

微流控芯片加载低温保护剂过程中的损伤评估*

周新丽^{1**}, 郭莹莹¹, 邵文琪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: 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潜力, 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。若采用传统的实验方法优化保护剂的加载和去除方案, 则需要大量的细胞且存在较大的随机误差。因此, 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、不同凹型加载中细胞的体积变化, 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 、累积性渗透损伤 AOD 及毒性损伤 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, 并通过细胞实验结果验证评估效果。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 能够较好地对细胞损伤进行评估, 为细胞损伤评估开辟了新思路。

The damage evaluation during cryoprotectant loading with Microfluidic chip

Zhou Xinli^{1**} Guo Yingying¹ Shao Wenqi¹ Dai Jianjun² Zhang Defu¹

(1 Institute of Biothermal Technology, University of Shanghai for science and technology, Shanghai, 200093, 2 Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, 201106)

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. The traditional experimental methods can be used to optimize the loading and unloading of CPAs, but a large number of cells and random errors will be required. Therefore, in this paper, Volume change of MII porcine oocyte in different loading time, different loading line types and different concave loading types were simulated with numerical simulation methods. Three traditional parameters ΔV (maximam volume change)、AOD (accumulative osmotic damage) and J (accumulative chemical damage) were used to evaluate the damage of oocyte. A comprehensive parameters based on the traditional parameters and entropy method was proposed to evaluate the damage, and the results of the cell experiment are used to verify the effectiveness of s. The results showed that there are divergence between 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 provides a new idea for the evaluation of cell damage.

Key words: microfluidic chips, porcine oocyte, damage evaluation

0 前言

卵母细胞的低温保存技术已经成为生殖能力保存的重要工具, 被广泛运用于牲畜育种和辅助生殖领域。现常用的低温保存方法为慢冻法以及玻璃化冻存, 两种方法都需要添加低温保护剂 (cryoprotective agent,

*国家自然科学基金(51376132)

**通讯联系人. 周新丽 Tel: +86-021-5527-0218; E-mail: zjulily@163.com

CPA) 以保护细胞, 减小冷冻损伤。而但在低温保护剂加载及去除的过程中, 细胞会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。传统的分步法添加去除保护剂会引起胞外多次渗透压突变, 容易造成渗透损伤及细胞膜结构损伤。微流控技术由于可实现保护剂溶液浓度的线性变化, 近年来被运用于保护剂的添加和去除。Song^[1]等人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(80%以上)显著高于一步法(55%左右)及两步法(70%左右)。另有研究者^[2-5]以软骨细胞核神经球干细胞为模型, 计算研究了低温保护剂连续性添加过程中不同线型, 如一般线性, 凹型, 凸型及 S 型加载时细胞体积、胞内保护剂浓度的变化情况, 结果表明连续性添加中 S 型加载和线性加载的结果较优。

若采用实验方法, 即经过加载去除后, 通过细胞的存活率和卵裂率等指标检测细胞的受损情况来对比各加载方法的优劣性, 则需要大量细胞及人力物力财力, 且存在较大的人工及环境实验误差。随着计算机的飞速发展, 数值模拟方法被运用于计算细胞在 CPA 添加去除过程中的体积及胞内保护剂的浓度变化, 用以指导后续实验的进行。

现有的跨膜运输的数学模型可用于计算 CPA 添加和去除过程。常用的三种理论评估参数, 包括细胞体积变化极值 ΔV 、积累性渗透损伤 AOD 和积累性毒性损伤 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^[6]。马学虎^[3]等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, 通常采用多步法添加去除 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) 旨在结合加载时间和细胞体积变化情况来共同探究细胞的受损情况。Jun Liu^[7]等以兔子卵母细胞为模型, 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。Liang Wang^[8]等也采用 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^[9]。毒性损伤不仅受时间影响, 还与 CPA 的浓度和温度有关, James^[10]等人根据已有的实验数据定义了 CPA 加载去除过程中的累积毒性损伤 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, 并模拟计算了出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, 如增加添加步数可以减小细胞的体积变化, 但延长了加载时间, 造成较大的累积性毒性损伤。邵文琪^[11]等研究表明, 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^[12,13], 熵是热力学中用以描述分子或离子运动的不可逆现象, 是微观状态多样性和均匀性的一种度量, 最先由德国物理学家 Clausius 在 1854 年提出。其值可以判断一个事件的随机程度和无序程度, 熵值越大, 事件混乱无序的程度越大。1948 年, 信息论的创始人 Shannon^[14]提出了“信息熵”的概念, 用以研究信息量化度量的问题, 信息度越高, 其信息熵越低。基于信息熵的熵值法在工程技术、社会经济等领域取得了非常广泛的应用, 如 Zou^[15]等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。

