

文章编号:0253-4339(2020)02-0152-07

doi:10.3969/j.issn.0253-4339.2020.02.152

微滴喷射玻璃化的过程损伤分析及保护剂优化

彭 涪 张宵敏 周新丽

(上海理工大学生物热科学研究所 上海 200093)

摘 要 微滴喷射玻璃化保存系统产生的微滴尺寸较小,在较低浓度的低温保护剂条件下即可实现玻璃化。本文采用微滴喷射玻璃化保存系统对 HepG2 细胞进行玻璃化保存,研究保护剂加载过程、喷射过程、接收过程及玻璃化/复温过程对细胞造成的损伤程度,并通过降低保护剂中 Me_2SO 浓度、添加适量海藻糖来优化保护剂配方。结果表明,微滴喷射玻璃化保存各过程对细胞均有损伤,保护剂加载过程、喷射过程、玻璃化及复温过程对细胞造成的损伤较大,薄片接收过程对细胞造成的损伤小。另外,随着保护剂中 Me_2SO 浓度的降低,低温保存后的细胞活性明显降低;保护剂浓度相同时,玻璃化保存效果较慢速冷冻效果好;适量的海藻糖能够起到增强低温保存效果的作用,过量则起到降低作用;以 5% Me_2SO +0.3 mol/L 海藻糖作为低温保护剂玻璃化保存细胞时,细胞存活率达(92.42±0.95)%,24 h 贴壁率达到(95.64±1.03)%,微滴喷射玻璃化效果最好。

关键词 微滴喷射;玻璃化;过程损伤;保护剂优化

中图分类号:TB61⁺1;R318.52

文献标识码:A

Process Damage Analysis and Cryoprotectant Optimization for Micro-droplet Spray Vitrification

Peng Tian Zhang Xiaomin Zhou Xinli

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

Abstract Micro-droplet spray vitrification system produces small droplets and can be vitrified at a lower concentration of cryoprotectant (CPA). In this study, HepG2 cells were vitrified using micro-droplet vitrification system; moreover, damages caused by CPA loading, spraying, receiving, and vitrification/rewarming processes were evaluated. In addition, CPA formulations were optimized by reducing the Me_2SO concentration and adding an appropriate amount of trehalose. The results showed that each step in micro-droplet spray vitrification may cause damage to the cells. CPA loading, spraying, vitrification and rewarming processes caused severe damages, but mild damages were caused by the sheet receiving process. Cell activities after cryopreservation are significantly reduced with a decrease in the Me_2SO concentration. When the CPA formulations are constant, cell activities in the vitrification group become better than those in the slow freezing group. Moderate amounts of trehalose can enhance the effect of cryopreservation, while excessive trehalose can be counteractive. When cells were preserved with 5% Me_2SO + 0.3 mol/L trehalose as a cryoprotectant, the cell survival rate reached (92.42±0.95)% and the 24 h adherence rate reached (95.64±1.03)%; therefore, the droplet spray vitrification effect was found to be the best.

Keywords micro-droplet spray; vitrification; process damages; cryoprotectant optimization

玻璃化能避免细胞内外冰晶的形成,近年来在低温保存领域备受关注。实现玻璃化有两种方法,一种是提高防冻剂(cryoprotectant, CPAs)浓度,另一种是提高冷却速率。添加高浓度 CPAs 会对细胞造成渗透损伤及毒性损伤^[1],具有较大的局限性。提高降温速率可通过两条途径:一是提高传热系数,如将液滴直接喷入液氮中或优化载体传热特性;二是通过降低微滴体积提高降温速率,即最小体积法玻璃化保

存。研究显示,当微滴尺寸降低到 0.1 μL 时,微滴降温速率从表面到中心可超过 10^5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ ^[2-3],能成功实现玻璃化。

微滴喷射玻璃化是通过降低微滴体积实现玻璃化的一种方法。它利用喷嘴装置将含有细胞的悬浮液离散成足够小的微滴并喷入液氮中,由于降温速率明显提高而实现玻璃化。微滴喷射玻璃化可以分为保护剂加载过程、喷射过程、接收过程及玻璃化/复温

