



微流控芯片加载低温保护剂过程中卵母细胞的损伤评估*

邵文琪¹⁾ 郭莹莹¹⁾ 戴建军²⁾ 张德福²⁾ 周新丽^{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, 上海 201106)

摘要 卵母细胞的低温保存为辅助生殖技术和胚胎工程技术提供了更大的发展空间, 而低温保存需要添加高浓度保护剂, 会对细胞造成渗透损伤及毒性损伤. 与分步法添加固定浓度的保护剂不同, 微流控法能够实现保护剂浓度的连续性变化, 关于微流控法连续性添加保护剂时卵母细胞的损伤评估还未见报道. 本文首先采用数值模拟的方法, 模拟细胞在不同加载时间、不同加载线型(线性、S型、凹型)、不同凹型加载(低凹型、高凹型)中细胞的渗透行为, 计算各方案中细胞的传统的损伤评估参数: 体积变化极值(ΔV)、积累性渗透损伤值(AOD)及毒性损伤值(J). 在此基础上, 藉由信息熵理论首次提出了综合损伤评估参数 s , 并通过猪卵母细胞微流控加载后孤雌激活实验的结果验证评估效果. 结果表明, 对于不同的加载方案, 传统的损伤评估参数结果之间出现分歧, 无法得到统一的结论. 通过分析囊胚率同综合损伤评估参数 s 值的关系, 发现二者呈负相关关系, 且相关系数很高, 说明综合损伤评估参数 s 能够较好地对应细胞损伤进行评估, 为细胞损伤评估开辟了新思路.

关键词 微流控芯片, 猪卵母细胞, 渗透损伤, 毒性损伤, 损伤评估

中图分类号 Q2, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0225

卵母细胞的低温保存是生殖能力保存的重要方法, 被广泛运用于牲畜育种和辅助生殖领域. 目前常用的低温保存方法有慢速冷冻法及玻璃化冻存法, 这两种方法都需要添加低温保护剂(cryoprotective agent, CPA)以减小冷冻损伤. 但是, 在低温保护剂加载及去除的过程中, 高浓度的低温保护剂使细胞内外产生渗透压的突变, 细胞受到不同程度的渗透损伤和毒性损伤. 因此, 优化CPA加载和去除方法对于提升细胞的冷冻保存质量具有重要意义. 微流控技术由于可实现保护剂溶液浓度的连续线性变化, 与传统的分步加载和去除保护剂的方法相比, 消除了渗透压的突变, 近年来被运用于保护剂的添加和去除. Song等^[1]以人肝癌细胞为模型, 制作了水平三流微流控装置用于细胞保护剂的添加和去除. 结果表明, 经冷冻后微流控组的存活率显著高于一步法及两步法.

为了评估不同保护剂加载和去除方案对卵母细胞的损伤情况, 通常有实验和理论计算两种方法. 若采用实验方法, 即经过加载/去除保护剂后, 检

测细胞的存活率和卵裂率等指标, 以此对比各加载方法的优劣性, 需要耗费大量人力物力且存在较大的实验误差. 而采用理论计算的方法, 常用的3种细胞损伤评估参数包括: 细胞体积变化极值(ΔV)、积累性渗透损伤值(AOD)和积累性毒性损伤值(J). 保护剂添加过程中, 细胞膜两侧的渗透压差驱动水和保护剂进出细胞将引起细胞体积变化, 若体积变化最大值 ΔV 超过细胞所能承受的极值范围, 将会对细胞造成不可逆的渗透损伤^[2]. 马学虎等^[3]通过模拟保护剂添加过程中细胞的体积变化, 考察了各种加载方案对细胞的体积损伤及渗透损伤. 为了减小细胞的体积变化, 通常采用多步法加载和去除CPA, 但同时也增加了在高浓度保护剂中的暴露时间, 因此提出积累型渗透损伤(accumulated osmotic damage, AOD), 旨在结合加

* 国家自然科学基金(51376132)资助项目.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2018-10-25, 接受日期: 2019-01-18

载时间和细胞体积变化情况来共同探究细胞的受损情况. Liu等^[4]以卵母细胞为模型, 计算了CPA加载和去除过程中的AOD值, 并对成熟的卵母细胞进行孤雌激活, 将各方案的细胞发育率同其相应的AOD值比较, 结果发现二者之间存在较高的相关性. Wang等^[5]也采用AOD值评估了小鼠卵母细胞加载保护剂后的损伤情况, 实验表明囊胚率越高, AOD值越小. 在加载/去除过程中, 不论体积变化如何, 细胞时刻都受到CPA自身毒性带来的毒性损伤, 有学者认为毒性损伤是低温保存面临的主要挑战^[6]. 毒性损伤不仅受时间影响, 还与CPA的浓度和温度有关, Benson等^[7]根据已有的实验数据定义了CPA加载/去除过程中的积累毒性损伤(J), 以人的卵母细胞为模型, 计算加载和去除过程中细胞受到的毒性损伤大小总和, 并模拟计算出了优于传统分步法的保护剂添加方案.

