

文章编号:0253-4339(2026)02-0157-10  
doi: 10.12465/issn.0253-4339.20241127001

## 细胞微液滴可控快速降温及复温的冻存系统研究

胡健<sup>1,2,3</sup> 党航宇<sup>1,2,3</sup> 占太杰<sup>1,2,3</sup> 崔梦冬<sup>4</sup> 韩恒鑫<sup>1,2,3</sup> 郭宁<sup>1,2,3</sup> 胥义<sup>1,2,3</sup>

(1 上海理工大学生物系统热科学研究所 上海 200093; 2 上海市生物资源低温保存技术服务平台 上海 200093;  
3 上海市肿瘤能量治疗技术与器械协同创新中心 上海 200093; 4 原启生物科技(上海)有限责任公司 上海 200120)

**摘要** 细胞微液滴的玻璃化保存方法在低温保存领域受到广泛关注,但微液滴玻璃化过程还存在降温/复温过程不可控等局限性。采用移动滑台升降,结合焦耳热复温方法搭建用于细胞微液滴玻璃化过程可控快速降温及复温的冻存系统,该系统通过调节浸入液氮的速度实现快速、可控降温,并通过控制焦耳热的加热时间、电流大小实现高速率复温过程,实现微液滴的玻璃化过程并显著避免了液滴复温过程的反玻璃化对细胞的损伤。结果表明:该系统可控制降温速率可以达到 $1.8 \times 10^4$  °C/min,能够实现细胞微液滴较低浓度保护剂下的玻璃化保存;复温速率控制可以达到 $4.0 \times 10^4$  °C/min,能有效避免较低浓度保护剂复温过程反玻璃化及冰晶再生长的发生;通过微液滴 A549 细胞低温保存效果,证实了该系统冷冻复苏后的存活率显著高于传统麦管保存。该研究工作有望为细胞微液滴自动玻璃化保存及复温方法提供新的解决方案。

**关键词** 玻璃化;焦耳热;降复温速率;细胞微液滴

中图分类号: TB61<sup>1</sup>;R318.52

文献标识码: A

## Research on the Cryopreservation System of Controlled Rapid Cooling and Rewarming of Cellular Micro-Droplets

Hu Jian<sup>1,2,3</sup> Dang Hangyu<sup>1,2,3</sup> Zhan Taijie<sup>1,2,3</sup> Cui Mengdong<sup>4</sup> Han Hengxin<sup>1,2,3</sup>  
Guo Ning<sup>1,2,3</sup> Xu Yi<sup>1,2,3</sup>

(1. Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China; 2. Co-innovation Center for Tumor Treatment with Energy, Shanghai, 200093, China; 3. Shanghai Technical Service Platform for Cryopreservation of Biological Resources, Shanghai, 200093, China; 4. OriCell Therapeutics Co., Ltd., Shanghai, 200120, China)

**Abstract** The vitrification preservation methods for cell microdroplets have received considerable attention in the field of cryopreservation. However, the vitrification process for microdroplets has limitations such as uncontrollable cooling/rewarming processes. In this study, a cryopreservation system for controllable rapid cooling and rewarming during the vitrification of cell microdroplets was constructed by combining the lifting of a moving slide table with the Joule heating rewarming method. This system achieves rapid and controllable cooling by adjusting the speed of immersion in liquid nitrogen and realizes a fast rewarming process by controlling the heating time and current intensity of Joule heating. Thus, it realizes the vitrification of microdroplets and significantly prevents damage to cells caused by devitrification during the droplet rewarming process. The results show that the cooling rate controlled by this system attained  $1.8 \times 10^4$  °C/min. This enabled the vitrification preservation of cell microdroplets with a relatively low concentration of cryoprotectant. The rewarming rate control attained  $4.0 \times 10^4$  °C/min. This effectively prevented the occurrence of devitrification and ice crystal regrowth during the rewarming process of the relatively low concentration of cryoprotectant. Cryopreservation of A549 cells in microdroplets verified that the survival rate after cryopreservation and resuscitation using this system is significantly higher than that after conventional straw preservation. The research presented in this paper is likely to provide new solutions for the automatic vitrification preservation and rewarming of cell microdroplets.

**Keywords** vitrification; Joule heating; cooling and rewarming rate; cell microdroplets

众多研究表明,微小尺度的生物样本在实现细胞玻璃化保存上具有明显优势<sup>[1-6]</sup>。这是因为样本尺

基金项目:国家自然科学基金(52076140)资助项目。(The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 52076140).)