过程。U. Demirci 等^[4-7]曾提出采用声学驱动微机械喷射器产生液滴,该装置产生的微滴尺寸微小,但不足之处是当喷射液体浓度增大时易导致喷嘴堵塞。随后,U. Demirci 等^[8]又提出一种开放式无喷嘴喷射系统,该装置每秒可生成 10 000 个微滴,具有高流量特点。由于该装置是开放式聚焦,声波不宜形成径向耦合,因此不利于稳定喷射。J. Samot 等^[9]提出的纳升级喷射微滴玻璃化保存系统,利用氮气流将含有细胞的悬浮液于喷嘴处形成微滴,薄膜接收后放入液氮中进行玻璃化,冷却速率超过 10^5 °C/min,是塑料麦管冷冻速率的 40 倍。

虽然液滴体积的减小大大提高了冷冻速率,但是采用微滴喷射系统玻璃化保存细胞时,各过程均有可能对细胞造成损伤。保护剂加载过程中,高浓度的低温保护剂会引起细胞毒性和渗透损伤;喷射过程中,随着氮气流速增大,氮气流对细胞的剪切力也随之加大,容易对细胞造成机械性损伤;接收过程中,随着接收距离增大,微滴拥有的势能增大,转化的动能便增大,由此造成的薄片接触性损伤就越大;复温过程中,易形成冰晶,冰晶会对细胞造成损伤。J. Samot 等^[9]以血细胞进行玻璃化实验,结果发现,在喷射和玻璃化/复温过程中,由冻融和剪切应力引起的溶血百分比分别为 2%~8%和 5%~17%,保护剂加载步骤导致溶血的百分比较小,占总溶血率 20%中的 2%。因此,有必要对微滴喷射玻璃化过程中的损伤进行分析,并针对主要损伤环节进行工艺优化,进一步提高该方法的效率。

另一方面,降温速率的提升使降低玻璃化保存时所需的保护剂浓度成为可能。 Me_2SO 是一种常用的渗透性保护剂,是首选的低温保护剂,但是对细胞有一定的毒性,直接输入人体内有副作用^[10-12]。因此,希望降低保护剂中 Me_2SO 浓度来减小 Me_2SO 对细胞造成的毒性损伤。海藻糖作为一种非渗透性保护剂,具有替代水分子与极性残余氢键结合以及参与细胞质中玻璃态基质形成的能力,可以稳定细胞膜、保护蛋白质结构,阻止冻结和脱水对细胞造成的损伤,大大提高细胞的存活率^[13]。因此,在低温保护剂中添加适量海藻糖有助于提高低温保存效果^[14-19]。当 Me_2SO 浓度降低时,可在保护剂中添加适量海藻糖,来提高低温保存效果。

本文采用微滴喷射玻璃化保存系统对 HepG2 细胞进行喷射实验,研究保护剂加载过程、喷射过程、薄片接收过程、玻璃化及复温过程对细胞造成的损伤程度。通过降低保护剂中 Me_2SO 浓度,添加适量海藻糖来优化保护剂配方,并将慢速冷冻法与微滴喷射玻

璃化保存效果进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

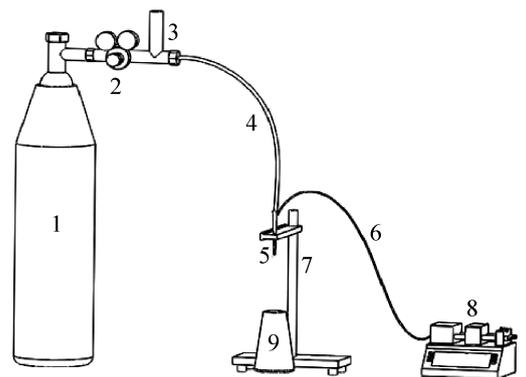
实验材料包括: HepG2 细胞、胎牛血清 FBS、DMEM 细胞培养基、胰酶、D-hanks 液、台盼蓝染色液(2X)、二甲亚砜(Me_2SO)、海藻糖。

实验设备包括:二氧化碳培养箱、程序降温盒、超低温冰箱、光学显微镜、微滴喷射玻璃化系统。

溶液配置: Me_2SO 按体积分数(v/v)配制,单位为%,海藻糖按物质的量浓度配制,单位为 mol/L。

1.2 微滴喷射玻璃化保存系统

图 1 所示为微滴喷射玻璃化保存系统装置。系统包括氮气流输送装置、细胞悬浮液注射装置、喷嘴、收集装置等部分。氮气流输送装置由氮气瓶提供氮气流,流量计调节氮气流速,双表头减压器调节氮气出口压力。悬浮液注射装置由微注射泵推动微注射器,注射细胞悬浮液,微注射器出口端选用内径为 0.16 mm 的平口针头,平口针头出口端连接内径 0.3 mm 的聚四氟乙烯管,输送细胞悬浮液。喷嘴由 200 μL 的移液器枪头和内径为 0.26 mm/0.16 mm 的尖口针头制作而成,如图 2 所示,将移液器枪头尖端切去 2 mm 后,用针头从距枪头尖端 2 cm 处侧面插入,直至针头露出枪头尖端 2 mm。接收装置采用的是直径为 90 mm 的聚乙烯薄膜。



