



微流控法制备载卵母细胞水凝胶微球及其玻璃化保存*

张 慧¹⁾ 张宇琪¹⁾ 胡剑麟²⁾ 周新丽^{1)**}

¹⁾ 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;

²⁾ 上海交通大学医学院附属第一人民医院辅助生殖医学科, 上海 200080)

摘要 **目的** 通过微流控法制备载卵母细胞海藻酸钠微球, 在低浓度保护剂下实现卵母细胞玻璃化保存。**方法** 采用流动聚焦型微流控芯片, 通过调整芯片结构、海藻酸钠溶液浓度和流速比, 制备大小均匀、空包率低、低温耐受的载卵母细胞海藻酸钠水凝胶微球。在低浓度低温保护剂下将微球玻璃化保存, 复温后检测存活率, 采用细胞松弛素B和氯化锶孤雌激活卵母细胞, 与Cryotop玻璃化法对比卵母细胞存活率和卵裂率、囊胚率。**结果** 制备的海藻酸钠微球在冷冻复温前后的体积稳定且结构完整, 在将卵母细胞包封在海藻酸钠水凝胶中后, 空包率低, 存活率、卵裂率和囊胚率与新鲜组相比无显著差异。在低浓度低温保护剂10% DMSO+10%乙二醇(EG)+0.5 mol/L海藻糖中玻璃化冻存后卵母细胞的存活率达到92.48%, 卵裂率70.80%, 囊胚率20.42%, 与高浓度保护剂15% DMSO+15% EG+0.5 mol/L海藻糖中Cryotop玻璃化法相比无显著性差异。**结论** 本文设计制作了三通道内部交联芯片并用于卵母细胞玻璃化保存的微流控系统, 可生成大小均匀、空包率低、低温耐受的载卵母细胞海藻酸钠水凝胶微球, 在低浓度保护剂下实现玻璃化保存, 为卵母细胞玻璃化保存方法提供新思路。

关键词 微流控, 卵母细胞, 微囊化, 玻璃化保存, 低温保护剂

中图分类号 Q2, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0321

卵母细胞低温保存是辅助生殖领域的重要技术, 在癌症患者保存生育力、维持物种多样性和种群完整性等方面起着重要作用, 主要技术分为慢速冷冻和玻璃化冷冻^[1-2]。玻璃化冷冻技术是先对卵母细胞进行高浓度的低温保护剂加载, 然后以极高的冷却速率将液态快速过渡到玻璃态, 此阶段无冰晶产生^[3]。为实现有效的卵母细胞玻璃化, Kuwayama等^[4]开发Cryotop载体对人卵母细胞进行玻璃化冷冻。目前, 采用Cryotop法作为冷冻载体, 15%二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)+15%乙二醇(ethylene glycol, EG)+0.5 mol/L海藻糖作为低温保护剂玻璃化保存卵母细胞是临床上常用的低温保存技术。但是, 使用高浓度低温保护剂DMSO、EG会造成潜在危险, 使卵母细胞玻璃化保存后的发育能力减退^[5-6]。而且DMSO作为最常用于卵母细胞的低温保护剂, 已经发现影响小鼠卵母细胞和胚胎的表观遗传和基因表达^[7]。Zhang等^[8]设计了一种液滴喷射玻璃化系统用于玻璃化

保存纳升液滴中的卵母细胞, 这种纳升液滴技术能够在使用较低的低温保护剂(1.4 mol/L EG+1.1 mol/L DMSO+1 mol/L蔗糖)下, 以更高的冷冻复温速率玻璃化卵母细胞, 这种方法的局限性在于莱顿弗罗斯特薄膜的传热衰减和液滴与液氮直接接触导致的细胞污染。所以, 仍然需要研究新型卵母细胞玻璃化保存的方法。

海藻酸钠水凝胶具有毒性小、生物相容性好, 且交联方法简单易操作、交联过程较为温和等优点, 被用于封装细胞的低温保存研究^[9-11]。Yao等^[12]采用静电喷雾装置制备直径约为(2.184±0.061) mm的红细胞海藻酸钠水凝胶微囊, 使用0.7 mol/L海藻糖作为低温保护剂, 通过不锈钢网将微囊进行液氮冷冻, 最终使得红细胞的回收率显

* 上海市肿瘤能量治疗技术与器械协同创新中心资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-55271200, E-mail: zjulily@163.com

收稿日期: 2023-08-08, 接受日期: 2023-10-25

著提高,最高可达85%以上。海藻酸钠水凝胶的加入可以有效降低细胞冷冻保存所需的保护剂浓度,并能让冻后的细胞保持较高的活性,维持正常功能。初步推测水分子与水凝胶网络之间有强相互作用,如水分子与水凝胶网络之间的氢键,减少了自由水的比例,从而减少冰晶数量起到抑制冰晶生成的作用^[13]。到目前为止,海藻酸钠水凝胶用于卵母细胞的低温保存研究还未见报道。

当用于低温保存时,要求载细胞微球具有良好的生物相容性、均匀性、耐冻性。在低温保存过程中,较差的均匀度或较为脆弱的水凝胶外壳可能会对保护剂渗透载细胞水凝胶微球的过程产生影响,从而导致保护剂加载的效率降低。在投入液氮后,不均匀的水凝胶外壳在热应力的作用下,可能会在的薄弱部位形成裂纹,从而对细胞造成破坏,影响细胞的冻存效果。目前常用的水凝胶封装细胞方法包括手动包封、喷雾干燥法、挤压法、乳化法等,这些方法有的在操作中涉及使用高温高压,有的生成的微球大小难以控制,都不适用于卵母细胞的封装^[14-15]。微流控技术因其生成过程可控、且具有良好的生物相容性,被认为是制备微球的实用可行方法。微流控技术微囊化细胞的过程首先是让细胞悬浮液(分散相)在不相溶流体(连续相)中乳化^[16],再通过物理和化学方法使液滴凝胶化。该方法的优点是形成单分散的液滴,并精确控制液滴的大小和形状。微流控芯片封装细胞可以用不同的几何结构实现,包括T字型、同向流动型和流动聚焦型^[17]。Etter等^[18]使用流动聚焦型微流控装置结合海藻酸钠水凝胶制备出包裹间充质干细胞的水凝胶微球,微球的机械性能提供了模拟肌肉骨骼组织的环境,并可以通过设置和改变参数生成直径为10~1 000 μm 的微球。

本文采用流动聚焦型微流控芯片将卵母细胞包封于海藻酸钠水凝胶,然后在低浓度保护剂下实现卵母细胞玻璃化保存。首先,对微流控芯片的喉部尺寸与交联结构进行优化,确定芯片尺寸与结构,以及海藻酸钠浓度和通道内溶液流速。其次,采用海藻酸钠水凝胶包封卵母细胞并释放,验证微流控芯片的包封有效性以及对卵母细胞的安全性。最后,通过微流控系统包封载卵母细胞海藻酸钠水凝胶微球,以金属筛网作为载体,使用低浓度的低温保护剂对微球进行玻璃化保存,并与Cryotop法对比卵母细胞存活率和发育潜能。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMSO、EG、细胞松弛素B购自美国Sigma公司,海藻糖、海藻酸钠、无水氯化钙,司盘80、氯化锶购自国药集团化学试剂有限公司,组织培养液(tissue culture media 199, TCM199)、胎牛血清购自美国Gibco公司,孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, M2630)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG, M2530)、透明质酸酶(H-3506)、M2培养液(M250)、胚胎用矿物油(M2460)、KSOM培养液(M1450)购自江苏易核科学仪器有限公司。

