 μ m, 两障碍物间隔为 50 μ m.

运用模塑法制作微流控芯片. 首先运用 AutoCAD 2007 (Autodesk, USA) 设计通道后打印光刻掩膜, 对掩膜进行清洗、涂胶、前烘、曝光、显影、坚膜, 得到光刻掩膜, 在模具上固化处理好的 PDMS 预聚体, 得到带有微通道及细胞腔的 PDMS 基片层, 将 PDMS 基片与 PDMS 盖片用等离子氧化处理后直接贴合, 进行不可逆封接, 在 60℃~75℃ 的恒温干燥箱中加固 1 h, 得到 PDMS 微流控芯片, 最后使用 0.6 mm 打孔器制作芯片进出口.

用于冷冻的芯片采用透明陶瓷及玻璃作为盖片, 与带有通道的 PDMS 基片进行不可逆封接, 制作一体化 PDMS- 透明陶瓷以及 PDMS- 玻璃芯片. 所用透明陶瓷为氧化铝透明陶瓷, 传热性能较好 (传热系数为 46W/m $\cdot$ K), 厚度为 200 μ m. 所用

玻璃为传热性能较好(传热系数为 $0.7\sim1.1\text{W/m}\cdot\text{K}$) 的玻璃, 但若同样选用 $200\text{ }\mu\text{m}$ 的玻璃, 在与透明陶瓷组相同的降温及升温条件下容易断裂, 因此选用 1 mm 厚的玻璃进行芯片制作。

微流控添加 - 去除低温保护剂的实验系统如图 1 所示, 由微注射泵(pump 11 pico plus elite,

Harvard, 美国)、微量进样针(GG001, 上海高鸽工贸有限公司)、微流控芯片及体视显微镜(SMZ-168, MOTIC, 日本)组成。其中微流注射泵为双通道注射 / 回吸可编程注射泵。通过注射泵调节单位时间内缓冲溶液和低温保护剂的流量来调节混合溶液的浓度变化。

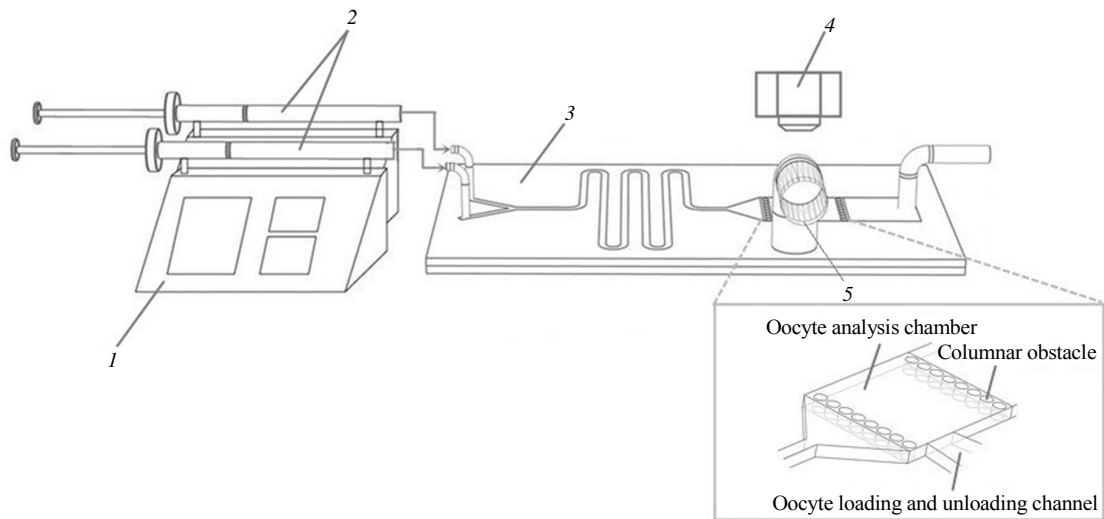


Fig. 1 A schematic illustration of the microfluidic experimental system
1: Microinjection pump; 2: Micro-syringe; 3: Y-microfluidic chip; 4: Stereoscopic microscope; 5: Oocyte channel.

