

猪卵母细胞渗透系数的测定及保护剂线性加载的优化*

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: 低温保存将对卵母细胞造成渗透损伤、毒性损伤和冰晶损伤, 为了筛选出较优的低温保存方案以减少细胞在低温保存过程中所受损伤, 有必要了解细胞在低温保存过程中对水的渗透系数 L_p 和对保护剂的渗透参数 P_s 。本文首先测量了猪卵母细胞对不同浓度的单一型(EG)、混合型保护剂(EG+Me₂SO)溶液的渗透系数(L_p 和 P_s), 研究细胞的渗透系数同保护剂种类和浓度的关系; 然后将所得参数用于微流控添加去除保护剂的数值模拟, 计算细胞在不同线性加载、不同凹型加载、分步线性加载中所受的累积渗透损伤及毒性损伤并进行比较; 最后采集MII期猪卵母细胞, 运用微流控对其进行不同方案的加载实验, 孤雌激活后计算卵裂率、囊胚率。结果表明: (1) 混合型保护剂的渗透参数高于单一型保护剂; 低温保护剂浓度越高, 猪卵母细胞对水和保护剂的渗透系数越大, 且在混合型保护剂中细胞的渗透参数随溶液浓度变化而变化的速率快于单一型保护剂。(2) S型加载细胞所受累积性渗透损伤及毒性损伤较大, 凹型加载细胞所受损伤最小, 其中高凹型更优。结合高凹及低凹优化出的三步添加法可显著提高保护剂添加后的细胞质量。(3) 不同线性加载的细胞实验中, 直线型加载所得的细胞卵裂率略高于其它线性加载组, 但凹型加载的囊胚率远高于其它线性加载组, 其中高凹型加载的囊胚率最高。

关键词: 猪卵母细胞, 保护剂浓度, 渗透系数, 凹型加载

Permeability Coefficient of Porcine Oocyte and the Optimization of Cryoprotectant Linear Loading

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: Cryopreservation will cause osmotic injury, toxicity damage and ice crystal damage to oocytes. It's necessary to know about the water permeability L_p and cryoprotectant(CPA) permeability P_s of oocyte to select a better cryopreservation scheme to reduce the damage of cells during cryopreservation. In this thesis, firstly, we measured the L_p and P_s of porcine oocytes in different concentrations of single-cryoprotectant(EG) and mixed-cryoprotectants(EG+Me₂SO) solutions, then we investigated the relationship between the permeability coefficient of cells with the type and concentration of CPAs. Secondly the resulting parameters were used to simulate the microfluidic addition and removal of the CPA, the accumulative osmotic damage(AOD) and toxicity damage(J) of the oocytes in different linear loading, different concave-type linear loading, and step-wise linear loading protocols were calculated; At last, we used microfluidics for the different loading protocols of the MII

*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

porcine oocytes and calculated the cleavage rate and blastocyst rate after parthenogenetic activation. The results showed that: (1) The permeability of the oocytes in mixed-CPAs solutions was higher than that of the single-CPA solution; the L_p and P_s of the oocyte were greater in the higher concentration solution, and the parameters of the oocytes in mixed-CPAs changed faster than that in the single-CPA. (2) S-type linear loading protocol had the maximum AOD and J, while the concave-type linear loading protocol had the least damage, and the high-convex-type was better than the low-convex-type. The three-step addition method combined with the advantages of high-concave and low-concave could significantly improve the cell quality after the loading of CPA. (3) In different linear loading experiments, the oocytes of simple linear loading protocol group had a slightly higher cleavage rate than the other linear loading groups, but the blastocyst rates of the oocytes in concave-type-linear loading protocol were much higher than those of other linear loading groups, in which high-convex-type loading protocol had the highest blastocyst rate.

Key words: porcine oocyte, cryoprotectant concentration, permeability, concave -type linear loading protocol

0 前言

随着辅助生殖技术和胚胎工程技术的发展, 卵母细胞的需求越来越多, 卵母细胞的低温保存技术应运而生, 已经成为了生殖力保存的重要工具, 广泛应用于动物学、生物医学和临床医学等多个方面。卵母细胞的低温保存主要有两种方法: 慢速冷冻和玻璃化冷冻, 两种方法都需要添加低温保护剂, 而低温保护剂的添加和去除将给细胞带来不同程度的渗透损伤和毒性损伤。在保护剂的添加和去除过程中, 由于细胞膜内外两侧存在渗透压差, 导致水和保护剂跨膜进出细胞, 细胞的体积也随之改变, 一旦细胞体积变化超过其临界值, 就会对细胞造成不可逆的渗透损伤, 具体表现为细胞膜结构和细胞骨架系统损伤、透明带硬化、染色体和 DNA 损伤等。渗透损伤的大小取决于体积变化的幅度、频率以及变化方向的改变次数^[1]。Succu 等^[2]观察小鼠卵母细胞放入冷冻液中后的形变, 发现细胞会迅速由圆形变为月牙形或者凹面镜形, 很有可能造成透明带的断裂或脱落。卵母细胞受到的毒性损伤主要来自于低温保护剂, 损伤的大小与低温保护剂的种类、浓度、温度以及接触时间有关^[3-5]。Fu^[6]等研究了冷冻保护剂对猪卵母细胞造成的毒性, 发现保护剂毒性将导致细胞的线粒体表面变得粗糙、轮廓不清。