本文首先模拟了猪卵母细胞在不同加载时间、不同线型、不同凹型的加载方案中细胞的体积变化, 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。在传统损伤参数的基础上, 根据熵值法的基本原理, 建立基于熵值法的猪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, 将得出细胞的囊胚率后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 渗透模拟的数学模型

目前渗透模型主要有三种: 一参数 (溶质渗透系数) 模型^[16,17]、经典的两参数 (水力传导系数和溶质

渗透系数)模型^[18]以及由 Kedem 和 Katchalsky 创立的三参数模型^[19]。Kleinhans^[20]和 Woods^[21]分别从理论上和细胞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 为渗透浓度, 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。各参数的取值如表 1 所示^[11]。并运用 MLAB 软件对细胞进行渗透模拟。

表 1 模拟计算所用参数值

参数	数值	单位
V_c	$0.84 \cdot 10^{-6}$	μm^3
V_{cpa}	63.5	L/mol
V_b	$0.24 \cdot 10^{-6}$	μm^3
L_p	4.5	um/(atm min)
P_s	3.24	um/min
R	0.86	J/(mol K)
T	298	K

1.2 传统损伤评估

运用 MLAB 软件编程计算 AOD 及 J 的值。其计算方法如下:

(1) 积累性渗透损伤

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

式中, $(V_c - V_{\text{iso}})$ 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。

(2) 积累性毒性损伤

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

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的不同保护剂种类、不同细胞类型的研究相吻合^[10]。

1.3 由熵值法提出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) 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 ，原始数据矩阵的标准化处理后得到 X 矩阵，计算方法如下：

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

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

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

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

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

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。

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

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

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 $0 \leq e_j \leq 1$ 。

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。

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

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。

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

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 ：

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

1.4 实验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出特别说明外均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

实验所用溶液浓度均为体积浓度比。基础液: TCM199+20%FBS, 低温保护剂溶液: 15%EG+15%Me₂SO+基础液。

1.5 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 500IU/mL) 中, 1h 内送达实验室。取 18G 的 5mL 注射器抽吸卵巢表面直径 2-6mm 的卵泡, 将抽得的卵泡液缓缓注入 10mL 的无菌离心管内, 在 39°C 下静置 15min 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 (COCs, cumulus oocyte complexes)。洗涤后放入四孔板, 每孔中放入 60-65 枚卵母细胞, 平衡 2h 后置于 38.5°C、5%CO₂ 气相饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 42-46h。

1.6 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 1 所示。芯片结构如图 2 所示, 由 Y 型入口通道、固定混合通道、蛇形混合通道、细胞操作腔 (分析腔)、细胞进出通道和出口通道组成。