1 氮气罐;2 双表头减压阀;3 流量计;4 氮气输出管;5 喷嘴;
6 悬浮液输送管;7 铁架台;8 泵送装置;9 薄片接收装置。

图 1 微滴喷射玻璃化保存系统装置

Fig.1 The micro-droplet spray vitrification system device

微滴喷射系统玻璃化的工作过程:将细胞悬液加载好相应浓度的低温保护剂装入注射器,注射器固定在微注射泵上,微注射泵以恒定的速度推进细胞悬浮液,于喷嘴处即可形成稳定的细胞悬液。然后打开氮气罐阀门,调节氮气出口压力到固定值,通过流量计显示及调节氮气流速。此时,氮气流和含有细胞的悬

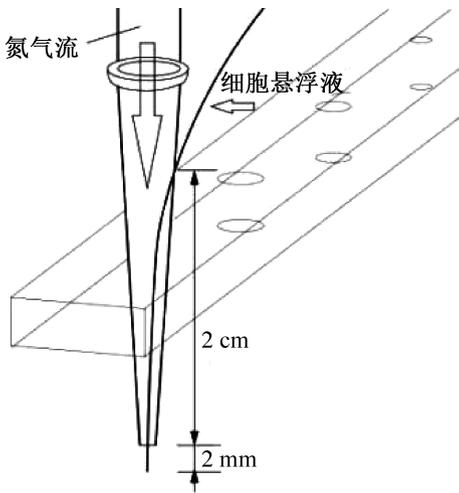


图 2 共流原理形成微滴的放大图

Fig.2 Enlarged view of droplet formation by co-flow principle

浮液构成共流,在细胞悬液的分子挤压及氮气流剪切的机械力作用下,于喷嘴处形成微滴。产生的微滴直接喷到塑料薄片上,然后将薄片迅速浸入液氮,实现玻璃化。

1.3 细胞冷冻方法

采用微滴喷射系统对已加载好 CPAs 的 HepG2 细胞进行微滴喷射玻璃化实验。张宵敏^[20]对喷射后的微滴尺寸以及 HepG2 细胞存活率进行评价,确定了最佳喷射参数为:内径为 0.16 mm 的针头作喷嘴,氮气流量为 3.2 L/min,悬浮液注射速度为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$,薄片接收位置为距喷嘴 6 cm 处。微滴喷射后用直径为 90 mm 的圆形塑料薄片接收,单个薄片接收时间为 5 s。然后将薄片迅速浸入液氮玻璃化。取出薄片,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养基复温,并用培养基将细胞洗脱下来。离心管收集洗脱液,离心弃上清,重悬细胞,测量细胞存活率及 24 h 贴壁率。

慢速冷冻法:细胞加载相应浓度的低温保护剂,移入 2 mL 冻存管,冻存管放入程序降温盒中,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱中冻存一周。取出后,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴复温,测量细胞存活率及 24 h 贴壁率。

1.4 细胞活性判断方法

1.4.1 台盼蓝染色计算细胞存活率

台盼蓝染料可以穿过损伤/死亡细胞的细胞膜,与已解体的 DNA 结合,并使其上色;活细胞则能够阻止台盼蓝染料进入细胞内。具体操作方法是:吸取 100 μL 重悬的细胞到离心管内,加入 100 μL 台盼蓝染色液(2X),混合均匀,染色 3 min。再吸取 10 μL 经过染色后的细胞悬液,用血细胞计数板计数,然后按式(1)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{细胞总数} - \text{蓝色细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.2 24 h 贴壁率

将细胞放入 CO_2 培养箱培养 24 h 后,用离心管收集上清液,用 2 mL 的 D-hanks 清洗两次并收集清洗液,离心,弃上清液,加 1 mL 培养基重悬细胞,所得为未贴壁细胞。贴壁细胞用胰酶消化下来,装入离心管中离心,去上清液,将细胞沉淀重悬至 1 mL,用细胞计数板计数。按式(2)计算细胞 24 h 贴壁率:

$$24 \text{ h 贴壁率} = \frac{\text{贴壁细胞数}}{\text{贴壁细胞数} + \text{未贴壁细胞数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.5 微滴喷射玻璃化各过程的损伤分析