虽然传统的损伤评估参数从不同角度对细胞损伤进行了评估, 但得出的结论可能出现分歧, 如增加加载步数可以减小细胞的体积变化, 但延长了加载时间, 造成较大的积累性毒性损伤. 邵文琪等^[8]研究表明, 采用多个损伤评估参数进行计算后, 不一定能得出统一的预测结果, 因此需要一个可以综合确定各参数的相对权重和合成方式的多指标综合评价方法, 其中确定各指标权重的方法之一为熵值法^[9-10]. 熵值法在工程技术、社会经济等领域取得了非常广泛的应用, 如Zou等^[11]将熵值法应用到模糊综合评价方法中, 对水质进行评价, 实验结果表明通过熵值法评价水质质量十分有效. Qiu等^[12]将熵值法应用到信息工程管理领域, 将信息理论和决策理论有效地结合, 为多因素决策提供理论支持. 吴铭程等^[13]基于熵值法设计了一个污染源区域排污量的评价模型, 为实现主要污染物总量减排目标提供有力的技术支持. 邓红星等^[14]基于熵值法建立燃气公交系统安全评价的模糊综合评判模型, 结果表明建立的评价指标具有一定的应用价值.

目前, 关于卵母细胞的损伤评估多是针对分步法添加固定浓度的保护剂, 而微流控法能够实现保护剂浓度的连续性变化, 关于微流控法连续性添加保护剂时卵母细胞的损伤评估还未见报道. 本文采用微流控法对猪卵母细胞进行保护剂的加载, 在不同加载时间、不同线型、不同凹型的加载方案中, 对猪卵母细胞细胞的渗透行为进行模拟, 以细胞体积变化极值 ΔV 、积累性渗透性损伤值AOD、积累

毒性损伤值 J 为评价指标, 对各个加载方案进行细胞损伤评估. 其次, 在传统损伤参数的基础上, 根据熵值法的基本原理, 建立基于熵值法的卵母细胞损伤评估模型, 计算各方案的综合损伤参数 s . 最后进行了猪卵母细胞微流控加载后孤雌激活实验, 将得出的细胞囊胚率同综合损伤评估参数 s 值进行对比, 验证 s 值评估的有效性.

1 材料与方法

1.1 渗透模型

目前渗透模型主要有3种: 一参数(溶质渗透系数)模型^[15-16]、经典的两参数(水力传导系数和溶质渗透系数)模型^[17]以及由Kedem和Katchalsky创立的三参数模型^[18]. Kleinhans^[19]和Woods^[20]分别从理论和实验上比较了两参数模型和三参数模型, 一致认为两参数模型更为简洁, 其预测结果更接近实际情况:

$$V_c = V_w + V_s + V_b \quad (1)$$

$$\frac{dV_w}{dt} = -L_p A R T (M^e - M^i) \quad (2)$$

$$\frac{dN_s}{dt} = P_s A (M_s^e - M_s^i) \quad (3)$$

$$V_s = N_s \cdot V_{cpa} \quad (4)$$

式(1)显示了各类体积间的关系, 式(2)式(3)分别描述了胞内水体积和胞内保护剂物质的量随时间的变化关系, 式(4)给出了胞内保护剂体积的算法. 其中, V_c 为卵母细胞的体积, V_s 为胞内保护剂体积, V_w 为胞内水体积, V_b 为卵母细胞的非渗透体积, V_{cpa} 为保护剂的偏摩尔体积, A 为卵母细胞截面积, M 为溶液浓度, R 为气体常数, T 为温度, N_s 为胞内保护剂摩尔数, L_p 为卵母细胞对水的渗透系数, P_s 为卵母细胞对保护剂的渗透系数, e 表示胞外, i 表示胞内, s 表示保护剂, t 表示时刻. 邵文琪^[8]测量了模拟所需要的各参数值(表1). 其中 L_p 及 P_s 值分别为猪卵母细胞在目标浓度保护剂(15%EG+15%Me₂SO)中的水渗透系数及保护剂渗透系数. 运用MLAB软件对细胞的渗透过程进行模拟.

1.2 加载方案

采用不同方案对猪卵母细胞连续性加载15%EG+15%Me₂SO的保护剂, 该保护剂的摩尔浓度为4.81 mol/L. 不同加载时间的加载方案如图1a所示, 分别在5 min、10 min、15 min内使细胞外保护剂浓度从0线性增加至4.81 mol/L. 不同线型的

Table 1 Parameter values used in the simulation calculation

Parameter	Value	Unit
V_c	0.84×10^{-6}	μm^3
V_{cpa}	63.5	$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$
V_b	0.24×10^{-6}	μm^3
L_p	4.5	$\mu\text{m} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
P_s	3.24	$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$
R	0.86	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
T	298	K

加载方案如图 1b 所示，线性、S 型、凹型都在 10 min 内使细胞外保护剂从 0 增加至 4.81 mol/L. S 型加载先在 0~150 s 内线性加载至 0.58 mol/L，后在 151~450 s 内加载至 4.14 mol/L，最后 150 s 内加载至最终浓度，使得整条加载曲线呈 S 型；凹型加载则在前 300 s 时先加载至 0.58 mol/L，在后 300 s 加载至 4.18 mol/L. 不同凹型加载组在低凹型、高凹型中各选取一种，同一般线性进行比较，加载方案见图 1c. 其中低凹型加载在 300 s 时加载到目标浓度的 12%，即为 0.58 mol/L，在后 300 s 中加载至最终浓度；而高凹型则在 540 s 时加载至目标浓度的 50%，在最后的 60 s 加载至最终浓度.