因此, 需要优化低温保护剂的加载去除过程以减小细胞损伤。传统的分步法添加去除保护剂使得细胞内外存在多次的渗透压差变化, 且操作步数较多, 细胞与保护剂的接触时间较长, 造成较大的渗透损伤和毒性损伤。有学者提出运用微流控技术^[7,8]来进行保护剂的加载或去除, 使细胞外的保护剂浓度呈连续性变化, 减少细胞的渗透损伤和毒性损伤。Fleming^[7]等建立了一个利用微通道扩散去除细胞流中 Me_2SO 的模型, 通过数值模拟分析微通道的尺寸、Peclet 数、细胞大小以及细胞对溶液的渗透速率保护剂去除效率的影响, 对去除方案进行优化。Yun Seok Heo^[9]等运用微流控装置精准控制保护剂溶液的浓度按照目标方案(分步、线性、复杂线性)发生连续性变化, 再借助 MATLAB 数值计算软件编程, 从 2236 种方案中筛选出较优加载方案, 使得能够在 15min 内完成 1.5mol/L 丙二醇的加载, 并且细胞体积变化不超过 10%。虽然前人已经运用微流控进行了多种加载方案的模拟研究, 但是还有其他复杂加载方案还未被研究, 如低凹型、高凹型、分步线性加载等。

为了优化保护剂的添加去除过程, 则需了解细胞的渗透特性, 包括细胞体积 (V)、非渗透体积 (V_b)、对水的渗透系数 (L_p) 和对低温保护剂的渗透系数 (P_s) 等。Wang^[10]等人研究了草地贪夜蛾的 sf21 细胞对不同浓度甘油溶液的水渗透系数, 发现溶液浓度越高, 其水渗透系数值越小。可见细胞在不同浓度的低温保护剂溶液中会有不同的渗透系数。卵母细胞体积与面积之比较大, 细胞膜对水和保护剂的渗透率较低。Agca^[11]测得了 M II 期牛卵母细胞分别对 EG (L_p : 0.83um/atm/min, P_s : 0.37×10^{-3} cm/min) 和 Me_2SO (L_p : 1.14um/atm/min, P_s : 0.48×10^{-3} cm/min) 溶液的渗透参数。Liu^[11]分别测量了兔子卵母细胞对 EG (L_p : 0.82um/atm/min, P_s : 2.70×10^{-3} cm/min)、甘油 (L_p : 0.64um/atm/min, P_s : 0.27×10^{-3} cm/min) 和 Me_2SO (L_p :

0.79um/atm/min, $P_s: 2.90 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$) 溶液的渗透系数。而与分步法添加固定浓度保护剂不同, 在微流控加载保护剂的过程中, 保护剂浓度是随时间变化的, 那么, 在理论优化微流控加载方案的过程中, 如果能根据不同的保护剂加载浓度, 将不同的渗透系数值代入模拟, 会使得模拟结果更加精确可靠。而前人的研究中, 大多是测量细胞对单一成分单一浓度保护剂的渗透系数, 此外, 目前常用的保护剂是混合型保护剂 (EG+Me₂SO), 各成分之间的相互作用是否影响渗透参数并不清楚。

目前关于微流控加载低温保护剂过程中细胞的渗透行为模拟和损伤评估的研究还较少。渗透行为模拟和损伤评估是理论优化加载方案的两种方法, 以细胞渗透相关参数为数据基础, 利用数值模拟软件依据渗透模型进行模拟, 对损伤评估参数进行计算并得出结果, 就能够对多种加载方案进行初步筛选。Liu^[1]等提出累积性渗透损伤参数 (Accumulative Osmotic Damage, AOD) 用于评估一段时间内的总的渗透损伤大小, 发现 AOD 值同兔子卵母细胞激活后的囊胚率之间呈高度相关关系。Benson^[12]等提出累积性毒性参数 J 来计算一段时间内细胞受到的总的毒性损伤大小, 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, 并模拟计算出优于传统分步法的添加方案。

本文首先将测量猪卵母细胞对不同浓度的单一型 (EG)、混合型保护剂 (EG+Me₂SO) 溶液的渗透系数 (L_p 和 P_s), 研究细胞的渗透系数同溶液中保护剂浓度的关系。在此基础上, 模拟 M II 猪卵母细胞在一般线性、S 型、高凹型、低凹型、分步线性的线性加载方案中的体积变化和胞内保护剂浓度变化, 计算各方案的累积性渗透损伤 AOD 及毒性损伤 J, 并对猪卵母细胞进行微流控芯片不同方案的加载实验, 统计经孤雌激活后细胞的卵裂率和囊胚率, 综合分析各类加载方案的优劣。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

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。

1.2 保护剂溶液配置

实验所用溶液浓度均为体积浓度比。

基础液: TCM199+20%FBS, 单一型保护剂溶液 I: 10%EG+基础液, 单一型保护剂溶液 II: 15%EG+基础液, 单一型保护剂溶液 III: 20%EG+基础液, 单一型保护剂溶液 IV: 30%EG+基础液。混合型保护剂溶液 I: 5%EG+5%Me₂SO+基础液, 混合型保护剂溶液 II: 7.5%EG+7.5%Me₂SO+基础液, 混合型保护剂溶液 III: 10%EG+10%Me₂SO+基础液, 混合型保护剂溶液 IV: 15%EG+15%Me₂SO+基础液。