1.2 小鼠卵母细胞采集

对7周龄的ICR系SPF级小鼠分别采用腹腔注射PMSG和HCG,注射量均为0.2 ml,注射时间相隔48 h,并在注射HCG 16 h收集卵母细胞。从小鼠输卵管壶腹部获取卵丘-卵母细胞复合体,将其放入50 μl 的1 g/L透明质酸酶液滴中酶解5 min,从而获得MII期卵母细胞。

1.3 微流控芯片的结构及其制作

微流控芯片主体由顶层、分布层、通道层和底层四部分组成。各层结构与顺序如图1a所示。顶层设置有各相溶液入口和出口,溶液从入口处泵入,进入分布层均匀分散,再在通道层内交汇形成液滴,最后再由出口处流出。选取聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)板为芯片材料,顶层与底层板厚度为0.5 mm,分布层与通道层厚度为0.3 mm。使用激光雕刻机(VLS2.30, UNIVERSAL, 美国)逐一加工芯片各层结构,并通过真空贴合机(TBK508, 深圳深旺达)键合。

1.4 微流控系统的搭建

图1b为生成微球的液滴微流控系统示意图,通过硅胶管将注射器与微流控芯片进行连接。通过注射泵(Pump 11 Pico Plus Elite, Harvard, 美国)将连续相矿物油与分散相海藻酸钠溶液或含卵母细胞的海藻酸钠溶液输送到微流控芯片中,并在芯片通道内部生成液滴,该生成过程可以通过显微镜(Nikon Eclipse E100, 尼康, 日本)和相机组合成图像观察区,实时监测观察。通道内部产生的液滴从芯片出口处通过硅胶管流入装有氯化钙溶液的收集皿中进行交联。该系统可通过调整各相溶液的流速,从而控制液滴生成的速度和粒径。

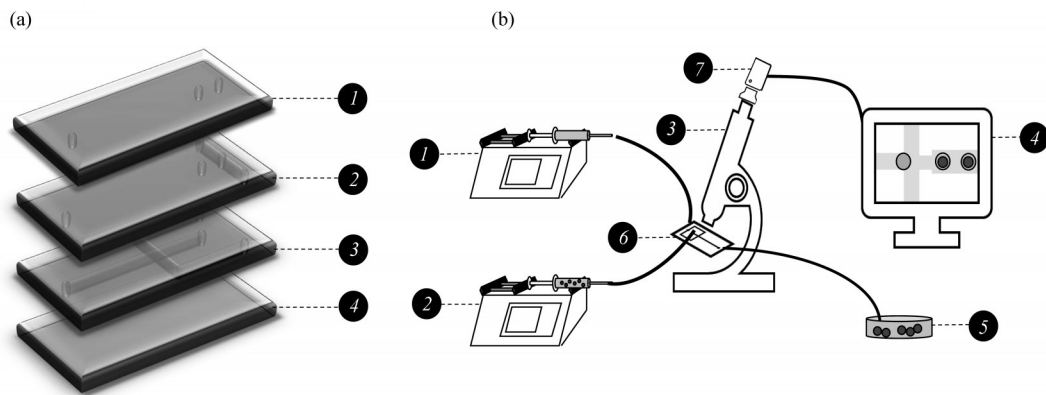


Fig. 1 Schematic illustration of the microfluidic system

(a) Structure of microfluidic chip. 1: Top layer, 2: distribution layer, 3: channel layer, 4: bottom layer; (b) Structure of the microfluidic system. 1, 2: syringe pumps, 3: microscope, 4: computer, 5: collection dish, 6: microfluidic chip, 7: camera.

1.5 微流控芯片喉部结构优化

为研究芯片喉部对液滴生成的影响，设计了3种不同类型和尺寸的喉部（图2）。喉部参数设计如下：(a) 无喉部；(b) 较宽结构喉部，宽150 μm；(c) 喉部长300 μm，宽120 μm。设置分散相1%海

藻酸钠溶液流速为2 μl/min，连续相矿物油的流速为20 μl/min。通过显微镜观察微流控芯片喉部的液滴生成情况。每组实验重复3次，每组约50枚微球。

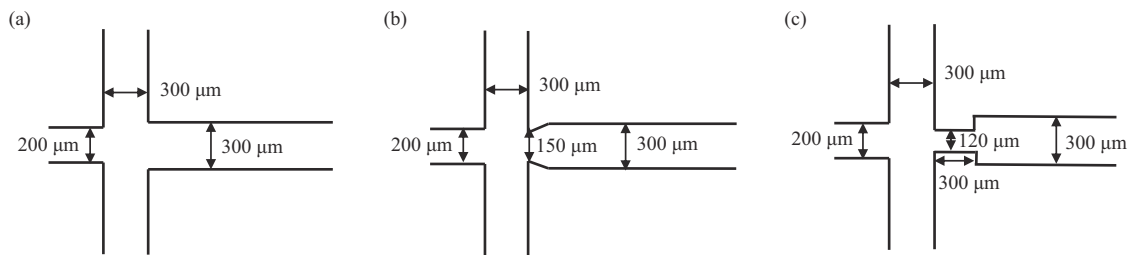


Fig. 2 Schematic diagram of microfluidic chip throat structure

(a) Without throat structure; (b) throat width 150 μm; (c) throat length 300 μm, width 120 μm.

1.6 微流控芯片交联结构的优化

海藻酸钠水凝胶通常采用直接滴入氯化钙溶液的化学交联法交联，为对比不同交联位置对海藻酸钠水凝胶微球生成效果的影响，本研究设计了3种结构的微流控芯片（图3）。其中（a）为外部交联芯片，海藻酸钠溶液在芯片喉部处生成液滴，随硅胶管流出到氯化钙溶液中交联。（b）为双通道内部交联芯片，分散相海藻酸钠溶液在喉部直接与油乳化剂混合，油乳化剂是含有17.5%（v/v）氯化钙和5%（v/v）司盘80的矿物油，其作用是在右方S型交联区内形成片上交联的海藻酸钠水凝胶微球。（c）为三通道内部交联芯片，分散相海藻酸钠溶液在第一个交汇口与矿物油处生成液滴，在第二个交汇口处与油乳化剂混合，于右方S型交联区内形成

片上交联的海藻酸钠水凝胶微球。分别收集3种微流控芯片生成的海藻酸钠水凝胶微球，倒置显微镜下观察微球形态并拍照记录，最后使用Image J中的测量工具对各组微球进行粒径测量。每组实验重复3次，每组约50枚微球。

1.7 微流控芯片溶液浓度和流速优化

使用三通道微流控芯片，设置连续相为海藻酸钠溶液，浓度分别为0.5%、1%、1.5%，溶液流速固定为2 μl/min。油相为添加0.1%司盘80的矿物油，流速分别设置为20 μl/min、30 μl/min、40 μl/min。油乳化剂相流速与油相相同。3组不同浓度海藻酸钠均进行3种不同流速比实验，共9组，分析微球生成效果和粒径尺寸，挑选最适生成参数。每组实验重复3次，每组约50枚微球。