收稿日期:2024-11-27;修回日期:2024-12-22;录用日期:2025-01-22

度小、比表面积大、热量传递快,因此可以在使用低浓度低温保护剂下通过高降温速率达到玻璃化状态<sup>[7]</sup>。目前,国内外学者在实现微小尺度玻璃化的方法方面进行了广泛研究,包括 OPS (open pulled straw)<sup>[8]</sup>、冷冻环<sup>[9-10]</sup>、固体冷表面玻璃化法<sup>[11-12]</sup>和基于微液滴的直接接触液氮玻璃化<sup>[5]</sup>等。

V. Landa 等<sup>[13]</sup>首次采用直接接触液氮玻璃化法,将 5~20  $\mu\text{L}$  的胚胎液滴直接打印至液氮中。后续 U. Demirci 等<sup>[14]</sup>将基于液滴的生物打印技术与低温保存技术相结合,使用微阀打印在含有液氮的培养皿中打印液滴,将喷墨打印方法和声学打印方法应用于微液滴玻璃化保存,X. Zhang 等<sup>[15]</sup>设计了一种基于注射器的纳升液滴,通过氮气流将细胞悬浮液打印到液氮,并通过铝箔收集液滴。这些高效的玻璃化方法为再生医学中的冷冻保存提供了新的思路。Cui Mengdong 等<sup>[16]</sup>总结了这些液滴玻璃化方法及其复温方式,认为国内外研究重点放在微小尺度样本降温过程,对于升温过程及整体自动化研究还处于欠缺阶段。降温过程中,高降温速率不可控使样本不同部位的热传导速率存在差异,以及与周围环境的热交换不均匀会导致热应力损伤<sup>[17-18]</sup>,并且手动降温导致各批次保存效果不稳定。复温过程中若方法不当,可能导致冰晶重新生长<sup>[19]</sup>,对细胞造成严重损伤<sup>[20]</sup>。此外,操作方式复杂、不易收集等均限制

了微液滴玻璃化保存的应用范围。

基于此,本文开发了一款用于细胞微液滴可快速降温及复温的冻存系统。该系统操作简单、成本低、可靠性高。能够实现对微液滴的可控降温,同时还能够利用焦耳热精确控制复温过程,避免反玻璃化过程的冰晶重新生长,并且减少热应力的损伤。该系统的应用有望为细胞治疗、器官移植等领域提供更加可靠的生物样本保存方法。

## 1 细胞微液滴可控快速降温与复温冻存系统的搭建与实验方法

### 1.1 实验系统搭建

细胞微液滴可控快速降温与复温的冻存实验系统主要分为焦耳热复温模块、移动模块与自动化控制模块 3 个部分,其构成如图 1(a)所示。

焦耳热复温模块如图 1(b)所示,焦耳热复温片采用三明治结构,铁铬铝合金与 80 mm $\times$ 100 mm 的亚克力板中间通过低温粘合胶粘合,确保在浸入液氮后不会脱落。其中为了承载 1~10  $\mu\text{L}$  的液滴底面积,采用宽为 5 mm 电热丝,其电阻值约为 6  $\Omega$ 。

移动模块由 SGX 单线轨滚珠丝杆滑台、鳄鱼夹组成。其中滑台可以通过升降将焦耳热复温片浸入、维持和远离泡沫箱里的液氮中,鳄鱼夹用于固定焦耳热复温片并传输电流进行焦耳热升温。

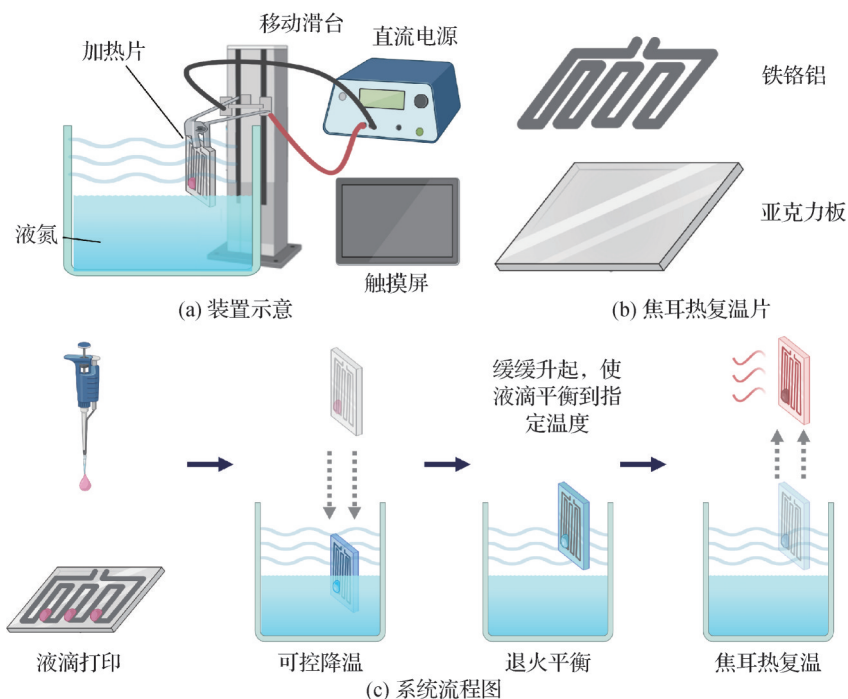


图 1 用于细胞微液滴可控降温与焦耳热复温系统设计

Fig.1 Design of controllable cooling of cell microdroplets and Joule heating rewarming system

