

小鼠睾丸组织慢速冷冻保存工艺的优化研究*

谭佳 郭莹莹 周新丽**

(上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093)

摘要 **目的** 冷冻保存睾丸组织用于后期移植, 是除精子冻存以外保持男性生育力的另一有效途径。本文对块状睾丸组织常用的慢速冷冻降温程序进行了改进。**方法** 通过缩短保护剂加载时间、提高第一阶段的冷却速率、第二阶段直接投入液氮等方法对小鼠睾丸组织进行冷冻保存。在不同温度对小鼠睾丸组织冻存体系进行诱导冰晶成核并冻存, 降低睾丸组织慢速冷冻保存所需保护剂浓度。**结果** 改进的两步法冻后组织内生殖细胞的凋亡阴性率均较高, 其中精原细胞 98.4%、精母细胞 99.2%、精子细胞 88.4%、支持细胞 98.1%, 显著高于常用慢速冷冻组, 与对照组均无显著性差异。相比于未置核组, -10°C 置核可显著提高 5% DMSO 保护剂慢速冷冻保存的冻后效果, 生殖细胞的凋亡阴性率为精原细胞 82.9%、精子细胞 92.1%、精母细胞 93.2% 及支持细胞 88.9%, 与较高浓度保护剂 10% DMSO 组冻存结果无显著性差异, 说明置核能够降低所需保护剂的浓度, 降低毒性损伤。**结论** 本研究通过改进两步法和置核提高了小鼠睾丸组织冻后的质量, 为临床上人睾丸组织的冻存提供参考。

关键词 睾丸组织, 慢速冷冻, 两步法冷冻, 置核

中图分类号 Q2, Q3, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0350

近年来, 由于各种因素(包括放化疗、遗传和先天性疾病等)引起的不孕不育发生率呈上升趋势。不孕症还会破坏患者的心理健康^[1], 保留生育能力对于保证患者的生活质量至关重要^[2]。常用的男性生殖力保存方法为精子保存, 是一种有效并且无创的生育力保存方法^[3-6]。但是, 患有少精症或无精症的男子难以采集正常活性的精子。另外, 由于癌症患者趋于年轻化, 被诊断患有癌症的儿童, 治愈率可能高达 80%^[7-8], 而癌症治疗可能对睾丸生殖细胞带来损害, 30% 的男性儿童癌症幸存者在成年时将患无精子症^[9]。因此, 对于无精子症及无法产生精子的青春期前癌症患者, 无法采用精子冷冻方法对他们进行生殖力保存, 冷冻保存睾丸组织用于后期移植可能是保持生育力的另一有效选择。睾丸组织可以用两种不同的形态进行保存: a. 睾丸细胞悬液; b. 睾丸组织块冻存。细胞悬浮液制备需要机械或酶促消化组织, 存在影响细胞活性的风险。此外, 睾丸组织本身的功能结构有明显的细胞间依赖关系, 细胞与细胞间相互作用的缺失也可能对细胞增殖和分化造成危害。为了保持精

原干细胞的成熟能力, 青春期前睾丸组织中的所有不同生殖细胞需要一起保存^[10]。因此, 睾丸组织块的保存被认为是一种良好的替代方法, 保存组织中完整的生精小管可维持细胞间相互作用以保留精原干细胞存活所必需的生理环境。

目前, 常用的块状睾丸组织低温保存技术是慢速冷冻保存。Milazzo 等^[11] 对未成熟小鼠睾丸组织冷冻保存方案进行了优化, 得出睾丸组织的慢速冷冻程序: 4°C 停留 30 min 以加载低温保护剂, $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -9°C , 停留 8 min, $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -40°C , $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -150°C , 后投入液氮。解冻后显示了代表细胞增殖能力的抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体约 80% 呈阳性表达, 与对照组 (91%) 仍有一些差距。Unni 等^[12] 运用类似程序对人睾丸组织冻存后

* 上海市促进市级医院临床技能与临床创新能力三年行动计划重大临床研究项目 (SHDC2020CR3077B) 资助。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2021-11-17, 接受日期: 2022-02-21

培养48 h, 结果显示了约50%的活性, 远低于对照组(70%)。Kvist等^[13]、Keros等^[14-15]、Travers等^[16]、Shinohara等^[17]均运用相似程序对人或动物模型睾丸组织进行了慢速冷冻保存。虽然睾丸组织的慢速冷冻取得了一定的成果, 但是根据慢速冷冻的原理, 上述睾丸组织冷冻程序存在两个问题: 一是常用慢速冷冻程序所用加载保护剂时间为30 min, 即使所需保护剂浓度较低, 长时间浸泡仍会对组织造成不可逆的毒性损伤; 二是降温的第一、二阶段的降温速率较慢, 保护剂加载完成后经过近2 h才投入液氮, 对组织造成较大的溶质损伤及毒性损伤。