1.3 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随机无菌采集猪卵巢, 置于 37°C-38.5°C 生理盐水 (含青、链霉素各 500IU/mL) 中, 1h 内送达实验室。用 39°C 的灭菌生理盐水冲洗 3-4 次, 取 18G 的 5mL 注射器抽吸卵巢表面直径为 2-6mm 的卵泡, 再将抽得的卵泡液缓缓注入 10mL 的无菌离心管内, 39°C 静置 15min 后, 转入直径 10cm 的培养皿内, 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)。分级后, 选用卵丘细胞层尽可能完整、致密、细胞质均匀并且卵丘层细胞较多的 COCs, 在 TCM199 (含 10%FBS) 中吹洗 3 次, 放入四孔板中平衡 2h, 每孔放入 60-65 枚卵母细胞, 后置于 38.5°C、5%CO₂ 气相饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 42-46h。

1.4 猪卵母细胞平均体积的测定

从四孔板中取出经体外成熟培养过的猪卵母细胞, 先用微量移液枪将卵母细胞吹至透明质酸酶溶液中吹打多次, 直至胞外卵丘细胞完全脱落, 后移至 TCM199 中洗 3 遍备用。打开荧光倒置显微镜, 将细胞置于 $\times 10$ 镜头下, 对形态规整并呈圆形的细胞进行拍照、保存。运用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件勾选各个卵母细胞截面并求出其截面积。再根据下式^[9, 13], 由截面积求得细胞体积。最后, 运用 SPSS Statistics 19.0 对 100 枚细胞的体积数据进行频率统计。

$$V_c = (4\pi/3) \cdot (A/\pi)^{3/2} \quad (1)$$

1.5 猪卵母细胞非渗透性体积的测定

非渗透性体积是在细胞中部分不参与渗透过程的体积。目前常用的测量方法是 Boyle-Van't Hoff 法^[14]，该方法是根据 Boyle-Van't Hoff 关系式（式 2）做出归一化体积 V/V_0 和归一化胞内渗透压 M_0/M 倒数的拟合直线，该直线在 Y 轴上的截距就是非渗透体积 V_b 。

$$\frac{V}{V_0} = (1 - V_b) \frac{M_0}{M} + V_b \quad (2)$$

测量非渗透体积 V_b ，首先打开冰点渗透压计，分别测量 3 次低渗、高渗以及等渗共 7 种溶液的渗透压值，取其平均数并做好记录。然后，从四孔板中取出 90 枚经体外成熟培养过的猪卵母细胞分为 6 组，每组 15 枚细胞，分别放入 6 滴 TCM199 溶液中，每滴溶液按 1~6 进行编号，后将细胞移至荧光倒置显微镜下，采用 $\times 10$ 镜头进行拍照，记录下细胞的初始截面情况。再取 6 滴溶液，每滴对应一种不渗透溶液，同样，对其按 A~F 进行编号。再将 1 号液滴内的 15 枚细胞移至 A 号液滴中，2 号的细胞移到 B 号液滴中，以此类推。所有细胞移动完成后，置于 CO_2 培养箱内平衡 20min。20min 后，将载有细胞培养皿移至荧光倒置显微镜下，再用 $\times 10$ 镜头进行拍照并记录下细胞此刻的截面情况。

1.6 猪卵母细胞渗透系数的测定

渗透参数的测量离不开渗透模型，它从物理角度展现了渗透过程中水和可渗透溶质的跨膜运输^[15, 16]。目前渗透模型主要有三种：Mazur^[17, 18]等提出的一参数（溶质渗透系数）模型；经典的两参数（水力传导系数和溶质渗透系数）模型^[19]（式 3-6）；以及由 Kedem 和 Katchalsky 创立的三参数模型^[16]，它相对于两参数模型，多了一个溶质-溶液相关系数 σ 。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，得出相似的结论：两参数模型更简洁，其预测结果更接近实际情况。

$$V_c = V_w + V_s + V_b \quad (3)$$

$$\frac{dV_w}{dt} = -L_p A R T (M^e - M^i) \quad (4)$$

$$\frac{dN_s}{dt} = P_s A (M_s^e - M_s^i) \quad (5)$$

$$V_s = N_s \cdot V_{cpa} \quad (6)$$

式 3 显示了各类体积间的关系，式 4 和 5 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，而式 6 给出了胞内保护剂体积的算法。

取用经体外成熟培养过的猪卵母细胞，打开荧光倒置显微镜（TS100, 日本 Nikon），选取 1 枚形状规整并呈圆形的卵母细胞放入 TCM199 中，置于 $\times 10$ 镜头下，拍照并记录细胞初始截面积。运用 Image-Pro Plus 6.0 软件，设置其图像采集频率为 5s/张，采集次数为 60 次，再将卵母细胞移至待测溶液中，并从细胞进入溶液开始计时并进行图像采集。图像采集结束后筛选出合适的细胞照片，利用 Image-Pro Plus 6.0 软件求出细胞截面积并作记录，再通过球体体积与投影面积的换算关系式（ $V=0.752S^{3/2}$ ），计算得到细胞的体积变化。重复测量三次后，将测出的一系列细胞体积值导入 MLAB 数值处理软件，对水渗透系数 L_p 和保护剂渗透系数 P_s 进行拟合。

1.7 不同添加方案的渗透模拟及损伤评估模型

运用 MLAB（Modeling Laboratory）对卵母细胞在不同线型、不同凹型、分步线性加载下加载混合型保护剂溶液 IV: 15%EG+15%Me₂SO+基础液的渗透行为进行模拟。