自动化控制模块采用 PLC (Siemens S7-1200) 和触摸屏 (MCGS 昆仑通态) 构建,如表 1 所示。控制系

统分为降温控制与复温控制,PLC 作为控制器实现滑台的移动以及电流的通断,触摸屏显示当前温度并

设置各项参数(下降速度、下降位置、上升速度、退火点温度、加热时间、脉冲频率),电流大小由直流电源设备本身控制。

表 1 主要系统设备及其不确定度

Tab.1 Main equipment of the system and its uncertainty

设备	型号	误差范围
可控直流电源	迈胜 MP6010D	电流误差:±1%V
温度变送器	速灵科 BAR02	扫描频率误差:±25 ms
固态继电器	德力西 CDG1-1DD	时间误差:5 ms
热电偶	ANSI ETA-T-T-36-SLE	温度误差:±1 °C
温度采集仪	Agilent 34970A	温度误差:±0.1°C

## 1.2 微液滴的可控降温过程

在可控降温前以分步加载的方式完成低温保护剂(CPA)的加载,随后用移液器将 5 μL 细胞悬液滴在焦耳热复温片最底部的连接处上,约 1 cm 处。同时,采用 T 型热电偶置于待测液滴的中部位置来采集液滴内部实时温度变化<sup>[21]</sup>并显示。

可控降温过程如图 1(c)所示。焦耳热复温片通过滑台上的鳄鱼夹夹住电极竖直固定在泡沫箱内液氮上方 50 cm 空中。通过触摸屏设置下降速度(0~90 mm/s)来控制焦耳热复温片的移动速度使其竖直浸入液氮中<sup>[22]</sup>,由于液氮上方的温度区间基本相同,液滴可以获得相对稳定的降温速率,同时由于液滴以不同的移动速度穿越温度区间可以得到不同的降温速率,从而实现降温过程的可控性。

## 1.3 微液滴可控复温过程

可控复温过程是基于焦耳热的原理对低温下的细胞微液滴进行快速电加热,以达到快速可控复温的过程<sup>[23-24]</sup>。而其中电流、电阻是影响焦耳热放热的重要因素<sup>[25]</sup>。但由于系统电源本身的限制(0~60 V、0~10 A),根据 Zhan Li<sup>[23]</sup>的理论,电阻在 6 Ω 时放热效率达到最大,因此电阻制作时设定为 6 Ω。

先将焦耳热复温片以 10 mm/s 的速度从液氮中缓慢取出,当温度达到设定好的退火点温度后,焦耳热复温片以最快速度 90 mm/s 的速度迅速升至泡沫箱之外来最低限度减少氮气层温度对液滴复温过程的影响,同时立刻开启电流(0~10 A)脉冲来实现快速加热。

当复温结束后,再用移液器将液滴重新收集起来,完成整个可控复温过程。

## 1.4 低温保护剂

本文研究了多种低温保护剂,包括甘油、EG(乙二醇)、PG(丙二醇)、DMSO(二甲基亚砜)单一组分,

以及 1:1 的甘油+PG、DMSO+EG 和 DMSO+PG 的复合组分微液滴玻璃化形成的能力。并将上述组分在完全培养基中稀释,完全培养基在 DMEM(Gibco)溶液中分别添加 5% 浓度的胎牛血清(FBS)和 1% 浓度的青霉素/链霉素(Gibco)。若无特殊说明,本文提及的浓度均指溶质在溶液中所占的体积分数。

## 1.5 临界降温速率(CCR)与临界复温速率(CWR)的确定

临界复温速率(CCR, critical cooling rate)是指在玻璃化保存过程中,能够使样品成功实现玻璃化转变的最低降温速率和在复苏过程中的最低升温速率。临界复温速率(CWR, critical warming rate)根据 Han Z. 等<sup>[26]</sup>的公式计算:

$$V_{\text{CCR}} = 1 \times 10^7 e^{-0.269C} \quad (1)$$

$$V_{\text{CWR}} = 3.775 V_{\text{CCR}}^{2.377} \quad (2)$$

式中: $V_{\text{CCR}}$ 为临界降温速率,°C/min; $C$ 代表 CPA 质量分数; $V_{\text{CWR}}$ 为临界复温速率,°C/min。 $V_{\text{CCR}}$ 与  $V_{\text{CWR}}$ 是 2 个关键参数,分别影响着液滴在降温与复温过程的冰晶生长<sup>[27]</sup>。当以临界降温速率或更高的速率降温时,溶液中的水分子来不及形成规则的冰晶结构,而是直接转变为玻璃态,否则冰晶会在细胞内外形成,冰晶的生长会刺破细胞膜,导致细胞内容物泄漏,从而使细胞死亡<sup>[27]</sup>。若复温速率低于临界复温速率,可能会出现反玻璃化现象,导致其内部结构从无序的非晶态转变为有序的晶体结构的过程,重新形成冰晶。这和降温过程中冰晶的危害一样,会对细胞等样品造成损伤<sup>[28]</sup>。

## 1.6 细胞培养与活力检测

通过与麦管对照保存肺癌人类肺泡基底上皮细胞(A549 细胞)来验证本系统保存效果。A549 细胞在完全培养基中培养,用胰蛋白酶将 A549 贴壁细胞消化收集并以  $1 \times 10^6$  个/mL 的密度放入培养基中重悬,再以分步加载的方式加载保护剂后立刻重悬打印在焦耳热复温片上进行冷冻保存。

在后续的细胞存活检测中采用吖啶橙/碘化丙啶染色(AO/PI, Nexcelom)评估细胞活力,其中脱氧核糖核酸(DNA)染色的正常细胞在吖啶橙下呈现均匀的绿色,坏死细胞呈现强烈的红色荧光。使用细胞计数仪(Biosharp)计算活细胞和死细胞的总数并捕捉细胞图像。

## 2 结果与讨论

### 2.1 系统性能分析

根据式(1)、式(2)计算出了常用的复合配方玻

璃化保护剂的临界降复温速率与浓度的关系,如图2(a)、(b)所示,系统的降温速率可控制在 $8.1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^4$  °C/min,推断出最低玻璃化浓度约为22%,复温速率在 $1.0 \times 10^3 \sim 4.0 \times 10^4$  °C/min,避免反玻璃化的最低浓度约为43%。具体浓度以保护剂种类为主,本文最多使用的甘油玻璃化倾向差,浓度会偏高。与其他相关玻璃化保存的自动化系统相比,本系统具有更高的降复温速率<sup>[29-31]</sup>。

测量了不同深度液氮上方温度区间,如图2(c)所示,来避免液氮蒸发影响液氮高度对液滴温度的影响。液氮液面在3 cm与5 cm深度时温度区间近似相同,而液氮液面深度为7 cm时,离泡沫箱开口处太近导致温度在液氮上方9 cm处开始出现大幅上升,因此本研究在实验时尽量控制液氮深度在3~5 cm来保证快速降温过程中的稳定性。移动滑台的升降速率控制在1~90 mm/s,精度为 $\pm 1$  mm/s。

根据温度数据采集结果发现,焦耳热复温片在复温结束后会有一段回温过程,如图2(d)所示(蓝色部分为未开始进行焦耳热加热,红色为开始加热),温度可以降至-50 °C,使液滴内冰晶再生长,这是由亚克力板未被完全加热导致的,因此加入了多个脉冲来抵消这段回温过程,使复温之后的温度稳定在0 °C的安全区域内。

## 2.2 可控降温特性

### 2.2.1 降温速率影响因素分析

对降温速率影响因素进行深入分析,并通过调整降温速率,观察并记录不同溶液组液滴的玻璃化状态变化。

据 V. Berejnov 等<sup>[32]</sup>所述,在1~10  $\mu$ L 体积范围内的保护剂溶液中,5  $\mu$ L 及以上的液滴在玻璃化过程中所需的保护剂浓度近似相同。此外,5  $\mu$ L 液滴在进入液氮后底部常出现断痕,但又不会发生炸裂,这可能与热应力损伤相关。因此,后续研究均针对5  $\mu$ L 液滴展开。不同浓度甘油液滴的温度曲线如图3(a)所示,结果表明,保护剂浓度对降温速率的影响相对较小,随着保护剂浓度的增加,降温速率略有降低。这归因于低浓度甘油液滴与液氮之间的热交换更为顺畅,而高浓度甘油会增加液滴黏度,阻碍热量的快速传递。其他保护剂种类,如DMSO、EG及甘油+EG复合组分等,均呈现类似的趋势。保护剂浓度与降温速率的拟合曲线如图3(b)所示,在后续调控降温速率时,需充分考虑溶液组分对降温速率的影响。