慢速冷冻过程中常用的低温保护剂二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)具有一定的生物毒性^[18]。苗俊英等^[19]发现, DMSO会诱导BEL-7402细胞核DNA凝缩和核片段化, 最后形成凋亡小体, 且随着DMSO浓度的增加和处理时间的延长, 细胞存活率明显下降, 用2%的DMSO处理细胞12 h后凋亡率达17.21%。在临床应用中已有研究表明, DMSO未完全洗脱将引起血管内溶血和血清转氨酶水平升高等副作用^[20], 患者出现肾功能衰竭肺水肿、心脏骤停和支气管痉挛等副作用^[21]。因此, 有必要研究在保证冻存效果的前提下减少渗透保护剂DMSO用量的方法。Huang等^[22]研究发现, 在溶液降温至成核温度之前进行置核操作, 使溶液中形成局部冰晶以提高胞外渗透压, 在渗透压差作用下细胞缓慢脱水, 以减少胞内冰的形成, 可达到替代渗透性保护剂的作用。另外, 置核可释放大量自由能, 抑制升温期间再结晶现象以提高冻后效果。在慢速冷冻过程中, 若冰晶以极快的速率在胞外形成, 胞内水来不及脱出, 将对细胞造成冰晶损伤, 冻结过程的早期增加置核程序可通过在相对较高的零下温度下人为形成晶核, 可以降低过冷的破坏作用^[23-24]。目前, 还未有研究者探究通过置核降低睾丸组织冻存所需渗透保护剂DMSO浓度, 以及不同置核温度下形成冰晶对睾丸组织冻存效果的影响机理。

针对以上问题, 本文首先提出改进两步法冷冻, 缩短了保护剂的加载时间, 将第一步的降温速率提升至1°C/min降至-40°C后直接投入液氮。比较常用慢速冷冻程序与改进两步法冷冻对睾丸组织的保存效果。其次, 在-6°C、-8°C、-10°C下对睾丸组织进行置核, 并运用低温显微镜分析置核过程中冰晶形成和生长情况, 结合睾丸组织的冻后效果

筛选最佳置核温度。本研究对小鼠块状睾丸组织的慢速冷冻保存方法进行了优化, 旨在提高其冻后质量, 为临床上人睾丸组织的冻存提供参考。

1 材料与方法

1.1 保护剂溶液配制

按照体积百分比浓度配置以下溶液。睾丸组织基础液(BS): 含20%FBS的DF12(DMEM/F-12)培养液。低温保护剂1: 5% DMSO+10% FBS+0.1 mol/L蔗糖+DF12。低温保护剂2: 10% DMSO+10% FBS+0.1 mol/L蔗糖+DF12。低温保护剂3: 15% DMSO+10% FBS+0.1 mol/L蔗糖+DF12。

1.2 小鼠睾丸组织采集

选取5~8周龄的雄性小鼠, 将其安乐死后快速置于手术台上, 用酒精棉轻轻擦拭腹部, 用消毒后的无菌剪刀剪开小鼠下腹部, 找到睾丸后剪去附睾连接组织以取出睾丸, 置于室温下(约24~26°C)的睾丸组织基础液中, 用镊子与剪刀夹住睾丸表面白膜轻轻撕开, 获得睾丸内部组织, 备用。

1.3 保护剂加载对睾丸组织的毒性损伤

分别将半个小鼠睾丸组织浸泡于5%、10%、15% DMSO保护剂溶液, 30 min后取出, 放入培养液中10 min去除保护剂, 并用培养液洗涤3次。对照组则在培养液中浸泡40 min。接着立即用DCFH-DA(2', 7-dichlorofluorescein diacetate, Sigma-Aldrich, UK)染色30 min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被胞内活性氧氧化为有荧光的二氯荧光素(dichlorofluorescein, DCF), 置于荧光显微镜下观察, 使用488 nm激发波长, 515~565 nm发射波长拍摄荧光照片。通过Image J软件记录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。

1.4 睾丸组织慢速冷冻程序

在3支1.8 ml冻存管中分别装入1 ml低温保护剂1、2、3, 每组取半颗小鼠睾丸, 放入3支冻存管中, 将小鼠睾丸组织分别以常用慢速和改进两步法在程序降温仪(CryoMed Freezer 7453, Thermo Fisher Scientific, USA)中进行冷冻。常用慢速冷冻程序为: a. 4°C停留30 min以加载低温保护剂; b. 2°C/min降至-9°C, 停留8 min; c. 0.3°C/min降至-40°C; d. 25°C/min降至-150°C; e. 快速取出投入液氮保存1 h。改进两步法冷冻程序为: a. 4°C停留10 min以加载低温保护剂; b. 1°C/min降至-40°C,

停留 1 min; c. 快速取出投入液氮。两种冷冻方法的降温程序如图 1 所示。

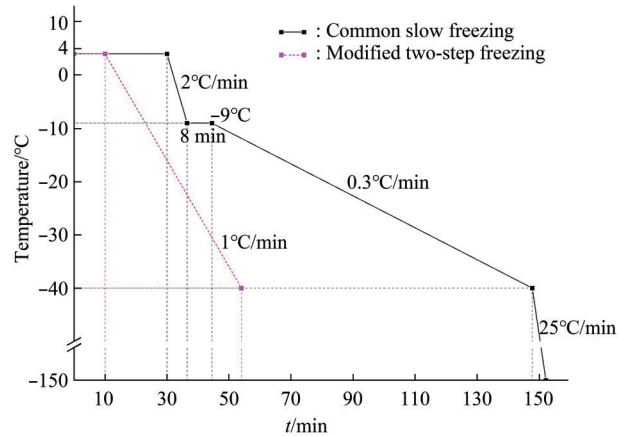


Fig. 1 Common slow freezing and modified two-step freezing procedure

复温时从液氮中快速取出冻存管，置于 37°C 恒温水浴锅复温，至冰晶融化。后将冷冻管中的组织块取出，放入 1 ml 的培养液中 10 min 去除保护剂，并用培养液洗涤 3 次。将组织放入装有 1 ml 培养液的孔板内，放置于 CO₂ 培养箱培养 6 h。