不同线型加载组的保护剂的浓度变化如图 1，三种线型均在 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，151-450s 内线性上升至 4.14mol/L，451-600s 内线性上升至 4.18mol/L。不同凹型的线型加载保护剂的浓度变化如图 5 所示，在 10min 内完成加载，低凹型加载在第 300s 时加载到目标浓度的 12%，后 300s 内线性加载到最终浓度。而高凹型加载则在第 540s 才加载到目标浓度的 50%，利用最后的 60s 时间达到最终浓度。分步线性加载分为一步线性、两步线性和三步线性加载，加载方案如图 3 所示，三步线性加载的后两步加载方案实际上又构成了一次凹型加载。

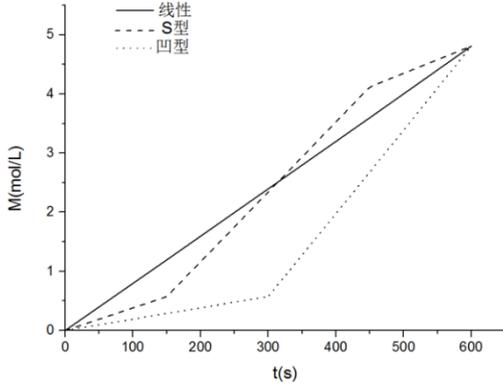


图 1 不同线型的线性加载方案

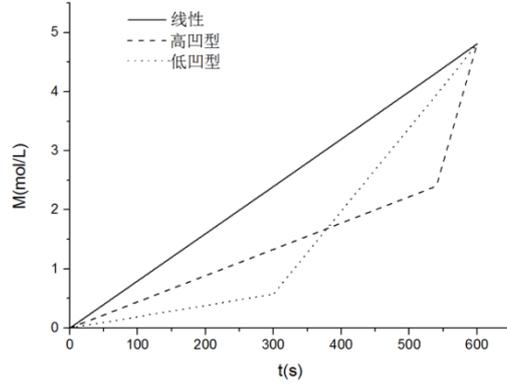


图 2 不同凹型的线性加载方案

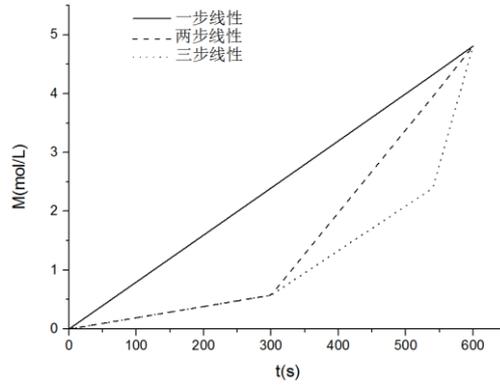


图 3 分步线性加载方案

1.8 卵母细胞的渗透损伤评估

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

$$AOD = \int_{start}^{end} \text{abs} \left| \frac{V_c - V_{iso}}{V_{iso}} \right| \cdot dt \quad (7)$$

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。

(2) 积累性毒性损伤

$$J = \int_{start}^{end} 0.005(M_s^i)^{1.6} \cdot dt \quad (8)$$

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^[22]。

1.9 卵母细胞实验及孤雌激活

实验所用微流控装置系统如图 1 所示，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。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。

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，微通道内的总流速为 $5\mu\text{L}/\text{min}$ ，不同线型加载组、不同凹型加载组、分步线性加载组中保护剂的进液针流速分别如图 1、2、3 所示，在 10min 内完成加载。

加载完成后采用电脉冲的方式对加载完成的卵母细胞进行孤雌激活，激活后的胚胎放入加有细胞松弛素 B 的胚胎培养液中于 CO_2 恒温培养箱中培养 4~5 h。后转移至胚胎培养液中置于培养箱，7 天后观察胚胎发育情况，统计细胞的卵裂率和囊胚率。

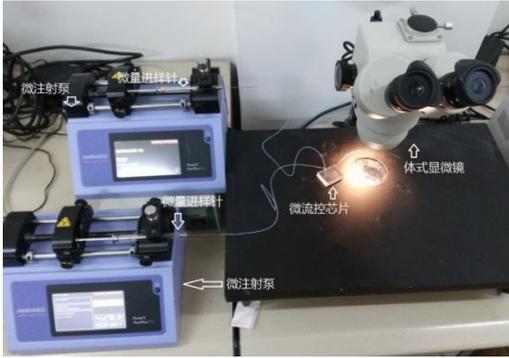


图 4 微流控芯片实物图

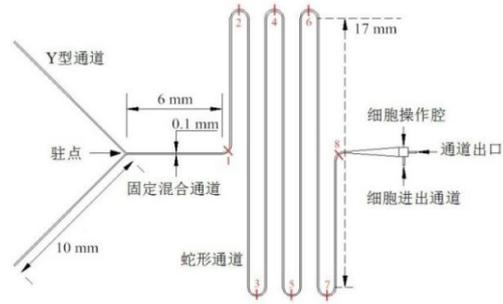


图 5 微流控芯片结构图

2 结果

2.1 猪卵母细胞平均体积

细胞体积统计结果如图 6 所示，可以看出猪卵母细胞体积大多数分布在 $0.7 \times 10^{-12} \sim 0.95 \times 10^{-12} \text{ m}^3$ 之间，最后的平均体积为 $(0.84 \pm 0.1) \times 10^{-12} \text{ m}^3$ ，同牛卵母细胞 ($(0.83 \pm 0.09) \times 10^{-12} \text{ m}^3$) [23] 差不多，但大于兔子卵母细胞 ($(0.72 \pm 0.008) \times 10^{-12} \text{ m}^3$) [1]。