本系统通过调节焦耳热复温片的下降速率来实现对液滴降温过程的精准控制。研究了不同下降速率对降温速率的影响,并获得了相应的液滴降温曲

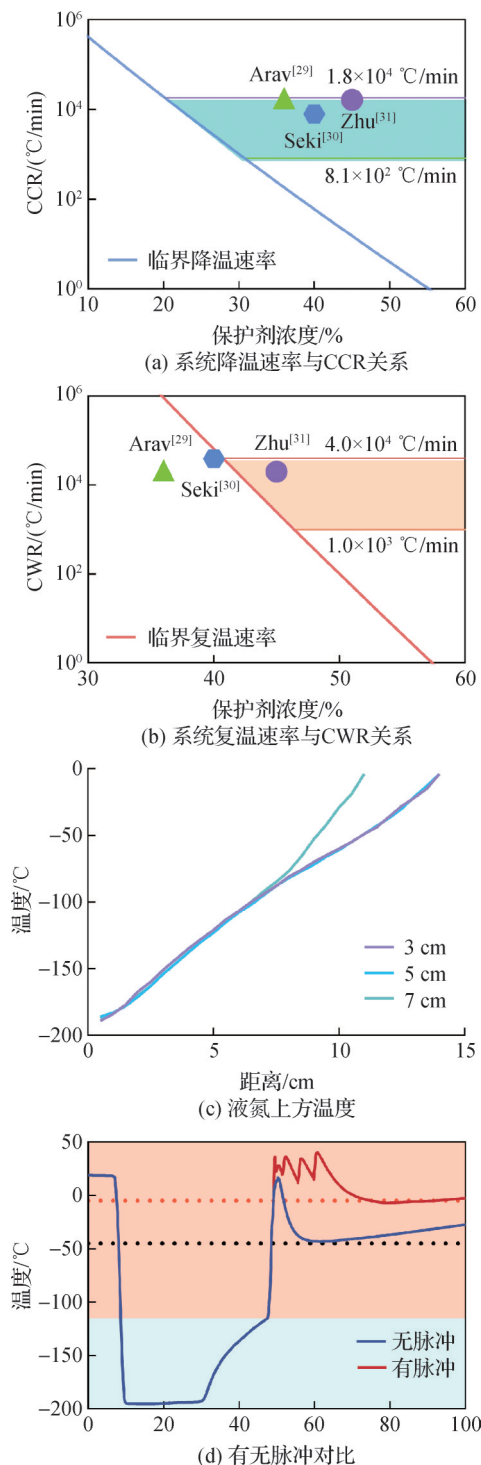


图2 系统性能分析

Fig.2 Analysis of system performance

线,如图3(c)所示。对于不同浓度和种类的保护剂液滴,不同下降速率下的温度变化总体趋势一致。当下降速率 $< 50$  mm/s时,液滴在液氮上方停留时间较长,氮气层环境温度对降温过程影响显著,随着下降速率的增加,温度变化增大;而当下降速率 $\geq 50$  mm/s时,液滴在液氮上方停留时间缩短,直接与液氮接触成为影响降温的主导因素,温度变化则相对稳定。通过最小二乘法拟合曲线,如图3(d)所示,结

果表明可以通过不同下降速率实现对不同降温速率的调控。

### 2.2.2 降温速率对液滴玻璃化状态的影响

观察并记录了多种保护剂在不同浓度下的结晶状况及室温下缓慢复温过程中的反玻璃化现象,并实时显示当前温度,来研究不同溶液组分对玻璃化冷冻效果的影响,表2总结了不同保护剂浓度和种类下溶液的结晶与玻璃化状态及其反玻璃化温度。表中将结晶状态标记为I(Icing),玻璃化状态标记为V(Vitrification),半结晶半玻璃化状态标记为IV(Icing

and Vitrification)。对于反玻璃化温度的观测,以液滴最顶部结晶时的温度为观测点来确定反玻璃化温度。表中数字表示液滴顶部开始反玻璃化的温度,“—”表示未出现反玻璃化现象。对于相同的保护剂种类,在降温速率相同时,浓度越高越容易实现玻璃化;在复温速率相同时,浓度越高越不易出现反玻璃化现象。同时,随着保护剂浓度的增加,反玻璃化温度也随之升高,这归因于高浓度保护剂使溶液更加黏稠,分子运动受限,需要更高的温度才能使整个溶液体系从玻璃态转变为结晶态。

表 2 不同溶液组分液滴的结晶与玻璃化状况

Tab.2 Crystallization and vitrification of droplets with different solution components