1.5 睾丸组织的置核冷冻程序

3 个 1.8 ml 冻存管中均装入 1 ml 低温保护剂 1，分别放入半个睾丸组织，于 4°C 冰箱内放置 10 min

进行保护剂加载。将程序降温仪预先降至 4°C，将完成保护剂加载的 3 只冻存管放入程序降温仪，分别以 1°C/min 的降温速率降至 -6°C、-8°C、-10°C，达到设定温度后，用液氮预冷的不锈钢镊子触碰液面置核，继续放入程序降温仪保持 10 min，然后将冻存管直接投入液氮。复温步骤与慢速冷冻组相同。

1.6 冰晶的低温显微观察

运用低温显微镜 (BX51, Olympus, 日本) 观察置核实验中的冰晶形态及生长，每组实验取 5 μl 低温保护剂滴加于载物坩锅内，盖 1.6 cm 直径玻璃盖玻片。将 3 组样品分别以 1°C/min 的降温速率冷却至 -6°C、-8°C、-10°C，用液氮预冷的不锈钢镊子触碰坩锅外围置核，观察形成冰晶生长速率及形态。在置核温度保持 10 min 后观察冰晶形态。

1.7 睾丸组织的冻存效果评价

睾丸组织形态，以及生精小管内部结构完整性主要通过 HE 染色评价。半定量评估切片组织的管腔完整性，正常结构评分为 1，管腔受到损伤结构评分为 0。当观察到以下结构变化时结构评分为 0：a. 精原细胞从基底膜分离；b. 基底膜破裂；c. 小管内出现体积较大的空泡；d. 小管内空泡面积超过单根小管截面积的 40%。最终管腔完整率计算方法见公式 (1)，每组实验重复 3 次，最终取平均值。

$$\text{管腔完整率} = \frac{\text{管腔总数} - \text{结构评分为0的管腔数量}}{\text{管腔总数}} \times 100\% \quad (1)$$

冷冻复温后睾丸组织的凋亡水平采用 Tunel 试剂盒进行检测。按照试剂盒的说明进行组织染色，染色后在荧光显微镜下观察细胞着色情况（显色后阳性凋亡细胞核为棕黄色，存活细胞核显蓝色）。在生精小管内，根据细胞形态学方法（细胞形状、核致密性和相对于基底膜的位置等）来确定各种细胞类型^[25]。分别计算各类细胞总数及各类细胞凋亡数量，各生精细胞 Tunel 阴性率通过公式 (2) 计算，每组实验重复 5 次，最后取平均值。

$$\text{细胞Tunel阴性率} = \frac{\text{细胞总数} - \text{凋亡细胞数量}}{\text{细胞总数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.8 数据处理与分析

采用 SPSS Statistics 19.0 软件中 One way ANOVA、Duncan's 新复极差法进行分析，以

$P < 0.05$ 作为差异显著评判标准。

2 结果与讨论

2.1 保护剂加载的毒性损伤

毒性损伤不仅与保护剂接触时间相关，还受保护剂浓度影响。对睾丸组织进行所用 3 种不同浓度保护剂的毒性试验，分别在 3 组保护剂浓度中浸泡 30 min 后测量睾丸组织的活性氧水平，荧光强度如图 2。相对于对照组，在保护剂溶液中浸泡后组织内活性氧水平显著上升，且随着保护剂浓度增高组织内活性氧水平增高，15% DMSO 浸泡后组织内活性氧水平 (9.27) 显著高于 5% (3.30) 及 10% (4.34) 组。活性氧的产生和去除的调节是通过细胞中的抗氧化剂机制进行的，一旦活性氧浓度超过细胞抗氧化剂保护机制的能力，就会导致无法修复

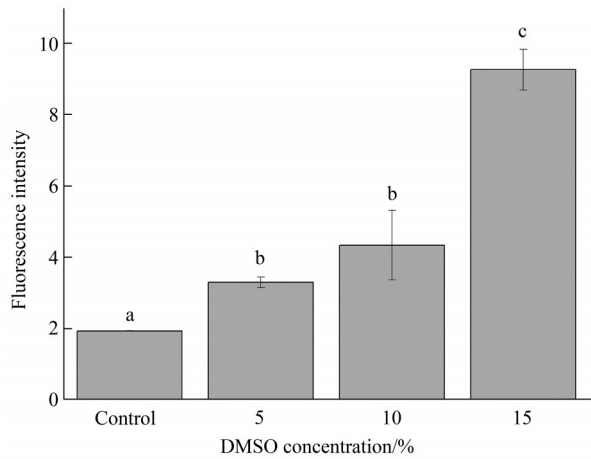


Fig. 2 Fluorescence intensity of reactive oxygen species after testicular tissue was immersed in DMSO solution for 30 min