1.3 传统损伤评估

运用 MLAB 软件计算 AOD 及 J 的值. 其计算方法如下：

1.3.1 积累性渗透损伤值

$$AOD = \int_{start}^{end} \left| \frac{V_c - V_{iso}}{V_{iso}} \right| dt \quad (5)$$

式中， $(V_c - V_{iso})$ 表示细胞体积的变化值，AOD 值的计算包含从加载开始至加载结束整个过程中细胞体积的变化情况，该评估模型采用体积变化的绝对值，包含了细胞体积膨胀和收缩造成的渗透

损伤.

1.3.2 积累性毒性损伤值

$$J = \int_{start}^{end} 0.005 (M_s^i)^{1.6} dt \quad (6)$$

式中， M_s^i 是胞内保护剂的归一化摩尔浓度，常数 0.005 和 1.6 都是基于保护剂浓度的毒性系数. 该模型的预测结果与以往文献中不同保护剂种类、不同细胞类型的研究结果相吻合 [7].

1.4 基于熵值法的综合损伤评估参数s

根据熵值法的基本原理，以细胞体积变化极值 (ΔV)、积累性渗透性损伤值 (AOD)、积累性毒性损伤值 (J) 为评价指标，对各个加载方案进行细胞损伤评估，建立基于熵值法的猪卵母细胞综合损伤评估模型. 设加载方案为 4 个 (其中一个为对照组)，评价指标为 3 个，则猪卵母细胞在加载完低温保护剂后受到的损伤模型如式 (7) 所示：

$$s_i = \sum_{j=1}^n w_j p_{ij} \quad (7)$$

其中 s_i 表示第 i 个待评加载方案的评价值， s_i 值越大，表示该加载方案对细胞产生的损伤越大； w_j 是通过熵值法赋权获得的各个加载方案的权重； p_{ij} 是熵值法赋权过程中得到的第 j 类损伤在第 i 个加载方案的值占总损伤值的比重. 综合评估参数 s 的赋权步骤如下.

1.4.1 原始数据矩阵标准化处理

根据各个加载方案对细胞产生的各个损伤，建立原始损伤值数据矩阵 Y ，将其标准化处理后得到 X 矩阵，计算方法如下：

$$Y = (y_{ij})_{m \times n} = \begin{bmatrix} y_{11} & \cdots & y_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ y_{m1} & \cdots & y_{mn} \end{bmatrix} \quad (8)$$

$$x_{ij} = \frac{y_{ij} - y_{Lj}}{y_{Hj} - y_{Lj}} \quad (9)$$

$$y_{Hj} = \max (y_{1j}, y_{2j}, \cdots, y_{mj}) \quad (10)$$

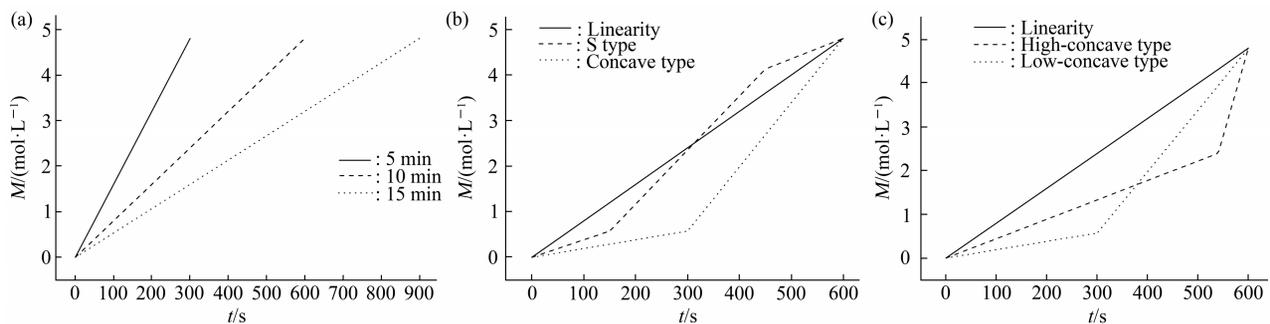


Fig. 1 Different loading schemes

(a) Loading scheme of different loading times; (b) Loading scheme of different line types; (c) The loading scheme of different concave types.

$$y_{1j} = \min (y_{1j}, y_{2j}, \dots, y_{mj}) \quad (11)$$

其中 y_{ij} 表示第 i 个待评加载方案第 j 种损伤值; y_{1j} 表示所有加载方案的第 j 种损伤的最大值, y_{mj} 表示所有加载方案的第 j 种损伤的最小值.