采用微滴喷射系统对 HepG2 细胞进行玻璃化保存实验,研究保护剂加载过程、喷射过程、薄片接收过程、玻璃化及复温过程对细胞造成的损伤程度。通过细胞活性来反映各步骤的损伤程度。每组实验重复 3 次。

对照组:新鲜细胞,检测细胞活性。加载保护剂组:细胞加载 10.0% Me_2SO 作低温保护剂,放置 5 min。离心后弃上清液,重悬细胞,检测细胞活性。喷射组:细胞加载 10.0% Me_2SO 作低温保护剂,放置 5 min。采用微滴喷射系统将细胞悬液喷入盛有 6 mL 完全培养基的培养皿中,接收时间为 10 min。离心管收集细胞悬浮液,离心后弃上清液,重悬细胞,检测细胞活性。薄片接收组:细胞加载 10.0% Me_2SO 作低温保护剂,放置 5 min。采用微滴喷射系统将细胞悬浮液喷到塑料薄片上,薄片正反面接收,单面薄片接收时间为 5 s。随后用完全培养基将所有薄片上的细胞洗脱下来,离心管收集洗脱液,离心后弃上清液,重悬细胞,检测细胞活性。玻璃化及复温组:细胞加载 10.0% Me_2SO 作低温保护剂,放置 5 min。采用微滴喷射系统将细胞悬浮液喷到塑料薄片上,正反面接收,单面薄片接收时间为 5 s,然后将薄片迅速浸入液氮,实现玻璃化。随后将所有薄片浸入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养基中复温,并用培养基将细胞洗脱下来。离心管收集洗脱液,离心后弃上清液,重悬细胞,检测细胞活性。

1.6 低温保护剂的优化

降低保护剂中 Me_2SO 浓度,研究不同 Me_2SO 浓度下的低温保存效果。对照组:新鲜组,检测细胞存活率及 24 h 贴壁率。实验组:分 10.0% Me_2SO 组、5.0% Me_2SO 组、2.5% Me_2SO 组及无保护剂组,各组成分配方如表 1 中序号 1~4。采用微滴喷射玻璃化和慢速冷冻法两种方法保存细胞。

在一定 Me_2SO 浓度的基础上,可添加适量海藻糖的方法来优化保护剂配方。对照组:10.0% Me_2SO 低温保护剂玻璃化组。实验组:分别在 2.5% Me_2SO 、

5.0% Me_2SO 的基础上添加 0.1、0.3、0.5 mol/L 浓度的海藻糖作保护剂的玻璃化组。各组成分配方如表 1 中序号 5~10。采用微滴喷射玻璃化法保存细胞。

表 1 不同浓度低温保护剂的配方

Tab.1 Formulation of different concentrations of cryoprotectant

序号	保护剂浓度	FBS/%	DMEM/%	$\text{Me}_2\text{SO}/\%$	海藻糖/(mol/L)
1	10.0% Me_2SO	20	70.0	10.0	0
2	5.0% Me_2SO	20	75.0	5.0	0
3	2.5% Me_2SO	20	77.5	2.5	0
4	无 Me_2SO	20	80.0	0	0
5	2.5% Me_2SO 0.1 mol/L 海藻糖	20	77.5	2.5	0.1
6	2.5% Me_2SO 0.3 mol/L 海藻糖	20	77.5	2.5	0.3
7	2.5% Me_2SO +0.5 mol/L 海藻糖	20	77.5	2.5	0.5
8	5.0% Me_2SO +0.1 mol/L 海藻糖	20	75.0	5.0	0.1
9	5.0% Me_2SO +0.3 mol/L 海藻糖	20	75.0	5.0	0.3
10	5.0% Me_2SO +0.5 mol/L 海藻糖	20	75.0	5.0	0.5

2 结果与讨论

2.1 喷射各过程对细胞造成的损伤

采用微滴喷射系统对细胞进行玻璃化保存实验,各过程后细胞的活性检测结果如表 2 所示。由表 2 可知,在整个玻璃化流程中,各个过程对细胞均有损伤,保护剂加载过程、喷射过程和玻璃化及复温过程对细胞造成的损伤较大。相对而言,薄片接收过程对细胞造成的损伤程度则小很多,细胞活性损伤不到 0.7%。保护剂加载过程对细胞造成的损伤较大,原因可能是系统加载保护剂选用的一步法过程中加载高浓度保护剂会对细胞造成较大的渗透损伤。

