

文章编号:0253 – 4339(2014) 01 – 0114 – 05
doi:10. 3969/j. issn. 0253 – 4339. 2014. 01. 114

纳米低温保护剂提高卵母细胞玻璃化保存效果的机理初探

李维杰 周新丽 吕福扣 刘宝林

(上海理工大学生物热科学研究所 上海 200093)

摘 要 纳米颗粒添加到低温保护剂中可能是未来低温保存的重要手段。采用添加了羟基磷灰石(HA)纳米颗粒的低温保护剂冷冻卵母细胞,使用低温显微镜观察了结晶、再结晶和融化时冰晶的形态和细胞的变化,同时记录各现象发生的温度。发现添加 0.05% HA 组在升温过程中再结晶不明显,且再结晶危险区较小,对细胞无损伤;而未添加 HA 组细胞在复温过程中受伤几率很高。结果表明纳米颗粒减少了复温过程中的再结晶可能是纳米低温保护剂提高细胞存活率的主要机理之一。

关键词 低温生物;重结晶;低温显微镜;纳米低温保护剂

中图分类号:TB61⁺1;TB383 **文献标识码:**A

Preliminary Study on the Mechanism of Promoting the Survival Rate of
Vitrified Oocytes with Nano-cryoprotectants

Li Weijie Zhou Xinli Lü Fukou Liu Baolin

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

Abstract Adding nanoparticles into cryoprotectant may be an important means of cryopreservation in future. The oocytes were cryopreserved using cryoprotectant containing hydroxyapatite (HA), and the morphology of crystal and oocytes in the process of crystallization, recrystallization and thawing were observed using cryomicroscope system. In the mean time, the temperatures were recorded when every phase change occurred. It is found that cryoprotectant with 0.05% HA recrystallized implicitly with narrow danger zone during rewarming and hence little harm was done to oocytes. In contrast, the group without any HA nanoparticles tended to get harmed. In conclusion, the mechanism that nano-cryoprotectant promoted the survival rate of oocytes was that nanoparticles hindered the recrystallization of cryoprotectant in the process of rewarming.

Keywords cryobiology; crystallization; cryomicroscope; nano-cryoprotectant

卵母细胞是动物的重要生殖细胞,卵母细胞长期保存对人类辅助生殖和保存濒危物种有积极作用。一般认为,低温可以降低生物体的新陈代谢,抑制生物酶活性,延长保存时间,理论上在液氮温度下卵母细胞可以保存几个世纪^[1]。但是由于卵母细胞自身体积大,含水量高,冷冻过程中易产生大量冰晶,影响存活率。为此研究人员发明了 Cryotop^[2]、开放式麦管法、冷冻环法、微滴法、电镜铜网法,目的是通过减少卵母细胞周围冷冻保护液的总体积,提高降温速率,实现卵母细胞玻璃化保存。尽管各种新方法的应用实现了卵母细胞的玻璃化或者部分玻璃化,但是卵母细胞复温后的存活率依然不理想^[3]。

为了突破制约当前低温保存的技术瓶颈,近年来出现了将纳米技术与低温工程学相结合的低温保存

策略——纳米低温保存。具有生物相容性的纳米颗粒,由于自身体积小(1~100nm),具有小体积效应,加入适量的纳米颗粒到低温保护剂中,可以起到强化传热^[4],促进异相成核的作用,防止过冷,控制冰晶尺寸。课题组开展了卵母细胞纳米低温保存的实验研究,当低温保护剂中添加浓度 0.1% 粒径 20nm 或 40nm 的 HA 纳米颗粒,采用 Cryotop 法冷冻猪 MII 期卵母细胞时,可以使存活率从 71% 提高到约 83%。当添加浓度 0.05% 粒径 60nmHA 的纳米颗粒到低温保护剂中并采用 Cryotop 法冷冻猪 GV 期卵母细胞时,发育率从 14.7% 提高到 30.4% (实验结果已另文发表),保护剂中添加 HA 纳米颗粒可以提高卵母细胞玻璃化保存效果,但是其相关机理还不清楚。

Seki 等^[5]认为,不理想的复温过程会造成玻璃化

的细胞及其周边冷冻保护液发生再结晶现象,这对细胞的损伤不亚于甚至超越冷冻过程中产生冰晶的危害。减少玻璃化冷冻液复温过程的再结晶的方法有以下两种^[6]:一是提高复温速率,使得玻璃化的冷冻保护液迅速通过容易再结晶的危险温度区直接转化为液态,二是改变冷冻保护液配方,减少复温过程中的再结晶。推测纳米颗粒的添加可能是因为减少了复温过程中的再结晶,从而提高了卵母细胞的玻璃化保存效果。因此,使用添加了羟基磷灰石(HA)纳米颗粒的玻璃化冷冻液冷冻卵母细胞,使用低温显微镜观察其在快速降温 and 快速升温过程中,结晶、再结晶和融化时冰晶的形态和细胞的变化,同时记录各现象发生的温度。试图证明纳米颗粒通过减少复温过程中的再结晶提高卵母细胞玻璃化保存效果的推测。