1.4 冷冻载体

所用 OPS 管参照 Vajta 等^[16]的制作方法, 细管的内径约为 $800\sim1\,000\text{ }\mu\text{m}$, 壁厚约 $80\text{ }\mu\text{m}$. 所购 QC 毛细管(WH-MXG-530690, 苏州汶灏芯片科技有限公司)制作材料为人工合成的高纯度石英玻璃,

其内径为 $530\text{ }\mu\text{m}$, 壁厚 $160\text{ }\mu\text{m}$. 所购 Cryotop (KITAZATO, Japan), 塑料薄片长 20 mm , 宽 0.4 mm , 厚 0.1 mm .

上述冷冻载体及用于冷冻的一体化芯片实物如图 2 所示.

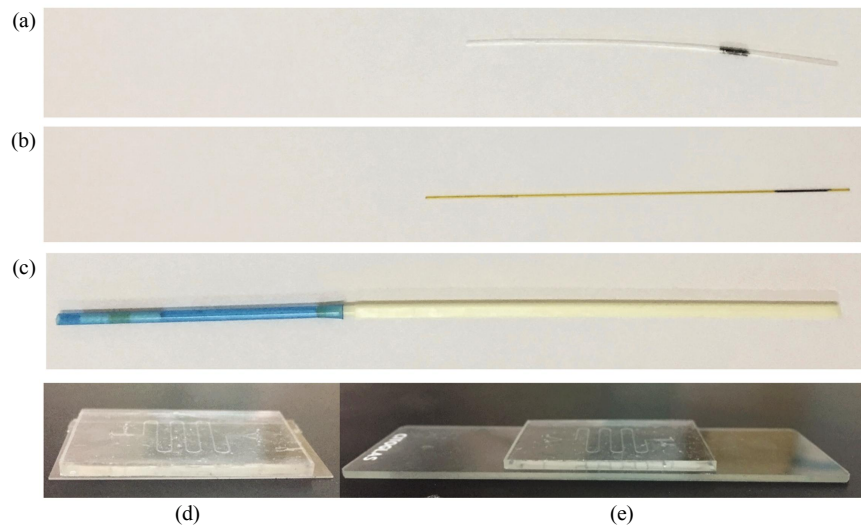


Fig. 2 Cryopreservation devices and integration microfluidic chips
(a) OPS. (b) QC. (c) Cryotop. (d) PDMS-transparent ceramic integration microfluidic chip. (e) PDMS-glass integration microfluidic chip.

1.5 实验方法

1.5.1 传统冷冻与微流控冷冻保存方案的对比

传统冷冻实验分3组, 每组10枚已去除卵丘细胞的MⅡ期卵母细胞. 3组细胞分别在低温保护剂1中平衡3~5 min, 移入低温保护剂2中平衡30 s, 加载至OPS细管、QC毛细管及Cryotop塑料薄片, 随后直接投入液氮冷冻保存. 2w后将3组细胞分批次取出, 含有细胞的一端迅速插入去除溶液1中, 待细胞解冻后平衡5 min, 然后将细胞转移至去除溶液2中平衡5 min, 后取出用TCM199洗涤2~3次, 放入含有10% FBS的TCM199溶液中静置1 h后进行后续处理. 每组实验重复3~5次.

微流控冷冻实验步骤如图3a所示. 实验分3组, 每组10枚已去除卵丘细胞的MⅡ期卵母细胞, 分别利用细胞口吸器放入PDMS-PDMS芯片的操作腔中, 两微量进液针内分别为低温保护剂2和基础液TCM199. 根据衣星越等^[11]对微流控连续添加保护剂的线型优化结果, 采用凹型添加法对细胞进行低温保护剂的添加, 装有低温保护剂2的进液针的流速变化如图4所示, 微通道内总流速为5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 总添加时间为10 min. 完成保护剂的添加后, 用细胞口吸器将细胞吸出, 迅速加载至OPS细管、QC毛细管及Cryotop塑料薄片, 投入液氮进行冷冻保存. 2w后将3组细胞分批次取出, 含

有细胞的一端放入去除溶液1中进行复温, 细胞解冻后, 运用口吸器吹入细胞分析腔对3组细胞进行保护剂去除, 采用凸型去除法对细胞进行保护剂的去除. 两微量进液针中分别为1 mol/L的蔗糖溶液和基础液TCM199, 蔗糖溶液的流速变化如图4所示, 微通道内总流速为5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 总去除时间为8 min. 保护剂去除完成后将细胞吸出转移至含有10% FBS的TCM199溶液中静置1 h后进行后续处理. 每组实验重复3~5次.