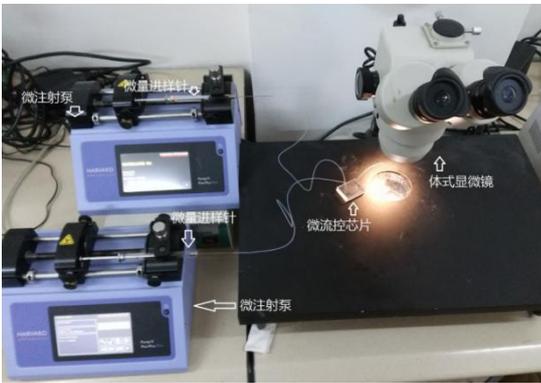


图 1 微流控芯片实物图

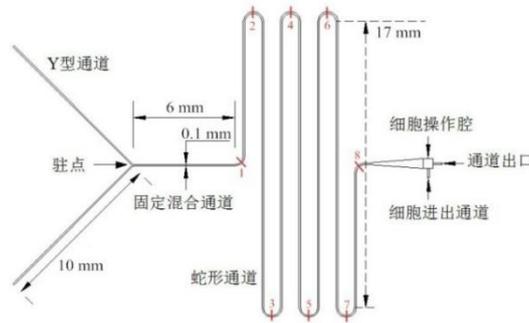


图 2 微流控芯片结构图

1.7 加载方案

不同加载时间实验组中每组将 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, 其中装有保护剂的进液针流速如图 3 所示, 微通道内的总流速为 5 μ L/min, 分别在 5, 10, 15min 内完成保护剂的线性加载, 保护剂的最终浓度为 4.18mol/L。不同线型加载组中保护剂的进液针流速如图 4, 在 10min 内完成加载。以 S 型加载为例, 在 0-150s 内, 保护剂浓度从 0 线性上升至 0.58mol/L, 151-450 内线性上升至 4.14mol/L, 451-600 内线性上升至 4.18mol/L。不同凹型的线型加载方式如图 5 所示。

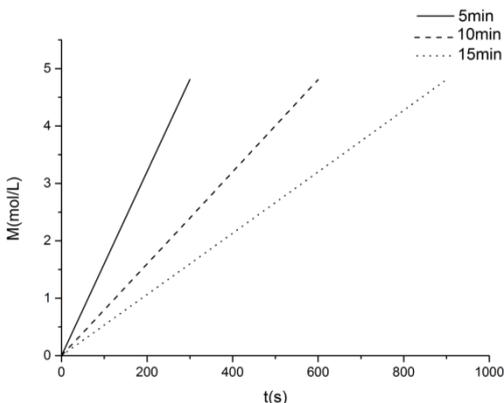


图 3 不同加载时间的加载方案

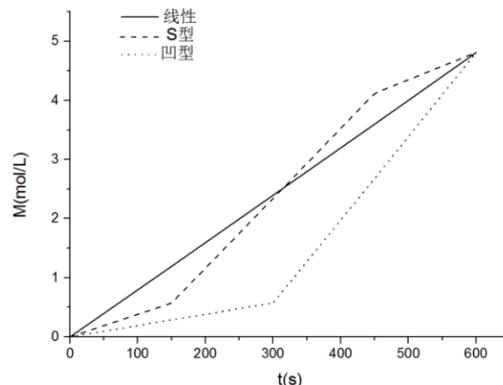


图 4 不同线型的线性加载方案

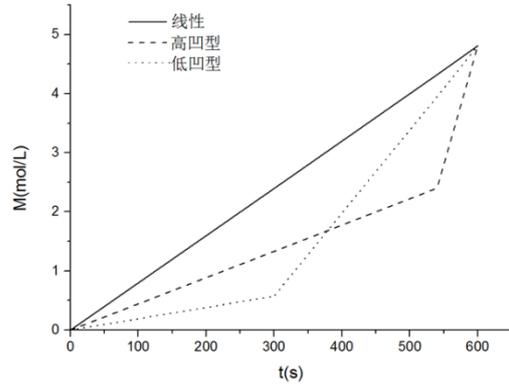


图 5 不同凹型的线型加载方案

1.8 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，激活后的胚胎放入胚胎培养液+细胞松弛素 B 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，通过下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