1.4.2 计算比重矩阵

对标准化处理后的损伤数据矩阵 X 计算第 j 类损伤在第 i 个加载方案的值占该损伤值总和的比重 p_{ij} , 如式 (12) 所示. 各个加载方案各类损伤比重组成了比重矩阵 P , 如式 (13) 所示.

$$p_{ij} = \frac{x_{ij}}{\sum_{i=1}^m x_{ij}} \quad (12)$$

$$P = (p_{ij}) = \begin{bmatrix} p_{11} & p_{12} & \dots & p_{1n} \\ p_{21} & p_{22} & \dots & p_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ p_{m1} & p_{m2} & \dots & p_{mn} \end{bmatrix} \quad (13)$$

1.4.3 熵值的计算

根据比重矩阵求得各个损伤的熵值 e_j :

$$e_j = -k \sum_{i=1}^m (p_{ij} \ln p_{ij}) \quad (14)$$

其中, 常数 k 与待评价的加载方案个数 m 有关. 为计算方便一般令 $k=1/\ln m$, 则 $0 \leq e_j \leq 1$.

1.4.4 差异性系数的计算

根据各个损伤的熵值 e_j 计算第 j 类损伤的差异性系数 g_j , 如式 (15) 所示. 差异性系数 g_j 越大, 该种损伤 x_{ij} 在加载方案综合评价中重要性就越强, 最终获得的权重也就越大.

$$g_j = 1 - e_j \quad (15)$$

1.4.5 权重的计算

根据差异性系数 g_j 即可计算出各类损伤的权重 w_j , 如式 (16) 所示. 权重的大小反映了该类损伤对细胞伤害的程度.

$$w_j = \frac{g_j}{\sum_{j=1}^n g_j} \quad (16)$$

1.4.6 综合评价值的计算

根据各类损伤的权重 w_j 和第 j 类损伤在第 i 个待评加载方案的值占该损伤总和的比重 p_{ij} , 求得各个加载方案的评价值 s_i :

$$s_i = w_1 y_{i1} + w_2 y_{i2} + w_3 y_{i3} \quad (17)$$

1.5 主要试剂及低温保护剂溶液的配制

组织培养液 (tissue culture medium 199, TCM-199)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、丙酮酸钠和青链霉素均购自于美国 Gibco 公司, 其余实验所用其他试剂除特别说明外均购自美国 Sigma-Aldrich 公司. 基础液: TCM199+20%FBS, 低温保护剂溶液: 15%EG+15%Me₂SO+基础液.

1.6 猪卵母细胞的采集、筛选和体外成熟

从上海市长宁区复兴屠宰场无菌采集卵巢, 置于生理盐水 (含青、链霉素各 500 U/ml) 中, 1 h 内送达实验室. 取 18 G 的 5 ml 注射器抽吸卵巢表面直径 2~6 mm 的卵泡, 将抽得的卵泡液缓缓注入 10 ml 的无菌离心管内, 在 39°C 下静置 15 min 后, 在实体显微镜下捡卵并计数, 选取胞质均匀、卵丘细胞层完整紧密、包裹 3 层以上的卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus oocyte complexes, COCs). 洗涤后放入四孔板, 每孔中放入 60~65 枚卵母细胞, 平衡 2 h 后置于 38.5°C、5% CO₂ 气相饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 42~46 h.

1.7 微流控实验系统

微流控实验系统由两微注射泵 (分别用于控制基础液和保护剂溶液的流速)、两微量进样器、微流控芯片、体式显微镜共同构成, 实验装置如图 2 所示. 芯片由 Y 型入口通道、固定混合通道、蛇形混合通道、细胞操作腔、细胞进出通道和出口通道

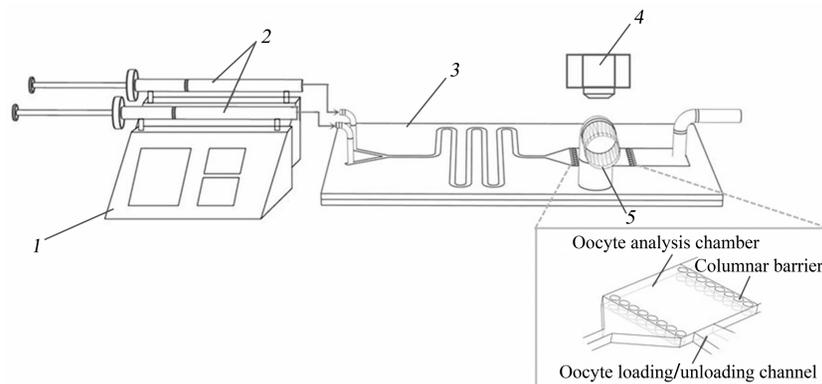


Fig. 2 A schematic illustration of the microfluidic experimental system

1: Microinjection pump, 2: Micro-syringe, 3: Y-microfluidic chip, 4: Stereoscopic microscope, 5: Oocyte channel.