1.5.2 卵母细胞一体化芯片冷冻-解冻方案

一体化芯片实验步骤如图3b所示. 一次取6~7枚已去除卵丘细胞的MⅡ期卵母细胞, 分别利用细胞口吸器放入PDMS-透明陶瓷以及PDMS-玻璃芯片的操作腔中, 两微量进液针内分别为低温保护剂2和基础液TCM199. 然后采用与实验1.5.1中微流控组相同的凹型添加法对细胞进行低温保护剂的添加. 完成添加后将芯片直接投入液氮进行冷冻保存2w后进行解冻处理. 将芯片取出放入38.5℃的恒温水浴中解冻, 导管出口始终保持朝上, 以防止液体由导管进入芯片, 平衡至芯片表面没有白霜. 后选用与实验1.5.1中微流控组相同的凸型去除法对细胞进行保护剂的去除. 完成保护剂的去除后将细胞吸出转移至含有10% FBS的TCM199溶液中静置1 h后进行后续处理. 每组实验重复3次以上.

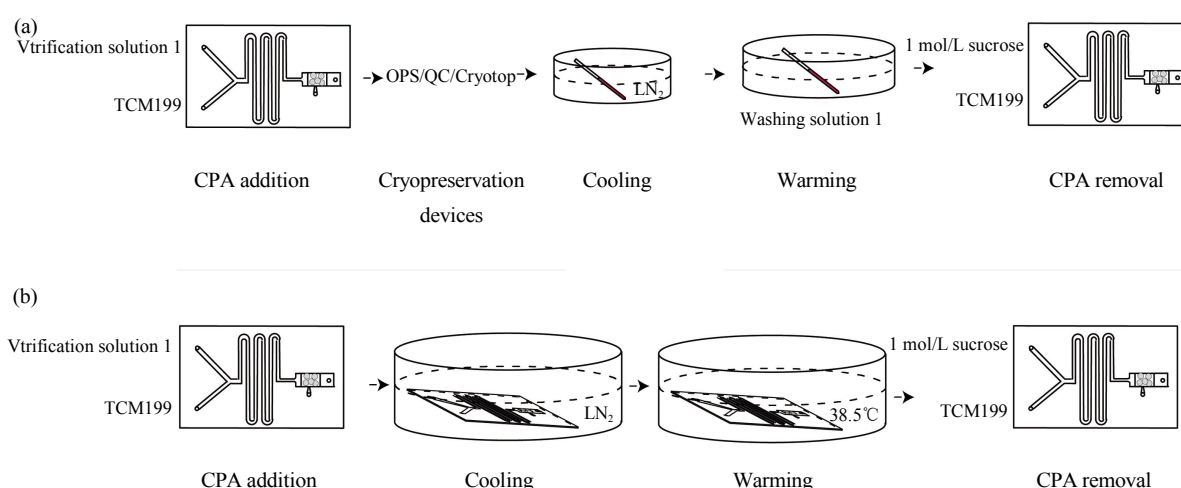


Fig. 3 Schematic of experiments

(a) Microfluidic CPA addition-removal protocol is combined with three kinds of cryopreservation devices. (b) Integration microfluidic chip is employed for oocytes loading, unloading, and cryopreservation.