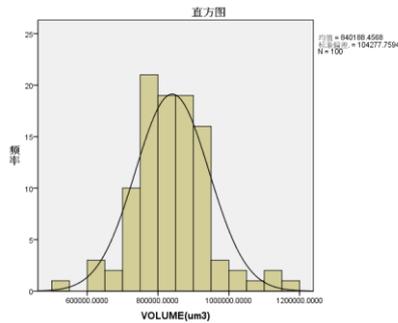


图 6 细胞体积分布情况

2.2 猪卵母细胞非渗透性体积

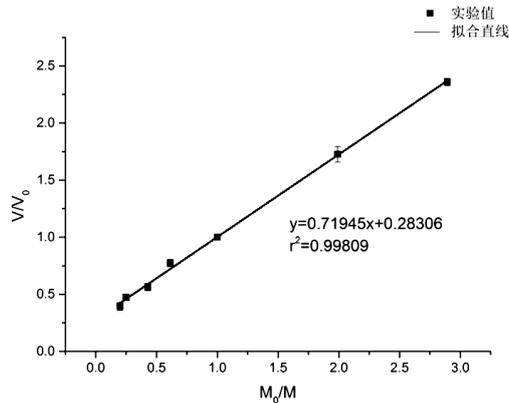


图 7 猪卵母细胞的 Boyle van't Hoff 关系直线

由 Boyle-Van't Hoff 关系式绘制 V/V_0 与 M_0/M 关系图 (2-4)，通过 Origin 9.0 数据分析软件对数据进行线性拟合处理，得出回归直线方程 $y = 0.72x + 0.28$ ($r^2 = 0.99$)，截距是 0.28，故非渗透体积 $V_b = 0.28V_0$ 。

2.3 猪卵母细胞对单一型保护剂溶液的渗透系数

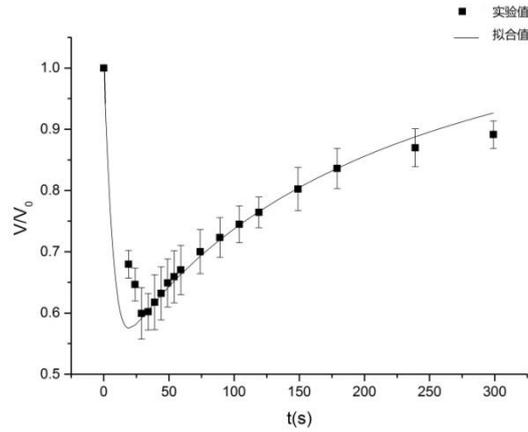
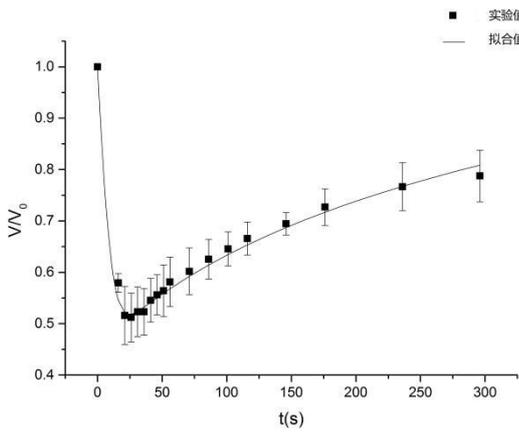


图8 MII猪卵母细胞在单一型保护剂溶液 I 中的体积变化

图9 MII猪卵母细胞在混合型保护剂溶液 I 中的体积变化

实验测得猪卵母细胞在单一型保护剂溶液中的渗透行为如图 8 所示(以单一型保护剂溶液 I 为例), 经过 MLAB 的拟合, 得出 MII 猪卵母细胞在不同浓度的单一型保护剂溶液中对水和保护剂的渗透系数, 如表 1 所示, 可以看出随着保护剂浓度的增大, 猪卵母细胞的 L_p 及 P_s 值也逐渐增大。

表 1 MII猪卵母细胞对不同浓度单一型保护剂溶液的渗透系数

单一型保护剂溶液	L_p ($\mu\text{m}/\text{atm}/\text{min}$)	P_s ($\mu\text{m}/\text{min}$)
I	1.38	13.2
II	1.56	22.8
III	1.8	25.2
IV	1.92	27

2.4 猪卵母细胞对混合型保护剂溶液的渗透系数

猪卵母细胞在混合型保护剂溶液中的渗透行为如图 9 所示(以混合型保护剂溶液 I 为例)。MLAB 拟合得出 MII 猪卵母细胞在不同浓度的混合型保护剂溶液中对水和保护剂的渗透系数如表 2 所示, 细胞在混合型保护剂溶液中对水和保护剂的渗透能力变化趋势与在单一型保护剂溶液中相同, 随着混合型保护剂浓度的增大, L_p 、 P_s 值均逐渐增大。

表 2 MII猪卵母细胞对不同浓度混合型保护剂溶液的渗透系数

混合型保护剂溶液	L_p ($\mu\text{m}/\text{atm}/\text{min}$)	P_s ($\mu\text{m}/\text{min}$)
I	1.38	22.2
II	3	25.2
III	3.9	29.4
IV	4.5	32.4

结合表 1 和表 2 分别作猪卵母细胞对不同保护剂的 L_p 及 P_s 值随溶液浓度的变化规律图, 如图 10 和 11 所示。其中, 从图 10 中可以看出, 相同浓度下混合型保护剂中卵母细胞对水的渗透性高于在单一型保护剂中的渗透性; 且随着保护剂浓度的增大, 在单一型保护剂溶液中猪卵母细胞对水的渗透系数变化缓慢, 而在混合型保护剂溶液中细胞对水渗透系数变化较快。由图 11, 虽然细胞对混合型保护剂的渗透系数始终比单一型的渗透系数大; 但在低浓度区时, 随着浓度变化, 细胞对单一型保护剂渗透系数比对混合型保护剂渗透系数变化要快。