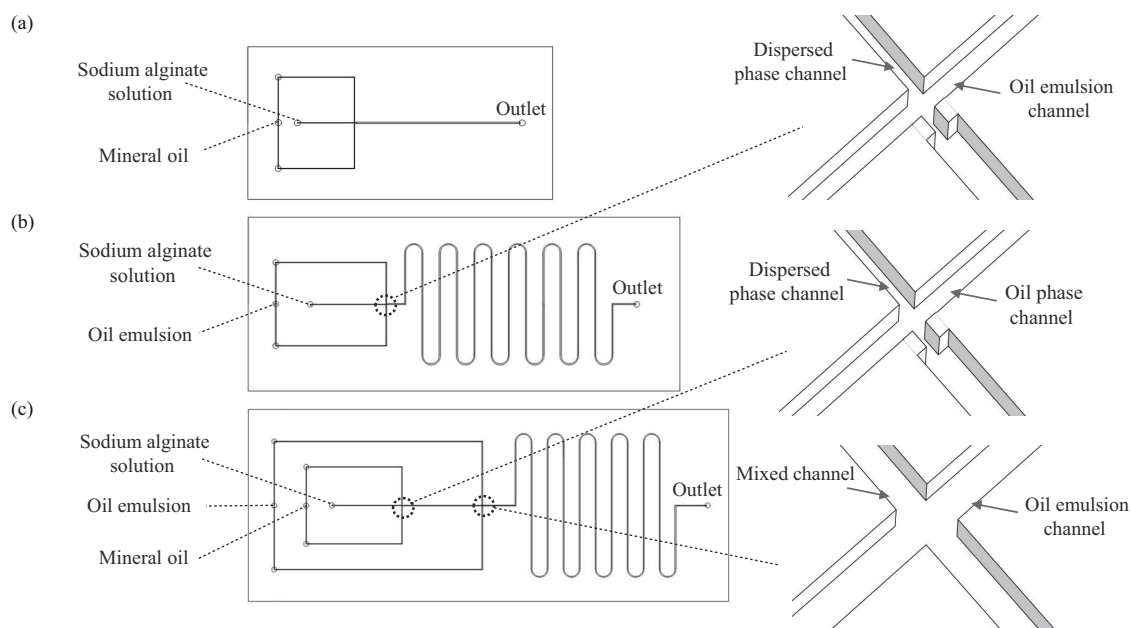


Fig. 3 Schematic diagram of microfluidic chip channel layer structure

(a) External cross-linking chip; (b) Dual-channel internal cross-linking chip; (c) Three-channel internal cross-linking chip.

1.8 海藻酸钠水凝胶微球低温耐受性测试

为探究海藻酸钠微球的低温性能,本研究运用低温显微镜(BCS196, Linkam Scientific, UK)观察微球在冷冻和复温过程中的变化。将含有15% DMSO (v/v) +15% EG (v/v) +0.5 mol/L 海藻糖和海藻酸钠微球的坩埚置于低温显微镜载物台中,设置降温程序为50°C/min,从20°C降温至-100°C,平衡1 min,再以100°C/min的升温至20°C,静置1 min。通过拍摄图像观察记录海藻酸钠微球在冷冻复温过程中的形态变化,并使用Image J软件测量微球在此过程中的直径变化,以此拟合微球在将复温过程中的体积变化趋势。每组实验重复3次,每组3枚微球。

1.9 载卵母细胞微球的制备及玻璃化冻存

使用口吸器将30~35颗卵母细胞吹至1%海藻酸钠溶液中,待卵母细胞充分分散后,用1 ml注射器吸取含卵母细胞的海藻酸钠溶液,5 ml注射器分别吸取矿物油与油乳化剂。开启注射泵开关,待各相溶液流速稳定后,可在芯片喉部即海藻酸钠溶液通道与矿物油通道的交汇处观察到均形成的液滴。液滴通过矿物油与油乳化剂的交汇处继续流向S型交联区,在此处交联成海藻酸钠微球,最后流入收集皿中,全程约5~8 min。均匀的载卵母细胞微球移至金属筛网(316 不锈钢, 200 目, 丝径0.05 mm)中并用磷酸缓冲盐溶液(phosphate

buffered saline, PBS)清洗3次后,浸入含10% DMSO (v/v) +10% EG (v/v) +0.5 mol/L 海藻糖的玻璃化溶液1(vitrification solution 1, VS1)中10 min。结束后将金属筛网投入液氮,1 h后取出进行复温。复温过程是迅速将金属筛网放入提前预热至37°C的含1 mol/L 海藻糖的复温溶液(rewarming solution, RS)中,1 min后放入含0.5 mol/L 海藻糖+0.075 mol/L 柠檬酸钠的稀释溶液1(dilution solution 1, DS1)中,3 min后将卵母细胞移至基础液中清洗3次,基础液是含有20%胎牛血清的TCM199溶液,最后移入M2培养液中。流程图如图4所示。

采用Cryotop玻璃化冻存卵母细胞作为对比。冷冻过程是将10颗卵母细胞放入7.5% EG (v/v) +7.5% DMSO (v/v)的平衡溶液中平衡15 min,再移至浓度为15% DMSO (v/v) +15% EG (v/v) +0.5 mol/L 海藻糖的VS2中浸润1 min。随后迅速将2~3颗卵母细胞加载至Cryotop载杆上,直接浸入液氮。冷冻1 h后,将卵母细胞放入提取预热至37°C的1 mol/L 海藻糖的RS中1 min,再转移至含有0.5 mol/L 海藻糖的DS2中稀释5 min,最终在基础液中清洗3次后移至M2培养液中。各实验组最终收集的卵母细胞均在培养箱中恢复1 h,统计存活率,评估卵母细胞后续发育能力。所有实验均重复3次。

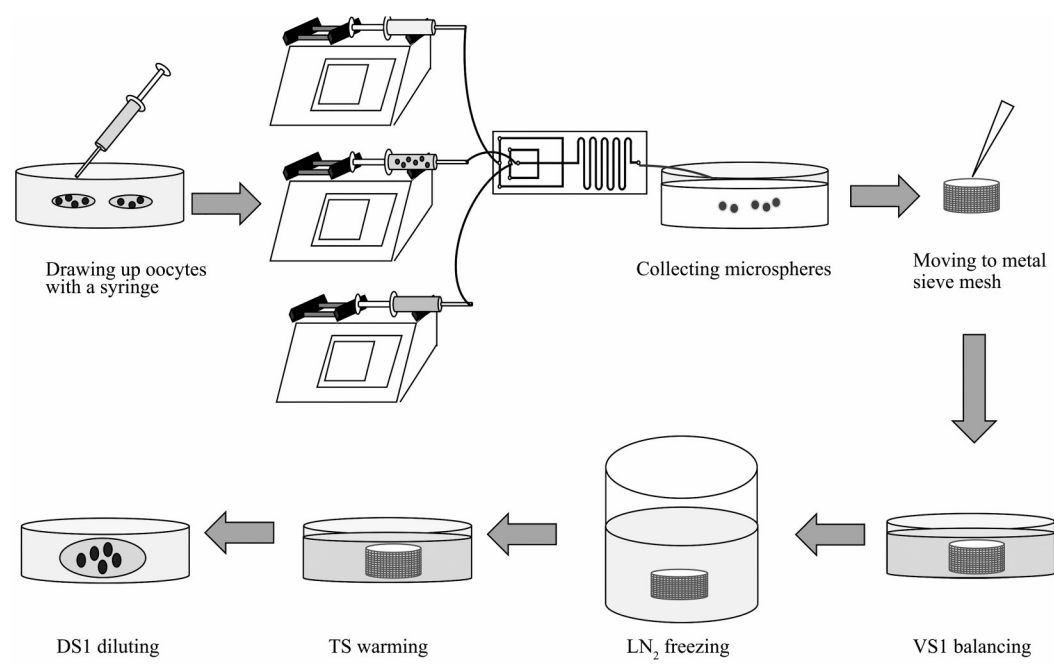


Fig. 4 Schematic illustration of the vitrification process for microfluidic encapsulated oocytes