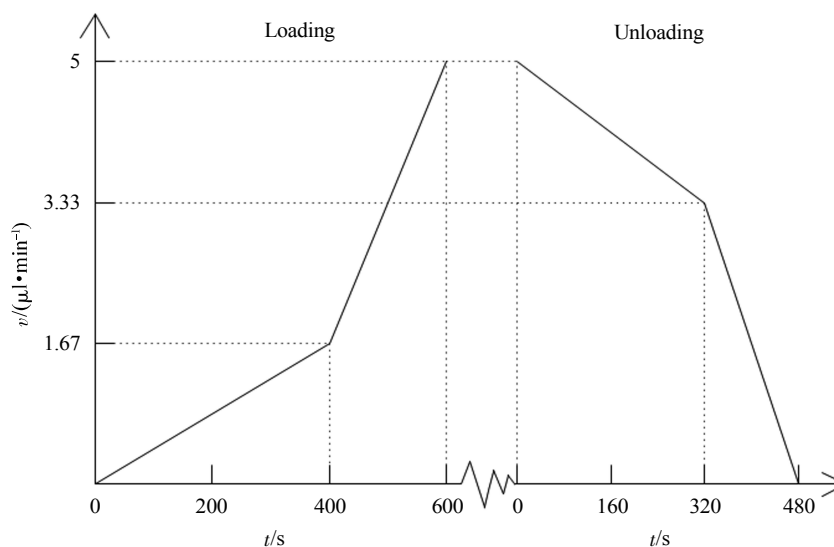


Fig. 4 The flow velocity of the concave addition with convex removal combination protocol

1.6 卵母细胞存活率及发育率判断

采用二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)对冷冻复温后的卵母细胞进行存活率检测, 卵母细胞用 TCM199 洗涤 3 次后转入 FDA 中避光染色 5~10 min, 再用 TCM199 洗涤 3~5 次, 在倒置荧光镜(1XY71, OLYMPUS, 日本)下观察染色情况, 胞质发强荧光视为活卵, 无荧光或荧光较弱为死卵. 采用电激活方法对卵母细胞进行孤雌激活, 使用电融合仪(Sandiego, 美国)电激活卵母细胞后转至胚胎培养液中进行培养, 2d 后观察卵裂率.

1.7 卵母细胞凋亡情况评价

采用 Annexin V-FITC 以及 PI 试剂盒对冷冻复温后的卵母细胞进行早期凋亡水平检测. 按照试剂盒的说明进行细胞染色, 染色后在荧光显微镜下观察细胞着色情况(Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光): 正常细胞不被 Annexin V-FITC 以及 PI 染色; 凋亡早期细胞仅被 Annexin V-FITC 染色, 而不被 PI 染色; 坏死或凋亡晚期细胞将同时被 Annexin V-FITC 以及 PI 染色. 统计早期凋亡细胞个数后, 以早期凋亡细胞个数与总细胞个数的比值作为实验的细胞早期凋亡率.

细胞内活性氧产生于氧化还原的中间步骤^[17], 其作用于细胞时, 将引起胞内钙离子浓度升高、能量缺失以及脂质氧化等^[18]. 有研究表明, 冷冻保存过程中, 胞内产生的活性氧会引起氧化应激、胞内基本分子退化、细胞膜的脂质氧化, 从而造成卵母

细胞以及胚胎的凋亡甚至死亡^[19-21]. 采用含有荧光探针 2', 7' - 二氯荧光素二乙酸酯 (2, 7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 的活性氧检测试剂盒对细胞进行活性氧水平检测. 染色后在荧光显微镜下观察, DCFH-DA 自身没有荧光, 其穿过细胞膜后, 在胞内水解生成 DCFH, DCFH 被胞内活性氢氧化为有荧光的二氯荧光素(dichlorofluorescein, DCF), 通过记录 DCF 的荧光信号强度来检测胞内活性氧水平, 结果用平均荧光值表示^[22].