组成.

1.8 微流控实验保护剂加载方案

将6枚卵母细胞放入操作腔中,两微量进液针内分别装入基础液及保护剂溶液,微通道内的总流速为5 $\mu\text{l}/\text{min}$,为了实现图1中细胞外保护剂浓度的不同变化方案,设置注射泵的注射方案,使保护剂的流速如表2~4所示.以S型加载为例,在0~150 s内,保护剂流速从0线性上升至0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$,151~450 s内线性上升至4.4 $\mu\text{l}/\text{min}$,451~600 s内线性上升至5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Table 2 Setting of CPA velocity of linear loading schemes with different times

Loading method	Flow rate setting	Time setting
I (5 min)	0~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 300 s)
II (10 min)	0~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 600 s)
III (15 min)	0~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 900 s)

Table 3 Setting of CPA velocity of linear loading schemes with different line types

Loading method	Flow rate setting	Time setting
Linearity	0 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 600 s)
S-type	0 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 150 s)
	0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~4.4 $\mu\text{l}/\text{min}$	(151 s, 450 s)
	4.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(451 s, 600 s)
Concave-type	0 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 300 s)
	0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(301 s, 600 s)

Table 4 Setting of CPA velocity of linear loading schemes with different concave types

Loading method	Flow rate setting	Time setting
Linearity	0 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 600 s)
High-concave-type	0 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 540 s)
	2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(541 s, 600 s)
Low-concave-type	0 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$	(0 s, 300 s)
	0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ ~5 $\mu\text{l}/\text{min}$	(301 s, 600 s)

1.9 卵母细胞孤雌激活及卵裂率、囊胚率计算

采用电脉冲的方式对保护剂加载完成的卵母细胞进行孤雌激活,激活后的胚胎放入含细胞松弛素B的胚胎培养液中,于 CO_2 恒温培养箱中培养4~5 h,再转移至胚胎培养液中,在培养箱内进行培养.激活后第7天观察胚胎发育情况,通过(18)与(19)式统计卵裂率和囊胚率:

$$\text{卵裂率} = \frac{\text{受精卵裂胚胎数}}{\text{受精卵数}} \times 100\% \quad (18)$$

$$\text{囊胚率} = \frac{\text{囊胚数}}{\text{受精卵数}} \times 100\% \quad (19)$$

2 结果与讨论

2.1 渗透行为模拟

以线性加载方式,在5 min、10 min、15 min内对猪卵母细胞加载保护剂,加载过程中的细胞体积变化情况如图3a所示.可以看出,5 min加载初期体积快速下降,体积变化大于10 min和15 min组.在加载末期细胞体积都有恢复趋势,5 min组的体积上升速率最快,但由于时间限制,最终细胞体积恢复最少.在加载结束时,5 min方案的细胞体积恢复至原体积的76%,而15 min方案的则能够恢复至90%以上.

一般线性加载、S型加载和凹型加载方案的细胞体积变化如图3b所示.相比于一般线性加载,在加载初期,S型加载和凹型加载体积较缓慢地下降,其中凹型的体积变化速率最小.在加载末期,S型加载的细胞体积呈稳固回升趋势,恢复至原体积的90%以上.而凹型加载的最终胞内水分含量最少,可能会进一步减小后期细胞在冷冻过程中受到的冰晶损伤.

不同凹型的加载方案的细胞体积变化如图3c所示.在加载初期,从低凹型加载到高凹型加载,再到一般线性加载,细胞体积的变化越来越快,体积变化极值越来越大,最终高凹型加载的最终细胞体积最小.

2.2 传统损伤评估结果

表5为不同加载时间组的损伤评估参数值.5 min加载方案得出的 ΔV 值显著高于10 min及15 min组.但在计算积累性渗透损伤值时发现,5 min组的AOD值远小于10 min及15 min组,这也进一步说明了渗透损伤不仅与细胞的体积变化相关,还与和CPA接触的时间有关,同Liu等^[4]的研究结果一致.计算细胞的积累性毒性损伤值发现,CPA的添加时间越长,J值越大,可能与CPA诱导的细胞质组织改变、膜特性或细胞代谢相关^[21].因此随着加载时间的延长,体积变化平缓, ΔV 值减小,但细胞所受积累性渗透损伤及毒性损伤增大,3个参数值得出的最佳方案存在矛盾.