1.10 卵母细胞冻存的评价

卵母细胞存活判断的标准为：a. 透明带完整且卵周间隙均匀，无消失或明显增大现象；b. 质膜完整，胞质无皱缩、变暗或是松散不均匀现象；c. 卵母细胞和透明带无明显变形。图5中箭头所指的卵母细胞已经死亡，其余卵母细胞是活的。

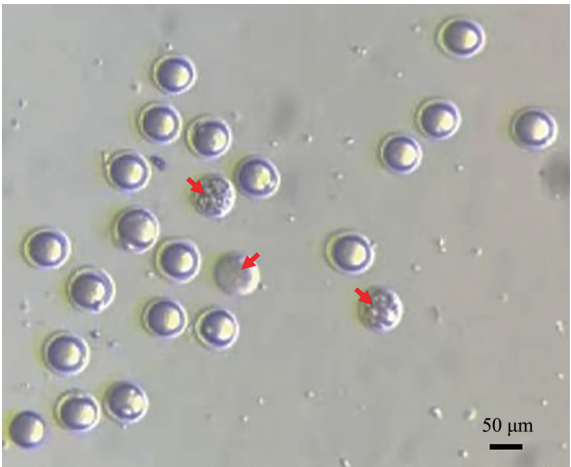


Fig. 5 Pictures of dead and live oocytes
Oocytes indicated by arrows are dead.

卵母细胞的后续发育能力通过体外孤雌激活方法评估。先在培养皿中制作两个 50 μl 的 KSOM 液

滴，沿培养皿边缘加入 2 ml 胚胎用矿物油封层，放入培养箱中平衡过夜。再取新培养皿，制作 50 μl 激活液液滴，胚胎用矿物油覆盖后放入培养箱中平衡 3~4 h。激活溶液中细胞松弛素 B 浓度为 5 mg/L，氯化铯浓度为 10 mg/L。待平衡好后将卵母细胞移入激活液液滴中，再放进培养箱中激活培养 4 h。4 h 后，将卵母细胞取出，并在 M2 培养液中洗涤 3 次。清洗后的卵母细胞置于 KSOM 液滴中放入培养箱继续培养。6 h 后观察卵母细胞激活情况，以极体排出为激活成果标志。此后每 24 h 观察一次卵母细胞情况。在 48 h 后观察卵母细胞卵裂情况，挑选卵裂细胞换液继续培养。96 h 后观察细胞发育情况，并计算囊胚率。存活率、卵裂率、囊胚率的计算方法如下。

存活率=存活数/卵母细胞总数×100%

卵裂率=卵裂数/存活数×100%

囊胚率=囊胚数/卵裂数×100%

1.11 数据分析

本研究使用 SPSS 2019 中的单因素 ANOVA 检验对数据进行处理。绘图与数据对比分析均使用 Origin 2021 和 Excel。数据结果以“均值±标准差”表示，采用 Tukey 新复极差法确定是否有差异， $P<0.05$ 作为差异显著评判标准。

2 结果与讨论

2.1 微流控芯片喉部结构对液滴生成的影响

3种微流控芯片喉部结构生成液滴情况如图6所示。无喉部结构的芯片内部通道内液滴难以形成,连续相海藻酸钠溶液呈液体柱与分散相矿物油

一起在通道内流动,是由于两相交汇处的剪切力不足以切割分散相溶液。当喉部宽度缩小至150 μm ,分散相溶液持续拖尾,且液滴粒径大小不一,通道内仍无法生成稳定的液滴形状。因卵母细胞的尺寸较大,喉部宽度至少为120 μm 。在喉部长度为300 μm ,宽度为120 μm 时,通道内形成的液滴均匀且稳定。

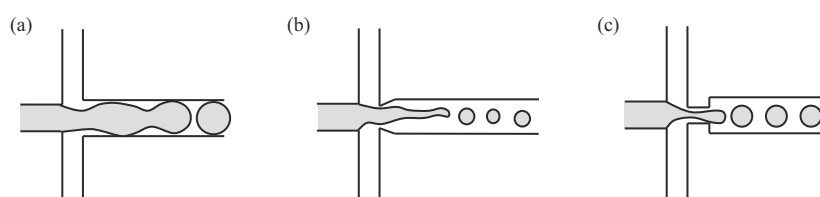


Fig. 6 Schematic diagram of droplet generation in the throat structure

(a) Without throat structure; (b) throat width 150 μm ; (c) throat length 300 μm , width 120 μm .

2.2 微流控芯片交联结构对微球粒径的影响

分散相海藻酸钠溶液的流速为2 $\mu\text{L}/\text{min}$,油相和油乳化剂的流速都为20 $\mu\text{L}/\text{min}$,3种芯片生成微球的粒径正态分布情况如图7所示。由图可知,不同的交联方式和芯片结构会对微球的粒径大小及均匀性有影响。外部交联芯片生成的海藻酸钠水凝胶微球的粒径分布范围广,均匀性差,平均粒径

(average diameter, D_{avg})为208.29 μm ,变异系数(coefficient of variation, CV)高达29.73%。双通道和三通道内部交联芯片生成的微球粒径均匀,平均粒径分别为263.74 μm 和262.76 μm ,变异系数分别为5.84%、2.88%。由此表明内部交联芯片有利于维持微球粒径的均匀性。