线粒体在细胞中不仅仅是产生 ATP 的工具, 在卵母细胞及胚胎的发育过程中也起着重要的作用^[23]. 研究表明, 在细胞的冷冻保存过程中, 胞内的线粒体分布以及线粒体膜功能会发生变化, 使得细胞在冻后的发育能力降低^[24]. 本实验采用线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)检测冻后细胞的线粒体膜电位. 细胞染色后在激光共聚焦显微镜(Nikon, Japan)下观察, 当线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体基质中, 形成聚合物产生红色荧光, 当线粒体膜电位较低时, JC-1 无法聚集在线粒体基质中, 此时 JC-1 单体产生绿色荧光. 通过胞内红绿荧光比例来衡量线粒体去极化的比例, 从而判断线粒体膜电位的变化, 结果用红绿荧光强度比值的平均值表示线粒体膜电位.

1.8 数据处理与分析

采用 SPSS Statistics 19.0 对实验结果进行分析,

实验数据用 Mean $\pm$ SD 表示, 显著性差异标准为 $P < 0.05$. 每组实验需重复 3 次以上.

2 结果与讨论

2.1 传统冷冻与微流控冷冻保存方案对卵母细胞存活率及体外发育的影响

采用传统两步法添加 - 去除保护剂, 并与 3 种不同冷冻载体搭配使用, 对卵母细胞进行冷冻保存, 卵母细胞的存活率和体外发育结果见表 1. 在 QC 和 Cryotop 中冷冻保存, 卵母细胞存活率(80%, 77.5%)显著高于在 OPS 中冷冻保存的存活率(55.8%). 将不同保存方案的卵母细胞在冷冻后孤雌激活, 并在培养 2d 后观察卵裂率. OPS 法、QC

法、Cryotop 法的卵裂率依次增高, 为 13.77%、19.96%、26.39%.

采用微流控添加 - 去除保护剂法, 并与 3 种不同的冷冻载体搭配使用, 对卵母细胞进行冷冻保存, 卵母细胞的存活率和体外发育结果见表 1. 在 QC 及 Cryotop 中冷冻保存后, 卵母细胞存活率(84.9%, 89.45%)远高于在 OPS 中冷冻保存(66.69%), 且与对照组的存活率无显著性差异. 将不同保存方案的卵母细胞在冷冻后孤雌激活, 并在培养 2d 后观察卵裂率. OPS 法、QC 法、Cryotop 法的卵裂率依次增高, 为 19.96%、26.58%、33.97%.

Table 1 Survival rates and in vitro development of oocytes treated with different traditional and microfluidic cryopreservation protocols

Frozen protocol	Survival rate		Cleavage rate	
	Two-step addition/removal	Microfluidic addition/removal	Two-step addition/removal	Microfluidic addition/removal
OPS	(55.80 $\pm$ 4.49)% ^e	(66.69 $\pm$ 1.85)% ^d	(13.77 $\pm$ 3.15)% ^d	(19.96 $\pm$ 1.03)% ^{cd}
QC	(80 $\pm$ 0)% ^{bc}	(84.90 $\pm$ 0.40)% ^{ab}	(19.96 $\pm$ 2.52)% ^{cd}	(26.58 $\pm$ 3.65)% ^{bc}
Cryotop	(77.5 $\pm$ 3.54)% ^c	(89.45 $\pm$ 2.06)% ^a	(26.39 $\pm$ 1.96)% ^{bc}	(33.97 $\pm$ 4.50)% ^b
Control group	(90.45 $\pm$ 1.38)% ^a		(87.73 $\pm$ 7.25)% ^a	

Letters (a-e) indicate significant difference in Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

通过对比以上两组试验还可以发现, 微流控法添加 - 去除保护剂与不同冷冻载体搭配冷冻后, 卵母细胞存活率和卵裂率均远高于传统法添加 - 去除保护剂与对应冷冻载体搭配冷冻后的结果. 说明微流控添加 - 去除保护剂通过控制细胞周围的溶液浓度连续变换, 减少了细胞由于保护剂浓度突然增大或减小而受到的渗透压突变冲击, 避免了细胞体积的大幅度变化, 有效减少了细胞在保护剂添加 - 去除时的渗透损伤. 其中, 微流控添加 - 去除保护剂搭配 Cryotop 载体对卵母细胞进行低温保存得到的存活率(89.45%)与对照组的存活率(90.45%)无显著

性差异, 且得到的卵裂率(33.97%)显著高于实验中其他冷冻方案的卵裂率.