2.1 渗透行为模拟

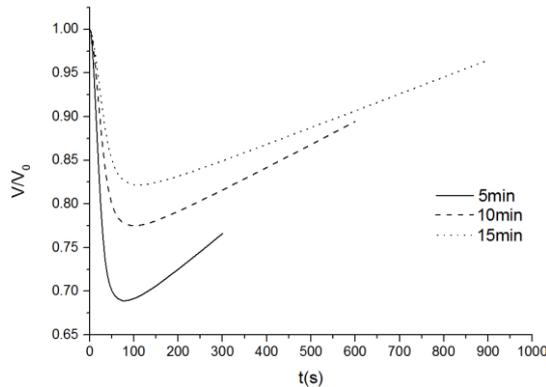


图 6 不同时间的线性加载方案的细胞体积变化

以 5min、10min、15min 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 6 所示。可以看出，三种加载方案下体积变化趋势相似，细胞均先失水体积降低至某体积最小值，后吸水恢复一部分体积。但 5min 加载初期由于胞外 CPA 浓度变化较快，细胞内外渗透压差急剧变化，使得细胞的体积快速下降，体积变化高于 10min 和 15min 组。在加载末期细胞体积都有恢复趋势，5min 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，5min 方案的细胞体积恢复至原体积的 76% 左右，而 15min 方案的则能够恢复至 90% 以上。

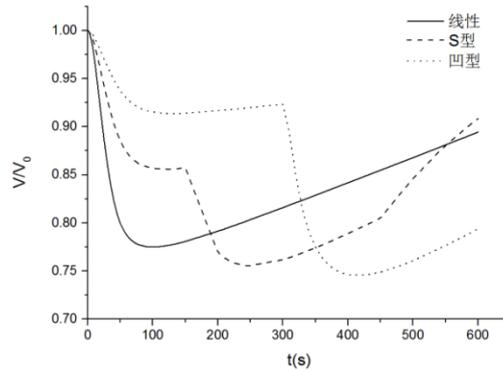


图 7 不同线型的线性加载方案的细胞体积变化

一般线性加载、S 型加载和凹型加载方案的细胞体积变化图 7 所示。细胞体积变化随胞外保护剂浓度的变化而分阶段变化。相比于一般线性加载，在加载初期，S 型加载和凹型加载由于保护剂的浓度变化较小，不会立刻收缩至最小体积，而是较缓慢的下降，其中凹型的体积变化速率最小。在加载末期，S 型加载的第三阶段保护剂浓度变化速率小，细胞体积呈稳固回升趋势，恢复至原体积的 90% 以上。而凹型加载的第二阶段保护剂浓度变化速率较快，加载末期细胞体积恢复较慢，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。

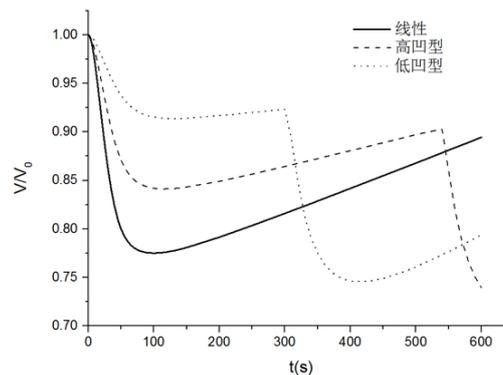


图 8 不同凹型的线性加载方案的细胞体积变化

不同凹型的线性加载方案的细胞体积变化如图 8 所示。在加载初期，从低凹线性加载到高凹线性加载，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。对于高凹线性和低凹线性加载，二者第一阶段加载的保护剂目标浓度不同，且高凹型的浓度变化速率高于低凹组，因此体积变化显著高于低凹组；进入加载的第二阶段后，低凹组细胞体积下降至最低值后开始回升，而高凹组由于在短时间内浓度极速上升，细胞体积持续减小且没有回升趋势，因此高凹线性加载的最终细胞体积最小。

2.2 传统损伤评估结果

表 2 不同加载时间的线性加载方案的损伤评估参数值

加载方法	ΔV	AOD	J
新鲜细胞	0	0	0
5min	0.31	81.02	6.17
10min	0.22	105.17	13.12
15min	0.18	106.88	20.16

对比不同加载时间组的损伤参数（如表 2 所示），5min 加载方案由于胞外 CPA 浓度变化较快，细胞内外渗透压差急剧变化，使得细胞的体积变化较大，因此得出的 ΔV 值显著高于 10min 及 15min 组。但在计算累积性渗透损伤时发现，5min 组的 AOD 值远小于 10min 及 15min 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 Jun Liu^[7]的研究结果一致。另 10min 与 15min