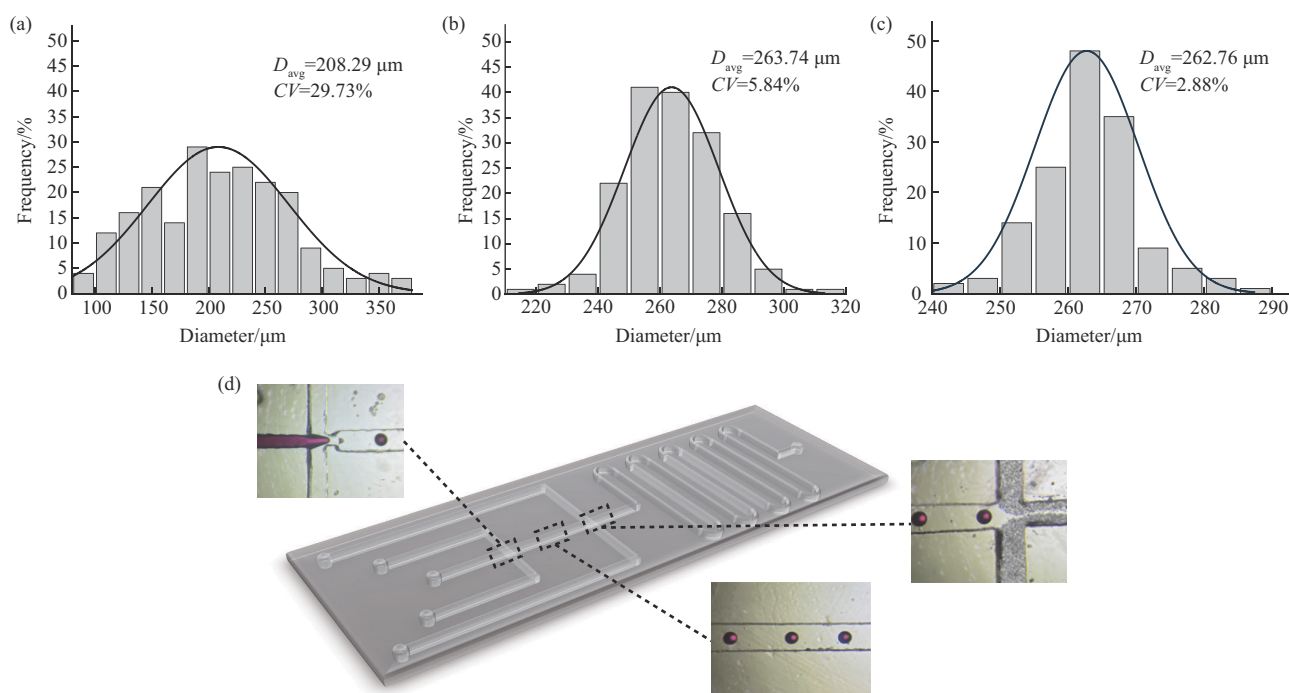


Fig. 7 Diameter distribution of microspheres and microspheres in three-channel internal crosslinking chips

(a-c) Microspheres diameter distributions of the external crosslinking chip (a), the two-channel internal cross-linking chip (b), and the three-channel internal cross-linking chip (c); (d) stable generation of microspheres by three-channel internal crosslinking chip.

分析造成微球平均粒径和变异系数差异的原因, 外部交联芯片使海藻酸钠溶液在芯片喉部产生液滴, 通过出口处流入氯化钙溶液中再交联, 液滴极易在硅胶管出口处发生碰撞, 造成微球黏连, 从而导致较大的粒径和形状差异。双通道内部交联芯片虽然可以使液滴在芯片内部交联成为微球, 提高微球粒径的均匀性, 但是由于海藻酸钠溶液与油乳化剂交汇的瞬间会发生交联反应, 在溶液泵送不稳定的情况下, 两股溶液极易在喉部发生堵塞, 影响微球持续稳定的形成。三通道内部交联芯片既可以使微球高度分散, 又可以避免交联反应造成的通道堵塞, 可稳定持续地产生海藻酸钠水凝胶微球, 整体微球变异系数仅为 2.88%。海藻酸钠水凝胶微球在三通道内部交联芯片中的生成情况如图 7d。

2.3 微流控芯片溶液浓度和流速对微球尺寸的影响

各通道溶液流速比与不同浓度海藻酸钠溶液产生的微球粒径及变异系数如表 1 所示。流速比为

10 时, 0.5% 海藻酸钠溶液生成的微球粒径最大, 平均粒径为 288.15 μm 。随着海藻酸钠溶液浓度的增大, 微球平均粒径逐渐减小, 1.5% 海藻酸钠微球的平均粒径仅为 192.63 μm 。海藻酸钠浓度越高黏性越大, 生成微球的粒径则越小。这是由于较低分散相溶液黏度会减少两相溶液交汇处液滴剪切过程中连续相的供给, 从而加速芯片喉部液滴的形成。对比流速比为 10 时的各组变异系数, 发现不同浓度组别之间的变异系数有较大差异, 1% 海藻酸钠组在流速比 10 时的变异系数最低, 仅为 2.88%, 而 0.5% 组和 1.5% 组的变异系数为 5.74% 和 7.12%。这是因为 0.5% 低浓度的海藻酸钠在通道内部形成单分散液滴, 但形成的液滴尺寸可能会超过微通道高度, 造成通道内部堵塞, 影响微球的稳定生成。而 1.5% 的海藻酸钠黏度过大, 连续相的剪切力不足以使海藻酸钠溶液在交汇处以球形液滴的形式断裂, 从而出现拖尾现象, 造成微球生成不均, 从而导致变异系数升高。

Table 1 Average diameter and coefficient variation of microspheres at different velocity ratio and concentrations

Group	Velocity ratio 10		Velocity ratio 15		Velocity ratio 20	
	$D_{\text{avg}}/\mu\text{m}$	CV/%	$D_{\text{avg}}/\mu\text{m}$	CV/%	$D_{\text{avg}}/\mu\text{m}$	CV/%
0.5%	291.15 ^a	5.74	262.71 ^b	8.92	201.68 ^c	9.61
1.0%	262.76 ^b	2.88	193.63 ^c	3.84	148.26 ^d	4.46
1.5%	192.63 ^c	7.12	156.63 ^d	11.45	105.45 ^e	13.23

Values with different superscripts (a-e) in all groups are significantly different ($P<0.05$).

海藻酸钠溶液组成的分散相具有稳定流速时, 在一定流速比范围内可以稳定的产生单分散液滴, 而随着分散相流速的增加, 液滴形成的稳定性降低, 各组微球的变异系数都出现上升趋势, 如 1% 海藻酸钠组在流速比为 10 时, 微球平均粒径为 262.76 μm , 变异系数 2.88%, 流速比增大到 20 时, 微球粒径减小为 156.63 μm , 但变异系数上升到 4.46%。流速比升高可能会造成泵送的溶液在通道内部流速不稳定的情况, 从而造成变异系数的升高。总体而言, 1% 海藻酸钠组在 3 种流速比下均可稳定产生均匀性较高的微球, 并且可以通过控制连续相的流速有效控制微球的尺寸。

2.4 海藻酸钠微球的低温性能评价

海藻酸钠水凝胶微球在 20℃ 的初始体积记为 V_0 , 其他各时间节点对应的微球体积记为 V , 用公式 V/V_0 分别计算微球的归一化体积。微球在外周存在 VS2 的冷冻和复温过程中, 各时间节点的归一化体积比如图 8 所示。海藻酸钠微球在整体降复温

过程中的体积变化较小, 最大变化仅为 5.1%, 微球体积的变化无明显规律, 说明冷冻复温对海藻酸钠水凝胶微球的体积并无影响。复温过程中 -60℃ 至 -20℃ 的温度区间内发生重结晶现象, 保护剂溶