1 材料与方法

1.1 细胞培养设备

BC-J160S CO₂ 培养箱:上海博讯实业有限公司,中国;YDS-35-20 液氮罐:东亚压力容器,中国;SW-CJ-1CU 超净工作台:松泰净化科技有限公司,中国。

1.2 主要试剂

实验中所用的试剂除特别说明外,均来自美国 Sigma 公司。TCM199 培养液,磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution, PBS),胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS):Gibco 公司,美国。60nm HA 纳米颗粒:南京欧瑞纳米科技有限公司,中国。

基础液:TCM199 + 20% FBS;预平衡液:基础液 + 8% Me₂SO + 8% 乙二醇(Ethylene Glycol, EG);玻璃化冷冻液(vitrification solution, VS):基础液 + 15% Me₂SO + 15% EG + 0.5 mol/L 蔗糖;0.5% HA 玻璃化冷冻液:VS + 0.5% HA;0.05% HA 玻璃化冷冻液:VS + 0.05% HA。

1.3 猪卵母细胞的采集及 M II 期卵母细胞的获得

卵巢采集于上海市长宁区复兴屠宰场。在猪屠宰后立即取卵巢组织,将采集的猪卵巢放入含 1000 μg/mL 双抗生理盐水中(35 ~ 37 °C),2 h 内运回实验室。用 95% 酒精对卵巢表面进行喷洒消毒,再用灭菌的生理盐水洗涤 2 ~ 3 次。选择直径为 2 ~ 8 mm 的卵泡,使用带有大号针头、20 mL 的一次性注射器(注射器中装有少量的 TCM199)将卵母细胞复合体连同卵泡液一起吸出。将抽出的卵泡液置于 50mm 的培养皿中,在 39 °C 恒温台上静放 10 min,移除上清液。取有 3 层以上卵丘细胞包裹且胞质均匀

的卵丘卵母细胞复合体进行成熟培养。

经洗涤后的卵丘卵母细胞复合体放入在培养箱内已平衡 4 h 以上的成熟液(TCM199 + 10% FBS + 10% 猪卵泡液 + 激素)中,成熟培养 42 h。成熟培养后的卵母细胞净透明质酸酶消化以去除卵丘细胞,用 TCM199 洗 3 ~ 5 遍备用。

1.4 不同实验组低温显微镜观察前处理

TCM 199 组:挑选成熟的且形态完好的 M II 期卵母细胞加载到 TCM199 中洗涤 3 次,备用。

VS 组:将成熟且形态完好的 M II 期卵母细胞在预平衡液中平衡 3min 后,移至玻璃化冷冻液中平衡 1min,用玻璃化冷冻液洗涤 3 次,备用。

VS + 0.5% HA 组:将成熟且形态完好的 M II 期卵母细胞在预平衡液中平衡 3min 后,移至 0.5% HA 玻璃化冷冻液中平衡 1min,用 0.5% HA 玻璃化冷冻液洗涤 3 次,备用。

VS + 0.05% HA 组:将成熟且形态完好的 M II 期卵母细胞在预平衡液中平衡 3min 后,移至 0.5% HA 玻璃化冷冻液中平衡 1min,用 0.05% HA 玻璃化冷冻液洗涤 3 次,备用。

1.5 低温显微系统

实验中使用的低温显微镜系统由 BCS196 生物冷冻台、T95 程序温度控制器、Linksys 32 温度控制软件、自动冷却系统(Linkham Scientific Instruments Limited, UK),以及 BX51TRF 显微镜(Olympus, Japan)组成。该系统通过控制样品台的加热和液氮流量调节升降温速度,可以在 -196 °C ~ 125 °C 范围内,以 0.01 ~ 150 °C/min 的速率实现样品的冷冻及复温。低温载物台置于显微镜物镜下,通过显微镜系统可以直接观察和摄录实验样品在冷冻、复温过程中的冰晶形态变化以及溶液的相变过程,也可以通过系统自带的 CCD 摄像头采集图像并由计算机实时显示。