组的 AOD 值相似，虽然 10min 组的细胞与 CPA 溶液接触时间较短，但由图 4 可以看出，其细胞体积变化略高于 15min 组，在两因素的共同作用下使得两组的结果相似。后计算细胞的累积性毒性损伤发现，CPA 的添加时间越长，J 值越大，毒性损伤的机制尚不清楚，但可能与 CPA 诱导的细胞质组织改变，膜特性或细胞代谢相关^[22]，可能是 CPA 添加总时间的延长同时也增加了细胞在高浓度保护剂中的暴露时间，高浓度保护剂对细胞的造成伤害较大，使得 J 值较大。

表 3 不同线型的线性加载方案的损伤评估参数值

加载方法	ΔV	AOD	J
新鲜细胞	0	0	0
一般线性	0.22	105.17	13.12
S 型	0.24	109.05	13.59
凹型	0.26	93.27	7.73

对比不同线型的损伤系数（表 3），从一般线性加载法到凹型线性加载法，其 ΔV 值逐渐增加，凹型加载由于第二阶段的保护剂浓度变化速率较大，细胞持续失水，使得体积变化极值高于线性及 S 型加载，但其累积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。S 型加载分三个阶段，其中第三阶段即保护剂浓度较高时，浓度变化较为平缓，使得细胞与高浓度保护剂的接触时间较长，带来较大的毒性损伤和累积性渗透损伤，使得 S 型加载的 AOD 值以及 J 值高于一般线性及凹型组。

表 4 不同凹型的线性加载方案的损伤评估参数值

加载方法	ΔV	AOD	J
新鲜细胞	0	0	0
一般线性	0.22	105.17	13.12
高凹型	0.26	82.27	5.97
低凹型	0.26	93.27	7.73

对于不同凹型的线性加载方案，一般线性加载由于保护剂浓度变化速率恒定，且较为平缓，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。低凹组由于后期细胞与高浓度保护剂的接触时间较长，累积性损伤较高。而高凹组细胞与高浓度保护剂中的接触时间远小于低凹型加载，因此受到的累积性损伤最小。

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:

1) 原始数据矩阵标准化处理

根据表 2 计算出猪卵母细胞在不同加载时间加载方案下的原始损伤值，将其矩阵化后用 Y 表示，再经标准化处理最终得到 X 矩阵。

$$Y = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0.3119 & 81.0177 & 6.1733 \\ 0.2257 & 105.1743 & 13.1179 \\ 0.1788 & 106.8781 & 120.1556 \end{bmatrix} \quad (20)$$

$$X = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0.7580 & 0.3063 \\ 0.7236 & 0.9840 & 0.6508 \\ 0.5733 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (21)$$

2) 计算比重矩阵

各个加载方案各类损伤比重组成了比重矩阵 P，最终结果如下所示。

$$P = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0.4354 & 0.2764 & 0.1565 \\ 0.315 & 0.3589 & 0.3325 \\ 0.2496 & 0.3647 & 0.511 \end{bmatrix} \quad (22)$$

3) 熵值的计算

表 5 各评估参数的熵值

损伤	ΔV	AOD	J
熵值	0.77	0.79	0.72

4) 差异性系数的计算

表 6 各类损伤的差异性系数

损伤	ΔV	AOD	J
差异性系数	0.22	0.21	0.28

5) 权重的计算

表 7 各类损伤的权重

损伤	ΔV	AOD	J
权重	0.32	0.30	0.38

6) 综合评价值的计算

于不同加载时间的加载方案来说，其综合损伤评估参数值可由式 (23) 求出。

$$s = 0.32 \Delta V + 0.30AOD + 0.38J \quad (23)$$

表 8 不同加载时间的线性加载方案的 s 值

加载方法	s
新鲜细胞	0
I(5min)	26.48
II(10min)	36.29
III(15min)	39.48

经计算，不同时间加载方案的 s 值见表 8。可以看出，加载时间越长，s 值越大，理论上细胞受到的损伤越大，此外，还可以看出，10min 和 15min 两种加载方案的 s 值相近，因此细胞的受损情况相近。