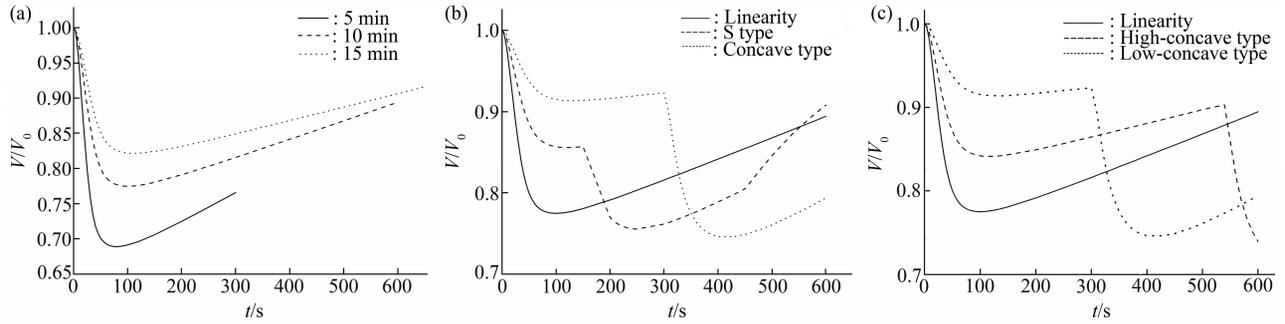


Fig. 3 Cell volume changes of different loading schemes

(a) Cell volume changes of linear loading schemes with different times; (b) Cell volume changes of linear loading schemes with different line types; (c) Cell volume changes of linear loading schemes with different concave types.

Table 5 Damage assessment parameter values of linear loading schemes with different loading times

Loading method	ΔV	AOD	J
Control group	0	0	0
5 min	0.31	81.02	6.17
10 min	0.22	105.17	13.12
15 min	0.18	106.88	20.16

表6为不同线型组的损伤评估参数值. 凹型加载的体积变化极值高于线性及S型加载, 但其积累性渗透损伤和毒性损伤均小于线性及S型. 凹型线性加载时J值达到最小7.73, 在S型线性加载时达到最大13.59, 接近凹型加载的2倍.

Table 6 Damage assessment parameter values of linear loading schemes with different line types

Loading method	ΔV	AOD	J
Control group	0	0	0
Linearity	0.22	105.17	13.12
S-type	0.24	109.05	13.59
Concave-type	0.26	93.27	7.73

表7为不同凹型组的损伤评估参数值. 对于不同凹型的线性加载方案, 一般线性加载中细胞受到的瞬时性渗透损伤较小, ΔV 在三组加载方案中最小, 但其AOD和J值远大于两凹型组. 其中高凹型加载中细胞与高浓度保护剂中的接触时间远小于低凹型加载, 因此受到的积累性损伤最小.

2.3 综合损伤评估

以不同加载时间的加载方案为例计算综合损伤评估参数s, 按照1.4中的方法计算三种评估参数的熵值、差异性系数及权重, 如表8所示.

Table 7 Damage assessment parameter values of linear loading schemes with different concave types

Loading method	ΔV	AOD	J
Control group	0	0	0
Linearity	0.22	105.17	13.12
High-concave-type	0.26	82.27	5.97
Low-concave-type	0.26	93.27	7.73

Table 8 Entropy value, difference coefficient and weight of each evaluation parameter

Evaluation parameter	ΔV	AOD	J
Entropy value	0.77	0.79	0.72
Difference coefficient	0.22	0.21	0.28
Weight	0.32	0.30	0.38

由表8, ΔV 、AOD、J的权重系数分别为0.32、0.30、0.38, 说明毒性损伤对细胞的影响最为显著. 不同加载时间的加载方案, 其综合损伤评估参数值可由式(20)求出.

$$s = 0.32\Delta V + 0.30AOD + 0.38J \quad (20)$$

按照类似的计算方法, 得到不同加载方案的s值(表9). 不同加载时间组, 10 min与15 min两方案的s值相似, 细胞受损情况相似, 而5 min加载方案所得s值最小, 虽然在5 min内完成保护剂的加载会引起较大的细胞体积变化, 但可能没有超出细胞可承受的体积变化上限, 对细胞造成的损伤较小, Benson等^[22]也提出, 在细胞体积变化极值范围内, 最小化加载或去除时间可大幅度降低细胞所受毒性损伤从而优化加载去除方案. 不同线型组中, S型线性加载方案的s值最大, 因此细胞受到的综合损伤最大, 而凹型线性加载方案的s值最小, 细胞受损最小. 不同凹型组中, 一般线性加载

方案的 s 值最大，而高凹型线性加载方案的 s 值最小，因此高凹型加载效果最优。

Table 9 The value of s for different loading schemes

Different times	s	Different line types	s	Different concave types	s
Control group	0	Control group	0	Control group	0
5 min	26.48	Linearity	38.76	Linearity	38.17
10 min	36.29	S-type	40.19	High-concave-type	28.29
15 min	39.48	Concave-type	33.01	Low-concave-type	32.20

2.4 卵母细胞的发育潜能

运用不同方案加载保护剂，各方案所得细胞囊胚率结果见表 10. 不同加载时间组中，5 min 加载方案的囊胚率最高，且加载时间越长，囊胚率越低. 不同线型组中，凹型组的囊胚率高于一般线性及 S 型组. 不同凹型组中，高凹组的囊胚率远高于低凹组.