表 2 喷射各过程后细胞的存活率及 24 h 贴壁率

Tab.2 Cell viability and 24 h adherence rate after spraying

过程	存活率/%	24 h 贴壁率/%
新鲜	97.64±1.53 ^a	99.05±0.37 ^a
加载保护剂	94.55±0.86 ^b	95.89±1.90 ^b
喷射	92.92±1.25 ^b	93.27±0.42 ^c
薄片接收	92.27±2.04 ^b	93.26±1.18 ^c
玻璃化及复温	88.15±1.55 ^c	89.86±1.54 ^d

注:用 Duncan's multiple range test 法进行多重比较,同列标有不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),标有相同小写字母表示组间差异不显著($P>0.05$)。

研究显示,采用分步法加载保护剂,对细胞的损伤明显要比一步法小很多。如 J. Samot 等^[9]采用两步加载法,得到的 CPA 加载步骤导致溶血的百分比小很小,20%总损伤中约占 2%。也有研究者^[21-26]将微流控技术应用于细胞低温保护剂的添加,实现了保护剂浓度的连续变化,从而提高了低温保存的细胞存活率。因此可在保护剂添加方式上进行改进,采用分步法或微流控法添加低温保护剂。喷射过程对细胞造成的损伤较大,原因可能是氮气流对细胞具有剪切力作用。剪切力损伤属于机械性损伤,因此可通过改进喷射方式或喷嘴来降低剪切力损伤。玻璃化及复温过程对细胞造成的损伤较大,原因可能有两方面:1)损伤来自于玻璃化过程,有可能是个别微滴直径偏大或保护剂不够优化,影响到玻璃化效果;2)损伤来自于复温过程,且复温过程的再结晶造成的细胞损伤更大。

2.2 降低 Me_2SO 浓度对细胞活性的影响

表 3 所示为降低 Me_2SO 浓度冻存时细胞的存活率及 24 h 贴壁率。由表 3 可知,用 10% Me_2SO 作低温保护剂,玻璃化保存细胞时,细胞存活率达到(90.03±1.47)%,24 h 贴壁率为(92.22±0.38)%。采用慢速冷冻法保存的细胞存活率为(88.33±0.67)%,24 h 贴壁率为(92.22±0.38)%,相比于同浓度保护剂的玻璃化组,细胞活性略低,但两组间并没有显著性差异。

表 3 降低 Me₂SO 浓度冻存时细胞的存活率及 24 h 贴壁率

Tab.3 Reducing the survival rate of Me₂SO concentration during cryopreservation and 24 h adherence rate

组号	保护剂浓度	存活率/%		24 h 贴壁率/%	
		慢速冷冻	玻璃化	慢速冷冻	玻璃化
1	10.0%Me ₂ SO	88.33±0.67 ^a	90.03±1.47 ^a	92.22±0.38 ^a	93.38±1.40 ^a
2	5.0%Me ₂ SO	77.40±1.36 ^c	80.64±2.67 ^b	82.46±1.05 ^c	85.50±1.77 ^b
3	2.5%Me ₂ SO	60.4±0.79 ^e	66.48±1.19 ^d	68.55±0.75 ^e	73.48±0.42 ^d
4	无保护剂	1.29±0.21 ^f	2.01±0.85 ^f	0.79±0.69 ^f	1.22±0.18 ^f

注:用 Duncan's multiple range test 法进行多重比较,同一检测指标标有不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$),标有相同小写字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

将 5.0% Me₂SO 组、2.5% Me₂SO 的细胞活性与 10.0% Me₂SO 组相比,发现无论是采用玻璃化还是慢速冷冻法,5.0% Me₂SO 组和 2.5% Me₂SO 组细胞活性明显低于 10.0% Me₂SO 组,这说明降低保护剂中 Me₂SO 浓度,低温保存效果明显降低。由此可见,Me₂SO 在低温条件下具有重要功效,能有效保护细胞免受冰晶和渗透压损伤。在同一水平低保护剂浓度下,玻璃化保存效果明显高于慢速冷冻法。例如在 5.0% Me₂SO 浓度下,玻璃化保存的细胞存活率和 24 h 贴壁率分别为 (80.64±2.67)%、(85.50±1.77)%,而慢速冷冻法保存的细胞存活率和 24 h 贴壁率分别为 (77.40±1.36)%、(82.46±1.05)%,明显低于玻璃化保存效果。