溶液组分	玻璃化状况	反玻璃化温度/°C	溶液组分	玻璃化状况	反玻璃化温度/°C
10% 甘油	I	—	30%PG	V	-135
20% 甘油	I	—	40%PG	V	-128
30% 甘油	IV	-100	50%PG	V	—
40% 甘油	V	-120	10%EG	I	—
50% 甘油	V	-117	20%EG	I	—
60% 甘油	V	-110	30%EG	IV	-140
70% 甘油	V	—	40%EG	V	-130
10%DMSO	I	—	50%EG	V	—
20%DMSO	I	—	5% 甘油+5%EG	I	—
30%DMSO	IV	-120	10% 甘油+10%EG	IV	-80
40%DMSO	V	-125	15% 甘油+15%EG	V	-115
50%DMSO	V	—	20% 甘油+20%EG	V	-115
10%PG	I	—	25% 甘油+25%EG	V	—
20%PG	I	—			

根据上述结论,研究了浓度为40%甘油在不同降温速率下的液滴结晶与玻璃化状态,由于甘油的玻璃化倾向低于其他低温保护剂,所以其临界降温速率略高于本文计算结果,由M. Warkentin等<sup>[33]</sup>在其文献中所述,浓度为40%甘油的临界降温速率约为 $1.2 \times 10^3$  °C/min。以90 mm/s的下降速率获得高降温速率 $1.8 \times 10^4$  °C/min,发现降温后的液滴呈现完整的玻璃化状态,但液滴底部出现裂痕并伴有微量冰晶生长,如图3(e)所示。以30 mm/s的下降速率获得中等降温速率 $1.5 \times 10^3$  °C/min,发现相同液滴从完全玻璃化状态转变为顶部结晶底部玻璃化的半结晶半玻璃化状态。以10 mm/s的下降速率获得低降温速率 $8.1 \times 10^2$  °C/min,发现液滴完全结晶。总体趋势与以往的临界降复温速率理论相同。研究结果表明,本系统完全能够通过调节下降速率来实现对液滴降温速率的精准控制,进而获得不同的玻璃化状态。

降复温速率理论相同。研究结果表明,本系统完全能够通过调节下降速率来实现对液滴降温速率的精准控制,进而获得不同的玻璃化状态。

## 2.3 可控复温特性

### 2.3.1 升温速率影响因素分析

为了研究电流大小对升温速率的定量影响,本研究在2、6和10 A的电流条件下分别采集了温度数据,结果如图4(a)所示。通过施加不同大小的电流进行加热,得到了相应的温度变化曲线,并进一步计算了升温速率,拟合结果如图4(b)所示。分析表明,电流与升温速率之间存在显著的正相关关系。本研究还对不同加热时间下的温度变化曲线进行了详细分析,如图4(c)和图4(d)所示,随着加热时间的延长,液滴的最终温度和升温速率均呈上升趋势。该现象主要源于焦耳热复温片的加热机制:焦耳热复温片通过电流加热,并将热量传导至