1.6 升降温过程的显微观察

取 10 μL 各组的溶液连同 3 ~ 5 枚形态完好的卵母细胞滴加到低温显微镜配套的石英皿上,调整视野,使视野中至少有一枚卵母细胞。采取 100 °C/min 的降温速率降温至 -190 °C,保持 5min,然后以 100 °C/min 的速度升温至 25 °C,记录升降温过程中溶液和细胞的形态变化,以及变化时刻对应的温度。

2 结果与讨论

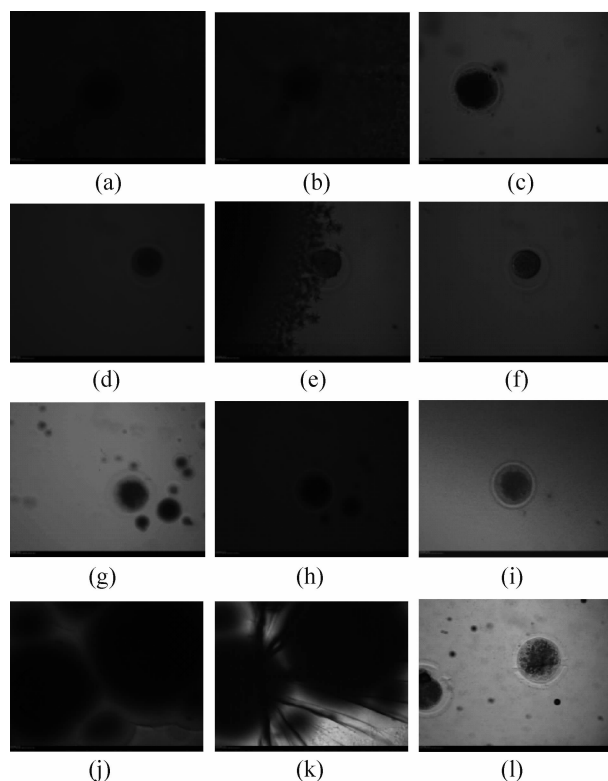
2.1 不同溶液结晶、再结晶、融化的显微图像

图 1 代表了不同溶液在降温 and 升温过程中冰晶形态和冰晶对细胞的影响。图 1(a)为细胞在

TCM199 降温过程中的结晶形态,由于溶液中不含保护剂成分,溶液结晶严重,由于冰晶方向各异性,造成折光率各不相同,因此透光性差,在显微镜视野中发黑。图 1(b)代表了升温过程中冰晶长大的情况,由于冰晶分别从多个面开始长大,当两界面相交的时候就形成了裂痕,该裂痕可以撕裂细胞。图 1(c)代表 TCM199 溶液融化后细胞形态,可见细胞壁被撕裂了 3 个裂口(红圈标示部分),对应图 1(b)中的三道裂痕,可见不加保护剂是难以保存卵母细胞的。

图 1(d)为 VS 组在降温过程中的结晶形态,可以看到因为降温速度快,溶液浓度高,发生了完全玻璃化现象,即使在 -190°C 的温度下也未出现结晶,可见 VS 组降温过程中确实没有对细胞损伤。但是升温过程中却出现了再结晶现象,如图 1(e)所示,结晶从视野的左侧开始,一直向右侧生长,且结晶前沿具有很明显的凌状——棱角分明,如果扎到细胞上会对细胞造成伤害,所幸由于升温速度快,冰在生长到视野一半,接触到细胞表面后迅速融化掉,没有继续生长,该实验曾重复一次,另一次冰晶从上往下推进,且没在细胞附近出现,但冰晶范围占视野总范围基本保持在 50% 左右,为了展示该过程对卵母细胞的威胁,特意选取具有代表性的本图片。通过图像分析软件分析,本次再结晶区域占视野总面积的 57.1%,因此对细胞的伤害几率还很高。图 1(f)为 VS 组融化后细胞形态,细胞壁没有明显的伤害。可见 VS 对于细胞冷冻确实有保护作用,但复温过程中,有一定的概率伤害细胞,提高升温速率可以降低伤害的概率,但是受到实验条件的制约,不能无限制提高升温速率。因此在实际的细胞保存中,卵母细胞的保存效果一直不理想。