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

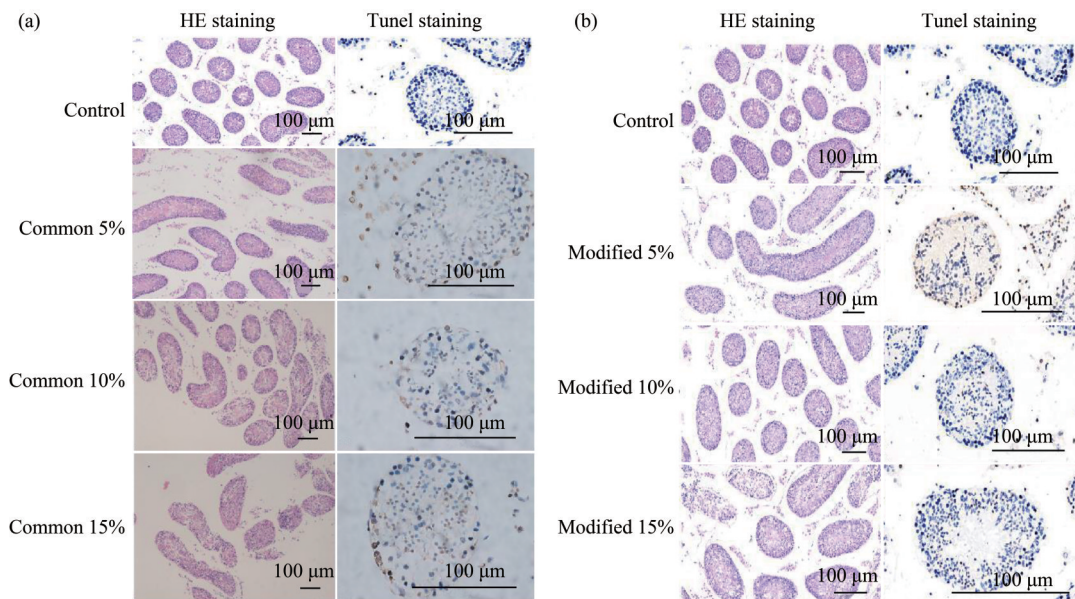


Fig. 3 HE and TUNEL staining of testicular tissue after freezing

(a) Common slow freezing; (b) modified two-step freezing.

Table 1 Lumen integrity rate and negative rate of cell apoptosis in testicular tissue after freezing

	Lumen integrity rate	Spermatogonial cells	Spermatoblast cells	Sperm cells	Sertoli cells
Control	(97.8±3.9)% ^a	(99.3±1.5)% ^a	(99.4±5.3)% ^a	(98.9±2.7)% ^a	(99.1±3.4)% ^a
Common 5%	(91.6±1.0)% ^a	(19.6±12.0)% ^c	(37.0±5.2)% ^c	(49.3±9.5)% ^b	(39.8±13.1)% ^c
Common 10%	(57.5±18.9)% ^b	(49.0±26.9)% ^b	(56.0±19.9)% ^b	(67.5±27.3)% ^b	(72.2±25.5)% ^b
Common 15%	(64.9±9.7)% ^b	(40.0±17.3)% ^{bc}	(49.0±3.4)% ^{bc}	(47.0±5.8)% ^b	(54.2±7.2)% ^{bc}
Modified 5%	(89.3±9.3)% ^a	(35.3±3.9)% ^c	(38.0±5.9)% ^c	(50.1±7.8)% ^c	(46.6±3.0)% ^c
Modified 10%	(97.4±4.4)% ^a	(98.4±1.7)% ^a	(99.2±1.2)% ^a	(88.4±2.3)% ^b	(98.1±1.3)% ^a
Modified 15%	(50.0±16.7)% ^b	(87.5±11.3)% ^b	(91.0±6.7)% ^b	(83.2±5.3)% ^b	(75.7±10.5)% ^b

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

的细胞损伤^[26]。Unni等^[12]以酶解后大鼠睾丸组织的平均细胞存活率为依据,对低温保护剂的毒性进行评价,结果发现在15 min的保护剂加载时间内,细胞的存活率随保护剂浓度的升高而下降,其结果与本文毒性实验结果一致。经15% DMSO浸泡30 min后活性氧水平显著升高,说明高浓度保护剂浸泡会对睾丸组织带来较大的不可逆毒性损伤,应尽量减少睾丸组织在保护剂中的浸泡时间。

2.2 常用慢速冷冻与改进两步法冷冻的冻存结果

运用5%、10%、15% DMSO保护剂对睾丸组织分别按照常用慢速冷冻与改进两步法冷冻程序保存,冻后对睾丸组织进行HE染色观察组织形态,另外进行TUNEL染色观察管腔内生精细胞的凋亡情况(图3),管腔完整率及生精细胞凋亡阴性率统计结果见表1。