当保护剂中没有 Me₂SO 时,无论是慢速冷冻还是玻璃化法,低温保存后的细胞几乎不能存活,对细胞活性影响较大。因此,保护剂中需保留一定量的 Me₂SO。当保护剂中 Me₂SO 浓度为 5.0%、2.5% 时,细胞存活率、24 h 贴壁率均在 60% 上,玻璃化保存结果还算理想。因此可降低 Me₂SO 浓度

到 5.0%、2.5%,在此基础上进一步优化保护剂配方。

2.3 添加海藻糖对细胞活性的影响

表 4 所示为在 2.5% Me₂SO、5.0% Me₂SO 作为低温保护剂的基础上,添加海藻糖时细胞的存活率及 24 h 贴壁率。由表 4 可知,保护剂浓度为 2.5% Me₂SO 时,细胞存活率仅为 (66.48±1.47)%,在此基础上添加 0.1 mol/L 的海藻糖时,细胞活性增加,达到 (74.09±1.54)%;继续增加海藻糖浓度到 0.3 mol/L,细胞存活率达到 (84.42±1.40)%;但当海藻糖浓度继续增加达到 0.5 mol/L 时,细胞存活率及贴壁率反而下降。海藻糖作为一种非渗透性保护剂,能起到膜稳定性功效,微量的海藻糖有助于提高玻璃化保存效率;但海藻糖量过多时,反而会抑制细胞表面的分子活性、阻止 Me₂SO 等渗透型保护剂进入细胞内,会造成细胞渗透性脱水,不利于细胞的低温保存^[27]。由此可见,在保护剂中添加海藻糖时,海藻糖浓度需适量,添加量过少,低温保存效果增加不明显,过多则起到反作用。

表 4 添加海藻糖玻璃化时细胞的存活率及 24 h 贴壁率

Tab.4 Cell viability and 24 h adherence rate when adding trehalose vitrification

组号	保护剂浓度	存活率/%	24 h 贴壁率/%
1	10.0%Me ₂ SO	90.03±1.47 ^{ab}	93.38±1.40 ^{ab}
2	2.5%Me ₂ SO	66.48±1.19 ^b	73.48±0.42 ⁱ
3	2.5%Me ₂ SO+0.1 mol/L 海藻糖	74.09±1.54 ^e	79.25±0.38 ^h
4	2.5%Me ₂ SO+0.3 mol/L 海藻糖	84.42±1.40 ^d	88.50±1.39 ^{de}
5	2.5%Me ₂ SO+0.5 mol/L 海藻糖	76.97±1.00 ^f	83.46±2.05 ^{fe}
6	5.0%Me ₂ SO	80.64±2.67 ^c	85.50±1.77 ^f
7	5.0%Me ₂ SO+0.1 mol/L 海藻糖	85.53±1.07 ^{cd}	89.99±1.00 ^{cd}
8	5.0%Me ₂ SO+0.3 mol/L 海藻糖	92.42±0.95 ^a	95.64±1.03 ^a
9	5.0%Me ₂ SO+0.5 mol/L 海藻糖	87.99±.60 ^{bc}	91.55±1.60 ^{bc}

注:用 Duncan's multiple range test 法进行多重比较,同列标有不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$),标有相同小写字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

添加同样物质的量浓度的海藻糖,在 5% Me₂SO 基础上添加比在 2.5% Me₂SO 基础上添加的效果好。如 2.5% Me₂SO+0.1 mol/L 海藻糖作低温保护剂时,玻璃化保存的细胞活性为(74.09±1.54)%,24 h 贴壁率为(79.25±0.38)%,而以 5% Me₂SO+0.1 mol/L 海藻糖作低温保护剂时,玻璃化保存的细胞活性却能达到(85.53±1.07)%,24 h 贴壁率达到(89.99±1.00)%,明显高于 2.5% Me₂SO 组,组间存在显著性差异。

以 5.0% Me₂SO+0.3 mol/L 海藻糖作为低温保护剂玻璃化保存细胞时,细胞存活率达到(92.42±0.95)%,24 h 贴壁率达到(95.64±1.03)%。与对照组 10.0% Me₂SO 作低温保护剂冻存效果相比,两组间并不存在显著性差异。