对于 VS + 0.05% HA 组,降温过程中,如图 1(g)出现了少量冰晶,这是由于 HA 纳米颗粒具有很强的异相成核作用,能加速冰晶成核,但是由于含量少,且 VS 浓度高,成核推动力不足以将所有溶液都成核,最终玻璃化仍然占主导地位,通过图像分析软件分析,视野中冰晶的比例只占总 3.9%,且冰晶本身尺寸较小,对细胞伤害小,因此降温过程只有很小的几率受到冰晶伤害。升温过程如图 1(h),并未发现明显的冰晶长大过程。这可能是分散在溶液中的纳米颗粒首先诱发成核,由于溶液中的晶核数量众多且分散均匀,所以冷冻保护液的液滴中均匀出现无数细碎的晶体,但尺寸小不具备刺穿细胞的能力,同时升温速度快,融化速度大于生长速度,未形成对细胞构成威胁的大冰晶就融化了。融化后的细胞形态如图 1(i),结构完整,细胞质均匀,可见 VS + 0.05%



(a) ~ (c) 分别表示细胞在 TCM199 溶液中,结晶、再结晶及最后融化时的图像;(d) ~ (f) 分别表示细胞在 VS 溶液中,玻璃化、再结晶及最后融化时的图像;(g) ~ (i) 分别表示细胞在 VS + 0.05HA 溶液中,部分玻璃化、再结晶及最后融化时的图像;(j) ~ (l) 分别表示细胞在 VS + 0.5HA 溶液中,结晶、再结晶及最后融化时的图像

图 1 不同实验组在冷冻和复温过程中
冰晶形态和卵母细胞的显微图像

Fig. 1 The micro-images of crystals and oocytes in different solutions during freezing and rewarming

HA 组有利于卵母细胞低温保存。

当纳米颗粒添加量增加到 0.5% 时,降温过程如图 1(j),由于添加的纳米颗粒过量,异相成核过程也过于强烈,结晶推动力远大于玻璃化能力,造成了视野中大部分区域被结晶覆盖,显然对细胞有危害。在升温过程中,如图 1(k),由于结晶在升温过程中体积会发生变化,变化并不均匀,不同结晶之间存在应力,相互挤压收缩,形成大冰壑,可能对细胞有较大伤害,细胞表面出现许多裂口。融化后,如图 1(l),两枚细胞均发生严重变形,细胞膜破裂,细胞质散乱,可见添加过量的纳米颗粒不仅不能保护细胞,还会造成更大伤害。

玻璃化或者部分玻璃化的溶液在复温过程是冰晶融化和再结晶同时发生的过程,较小的冰晶的吉布斯自由能高^[5],稳定性差,而较大的冰晶则相反,其自由能低,稳定性高,吉布斯自由能趋向于由

高到低。升温过程中,冰晶获得外界的热量,处于亚稳态,部分小冰晶开始融化,未融化的小冰晶具有吸附溶液的趋势,生长成为自由能较低的大冰晶,这个过程就是复温过程中的再结晶^[5, 7]。加入纳米颗粒之后,复温过程的再结晶更加复杂,但依然受吉布斯自由能降低的原理驱使,但是当冰晶的生长界面碰到纳米颗粒,由于得不到溶液补充,再结晶的冰晶尺寸就受到很大限制,没有大冰晶的伤害,卵母细胞的存活率就会提高。

2.2 不同溶液对结晶温度和再结晶温度的影响

在对不同组进行快速冷冻和复温过程中,同时记录了四种溶液结晶开始温度、再结晶开始温度、冰晶完全消除温度,如表 1 所示。TCM199 冰晶出现的温度最高,为 -20.4℃,这是由于溶质浓度较低造成的。含有 VS 的组别温度相对较低,VS 组由于玻璃化效果好,降温段未出现明显的冰晶,而添加了 HA 纳米颗粒组由于纳米颗粒的异相成核作用,均出现了冰晶,且纳米颗粒含量越高出现冰晶的温度越高^[8]。由于 TCM199 和 VS + 0.5% HA 组在降温过程中结晶比较严重,导致溶液折光率变化,且升温过程中再结晶不明显,所以再结晶开始温度无法观察。当 TCM199 达到 5.8℃ 时,结晶才完全融化,而含有 VS 组都比其低。含有 VS 组中,结晶温度同 HA 含量有关,HA 浓度越高,融化温度越高,这可能是 HA 纳米颗粒可以吸附周围的溶液^[9],降低其自由能,从而升高了融化温度。冰晶完全消除温度与再结晶开始温度之差即为再结晶危险区间,由于在该温度区间中原本玻璃化或部分玻璃化的冷冻保护液会再次产生冰晶,造成细胞危害,因此该区域越小,越容易通过快速升温的方法通过该区域。添加了 0.05% HA 的 VS 的再结晶危险区 (41.7℃) 比 VS 组的再结晶危险区 (56.6℃) 窄,更有利于细胞保存。

表 1 不同溶液对结晶温度和再结晶温度的影响
Tab.1 The effect of different solutions on temperature of crystallization and recrystallization