在常用慢速冷冻降温保存与改进两步法冷冻降温程序中，低浓度保护剂组的管腔完整率相对较高，结合图2的活性氧荧光结果分析可知，高浓度保护剂将会对睾丸组织造成较大毒性损伤，可能是造成管腔完整率降低的原因。Tunel结果显示，在常用慢速冷冻降温保存与改进两步法冷冻降温程序中，当DMSO的浓度为5%时，组织内细胞的凋亡率都较高，可能是低浓度保护剂阻冰作用的缺失使得细胞受到较大的冰晶损伤。当DMSO的浓度为10%时，两种方法冻后组织内生殖细胞的凋亡阴性率均显著提高，改进两步法带来的对比更加突出。当DMSO浓度为15%时，细胞凋亡阴性率都有所降低，但仍高于5% DMSO组。对比睾丸组织改进两步法冷冻及常用慢速冷冻法在5%、10%、15% DMSO保护剂溶液中的冻后效果，两种方法的最优保护剂浓度均为10% DMSO。这可能是由于10% DMSO组比5% DMSO组更能显著降低结晶量；而10% DMSO带来的毒性损伤与5% DMSO无显著性差异，并显著低于15% DMSO组。Pukazhenthii等^[27]在室温下将新生羊羔睾丸组织块浸泡于20% DMSO一段时间后放入程序降温盒转移到-80℃冰箱过夜，次日投入液氮，结果显示了75%左右的冻后总细胞活力。本研究改进两步法10% DMSO浓度时冻后细胞活力为精原细胞98.4%、精母细胞99.2%、精子细胞88.4%、支持细胞98.1%，证明了改进两步法的有效性。

改进两步法所得管腔完整率及细胞凋亡阴性率均高于常用慢速冷冻法，其原因可能包括以下几个方面。a. 改进两步法所用加载时间为10 min，缩短了浸泡时间。毒性损伤受保护剂浓度及接触时间共同影响^[28]，缩短了组织与保护剂接触时间可减小组织在加载过程中所受毒性损伤。b. 将第一阶段降温速率提高至1℃/min，减小了降温所需时间与细胞所受渗透损伤。Liu等^[29]指出细胞所受渗透损伤不仅与渗透压差相关，还受细胞体积变化经历时

间相关。Abrishami等^[30]将猪睾丸组织在22℃下于10% DMSO中浸泡10 min后，通过程序降温仪接连使用1℃/min、0.3℃/min、0.5℃/min、10℃/min的降温速率经近3 h降至-90℃，随后投入液氮，结果显示解冻后平均75%的细胞活力。而在相同的10% DMSO浓度下，本文的改进两步法冻后细胞活力为精原细胞98.4%、精母细胞99.2%、精子细胞88.4%、支持细胞98.1%，这一研究结果进一步证实了渗透损伤的减少是本文改进两步法提高存活率的关键。c. 改进两步法在第二阶段直接投入液氮，提高此阶段的降温速率，促进未冻溶液的非晶态固化从而减小冷冻中潜在的冰晶损伤。

2.3 置核对降低保护剂浓度的作用

采用低浓度保护剂（5% DMSO）对睾丸组织进行置核温度分别为-6℃、-8℃、-10℃的冻存，分别在不同温度置核后平衡10 min，然后直接投入液氮保存。冻后睾丸组织的HE及Tunel染色结果见图4，管腔完整率及生精细胞凋亡阴性率见表2。

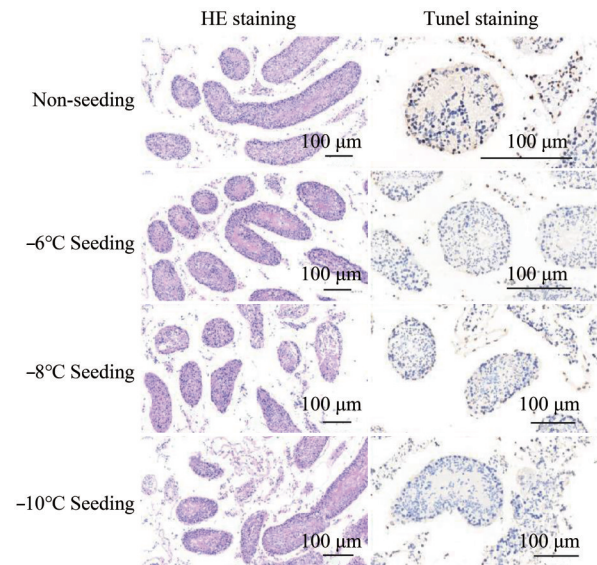


Fig. 4 HE and Tunel staining results of testicular tissue after ice seeding

Table 2 Lumen integrity rate and negative rate of germ cell apoptosis in testicular tissue after ice seeding

	Lumen integrity rate	Spermatogonial cells	Spermatoblast cells	Sperm cells	Sertoli cells
5% Non-seeding	(89.3±9.3)% ^{abc}	(35.3±3.9)% ^d	(38.0±5.9)% ^c	(50.1±12.3)% ^c	(46.7±3.0)% ^c
5% -6°C seeding	(94.4±4.9)% ^{ab}	(60.1±6.6)% ^c	(69.1±12.7)% ^b	(69.0±5.5)% ^b	(47.2±12.7)% ^c
5% -8°C seeding	(70.8±18.6)% ^{bc}	(58.4±10.1)% ^c	(70.2±6.2)% ^b	(82.2±8.3)% ^a	(69.4±2.4)% ^b
5% -10°C seeding	(66.1±19.3)% ^c	(82.9±8.4)% ^b	(93.2±5.0)% ^a	(92.1±2.5)% ^a	(88.9±12.7)% ^a
10% Non-seeding	(97.4±4.4)% ^a	(98.4±1.7)% ^a	(99.2±1.2)% ^a	(88.4±2.3)% ^a	(98.1±1.3)% ^a