2.2 一体化微流控保存方案对细胞的存活率与体外发育的影响

卵母细胞在 PDMS- 透明陶瓷以及 PDMS-玻璃一体化芯片低温保存后的细胞存活率及体外发育情况, 结果见表 2. PDMS- 透明陶瓷组的细胞存活率(59.79%)远高于 PDMS- 玻璃组的细胞存活率(33.4%), 将卵母细胞在冷冻后孤雌激活, 并在培养 2d 后观察卵裂率, PDMS- 透明陶瓷组的细胞卵裂率为 12.33%. 实验中 PDMS- 透明陶瓷以及

Table 2 Survival rates and in vitro development of oocytes treated with different integrated microfluidic cryopreservation protocols

Frozen protocol	Survival rate	Cleavage rate
Control group	(90.45 $\pm$ 1.38)% ^a	(87.73 $\pm$ 7.25)% ^a
PDMS-transparent ceramic chip	(59.79 $\pm$ 5.01)% ^b	(12.33 $\pm$ 6.13)% ^b
PDMS-glass chip	(33.40 $\pm$ 4.19)% ^c	(0 $\pm$ 0)% ^b

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

PDMS- 玻璃一体化芯片冷冻结果的不同是由于陶瓷的导热系数(46W/m·K)远高于玻璃的导热系数(0.7~1.1W/m·K). 且选用的透明陶瓷芯片厚度为200 μm, 而选用的玻璃芯片厚度为1 mm, 传热阻力较大, 因此 PDMS- 透明陶瓷芯片的保存效果优于 PDMS- 玻璃芯片.

将以上结果与表 1 进行对比, 发现 PDMS- 透明陶瓷组的冷冻保存与传统添加 - 去除保护剂与 OPS 冷冻载体搭配的冷冻保存, 两者所得卵母细胞存活率(59.79%, 55.80%)与卵裂率(12.33%, 13.77%)无显著性差异. 但是, PDMS- 透明陶瓷组的冷冻保存与传统添加 - 去除保护剂与 QC、Cryotop 冷冻载体搭配的冷冻保存相比, 卵母细胞的存活率与卵裂率均显著低于后两者. 微流控一体化芯片的保存结果还不理想的原因在于: a. 目前常用的芯片材料是 PDMS, 其键合技术、导管与芯片的密封技术都已发展成熟, 但是 PDMS 的导热系数较低(0.2W/m·K), 限制了其冷冻速率, 从而影响玻璃化冷冻效果, 目前还未找到导热系数高且

加工技术成熟的芯片材料来代替 PDMS 芯片. b. 在操作过程中, 一体化芯片在添加保护剂后没有将多余保护剂溶液从细胞腔中移除, 升降温过程中由于细胞周围有较多溶液覆盖, 导致升降温速率下降.

2.3 微流控冷冻后卵母细胞的凋亡情况

新鲜组、微流控添加 - 去除法搭配 Cryotop 方案组以及传统添加 - 去除保护剂与 OPS 冷冻载体组卵母细胞的早期凋亡率、活性氧水平、线粒体膜电位见表 3. 细胞经冷冻后, 早期凋亡率显著升高, 但微流控组的卵母细胞早期凋亡率(39.44%)显著低于传统两步法组(61.43%); 胞内活性氧显著升高, 但微流控组的卵母细胞胞内活性氧水平(11.9)显著低于传统两步法组(13.19); 线粒体膜电位水平显著降低, 但微流控组的卵母细胞中线粒体膜电位水平(0.94)显著高于传统两步法组(0.48). 可以看出, 采用微流控法添加、去除保护剂并结合 Cryotop 法冷冻卵母细胞, 可以有效降低卵母细胞的早期凋亡率和胞内活性氧水平, 并减小线粒体损伤, 提高细胞的冻后质量.