2.5 综合损伤评估效果

为了验证 s 值评估的有效性，以不同加载时间组为例，拟合综合评估参数 s 与囊胚率的关系拟合曲线 (图 4). 结果显示 s 同囊胚率之间呈负相关关系，且相关度较高. 以相同的方法拟合不同线型及不同凹型组的 s 值与囊胚率曲线，均得出相同结论，说明综合评估参数 s 对卵母细胞的损伤评估是可行的.

3 结 论

本文首先运用传统的评估参数对微流控连续加载保护剂的不同方案进行评估，在此基础上提出了新的综合损伤评估参数 s ，用以计算各方案下细胞所受综合损伤. 随后进行了猪卵母细胞微流控加载实验，孤雌激活后统计囊胚率，分析囊胚率与 s 值之间的关系来验证 s 值的可用性，并得出以下结论：

a. 加载时间越长，细胞体积变化最大值 ΔV 越小，但累积性损伤值 AOD 、 J 值越大；不同线性加载时，S 型线性加载的 AOD 值和 J 值最大，而凹型

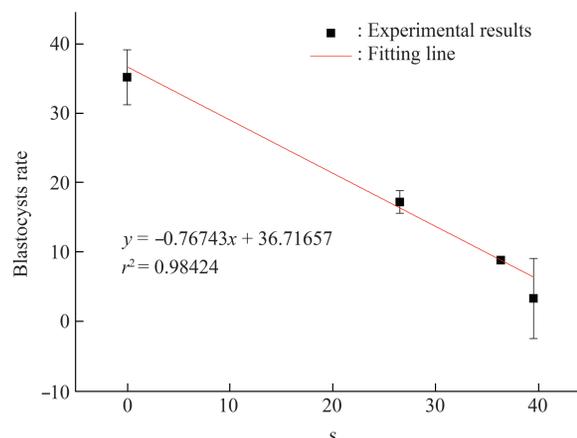


Fig. 4 Relationship between the value of s and blastocyst rate at different loading times

线性加载的 AOD 值和 J 值最小；对凹型添加进一步进行检测，高凹型线性加载的体积变化极值虽然较大，但 AOD 值和 J 值最小. 3 个传统评估参数值所得结论存在矛盾.

b. 不同加载时间组中计算的累积性毒性损伤值在 s 值中所占权重最高，10 min 与 15 min 组的 s 值相近，并显著高于 5 min 组；不同线型组中，S 型线性加载方案的 s 值最大，而凹型线性加载方案的 s 值最小. 不同凹型组中，一般线性加载方案的 s 值最大，高凹型线性加载方案的 s 值最小.

c. 将三组不同方案的 s 值与实验所得囊胚率进行对比， s 值同囊胚率之间呈负相关关系，且相关度较高，说明综合评估参数 s 对卵母细胞的损伤评估是可行的.

本文首次提出同时参考三种传统损伤评估参数来评估细胞受到的损伤，使得能够从瞬时和累积性两种角度对渗透损伤和毒性损伤两个方面进行分析，并针对传统损伤评估方法的不足之处，提出综合损伤评估参数，通过细胞孤雌激活实验结果验证出其评估的有效性，为细胞的损伤评估提供一条新思路.

Table 10 The blastocyst rate of oocytes after loading with different loading schemes

Different times	Blastocyst rate/%	Different line types	Blastocyst rate/%	Different concave types	Blastocyst rate/%
Control group	35.20±3.97	Control group	35.2±3.97	Control group	35.20±3.97
5 min	17.25±1.62	Linearity	8.84±0.44	Linearity	8.84±0.44
10 min	8.84±0.44	S-type	3.33±5.77	High-concave-type	23.48±4.73
15 min	3.33±5.77	Concave-type	16.31±1.62	Low-concave-type	16.31±1.62