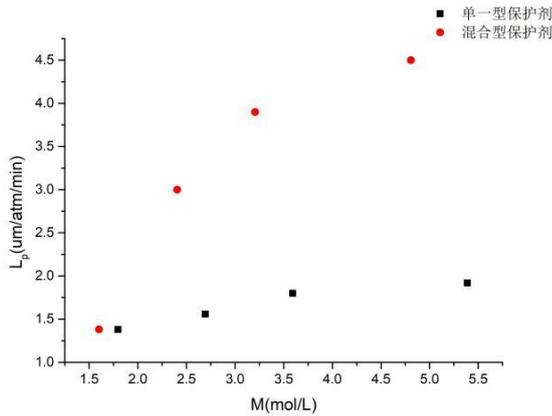


图 10 猪卵母细胞对不同保护剂的水渗透系数随保护剂浓度的变化规律

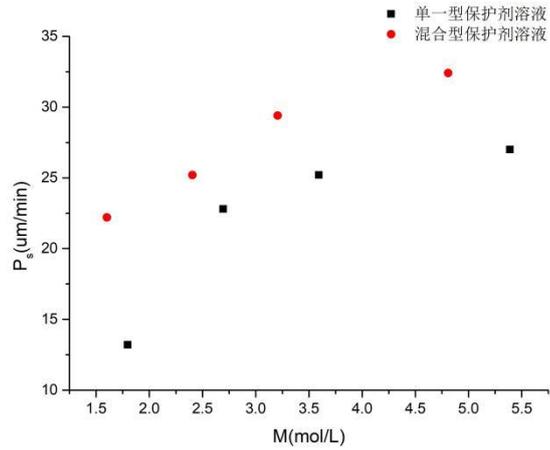


图 11 猪卵母细胞对不同保护剂的渗透系数随保护剂浓度的变化规律

2.5 渗透模拟及损伤评估

不同线型的加载方案中细胞体积变化的数值模拟结果如图 12 所示。一步添加由于初期浓度变化较快，体积变化也较快，而在后期呈稳固回升趋势，体积可恢复至原体积的 90% 左右。而凹型加载分两阶段进行，第一阶段浓度变化较小，体积变化值较小，而第二阶段保护剂浓度变化较快，使得细胞大幅度脱水，最终体积仅恢复至原体积的 80% 左右。S 型加载分三个阶段进行，第一、三阶段保护剂浓度变化缓慢，细胞体积变化平缓，而第二阶段保护剂浓度变化较快且时间较长，细胞脱水后缓慢恢复，并在第三阶段体积稳固回升，可回升至原体积的 90% 以上。

不同凹型的线性加载方案的细胞体积变化如图 13 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，体积变化极值也越来越大。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，而高凹组后期由于在短时间内保护剂浓度极速上升，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。

分步线性加载中细胞体积变化如图 14，可以看出，细胞体积变化起伏阶段数与加载步数相同，且步数越多，每阶段细胞体积变化的幅度越小，给细胞造成的胞内外渗透压差越小，最终的胞内水含量越小，利于后期的冷冻保存。

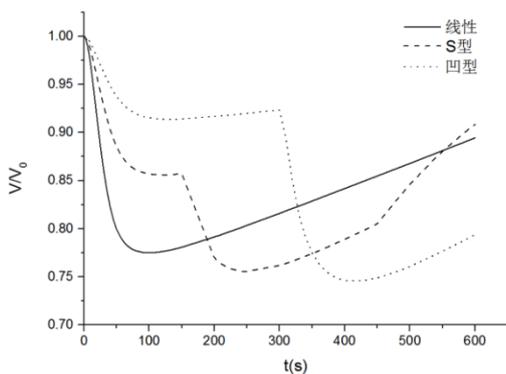


图 12 不同线型的线性加载方案的细胞体积变化

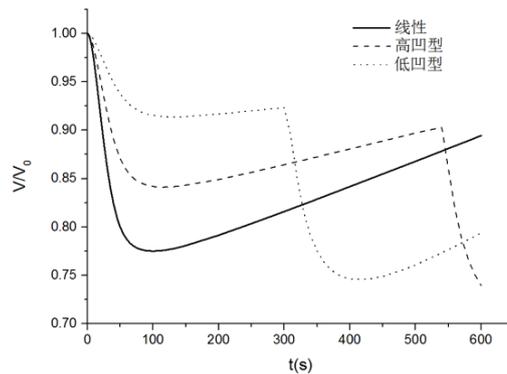


图 13 不同凹型的线性加载方案的细胞体积变化

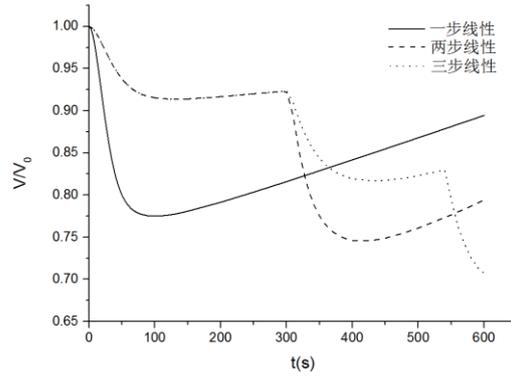


图 14 分步线性加载方案的细胞体积变化

分别计算不同加载组的体积变化极值，累积性渗透损伤及毒性损伤，得出结果如下：

对比不同线型的损伤系数（表 3），从一般线性加载法到凹型加载法，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。J 值在凹型线性加载时达到最小(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。