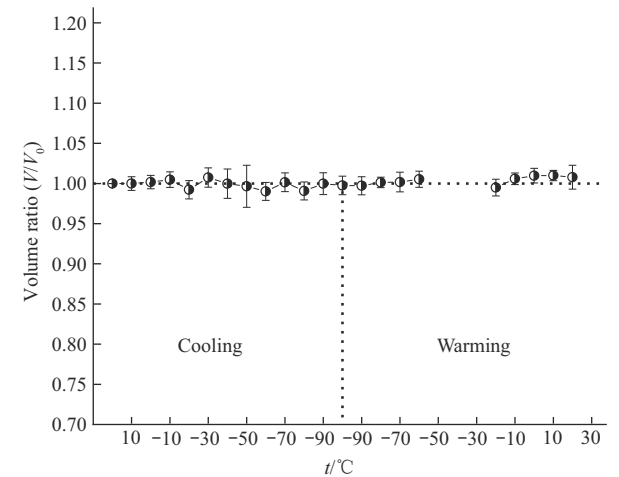


Fig. 8 Normalized volume of microspheres during cooling and warming

液中冰晶的产生影响观察视野，所以此段未统计微球体积变化。

海藻酸钠水凝胶微球在冷冻复温过程中的低温显微图像如图9所示。从低温显微图中可以观察到海藻酸钠水凝胶微球在冷冻复温全过程中并未出现剧烈的膨胀或皱缩现象，整体维持着较好的球形结

构。微球在冷冻复温后与冻前的微球相比，二者无明显差异，冻后的球体边缘平滑，无破损和皱缩。说明冷冻复温过程中，三通道内部交联芯片制备的海藻酸钠水凝胶微球在周围添加保护剂溶液的情况下，微球的体积稳定且形态结构完整，可进一步用于卵母细胞的包封和冷冻保存。

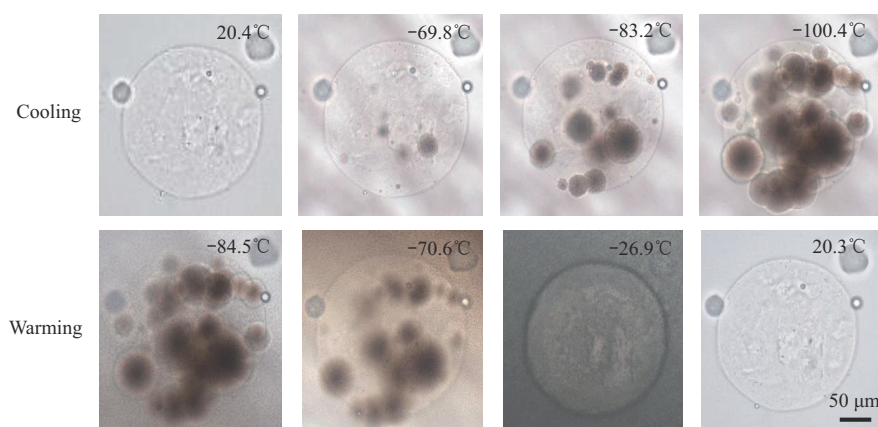


Fig. 9 Images of microspheres during the cooling and warming

2.5 微流控包封卵母细胞的效果评价

区别于其他细胞，卵母细胞的总体数量少且个体体积大，在整体的玻璃化实验操作中应尽量避免卵母细胞的丢失。在3种不同流速比下制备载卵母细胞海藻酸钠水凝胶微球，收集微球的空包率以及卵母细胞丢失率如下表2所示。流速比为20时，矿物油和油乳化剂的流速过快，海藻酸钠微球的产生量也随之增加，由于卵母细胞数量有限，从PBS溶液中收集的微球空包率高达86.94%。高流速比情况下，卵母细胞在芯片喉部和通道内的移动速度较快，包封效果不佳，同时会出现较高的卵母细胞丢失率（58.11%）。在相同的泵送时间内，流速比为15和10时，随着流速比的降低，微球的空包率和卵母细胞丢失率随之降低。其中，流速比为10的262 μm组的细胞丢失率最低为11.09%。

Table 2 Empty rate of sodium alginate hydrogel microspheres and loss rate of oocytes at different velocity ratio

Velocity ratio	Diameter/μm	Empty rate of microspheres/%	Loss rate of oocytes/%
20	156±6.56 ^c	86.94±4.21 ^a	58.11±5.84 ^a
15	193±7.61 ^b	64.61±3.58 ^b	36.56±4.46 ^b
10	262±7.57 ^a	32.28±1.56 ^c	11.09±4.33 ^c

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

1%海藻酸钠与卵母细胞混合溶液在流速比为10的三通道外部交联微流控芯片中生成的载卵母细胞微球如图10a所示。从图中可以看出单颗卵母细胞位于微球的中心位置，整体状态良好。包封释放后的卵母细胞存活和发育情况以及新鲜卵母细胞的对比如图10b所示。卵母细胞存活率（96.99%）、卵裂率（88.71%）和囊胚率（26.29%），新鲜组卵母细胞存活率（100%）、卵裂率（90.74%）和囊胚率（27.12%），两者无显著性差异。实验结果说明，使用微流控芯片包封卵母细胞，再将卵母细胞释放，对卵母细胞的存活率和后续发育能力无显著影响。

2.6 微流控包封卵母细胞的玻璃化冻存效果

Cryotop 玻璃化法保存卵母细胞需要多步平衡且使用高浓度低温保护剂（15% DMSO+15% EG+0.5 mol/L 海藻糖），冻后存活率为91.93%。Sudiman等^[19]用不同的冷冻保护剂玻璃化小鼠卵母细胞，发现用DMSO+EG处理的小鼠卵母细胞的存活率和卵裂率（87.8%，51.7%）优于用丙二醇+EG（32.7%，16.7%），但卵裂率会明显低于对照组（91.7%）。微流控包封卵母细胞的方法只需平衡一次，使用低浓度的保护剂（10% DMSO+10% EG+0.5 mol/L 海藻糖），存活率达到92.48%。对比后续卵裂率与囊胚率情况，微流控包封卵母细胞的

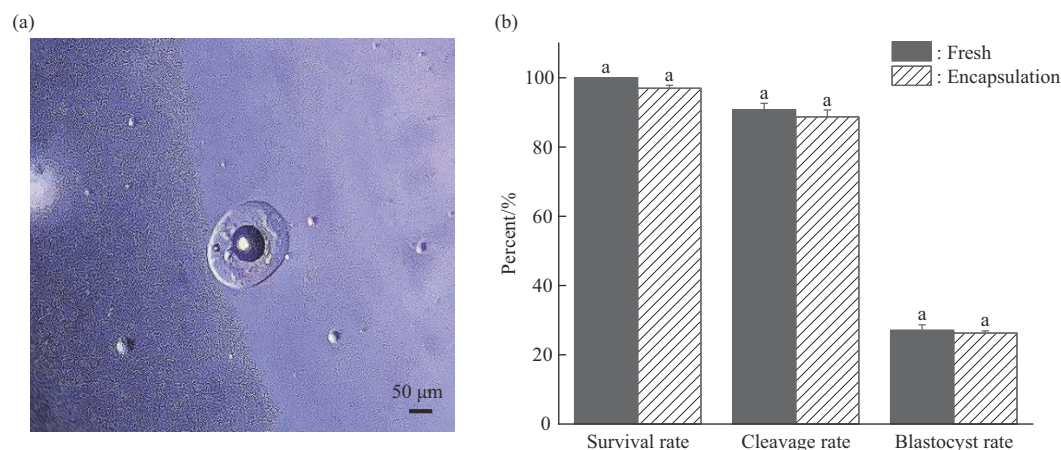


Fig. 10 The outcome of microfluidic oocyte encapsulation

(a) Picture of oocyte encapsulated in sodium alginate hydrogel. (b) Survival and *in vitro* developmental capacity of sodium alginate hydrogel encapsulated oocytes. Values with the same letter (a) in the same group are not significantly different ($P > 0.05$).