参 考 文 献

- [1] Song Y S, Moon S, Hulli L, *et al.* Microfluidics for cryopreservation. *Lab on A Chip*, 2009, **9**(13): 1874-1881
- [2] Hunt C J, Armitage S E, Pegg D E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology*, 2003, **46**(1): 76-87
- [3] 马学虎, 范文霞, 潘广生, 等. 冷冻保护剂导入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
- [4] Liu J, Mullen S, Meng Q, *et al.* Determination of oocyte membrane permeability coefficients and their application to cryopreservation in a rabbit model. *Cryobiology*, 2009, **59**(2): 127-134
- [5] Wang L, Liu J, Zhou G B, *et al.* Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures I. *Biology of Reproduction*, 2011, **85**(5): 884-894
- [6] Fahy G M, Wolk B, Wu J, *et al.* Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, 2004, **48**(1): 22-35
- [7] Benson J D, Kearsley A J, Higgins A Z. Mathematical optimization of procedures for cryoprotectant equilibration using a toxicity cost function. *Cryobiology*, 2012, **64**(3): 144-151
- [8] 邵文琪. 猪卵母细胞在微流控加载低温保护剂过程中的渗透行为模拟及损伤评估[D]. 上海: 上海理工大学, 2017
Shao W Q. Shanghai: University of Shanghai for Science and Technology, 2017
- [9] 张卫民, 安景文, 韩朝. 熵值法在城市可持续发展评价问题中的应用. *数量经济技术经济研究*, 2003, **20**(6): 115-118
Zhang W M, AN J W, Han C. *Quantitative And Technical Economics*. 2003, **20**(6): 115-118
- [10] 张卫民. 基于熵值法的城市可持续发展评价模型. *厦门大学学报哲学社会科学版*, 2004(2): 109-115
Zhang W M. *Journal of Xiamen University (Art & Social Sciences)*. 2004(2): 109-115
- [11] Zou Z H, Yun Y, Sun J N. Entropy method for determination of weight of evaluating indicators in fuzzy synthetic evaluation for water quality assessment. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2006, **18**(5): 1020-1023
- [12] Qiu W H. Multi-factors decision-making entropy method and its application in engineering management. *Engineering Sciences*, 2010, **08**(4): 74-79
- [13] 吴铭程, 铁治欣, 丁成富, 等. 基于熵值法的污染源区域排污量评价模型研究. *浙江理工大学学报*, 2016, **35**(4): 615-619
Wu M C, Tie Z X, Ding C F, *et al.* *Journal of Zhejiang Institute of Science and Technology*. 2016, **35**(4): 615-619
- [14] 邓红星, 李嘉璐, 张文会, 等. 基于熵值法的燃气公交系统安全评价. *重庆理工大学学报*, 2016, **30**(10): 81-85
Deng H X, Li J L, Zhang W H, *et al.* *Journal of Chongqing Institute of Technology*. 2016, **30**(10): 81-85
- [15] Mazur P, Leibo S P, Miller R H. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures. *The Journal of Membrane Biology*, 1974, **15**(1): 107-136
- [16] Mazur P, Miller R H. Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2 m solutions at 0 or 20 °C. *Cryobiology*, 1976, **13**(5): 507-522
- [17] Fabbri R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. *Cell & Tissue Banking*, 2006, **7**(2): 113-122
- [18] Kedem O, Katchalsky A. Thermodynamic analysis of biological membranes to non-electrolytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1989, **1000**(1000): 413-430
- [19] Kleinans F W. Membrane Permeability Modeling: Kedem-Katchalsky vs a Two-Parameter Formalism. *Cryobiology*, 1998, **37**(4): 271-289
- [20] Woods E J, Liu J, Gilmore J A, *et al.* Determination of human platelet membrane permeability coefficients using the kedem-katchalsky formalism: estimates from two-vs three-parameter fits. *Cryobiology*, 1999, **38**(3): 200-208
- [21] Hammerstedt R H, Graham J K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 1992, **29**(1): 26
- [22] Benson J D, Chicone C C, Critser J K. A general model for the dynamics of cell volume, global stability, and optimal control. *Journal of Mathematical Biology*, 2011, **63**(2): 339-359

The Injury Evaluation During Cryoprotectant Loading With Microfluidic Chip*

SHAO Wen-Qi¹⁾, GUO Ying-Ying¹⁾, DAI Jian-Jun²⁾, ZHANG De-Fu²⁾, ZHOU Xin-Li^{1)**}

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

²⁾Animal and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract With the help of the oocyte cryopreservation, the assisted reproductive technology and the embryo engineering technology have tremendous development potential. However, the high concentration of cryoprotectants (CPAs) in cryopreservation will cause osmotic damage and toxic damage to oocytes. Unlike adding a fixed concentration of CPA in step-by-step method, the microfluidic method can achieve continuous CPA concentration change. The oocytes damage evaluation in CPA continuous loading by microfluidic method has not been reported. In this paper, the osmotic behavior of M II porcine oocytes in different loading time, different loading line types and different concave loading types were simulated. Three traditional parameters ΔV (maximum volume change), AOD (accumulative osmotic damage) and J (accumulative chemical damage) were used to evaluate the damage of oocyte. A comprehensive parameter s , which based on the traditional parameters and the information entropy theory, was proposed to evaluate the damage. Oocytes loading experiments were conducted to verify the effectiveness of s . The results showed differences from the results of traditional damage assessment parameters, which cannot come to the unified conclusion. By analyzing the relationship between blastocyst rate and s , we found that there is a highly negative correlation between s and blastocysts rate. That indicates that the comprehensive damage assessment parameter s can be used to assess cell damage and breaks a new path for cell damage evaluation.

Key words microfluidic chips, porcine oocyte, osmotic injury, toxic damage, damage evaluation

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0225

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (51376132).

** Corresponding author.

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

Received: October 25, 2018 Accepted: January 18, 2019