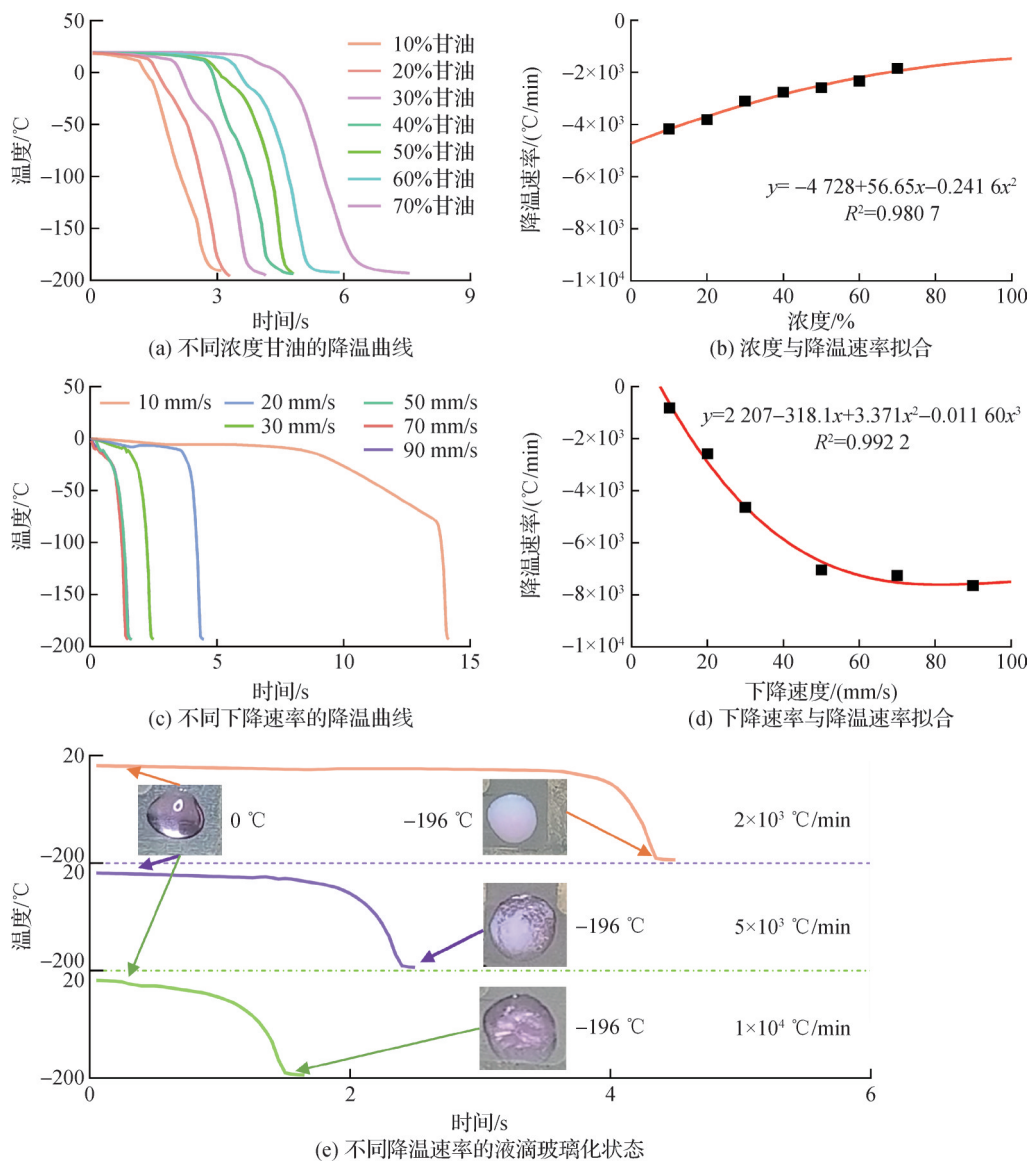


图 3 系统的可控降温能力

Fig.3 Controlled cooling performance of the system

液滴。焦耳热复温片的升温速率远高于液滴，随着加热时间的增加，复温片与液滴之间的温差逐渐增大，从而加速了热传导过程，进而导致液滴的升温速率增加。然而，为防止液滴温度超过 40 °C (该温度可能导致细胞死亡)，加热时间必须受到严格限制。此外，为了减少热应力损伤，本研究在加热前先将液滴平衡至退火点温度，这一步骤缩短了加热时间。因此，在需要更长的加热时间时，应相应降低退火点温度。

### 2.3.2 升温速率对液滴反玻璃化状态的影响

本研究观察并记录了甘油在不同浓度下的结晶状况以及不同升温速率下的液滴反玻璃化状况。以 50% 甘油为例，与临界降温速率同理，据 J. B. Hopkins 等<sup>[34]</sup>文献中所述，甘油的临界复温速率为  $4 \times 10^3$  °C/min，不同升温速率下的状态如图 4(e) 所示。

在 10 A 电流、1 200 ms 加热时间和 -150 °C 退火点温度条件下，获得高升温速率  $4 \times 10^4$  °C/min，发现升温后的液滴未出现反玻璃化现象，仅液滴上方出现一层由水雾结冰形成的薄膜，随升温过程逐渐消散。在 10 A 电流、600 ms 加热时间和 -110 °C 退火点温度条件下，获得中等升温速率  $1 \times 10^4$  °C/min，发现液滴顶部出现反玻璃化现象，这是因为液滴底部升温速率足够高以避免反玻璃化，但热量从底部向上传递导致顶部升温速率过慢，低于临界复温速率，不足以避免反玻璃化而结晶。在 2 A 电流、800 ms 加热时间和 -110 °C 退火点温度条件下，获得低升温速率  $2 \times 10^3$  °C/min，发现液滴在复温过程中完全结晶。研究表明，本系统可以通过调节电流大小和加热时间来精确控制液滴的升温速率，从而获得不同的复温状态。