实验组	冰晶出现温度 /℃	再结晶开始温度 /℃	冰晶完全消除 温度/℃	再结晶危险区 间/℃
TCM 199	- 20. 4	-	5. 8	-
VS	-	- 88. 0	- 31. 4	56. 6
VS + 0. 05% HA	- 67. 2	- 66. 5	- 24. 8	41. 7
VS + 0. 5% HA	- 56. 9	-	- 19. 2	-

3 结论

添加 0.05% HA 组在升温过程中再结晶不明显,且再结晶危险区较小,对细胞无损伤;而未添加 HA 组细胞在复温过程中受伤几率很高。玻璃化保存是一个有效的细胞保存手段,复温过程中再结晶是一个影响细胞存活率的重要环节,不恰当的复温过程都可能引起再结晶,导致致命的细胞损伤^[10]。实际上,添加纳米颗粒还可能减少溶液的结晶总量,提高溶液的导热系数,都有可能减少细胞损伤,提高存活率,因此纳米低温保存的机理还有待更多的探讨。

本文受上海教委科研创新项目 (14YZ098) 资助。(The project was supported by the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (No. 14YZ098).)

参考文献

[1] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术 [M]. 科学出版社, 1994:23-67.

[2] Cobo Ana, Domingo Javier, Perez Sonia, et al. Vitrification: An effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients [J]. Clinical & Translational Oncology, 2008, 10(5): 268-273.

[3] Gook Debra A. History of oocyte cryopreservation [J]. Reproductive biomedicine online, 2011, 23(3): 281-289.

[4] 刘宝林, 华泽钊. 冻结食品的玻璃化保存[J]. 制冷学报, 1996, 17(1): 26-31. (Liu Baolin, Hua Zezhao. The glassy state storage of frozen food[J]. Journal of Refrigeration, 1996, 17(1): 26-31.)

[5] Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice [J]. Biology of Reproduction, 2008, 79(4): 727-737.

[6] Check J H. Advances in oocyte cryopreservation - part i: Slow cool rapid thaw technique [J]. Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology, 2008, 35(4): 237-239.

[7] Seki S, Mazur P. Kinetics and activation energy of recrystallization of intracellular ice in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling[J]. Cryobiology, 2008, 56(3): 171-180.

[8] Lv Fukou, Liu Baolin, Li Weijie, et al. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on devitrification of peg-600 cryoprotectant [C]//2012 international conference on future energy, environment, and materials, 2012:796-801.

[9] 何钦波, 童明伟, 刘玉东. 低温相变蓄冷纳米流体成核过冷度的实验研究 [J]. 制冷学报, 2007, 28(4): 33-36. (He Qinbo, Tong Mingwei, Liu Yudong. Experimental Study on Super- cooling Degree of Nanofluids for Cryogenic

Cool Storage[J]. Journal of Refrigeration, 2007, 28(4): 33-36.)

[10] Jondet M, Dominique S, Scholler R. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte [J]. Cryobiology, 1984, 21(2): 192-199.

作者简介
李维杰(1983 -),男,博士,讲师,上海理工大学医疗器械与食

品学院,021 - 55270702, E-mail: liweijie10@ 139. com。研究方向:生物材料低温保存。

About the author
Li Weijie(1983 -), male, Ph. D., Lecturer, School of medical instrument and food engineering, Univercity of Shanghai for Science and Technology, 021 - 55270702, E-mail: liweijie10@ 139. com. Reserach fields: Cryopreservation of biomaterials.

(上接第 57 页)

[8] 缪道平,吴业正. 制冷压缩机[M]. 北京:机械工业出版社,2001:131-133.

[9] G·戈里,朱学章,金慧珠,等译. 汽车交流发电机[M]. 北京:人民交通出版社,1987:100-113.

[10] Zisheng Lu, Ruzhu Wang, Zaizhong Xia, et al. Experimental investigation adsorption chillers using micro-porous silica gel-water and compound adsorbent-methanol [J]. Energy Conversion and Management, 2013, 65: 430-437.

通信作者简介
王丽伟,女(1973 -),教授,上海交通大学制冷与低温工程研

究所,(021) 34208038, E-mail: lwwang@ sjtu. edu. cn。研究方向:吸附式制冷与热功转换、传热传质强化、热驱动的热力循环。

About the corresponding author
Wang Liwei (1973 -), female, professor, Institute of Refrigeration and Cryogenics, Shanghai Jiao Tong University, (021) 34208038, E-mail: lwwang@ sjtu. edu. cn. Research fields: adsorption refrigeration and electricity generation, heat and mass transfer intensification, the thermodynamic cycle driven by the thermal energy.