卵裂率 (70.80%) 和囊胚率 (20.42%) 略高 Cryotop 组的卵裂率 (68.25%) 和囊胚率 (20.01%), 两者之间并无显著性差异 (图 11)。

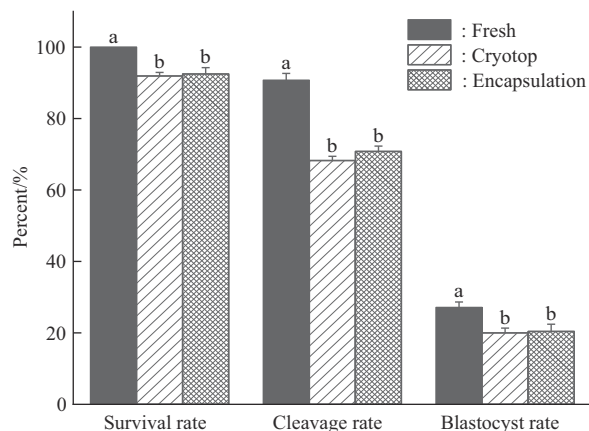


Fig. 11 Survival and *in vitro* developmental capacity of vitrified oocytes by different methods

Values with different letters (a, b) in the same group are significantly different ($P < 0.05$).

Cryotop 法的保护剂需要多步平衡以降低保护剂对卵母细胞造成的渗透损伤, 且保护剂浓度高, 加载时间长达 16 min。相比于 Cryotop 法, 首先, 微流控包封卵母细胞降低了保护剂浓度, 且加载保护剂时可以一步加载, 加载时长 10 min, 有效简化了保护剂加载的步骤和时长, 从而减少高浓度保护剂对卵母细胞的毒性及基因表达的影响, 同时不影

响卵母细胞的后续发育能力。其次, 海藻酸钠水凝胶的包封可以避免卵母细胞直接与保护剂接触, 保护剂需透过凝胶外壳缓渗至内部, 一定程度上降低了卵母细胞的渗透损伤。而且在安全性方面, Cryotop 法中卵母细胞移至载杆上浸入液氮冷冻的过程中, 细胞需直接接触液氮, 而微流控包封法则使卵母细胞被包裹在海藻酸钠水凝胶中, 放入金属筛网载体再投入液氮冻存的实验过程中并不直接与液氮接触, 降低了交叉污染的风险。并且因为海藻酸钠水凝胶的包裹, 微流控包封的卵母细胞在玻璃化过程的降复温速率低于 Cryotop 法的速率 (10^5 K/min), 所以在较低的降复温速率下, 实现了保护剂浓度的降低是由于海藻酸钠水凝胶的封装。

3 结 论

本文针对卵母细胞这种数量少且体积大的特殊细胞, 设计制作了三通道内部交联微流控芯片, 使用芯片制备载卵母细胞海藻酸钠水凝胶微球, 并对微球进行冷冻保存实验, 主要得出以下结论:

a. 芯片喉部结构对液滴生成有较大影响, 喉部长度为 300 μm, 宽度为 120 μm 时, 通道内形成的液滴均匀且稳定。三通道内部交联微流控芯片可稳定生成具有高分散性和均匀性的载卵母细胞海藻酸钠微球。

b. 选择 1% 海藻酸钠, 流速设置为 2 μl/min 时, 微流控芯片能稳定且均匀地生成微球, 而且微球具有耐低温性。在流速比为 10、15、20 的情况下,

微球平均粒径分别为 262.71 μm 、193.63 μm 、156.63 μm 。流速比为 10 时,空包率 (32.28%) 和细胞丢失率 (11.09%) 最低。包封释放后的卵母细胞存活率 (96.99%)、卵裂率 (88.71%) 和囊胚率 (26.29%) 与新鲜组无显著性差异。

c. 微流控生成的载卵母细胞海藻酸钠微球在低浓度保护剂 10% DMSO+10% EG+0.5 mol/L 海藻糖中玻璃化保存的存活率和发育率,与 Cryotop 法在高浓度保护剂 15% DMSO+15% EG+0.5 mol/L 海藻糖中玻璃化保存的结果没有显著性差异,说明海藻酸钠水凝胶的封装可以降低卵母细胞玻璃化所需的保护剂浓度。

本文设计的微流控系统成功应用于卵母细胞玻璃化保存,生成的载卵母细胞海藻酸钠微球大小均匀,具有高分散性、空包率低、低温耐受的优点,在低浓度保护剂玻璃化保存后达到与高浓度保护剂 Cryotop 法玻璃化卵母细胞的冻存效果,显著降低了保护剂浓度,且缩短保护剂加载时间。该方法是卵母细胞玻璃化保存的一种新方法,是提高卵母细胞玻璃化保存效果的新尝试。

参 考 文 献

- [1] Borini A, Coticchio G. Preservation of Human Oocytes: From Cryobiology Science to Clinical Applications. London: Informa Healthcare, 2010
- [2] Chang C C, Shapiro D B, Nagy Z P. The effects of vitrification on oocyte quality. Biol Reprod, 2022, **106**(2): 316-327
- [3] Vajta G, Nagy Z P, Cobo A, *et al.* Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. Reprod Biomed Online, 2009, **19**(3): 1-7
- [4] Kuwayama M, Vajta G, Kato O, *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online, 2005, **11**(3): 300-308
- [5] Hu W, Marchesi D, Qiao J, *et al.* Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. Fertil Steril, 2012, **98**(3): 752-760
- [6] Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, *et al.* Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food Chem Toxicol, 2010, **48**(7): 1905-1912
- [7] Wiltshire A, Schaal R, Wang F, *et al.* Vitrification with dimethyl sulfoxide induces transcriptomic alteration of gene and transposable element expression in immature human oocytes. Genes (Basel), 2023, **14**(6): 1232
- [8] Zhang X, Khimji I, Shao L, *et al.* Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. Nanomedicine, 2012, **7**(4): 553-564
- [9] Huang H, Choi J K, Rao W, *et al.* Alginate hydrogel microencapsulation inhibits devitrification and enables large-volume low-CPA cell vitrification. Adv Funct Mater, 2015, **25**(44): 6939-6850
- [10] 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
- [11] Sevenler D, Bean H, Toner M, *et al.* Slow-delivery and distributed exchange of cryoprotective agents with hydrogel beads. Cryobiology, 2021, **103**: 150-152
- [12] Yao J, Shen L, Chen Z, *et al.* Hydrogel microencapsulation enhances cryopreservation of red blood cells with trehalose. ACS Biomater Sci Eng, 2022, **8**(5): 2066-2075
- [13] Chang T, Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. Adv Sci (Weinh), 2021, **8**(6): 2002425
- [14] Naqvi S M, Vedicherla S, Gansau J, *et al.* Living cell factories-electrosprayed microcapsules and microcarriers for minimally invasive delivery. Adv Mater, 2016, **28**(27): 5662-5671
- [15] Chen Z, Wang L, Stegemann J P. Phase-separated chitosan-fibrin microbeads for cell delivery. J Microencapsul, 2011, **28**(5): 344-352
- [16] Choi C H, Wang H, Lee H, *et al.* One-step generation of cell-laden microgels using double emulsion drops with a sacrificial ultra-thin oil shell. Lab Chip, 2016, **16**(9): 1549-1555
- [17] Velasco D, Tumarkin E, Kumacheva E. Microfluidic encapsulation of cells in polymer microgels. Small, 2012, **8**(11): 1633-1642
- [18] Etter J N, Karasinski M, Ware J, *et al.* Dual-crosslinked homogeneous alginate microspheres for mesenchymal stem cell encapsulation. J Mater Sci Mater Med, 2018, **29**(9): 143
- [19] Sudiman J, Lee A, Ong K L, *et al.* Tolerance of lamb and mouse oocytes to cryoprotectants during vitrification. Zygote, 2019, **27**(1): 36-45