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，且变化较为平缓，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 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。

对于分步线性加载，所分步数越多， ΔV 越大，AOD 值和 J 值越小。此外，还可以看出从一步线性加载到三步线性加载，AOD 值有幅度为 24.2%的下降，而 J 值有 66.4%的下降，分步线性加载可显著减小细胞所受损伤。

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

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

表 5 分步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
一步线性	0.22	105.17	13.12
两步线性	0.26	93.27	7.73
三步线性	0.29	79.68	4.41

2.5 细胞实验结果

运用微流控芯片对M II期猪卵母细胞进行不同方案的低温保护剂加载实验，孤雌激活后统计卵裂率及囊胚率，统计结果如下：

表 6 不同线性加载方案的卵裂率和囊胚率

加载方法	卵裂率 (%)	囊胚率 (%)
新鲜	91.84±0.81	35.2±3.97
直线型	85.35±4.87	8.84±0.44
S型	82.58±7.98	3.33±5.77
凹型	83.69±1.62	16.31±1.62

从表 6 中可以看出，凹型线性加载的细胞卵裂率较其他三组细胞稍低，但其囊胚率仅次于新鲜细胞，高于直线性加载和 S 型加载。

经过不同凹型的线性加载，各方案的细胞卵裂率、囊胚率结果如表 7 所示。四种方案的细胞卵裂率相差不大，但其囊胚率却明显不同，其中，高凹型和低凹型线性加载的细胞囊胚率较直线型高，其中高凹型加载所得细胞囊胚率结果最优。

表 7 不同凹型线性加载方案的卵裂率和囊胚率

加载方法	卵裂率 (%)	囊胚率 (%)
新鲜	91.84±0.81	35.2±3.97
直线型	85.35±4.87	8.84±0.44
高凹型	82.32±0.87	23.48±4.73
低凹型	83.69±1.62	16.31±1.62

3 讨论

本文首先测量了猪卵母细胞在单一型保护剂及混合型保护剂中在不同浓度下对水及保护剂的渗透系数。据已有研究表明，添加 CPA 可以提高小鼠卵母细胞膜的水传导率^[24]，但具体的膜组分结构的改变还未见报道^[25]，另卵母细胞对 EG 及 Me₂SO 的 L_p 及 P_s 值相近^[1]，本文结果表明二者混合后细胞的 L_p，P_s 值显著增大，可能是两种物质混合后增强了溶液与细胞间的相互作用，使得水、保护剂进出细胞的阻力变小，渗透性增强，且随着保护剂的浓度增大，胞内外的渗透压差增强，保护剂和水进出细胞膜的驱动力变大，使得细胞膜渗透性增强。且 Kasai 等^[26]通过对小鼠胚胎的研究表明，EG 的毒性小于 Me₂SO，因此 EG 和 Me₂SO 联合使用毒性比 Me₂SO 单独使用时更低，减小保护剂对细胞的毒性损伤，同时对细胞的纺锤体有一定的保护作用，从而提高卵母细胞的低温保存效果^[27,28]。

本文首次提出高凹及低凹型加载，与直线型及 S 型加载相比，其优势在于细胞与高浓度 CPA 接触时间减小，使得细胞所受累积性渗透损伤及毒性损伤减小，虽然凹型加载时细胞的体积变化较大，但仍在细胞可承受的体积变化范围内，因此囊胚率远高于其它两组。Benson^[12]等人也提出，在细胞体积变化极值范围内，可优化其它因素如加载时间，以提高加载去除后细胞质量。另高凹型加载中细胞在高浓度阶段中的保护剂浓度变化较低凹型快，时间短，最终胞内水含量较低，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。而三步法是低凹及高凹的组合优化，包含二者共同的优点，减小了高浓度 CPA 的接触时间的同时，细胞体积分步下降，使得体积变化也减小，提高细胞质量。

4 结论

为了优化筛选保护剂的加载方案，减小对卵母细胞的损伤，本文首先进行了不同浓度的保护剂溶液加载猪卵母细胞实验，并结合了经典的两参数模型，研究了保护剂浓度的变化对猪卵母细胞渗透参数的影响；并在此基础上对不同线性、不同凹型加载方案进行渗透模拟，分别计算各方案的累积性渗透损伤及毒性损伤；并采集猪卵母细胞进行细胞实验，并统计各组加载方案所得卵母细胞卵裂率及囊胚率，得出以下结论：

(1)低温保护剂浓度越高，猪卵母细胞对水和保护剂的渗透系数越大；且细胞在混合型保护剂溶液中的 L_p，P_s 值比在单一型保护剂溶液中大，随保护剂浓度变化而变化的速率也更快。

(2)不同线型加载时，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；对不同凹型添加进一步计算，高凹型线性加载的AOD值和J值小于低凹型加载；三步线性加载是凹型加载的进一步优化，其AOD及J值为所有加载组中最小。

(3)细胞实验的结果表明，S型加载所得细胞的卵裂率及囊胚率均低于直线型及凹型加载，凹型加载的卵裂率略低于直线型加载，但其囊胚率远高于直线型加载，因此不同线型组中，凹型加载方案最优。对于不同凹型加载组，高凹型加载的卵裂率与低凹型加载相似，但高凹组的囊胚率显著高于低凹组。