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

由HE染色结果可知,采用5% DMSO作为保护剂,置核温度为 -10°C 时,部分管腔结构受到损伤,且组织内部结构出现损伤,因此冻后睾丸组织的管腔完整率(66.1%)低于 -6°C 及 -8°C 置核组。由Tunel染色可知,使用5% DMSO保护剂溶液进行 -10°C 置核操作后,各生殖细胞的冻后凋亡阴性率与改进两步法的10% DMSO溶液未置核相比无显著差异,说明置核操作可减小具有生物毒性的渗透保护剂的用量,并取得相似的保护效果。但本实验未完全替代渗透性保护剂,置核替代渗透性保护剂时仍需部分渗透性保护剂以减小细胞在胞外冰晶生长过程中所受渗透应激^[22],因此本研究中适当低浓度的5% DMSO可缓解组织在渗透平衡失水时受到的渗透损伤以提高冻存效果。

在3个置核温度下,置核后生精细胞的凋亡水平均显著低于未置核组,说明置核操作也可显著降低细胞凋亡,可能原因在于:经置核操作后冰晶在组织外形成并生长提高了组织外渗透压,细胞内溶液浓度增大,置核后直接投入液氮,使高浓度胞外未冻溶液及达到渗透平衡的胞内溶液在快速冷却中形成部分玻璃化,抑制冰晶的生成以减小组织所受冰晶损伤。Huang等^[22]通过焓和自由能的变化发现在零度以下的高温下($-10^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$)置核可以释放巨大的自由能,避免这些自由能在冷却期间储存

在样品中,并在复温期间释放后触发胞外重结晶和胞内冰。因此置核可能避免了睾丸组织复温过程中的重结晶现象,提高冻后效果。

分别在 -6°C 、 -8°C 、 -10°C 温度下用预冷镊子触碰坩锅边缘置核并维持10 min,运用低温显微镜观察3种置核温度所得冰晶形态(图5)。由图5可知, -6°C 置核时,初始较锋利的冰晶可能对组织造成较大机械损伤, -8°C 置核初始冰晶未出现锋利纹理,在 -10°C 置核,初始冰晶较前两组更为致密,置核时组织在溶液形成冰晶的过程中受到的机械损伤最小。不同温度置核后分别维持10 min观察冰晶生长情况,在 -6°C 下置核10 min后冰晶聚集成较大冰晶并形成沟壑。 -8°C 置核10 min后,部分冰晶聚集成块,形成体积较大冰晶,带来少量沟壑。而在 -10°C 置核10 min后未观察到冰晶明显变化,冰晶依旧较为均匀致密,未观察到明显沟壑。这可能是由于过冷度较大则形成的晶核小而多,形成密集的小冰晶,过冷度较小则形成的晶核大而少,形成大冰晶^[31]。同时,过冷度增大,溶液黏度增加,使质点移动困难,难以从溶液扩散到晶核表面,不利于晶体的成核或长大^[32]。冰晶再生长形成的沟壑可能对细胞造成挤压应力,对组织带来机械损伤。综合分析, -10°C 置核可减小组织所受机械损伤。