3 总结与展望

本文采用微滴喷射系统对 HepG2 细胞进行微滴喷射玻璃化实验,研究了微滴喷射玻璃化各过程对细胞造成的损伤程度,并优化了玻璃化保存时的低温保护剂配方,得到如下结论:

1) 微滴喷射玻璃化各过程对细胞均有损伤,但损伤程度各有不同。其中,保护剂加载过程、喷射过程和玻璃化过程对细胞造成的损伤较大,薄片接收过程对细胞造成的损伤很小。

2) 随着保护剂中 Me₂SO 浓度的降低,低温保存后的细胞活性明显降低,在保护剂浓度相同时,玻璃化保存效果较慢速冷冻效果好。保护剂中添加适量海藻糖,低温保存后细胞活性增加,但海藻糖浓度过量则不利于低温保存。

3) 以 5.0% Me₂SO+0.3 mol/L 海藻糖作为低温保护剂进行微滴喷射玻璃化保存细胞时,细胞存活率达到(92.42±0.95)%,24 h 贴壁率达到(95.64±1.03)%。

4) 文中采用的微滴喷射玻璃化保存系统是在现有研究基础上加以改进,并将其应用于 HepG2 细胞玻璃化实验,在很多方面还有较大的研究空间。可将微滴喷射玻璃化保存系统应用于其他种类的细胞体系,以验证该系统的可拓展性及保护剂配方在其他细胞玻璃化保存上的普遍适用性。

5) 文中提出的微滴喷射玻璃化保存系统,采用的是薄片式收集装置接收微滴,该方式保存量非常有限。要实现小细胞系统的大体量保存,可采用容器式收集装置接收微滴,其具有高通量的特点,有望解决小体积细胞的大体量保存问题。

参考文献

- [1] DHALI A, ANCHAMPARUTHY V M, BUTLER S P, et al. Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification [J]. *Heriogenology*, 2007, 68 (9): 1292-1298.
- [2] XU Fangqian, MOON S J, EMRE A E, et al. A droplet-based building block approach for bladder smooth muscle cell (SMC) proliferation [J]. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 1206.
- [3] MARTINEZ-BURGOS M, HERRERO L, MEGÍAS D, et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage [J]. *Fertility and Sterility*, 2011, 95 (1): 374-377.
- [4] DEMIRCI U, YARALIOGLU G G, HAEGGSTORM E, et al. 2D acoustically actuated micromachined droplet ejector array [C]// *Proceedings of the IEEE Symposium on Ultrasonics*. Honolulu: IEEE, 2003.
- [5] DEMIRCI U, YARALIOGLU G G, HAEGGSTORM E, et al. Femtoliter to picoliter droplet generation for organic polymer deposition using single reservoir ejector arrays [J]. *IEEE Transactions on Semiconductor Manufacturing*, 2005, 18(4): 709-715.
- [6] DEMIRCI U. Acoustic picoliter droplets for emerging applications in semiconductor industry and biotechnology [J]. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2006, 15(4): 957-966.
- [7] DEMIRCI U. Droplet-based photoresist deposition [J]. *Applied Physics Letters*, 2006, 88(14): 265-267.
- [8] DEMIRCI U, Montesano G. Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets [J]. *Lab on A Chip*, 2007, 7(9): 1139-1145.
- [9] SAMOT J, MOON S, SHAO L, et al. Blood banking in living droplets [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): 69.
- [10] SUZUKI T, KOMADA H, TAKAI R, et al. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos [J]. *Fisheries science*, 1995, 61 (2): 193-197.
- [11] ROWLEY S D, ANDERSON G L. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 1993, 11 (5): 389-393.
- [12] VIOLANTE G D, ZERROUK N, RICHARD I, et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on CaCO₂/TC₇ colon tumor cell cultures [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25 (12): 1600-1603.
- [13] RUDOLPH B, CHANDRASEKHAR I, GABER B, et al.