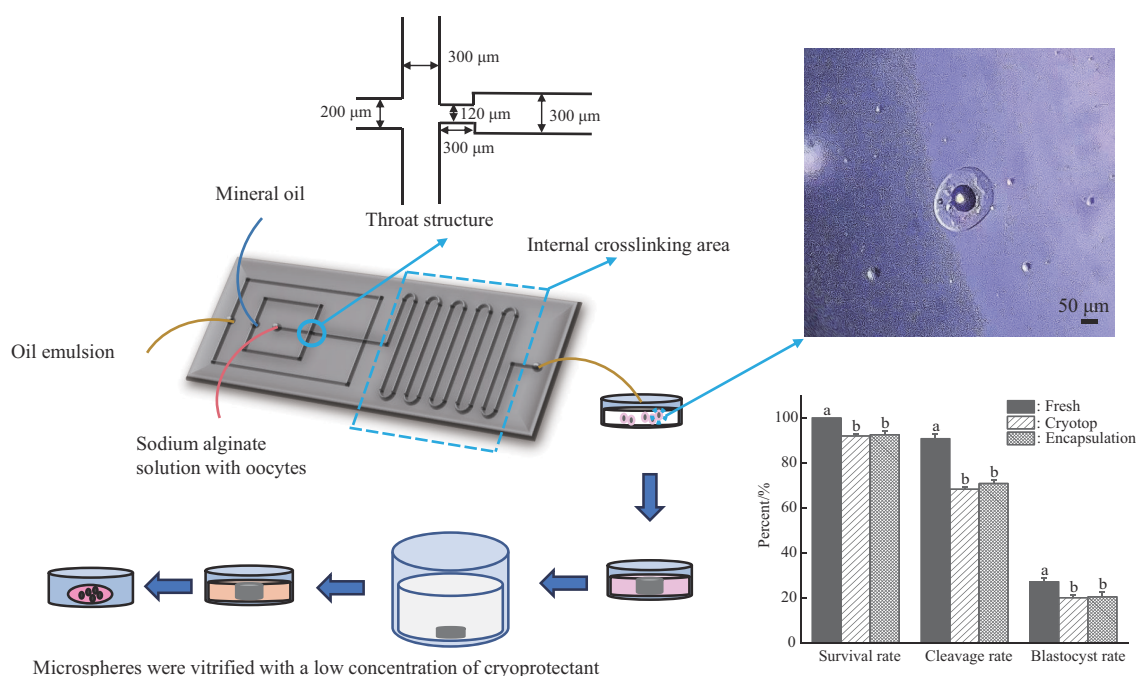
Vitrification Preservation of Oocyte Hydrogel Microspheres Prepared by Microfluidics*

ZHANG Hui¹⁾, ZHANG Yu-Qi¹⁾, HU Jian-Lin²⁾, ZHOU Xin-Li^{1)**}

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

²⁾Department of Reproductive Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China)

Graphical abstract



Abstract Objective This study aimed to develop a novel method for encapsulating oocytes in sodium alginate hydrogel using microfluidics, then to vitrify these encapsulated oocytes in a single-step process with low concentrations of cryoprotectants. **Methods** We utilized a flow-focusing microfluidic chip to generate sodium alginate hydrogel microspheres. The influence of various parameters, including throat structure, cross-linking method, sodium alginate concentrations, and flow rate ratios on the stability diameter, and coefficient of variation of microspheres were examined. To further investigate the cold-resistance of these microspheres, we used cryomicroscopy to observe changes in volume and morphology of microspheres during cooling and warming processes. We used microfluidic chip to encapsulate oocytes in sodium alginate hydrogel microspheres, the empty

* This work was supported by a grant from Shanghai Co-innovation Center for Energy Therapy of Tumors.

** Corresponding author.

Tel: 86-21-55271200, E-mail: zjulily@163.com

Received: August 8, 2023 Accepted: October 25, 2023

rate of microspheres and loss rate of oocytes were determined. After releasing from microspheres and parthenogenetic activation with cytochalasin B and strontium chloride, the survival, cleavage and blastocyst rates were evaluated during *in vitro* maturation. Finally, oocytes encapsulated in sodium alginate microspheres were vitrified with low concentrations of cryoprotectants. We compared the survival and development capability of the oocytes with the Cryotop method. **Results** When the throat of the microfluidic chip measures 300 μm in length and 120 μm in width, microspheres can be uniformly formed at the throat of the chip. Sodium alginate generates microspheres with a wide size distribution when cross-linking outside the chip, while internal cross-linking within the chip results in more uniform microspheres. The stability of microsphere formation is significantly improved with the use of a three-channel internal cross-linking chip. At a flow rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ and with 1% sodium alginate, the microfluidic chip can consistently and uniformly produce microspheres. Under flow rate ratios of 10, 15, and 20, the average microsphere diameters are 262.71 μm , 193.63 μm , and 156.63 μm , respectively. The sodium alginate hydrogel microspheres maintained their volume and structural integrity during the cooling and warming processes. Using a three-channel internal cross-linking microfluidic chip to encapsulate oocytes, at a flow rate ratio of 10, the empty rate is 32.28%, and the cell loss rate is 11.09%. After encapsulation and subsequent release, the oocyte survival rate (96.99%), cleavage rate (88.71%), and blastocyst formation rate (26.29%) showed no significant differences compared to the fresh group. After the microspheres were vitrified using a low concentration of cryoprotectant (10% DMSO+10% ethylene glycol (EG)+0.5 mol/L trehalose), the survival rate, cleavage rate, and blastocyst rate were 92.48%, 70.80%, and 20.42%, respectively. No significant difference was observed when compared to the Cryotop method using a higher concentration of cryoprotectant solution (15% DMSO+15% EG+0.5 mol/L trehalose). **Conclusion** We designed and fabricated a microfluidic system with three-channel internal cross-linking chips used for oocyte vitrification preservation. The microfluidic system can generate oocytes-loaded sodium alginate hydrogel microspheres with uniform size, low empty rate, and good cold-resistance. The method successfully reduced the concentration of cryoprotectants in a single-step vitrification process, the developmental capability of oocytes during *in vitro* maturation were comparable with Cryotop method. Unlike the Cryotop method, the oocytes encapsulated in hydrogel does not come into contact with liquid nitrogen, eliminating the risk of cross-contamination. This study provides a novel approach to oocyte vitrification.

Key words microfluidics, oocytes, microencapsulation, vitrification, cryoprotectants

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0321