用以上方法同理对不同线型、不同凹型组进行综合损伤计算，计算结果如下：

表 9 不同线型的线性加载方案的 s 值

加载方法	s
新鲜细胞	0
一般线性	38.76
S 型	40.19
凹型	33.01

表 10 不同凹型的线性加载方案的 s 值

加载方法	s
新鲜细胞	0
一般线性	38.76
高凹型	40.19
低凹型	33.01

由表 9，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。计算不同凹型组的 s 值，由表 10 可以看出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。

2.4 细胞实验结果

表 11 不同加载时间线性加载方案的囊胚率

加载方法	囊胚率 (%)
新鲜	35.2±3.97

5min	17.25±1.62
10min	8.84±0.44
15min	3.33±5.77

经过不同的时间加载保护剂，各方案的细胞囊胚率结果见表 11，可以看出 5min 加载方案的囊胚率最高，且加载时间越长，囊胚率越低。

表 12 不同线型的线性加载方案的囊胚率

加载方法	囊胚率 (%)
新鲜	35.2±3.97
一般线性	8.84±0.44
S 型	3.33±5.77
凹型	16.31±1.62

表 13 不同凹型的线性加载方案的囊胚率

加载方法	囊胚率 (%)
新鲜	35.2±3.97
一般线性	8.84±0.44
高凹型	23.48±4.73
低凹型	16.31±1.62

由表 12，不同线型组的囊胚率中，凹型组的囊胚率高于一般线性及 S 型组。对凹型组进一步检测，结果如表 13 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，见图 6。拟合结果发现 s 同囊胚率之间呈负相关关系，且相关度较高，分别是 0.95。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。

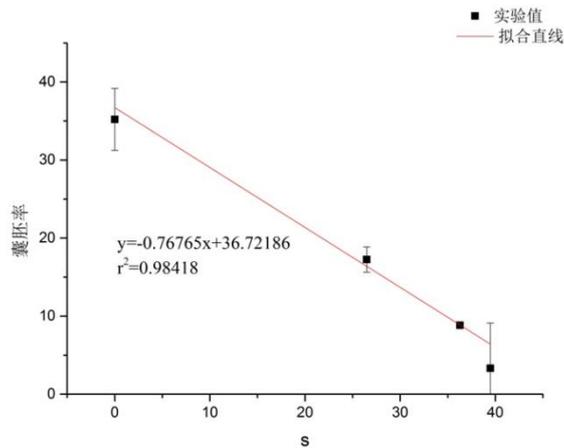


图 9 不同加载时间线性加载的 s 值与囊胚率的关系

3 讨论

本文首先通过数值模拟的方法，计算细胞在不同的保护剂加载方案下的体积变化，并计算比较了各加载方案的 ΔV 、AOD 和 J 值。结果表明，三种加载方案下各传统损伤评估参数所得结论不同，以不同加载时间组为例，随着加载时间的延长，体积变化平缓， ΔV 值越小，但细胞所受累积性渗透损伤及毒性损伤越大，三者得出的最佳方案存在矛盾。而本文提出的综合损伤评估参数 s 可综合考虑各参数进行损伤评估。计算得 ΔV 、AOD、J 的权重系数分别为 0.32、0.30、0.38，说明渗透损伤对细胞的影响最为显著，则日后在评价加载时间不同的方案，对其进行优化时，应重点改进毒性损伤。另外不同加载时间组计算得 10min

与 15min 两方案的 s 值相似, 细胞受损情况相似, 而 5min 加载方案所得 s 值最小, 虽然在 5min 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^[23]等人也提出, 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。

本文只研究了细胞在特定浓度的一种混合型 (EG+Me₂SO) 保护剂溶液不同加载时间内的渗透行为, 日后可以测量细胞在多个浓度梯度下对多种类型保护剂溶液的渗透系数, 为优化加载方案提供更多的基础数据。另传统毒性损伤评估参数 J 值的计算公式只包含加载的时间和保护剂的浓度的影响, 而并未涉及保护剂的种类, 但不同的保护剂对细胞造成的毒性损伤必然不同, 所以有必要改进参数 J 的计算, 将保护剂种类这一重要因素考虑进去。虽然本文中综合损伤评估参数的评估能力较好, 但所做的细胞验证实验有限, 还需在以后的研究中进行更多的细胞实验去验证。