- Molecular modelling of saccharide-lipid interactions [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1990, 53(2): 243–261.
- [14] ELBEIN A D, PAN Y, PASTUSZAK I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule[J]. *Glycobiology*, 2003, 13(4): 17–27.
- [15] LYNCH A L, CHEN R, and SLATER N K. pH-responsive polymers for trehalose loading and desiccation protection of human red blood cells[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(19): 4443–4449.
- [16] ERDAG G, EROGLU A, MORGAN JR, et al. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose [J]. *Cryobiology*, 2002, 44(3): 218–228.
- [17] BUCHANAN S S, GROSS S A, ACKER J P, et al. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line [J]. *Stem Cells and Development*, 2004, 13(3): 295–305.
- [18] 袁晓华, 王淑芬, 杨世华, 等. 不同防冻剂对兔胚胎干细胞慢速冷冻保存的影响[J]. *动物学研究*, 2007, 28(1): 81–87. (YUAN Xiaohua, WANG Shufen, YANG Shihua, et al. Effects of different antifreeze agents on slow cryopreservation of rabbit embryonic stem cells[J]. *Zoology Research*, 2007, 28(1): 81–87.)
- [19] BUCHANAN S S, GROSS S A, ACKER J P, et al. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line [J]. *Stem Cells and Development*, 2004, 13(3): 295–305.
- [20] 张霄敏. 微滴喷射玻璃化保存的实验研究[D]. 上海: 上海理工大学, 2018. (ZHANG Xiaomin. Experimental study on vitrification preservation of microdroplet spray[D]. Shanghai: Shanghai University of Science and Technology, 2018.)
- [21] 杨云, 周新丽, 戴建军, 等. 微流控线性加载低温保护剂减少猪 M II 期卵母细胞的渗透损伤[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(6): 616–623. (YANG Yun, ZHOU Xinli, DAI Jianjun, et al. Microfluidic linear load low temperature protective agents to reduce the pig M phase II oocyte penetrating injury[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2016, 43(6): 616–623.)
- [22] 周新丽, 邵文琪, 杨云, 等. 卵母细胞在微流控装置加载保护剂过程中的渗透行为模拟及损伤评估[J]. *热科学与技术*, 2017, 16(1): 8–12. (ZHOU Xinli, SHAO Wenqi, YANG Yun, et al. Oocytes osmotic behavior simulation and damage assessment during microfluidic device loading of protectin [J]. *Journal of Thermal Science and Technology*, 2017, 16(1): 8–12.)
- [23] 周新丽, 衣星越, 周楠峰, 等. 用于低温保护剂混合的微流控芯片设计及优化[J]. *生物医学工程学杂志*, 2016, 33(3): 461–465. (ZHOU Xinli, YI Xingyue, ZHOU Nanfeng. Design and optimization of microfluidics chip for low temperature protectant mixing [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2016, 33(3): 461–465.)
- [24] 杨云, 周新丽, 戴建军, 等. 低温保护剂添加与去除过程对猪卵母细胞的渗透损伤[J]. *制冷学报*, 2017, 38(3): 114–118. (YANG Yun, ZHOU Xinli, DAI Jianjun, et al. Osmotic damage of porcine oocytes induced by low-temperature protectant addition and removal [J]. *Journal of Refrigeration*, 2017, 38(3): 114–118.)
- [25] 杨云, 周新丽, 周楠峰, 等. 用于卵母细胞保护剂添加过程的微混合器优化模拟[J]. *浙江农业学报*, 2015, 27(3): 460–466. (YANG Yun, ZHOU Xinli, ZHOU Nanfeng, et al. Optimization simulation of micromixer for oocyte protectant addition process [J]. *Journal of Zhejiang Agriculture*, 2015, 27(3): 460–466.)
- [26] SONG Y S, MOON S, HULLI L, et al. Microfluidics for cryopreservation [J]. *Lab on A Chip*, 2009, 9(13): 1874–1881.
- [27] 姚岚, 梁玮, 刘宝林. 人肝癌细胞 Hep-G2 的低温保存研究[J]. *制冷学报*, 2015, 36(2): 95–100. (YAO Lan, LIANG Wei, LIU Baolin. Cryopreservation of Hep-G2 in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Journal of Refrigeration*, 2015, 36(2): 95–100.)

通信作者简介

周新丽,女,博士,教授,上海理工大学生物系统热科学研究所,(021)55270218,E-mail: zjulily@163.com。研究方向:低温保存技术在辅助生殖领域的应用,微流控技术在低温生物医学中的应用,组织、器官的低温保存技术。

About the corresponding author

Zhou Xinli, female, Ph. D., professor, Institute of Biological System Thermal Science, Shanghai University of Science and Technology, +86 21–55270218, E-mail: zjulily@163.com. Research fields: application of cryopreservation technology in assisted reproduction; application of microfluidic control technology in cryogenic biomedicine; cryopreservation technology for tissues and organs.