采用混合性保护剂对细胞进行加载可提高细胞对水及保护剂的渗透能力，另高凹型加载可显著减小细胞在保护剂加载过程中所受累积性渗透损伤和毒性损伤，为日后设计卵母细胞低温保存中保护剂加载方式提供一种新思路。

符号说明：

V_c ——卵母细胞体积， m^3 ；

V_w ——卵母细胞胞内水的体积， m^3 ；

V_s ——卵母细胞胞内保护剂的体积， m^3 ；

V_b ——卵母细胞胞内非渗透体积， m^3 ；

V_{cpa} ——保护剂偏摩尔体积， m^3 ；

A ——卵母细胞截面面积， m^2 ；

M ——重量渗透浓度， $Osm/kg H_2O$ ；

R ——气体常数， $J/(mol \cdot K)$ ；

T ——温度， K ；

N_s ——卵母细胞胞内保护剂摩尔数， mol ；

L_p ——水渗透系数， $m/atm/s$ ；

P_s ——保护剂渗透系数， m/s ；

e ——胞外；

i ——胞内；

s ——保护剂；

t ——时刻， s ；

参考文献

- [1] 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.
- [2] Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, et al. Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre - implantation development and mRNA abundance[J]. Molecular Reproduction & Development, 2010, 75(3):538-546.
- [3] Elmoazzen H Y, Poovadan A, Law G K, et al. Dimethyl sulfoxide toxicity kinetics in intact articular cartilage[J]. Cell & Tissue Banking, 2007, 8(2):125-133.
- [4] Fahy G M, Wowk B, Wu J, et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity.[J]. Cryobiology, 2004, 48(3):22-35.
- [5] Wang X, Hua T C, Yang G H, et al. The Cryopreservation of a Tissue Engineered Dermal Replacement by Programmed Freezing[C]// IEEE Engineering in Medicine & Biology Conference. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2005:494.
- [6] Fu X W, Shi W Q, Zhang Q J, et al. Positive effects of taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes.[J]. Animal Reproduction Science, 2009, 115(1):158-168.

- [7] Fleming K K, Longmire E K, Hubel A. Numerical characterization of diffusion-based extraction in cell-laden flow through a microfluidic channel.[J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2007, 129(5):703.
- [8] Chen H H, Shen H, Heimfeld S, et al. A microfluidic study of mouse dendritic cell membrane transport properties of water and cryoprotectants[J]. *International Journal of Heat & Mass Transfer*, 2008, 51(23):5687-5694.
- [9] 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.
- [10] Wang J, Zhu K, Zhao G, et al. Correction: Dual Dependence of Cryobiological Properties of Sf21 Cell Membrane on the Temperature and the Concentration of the Cryoprotectant.[J]. *Plos One*, 2013, 8(8):e72836.
- [11] Agca Y, Liu J, Peter A T, et al. Cryoprotectant and water permeability of immature and in vitro matured bovine oocytes[J]. *Theriogenology*, 1997, 47(1):340-340.
- [12] 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):144-151.
- [13] LEIBO S P. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova [J]. *The Journal of Membrane Biology*, 1980, 53(3): 179-88.
- [14] HOFF J H V T. The role of osmotic pressure in the analogy between solutions and gases [J]. *Philosophical Magazine*, 1972, 100(159): 39-44.
- [15] GUTI RREZ A M, GONZ LEZ E, ECHEVARR A M, et al. The proximal straight tubule (PST) basolateral cell membrane water channel: Selectivity characteristics [J]. *The Journal of Membrane Biology*, 1995, 143(3): 189-97.
- [16] KEDEM O, KATCHALSKY A. Thermodynamic analysis of biological membranes to non-electrolytes [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1989, 1000(1000): 413-30.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] JACOBS M H. The simultaneous measurement of cell permeability to water and to dissolved substances (pages 427–444) [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1933, 2(4): 427-44.
- [20] KLEINHANS F W. Membrane Permeability Modeling: Kedem–Katchalsky vs a Two-Parameter Formalism [J]. *Cryobiology*, 1998, 37(4): 271-89.
- [21] 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 [J]. *Cryobiology*, 1999, 38(3): 200-8.
- [22] FABBRI R. Cryopreservation of Human Oocytes and Ovarian Tissue [J]. *Cell & Tissue Banking*, 2006, 7(2): 113-22.
- [23] WANG X, DW A N A, LONERGAN P. Membrane permeability characteristics of bovine oocytes and development of a step-wise cryoprotectant adding and diluting protocol [J]. *Cryobiology*, 2010, 61(1): 58.
- [24] Pfaff R T, Liu J, Gao D, et al. Water and DMSO membrane permeability characteristics of in-vivo- and in-vitro-derived and cultured murine oocytes and embryos[J]. *Molecular Human Reproduction*, 1998, 4(1):51-9.
- [25] Paynter S J, Fuller B J, Shaw R W. Temperature Dependence of Kedem–Katchalsky Membrane Transport Coefficients for Mature Mouse Oocytes in the Presence of Ethylene Glycol ☆[J]. *Cryobiology*, 1999, 39(2):169.
- [26] Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos.[J]. *Journal of Reproduction & Fertility*, 1981, 63(1):175-80.
- [27] 裴燕, 索伦, 王亮,等. 乙二醇及二甲基亚砷对小鼠卵母细胞冷冻后纺锤体及孤雌激活后发育能力的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(5):13-16.
- [28] Mahmoud K G, Scholkamy T H, Ahmed Y F, et al. Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods.[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2010, 45(4):565-571.