Table 3 Apoptosis rate, reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential of oocytes treated with different cryopreservation protocols (n > 40)

Groups	Early apoptosis/%	ROS	Mitochondrial membrane potential
Control group	0 ^a	(9.64 ± 1.07) ^a	(1.35 ± 0.43) ^a
Microfluidic + Cryotop	39.44 ^b	(11.90 ± 1.20) ^b	(0.94 ± 0.13) ^b
Two-step + OPS	61.43 ^c	(13.19 ± 2.89) ^c	(0.48 ± 0.06) ^c

a-c: Values with different superscripts in the same column are significantly different (P < 0.05).

3 结 论

本文首先设计了用于添加 - 去除保护剂的微流控芯片, 并首次与冷冻载体(OPS、QC、Cryotop)搭配, 对卵母细胞进行冷冻保存实验. 另外为了简化实验步骤, 首次选用玻璃及透明陶瓷作为基片制作了集 CPA 添加、冷冻、复温、CPA 去除为一体的透明 PDMS- 陶瓷、PDMS- 玻璃一体化芯片并对卵母细胞进行冷冻保存. 得出以下结论:

a. 微流控添加 - 去除保护剂组卵母细胞冻后存活率以及培养后的卵裂率都显著高于传统添加 - 去除组, 其中微流控添加 - 去除法搭配 Cryotop 方案的保存效果最优且可以有效降低卵母细胞的早期凋亡率和胞内活性氧水平, 并减小线粒体损伤, 提

高细胞的冻后质量.

b. PDMS- 透明陶瓷一体化芯片的卵母细胞存活率远高于 PDMS- 玻璃一体化芯片, 但仅与传统添加 - 去除保护剂与 OPS 冷冻载体搭配的冷冻保存后所得卵母细胞存活率与卵裂率无显著性差异, 保存效果还不理想, 在芯片材料选择、芯片加工技术及冻存操作程序方面还有待进一步的优化.

微流控装置搭配玻璃化冷冻载体可以有效改善保护剂添加 - 去除过程中细胞所受的渗透损伤和毒性损伤, 提高卵母细胞的冻后存活率及质量, 可作为临床应用保存方案. 另本文提出的微流控一体化芯片可以简化实验步骤, 最大限度地减小卵母细胞受到的损伤, 为卵母细胞的低温保存提供新的思路, 有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- [1] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994: 149-155
Hua Z Z, Ren H S. Beijing: Science Press, 1994: 149-155
- [2] Moussa M, Shu J, Zhang X, *et al.* Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Science China Life Sciences*, 2014, **57**(9): 903-914
- [3] Shi W Q, Zhu S E, Zhang D, *et al.* Improved development by Taxol pretreatment after vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Reproduction*, 2006, **131**(4): 795-804
- [4] Rojas C, Palomo M J, Albarrac   N J L, *et al.* Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology*, 2004, **49**(3): 211-220
- [5] Fujihira T, Kishida R, Fukui Y. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology*, 2004, **49**(3): 286-290
- [6] Ogawa B, Ueno S, Nakayama N, *et al.* Developmental ability of porcine *in vitro* matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. *J Reprod Dev*, 2010, **56**(3): 356-361
- [7] Galeati G, Spinaci M, Vallorani C, *et al.* Pig oocyte vitrification by cryotop method: effects on viability, spindle and chromosome configuration and *in vitro* fertilization. *Animal Reproduction Science*, 2011, **127**(1-2): 43-49
- [8] Kuwayama M, Vajta G, Kato O, *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 2005, **11**(3): 300-308
- [9] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 2007, **67**(1): 73-80
- [10] Song Y S, Moon S J, Hulli L, *et al.* Microfluidics for cryopreservation. *Lab on A Chip*, 2009, **9**(13): 1874-1881
- [11] 杨云, 周新丽, 戴建军, 等. 微流控线性加载低温保护剂减少猪 M II 期卵母细胞的渗透损伤. *生物化学与生物物理进展*, 2016, **43**(6): 616-623
Yang Y, Zhou X L, Dai J J, *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2016, **43**(6): 616-623
- [12] 衣星越. 微流控装置用于卵母细胞低温保护剂及冷冻保存的实验研究[D]. 上海: 上海理工大学. 2016
Yi X Y. Shanghai: University of Shanghai for Science and Technology. 2016
- [13] Kondo E, Wada K, Hosokawa K, *et al.* Cryopreservation of adhered mammalian cells on a microfluidic device: Toward ready-to-use cell-based experimental platforms. *Biotechnology & Bioengineering*, 2016, **113**(1): 237-240
- [14] Li S, Liu W, Lin L. On-chip cryopreservation of living cells. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2010, **15**(2): 99-106
- [15] Zou Y, Yin T, Chen S, *et al.* On-chip cryopreservation: a novel method for ultra-rapid cryoprotectant-free cryopreservation of small amounts of human spermatozoa. *Plos One*, 2013, **8**(4): e61593
- [16] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction & Development*, 1998, **51**(1): 53-58
- [17] Gu  rin P, El M S, M  n  zo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 2001, **7**(2): 175-189
- [18] 李忌, 郑荣梁. 活性氧诱导细胞凋亡. *中国细胞生物学学报*, 1997, **1**(3): 116-119
Li J, Zheng R L. Chinese Journal of Cell Biology, 1997, **1**(3): 116-119
- [19] Tatone C, Di E G, Vento M, *et al.* Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological Endocrinology*, 2010, **26**(8): 563-567
- [20] Zhao X M, Du W H, Wang D, *et al.* Effect of cyclosporine pretreatment on mitochondrial function in vitrified bovine mature oocytes. *Fertility & Sterility*, 2011, **95**(8): 2786-2788
- [21] Luz H K M, Wanderley L S, Faustino L R, *et al.* Role of antioxidants agents in germ cells and embryos cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinari*, 2011, **39**(2): 23-26
- [22] Ou X H, Li S, Wang Z B, *et al.* Maternal insulin resistance causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. *Human Reproduction*, 2012, **27**(7): 2130-2145
- [23] 林翠英, 王世鄂. 线粒体与卵母细胞和早期胚胎发育. *解剖学研究*, 2008, **30**(5): 385-388
Lin C Y, Wang S E. *Anatomy Research*, 2008, **30**(5): 385-388
- [24] Lei T, Guo N, Tan M H, *et al.* Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences)*, 2014, **34**(1): 99-102