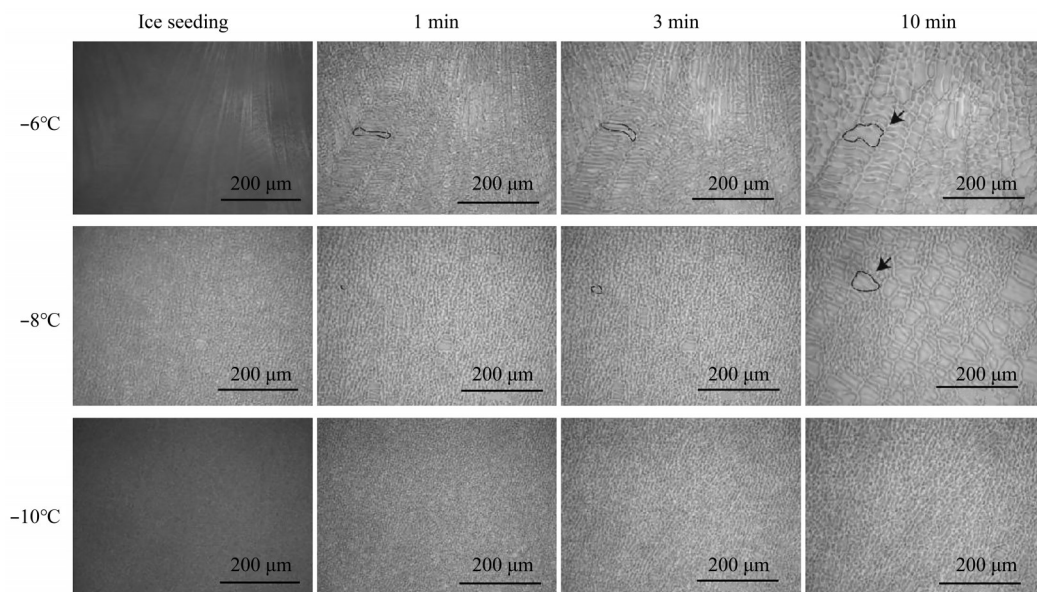


Fig. 5 Ice crystal morphology nucleated at different temperatures

本文的置核冻存方法区别于传统的慢速冷冻和玻璃化方法,它消除了常规慢速冷冻的限制,可在指定温度置核后直接放入液氮保存,通过提高降温速率促进未冻溶液的非晶态固化,既不需要传统用于慢速冷冻的专用冷冻容器(如程序降温盒)^[33],也避免了传统慢速冷冻所需的复杂繁琐冷冻程序^[17, 34]。3个温度置核后凋亡阴性率均高于未置核组,验证了置核操作对冰晶重结晶的抑制效果。在5% DMSO保护剂溶液进行-10℃置核操作后的冻存效果与改进两步法10% DMSO溶液未置核无显著差异,说明了置核对降低保护剂浓度的效果。Lauterboeck等^[35]分别用5% DMSO和10% DMSO作为保护剂,分别在-4℃、-10℃、-14℃对间充质干细胞进行手动置核,以膜完整性和再培养率为依据筛选最佳保护剂浓度和置核温度,也得到近似的结果。加载保护剂后将细胞从4℃以7.5℃/min冷却到所需的成核温度,置核后接着以7.5℃/min冷却至-30℃,然后以3℃/min冷却至-80℃,而后转至-150℃电冰箱储存。结果显示,浓度为5%的DMSO在-10℃置核时是最有益于间充质干细胞低温保存的。其中,5% DMSO在-10℃置核时间充质干细胞的膜完整性和再培养率都显著高于10% DMSO在-10℃置核组。

值得注意的是,组织冻存不同于细胞冻存,一般情况下组织中不同种类的细胞对应着不同的最优冻存程序。不过本研究两组实验选取的最优组中,不同种细胞(精原细胞、精母细胞、精子细胞、支持细胞)的存活率均相对其他组较好,不同种细胞间差异不显著,说明4种细胞对低温冻存的敏感性相近,因此对应的最优保存程序也近似。此外,睾丸组织自身的结构也对不同种类的细胞得到近似的保存效果有帮助。睾丸组织主要由结缔组织与许多生精小管组成,而每根生精小管由生精上皮与管腔构成,精原细胞、精母细胞、精子细胞、支持细胞等有序分布在数十微米的生精上皮管壁上^[36],降温与复温时4种细胞温度变化几乎同步,不会出现热应力释放导致的损伤。

3 结 论

冷冻保存睾丸组织用于后期移植是除精子冻存以外保存男性生育力的另一有效的选择。本文通过缩短保护剂加载时间、提高第一阶段的冷却速率、第二阶段直接投入液氮等方法对睾丸组织的常用慢速冷冻方法进行了优化,并在不同温度对睾丸组织

进行置核,得到如下结论:

a. 当使用10% DMSO对睾丸组织进行改进两步法降温冻存时,冻后组织内生殖细胞的凋亡阴性率均较高,其中精原细胞100%、精母细胞100%、精子细胞88.4%、支持细胞100%,显著高于常用慢速冷冻组,且与对照组均无显著性差异。

b. 相较于未置核组,低浓度保护剂5% DMSO组在-10℃置核时的冻存结果与较高浓度保护剂10% DMSO组无显著性差异,生殖细胞的凋亡阴性率为精原细胞82.9%、精子细胞92.1%、精母细胞93.2%及支持细胞88.9%,证明了置核能够降低所需保护剂的浓度。

本研究通过改进两步法和置核提高了小鼠睾丸组织冻后的质量,为临床上人睾丸组织冻存时保护剂浓度和冻存工艺的确定提供参考。

参 考 文 献

- [1] Schover LR, Rybicki LA, Martin BA, *et al.* Having children after cancer—a pilot survey of survivors' attitudes and experiences. *Cancer*, 1999, **86**(4): 697-709
- [2] Oosterhuis B E, Goodwin T, Kiernan M, *et al.* Concerns about infertility risks among pediatric oncology patients and their parents. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, **50**(1): 85-89
- [3] Palermo G, Joris H, Devroey P, *et al.* Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, **340**(8810): 17-18
- [4] Tournaye H, Dohle G R, Barratt C L R. Fertility preservation in men with cancer. *Lancet*, 2014, **384**(9950): 1295-1301
- [5] Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N, *et al.* Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril*, 2004, **81**(2): 342-348
- [6] Anderson RA, Mitchell R T, Kelsey T W, *et al.* Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, **3**(7): 556-567
- [7] Aslam I, Fishel S, Moore H, *et al.* Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. *Human Reprod*, 2000, **15**(10): 2154-2159
- [8] Hudson M M. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstet Gynecol*, 2010, **116**(5): 1171-1183
- [9] Thomson A B, Campbell A J, Irvine D S, *et al.* Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet*, 2002, **360**(9330): 361-367
- [10] Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol*, 2005, **82**(5): 381-388
- [11] Milazzo J P, Travers A, Bironneau A, *et al.* Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *J Androl*, 2010, **31**(6):