4 结论

本文首先运用传统的评估参数对不同的保护剂添加方案进行数值模拟评估, 在这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:

1. 加载时间越长, 细胞体积变化最大值 ΔV 越小, 但累积性损伤即 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。三个传统评估参数值所得结论存在矛盾。

2. 计算得累积性毒性损伤在 s 值中所占权重最高, 10min 与 15min 组的 s 值相近, 并显著高于 5min 组; 不同线性组中, 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。

3. 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。

参考文献

- [1] Song Y S, Moon S, Hulli L, et al. Microfluidics for cryopreservation[J]. Lab on A Chip, 2009, 9(13):1874-1881.
- [2] 解政鼎, 马学虎, 艾丹亭, 等. 低温保护剂对神经干细胞球添加过程的模拟分析[J]. 化工学报, 2013, 64(11):3956-3967.
- [3] 马学虎, 范文霞, 潘广生, et al. 冷冻保护剂导入细胞过程的模拟和优化 [J]. 热科学与技术, 2008, 7(4): 324-30.
- [4] 艾丹亭, 马学虎, 兰忠, 等. 多组分冷冻保护剂导入神经干细胞球的传质模拟[J]. 高校化学工程学报, 2015(1):1-10.
- [5] 石颖. 神经干细胞的玻璃化冷冻保存研究[D]. 大连理工大学, 2009.
- [6] 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.[J]. Cryobiology, 2003, 46(1):76-87.
- [7] LIU J, MULLEN S, MENG Q, et al. Determination of oocyte membrane permeability coefficients and their application to cryopreservation in a rabbit model ☆ [J]. Cryobiology, 2009, 59(2): 127-34.
- [8] 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 Procedures1 [J]. Biology of Reproduction, 2011, 85(5): 884-94.
- [9] Fahy G M, Wowk B, Wu J, et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity.[J]. Cryobiology, 2004, 48(1):22.
- [10] BENSON J D, KEARSLEY A J, HIGGINS A Z. Mathematical optimization of procedures for cryoprotectant equilibration using a toxicity cost function [J]. Cryobiology, 2012, 64(3): 144-51.
- [11] 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

-
- [12] 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 [J]. 数量经济技术经济研究, 2003, 20(6): 115-8
- [13] 张卫民. 基于熵值法的城市可持续发展评价模型 [J]. 厦门大学学报哲学社会科学版, 2004, 2): 109-15.
- [14] SHANNON C E. A mathematical theory of communication [J]. Bell Labs Technical Journal, 1948, 5(4): 3-55.
- [15] 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[J]. 环境科学学报(英文版), 2006, 18(5):1020-1023.
- [16] MAZUR P, LEIBO S P, MILLER R H. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures [J]. The Journal of Membrane Biology, 1974, 15(1): 107-36.
- [17] MAZUR P, MILLER R H. Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2 m solutions at 0 or 20 °C [J]. Cryobiology, 1976, 13(5): 507-22.
- [18] FABBRI R. Cryopreservation of Human Oocytes and Ovarian Tissue [J]. Cell & Tissue Banking, 2006, 7(2): 113-22.
- [19] LEIBO S P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis [J]. Theriogenology, 2008, 69(1): 37-47.
- [20] ARAV A, ZVI R. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes? [J]. Molecular & Cellular Endocrinology, 2008, 282(1): 150-2.
- [21] HEO Y S, LEE H J, HASSELL B A, et al. Controlled loading of cryoprotectants (CPAs) to oocyte with linear and complex CPA profiles on a microfluidic platform [J]. Lab on A Chip, 2011, 11(20): 3530-7.
- [22] Hammerstedt R H, Graham J K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol.[J]. Cryobiology, 1992, 29(1):26.
- [23] Benson J D, Chicone C C, Critser J K. A general model for the dynamics of cell volume, global stability, and optimal control[J]. Journal of Mathematical Biology, 2011, 63(2):339-359.