Experimental Study of Microfluidic Chip for Cryopreservation of Oocytes*

ZHOU Xin-Li¹⁾**, GUO Ying-Ying¹⁾, YI Xing-Yue¹⁾, DAI Jian-Jun²⁾, ZHANG De-Fu²⁾

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

²⁾ *Animal and Veterinary Research Institute, SAAS, Shanghai 201106, China)*

Abstract Cryopreservation will cause osmotic damage, toxic damage and ice crystal damage to oocytes, thus it is difficult to improve the quality of the frozen oocytes. In this paper, microfluidic and stepwise cryoprotectant (CPA) loading-unloading protocols were combined with three kinds of cryopreservation devices (OPS, QC and Cryotop) to cryopreserve the porcine oocytes for the first time. Moreover, PDMS-transparent ceramic and PDMS-glass integration microfluidic chips were employed for oocytes cryopreservation for the first time, the survival rate and development rate of cryopreserved oocytes were used to evaluate optimal cryopreservation protocol. Finally, early apoptosis rate, intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential of oocytes were analyzed. The results showed that the survival rate and cleavage rate of frozen oocytes by microfluidic loading-unloading of CPAs were significantly higher than traditional loading-unloading group. Microfluidic method could reduce the early apoptosis rate, intracellular ROS and mitochondrial damage, improve the quality of frozen oocytes. The survival rate and cleavage rate of oocytes cryopreserved by PDMS-transparent ceramic integrated chip were not significantly different from traditional OPS method. Microfluidic chip technology provides a new idea for oocytes cryopreservation and has good application prospects.

Key words microfluidic chip, oocytes, loading-unloading protocol, integrated microfluidic chip

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0016

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (51376132) and Shanghai Natural Science Foundation (13ZR1429200).

**Corresponding author.

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

Received: January 9, 2018 Accepted: April 26, 2018