- 617-630
- [12] Unni S, Kasiviswanathan S, D'Souza S, *et al.* Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. *Fertil Steril*, 2012, **97**(1): 200-8.e1
- [13] Kvist K, Thorup J, Andersen C Y, *et al.* Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Human Reprod*, 2006, **21**(2): 484-491
- [14] Keros V, Hultenby K, Borgstrom B, *et al.* Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Human Reprod*, 2007, **22**(5): 1384-1395
- [15] Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, *et al.* Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Human Reprod*, 2005, **20**(6): 1676-1687
- [16] Travers A, Milazzo J P, Perdrix A, *et al.* Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology*, 2011, **76**(6): 981-990
- [17] Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, *et al.* Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and *in-vitro* microinsemination. *Human Reprod*, 2002, **17**(12): 3039-3045
- [18] Fahy G M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 1986, **23**(1): 1-13
- [19] 苗俊英, 张捷, 张尚立, 等. 二甲基亚砷诱导人肝癌细胞 BEL-7402 凋亡的研究. *山东大学学报(医学版)*, 2002(2): 103-105
Miao J Y, Zhang J, Zhang S L, *et al.* *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2002(2): 103-105
- [20] Broadwell R D, Salzman M, Kaplan R S. Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier. *Science*, 1982, **217**(4555): 164-166
- [21] Santos N C, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, *et al.* Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*, 2003, **65**(7): 1035-1041
- [22] Huang H S, Zhao G, Zhang Y T, *et al.* Predehydration and ice seeding in the presence of trehalose enable cell cryopreservation. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, **3**(8): 1758-1768
- [23] Maffei S, Hanenberg M, Pennarossa G, *et al.* Direct comparative analysis of conventional and directional freezing for the cryopreservation of whole ovaries. *Fertil Steril*, 2013, **100**(4): 1122-1131
- [24] Fiser P S, Fairfull R W. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 1989, **26**(1): 64-69
- [25] Gunasekaran K, Pandiyan N. *Male Infertility: a Clinical Approach*. New Delhi: Springer, 2016
- [26] Kakkar P, Singh B K. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol Cell Biochem*, 2007, **305**(1-2): 235-253
- [27] Pukazhenti B S, Nagashima J, Travis A J, *et al.* Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. *PLoS One*, 2015, **10**(4): e0123957
- [28] 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
- [29] 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
- [30] Abrishami M, Anzar M, Yang Y, *et al.* Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology*, 2010, **73**(1): 86-96
- [31] 刘威, 郭明伟, 郭治宇, 等. 胞内冰形成机理研究进展. *制冷学报*, 2018, **39**(3): 126-134
Liu W, Guo M W, Guo Z Y, *et al.* *Journal of Refrigeration*, 2018, **39**(3): 126-134
- [32] 华泽钊, 任禾盛. *低温生物医学技术*. 北京: 科学出版社, 1994: 80-81
Hua Z Z, Ren H S. *Cryogenic Biomedical Technology*. Beijing: Science Press, 1994: 80-81
- [33] Onofre J, Baert Y, Faes K, *et al.* Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Human Reprod Update*, 2016, **22**(6): 744-761
- [34] Yildiz C, Mullen B, Jarvi K, *et al.* Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology*, 2013, **67**(1): 70-75
- [35] Lauterboeck L, Hofmann N, Mueller T, *et al.* Active control of the nucleation temperature enhances freezing survival of multipotent mesenchymal stromal cells. *Cryobiology*, 2015, **71**(3): 384-390
- [36] 王庭槐. *生理学*. 第九版. 北京: 人民卫生出版社, 2018
Wang T H. *Physiology*. 9th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018

Study on Optimization of Slow Freezing Protocol of Mouse Testis*

TAN Jia, GUO Ying-Ying, ZHOU Xin-Li**

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

Abstract Objective Cryopreservation of testicular tissue for later transplantation is another effective way to maintain male fertility. **Methods** In this paper, the procedure of slow freezing of massive testicular tissue was optimized by shortening the loading time of cryoprotectant (CPA), increasing the freezing rate at the first stage, and directly plunging into liquid nitrogen at the second stage. The mouse testis was cryopreserved by modified two-step freezing. In addition, ice seeding procedure was applied at different temperatures in order to reduce CPA concentration required for cryopreservation of testicular tissue. **Results** The results showed that negative rate of apoptosis of germ cells in frozen tissues with modified two-step method was significantly higher than commonly used slow freezing method, and had no significant difference with control group. Among them, the negative rate of spermatogonial cells was 98.4%, that of spermatoblast cells was 99.2%, that of sperm cells were 88.4%, and that of sertoli cells was 98.1%. Compared with non-seeding group, seeding at -10°C can improve the survival rate of testicular tissue that frozen with 5% DMSO. The negative rate of apoptosis were 92.1% (spermatozoa), 93.2% (spermatocytes) and 88.9% (Sertoli), which are not significantly different from that of 10% DMSO group. This indicates ice seeding can reduce the CPA concentration and toxic damage. **Conclusion** Modified two-step freezing and ice seeding improve the quality of mouse testicular tissue after freezing, and provide a reference for freezing of human testis in clinical.

Key words testicular tissue, slow freezing, two-step freezing, ice seeding

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0350

* This work was supported by a grant from Clinical Research Plan of SHDC (SHDC2020CR3077B).

** Corresponding author.

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

Received: November 17, 2021 Accepted: February 21, 2022