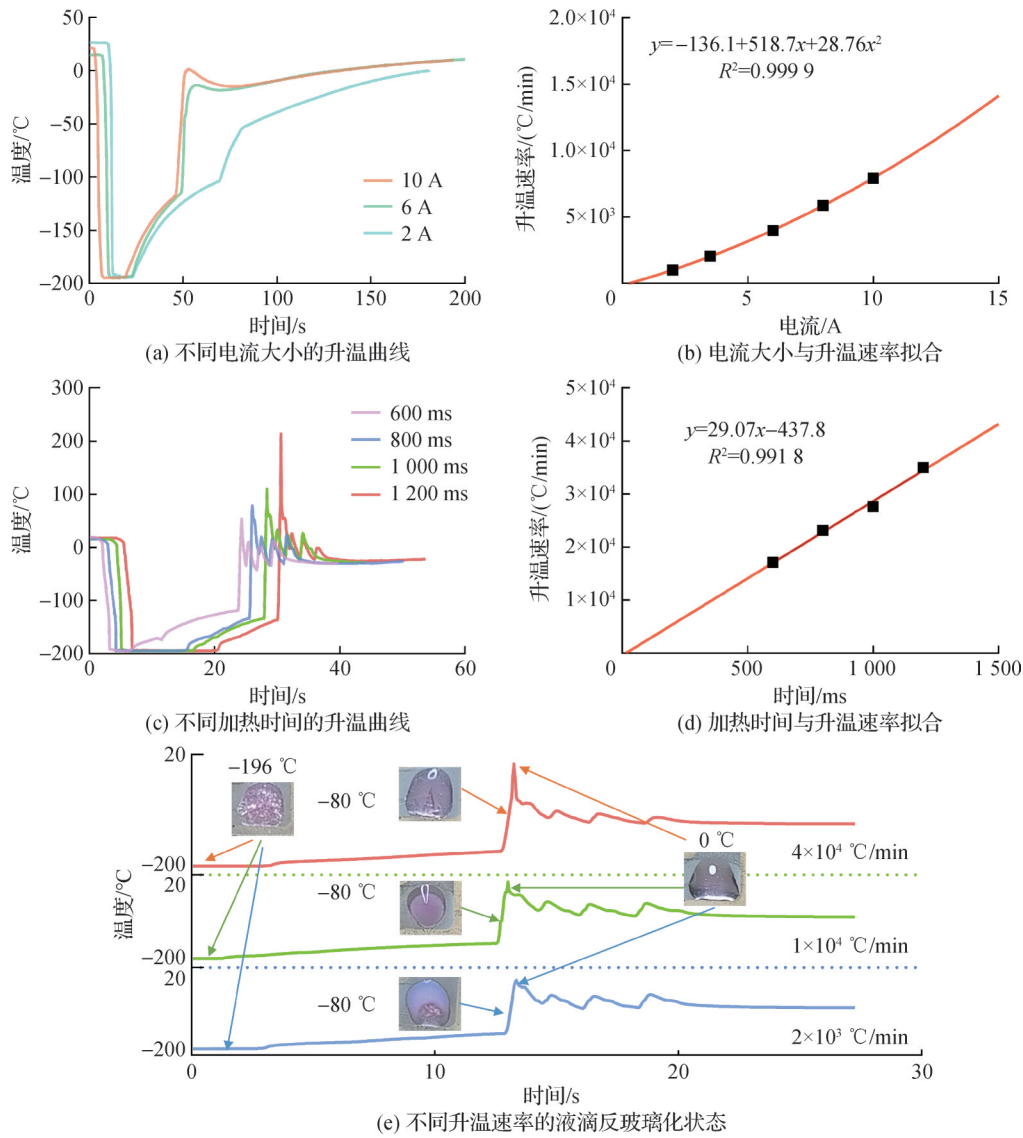


图 4 系统的可控复温能力

Fig.4 Controllable rewarming performance of the system

## 2.4 细胞保存效果评估

为了验证本系统在细胞降温及复温过程中的实用性和优势,对比了使用不同浓度单一保护剂甘油 (GLY)及复合保护剂 GLY+EG 溶液时,本系统与传统的麦管保存方法对 A549s 细胞活力的影响。基于上述研究结果,选择了 3 种复温速率进行实验。实验结果如图 5(a)、(b)所示(带底纹表示复温速率超过临界复温速率),当甘油浓度为 50% 时,中高复温速率组的复温速率均超过临界值,因此 2 组间的细胞存活率差异不显著,分别为 76.00% 和 74.33%。然而,这 2 组的细胞存活率均显著高于未达到临界复温速率的低复温速率组(43.19%)。该结果表明,在 50% 甘油浓度条件下,达到或超过临界复温速率对于提高细胞存活率具有重要作用。经过本系统冻存后的细胞活力显著高于麦管保存组。总体来看,超过临界

复温速率的实验组细胞存活率显著大于未超过临界复温速率组,本系统冻存后的细胞活力显著高于麦管保存组,但当复温速率都超过临界复温速率时,无明显差异。值得注意的是,40% 甘油的麦管组与 15% 甘油+15%EG 组的效果不佳,可能是未实现完全玻璃化所致。实验结果表明,在复温阶段,通过合理设定退火点温度和升温速率,系统不仅有效避免了较低浓度保护剂的反玻璃化现象,从而显著提升了细胞活力。

## 3 结论与展望

本文设计了一种低成本、降温与复温快速且可控的冻存系统,有效解决了玻璃化保存过程中降温速率难以控制、过程不稳定等关键问题。通过对降温与复温过程中温度的精确监测与分析,得到如

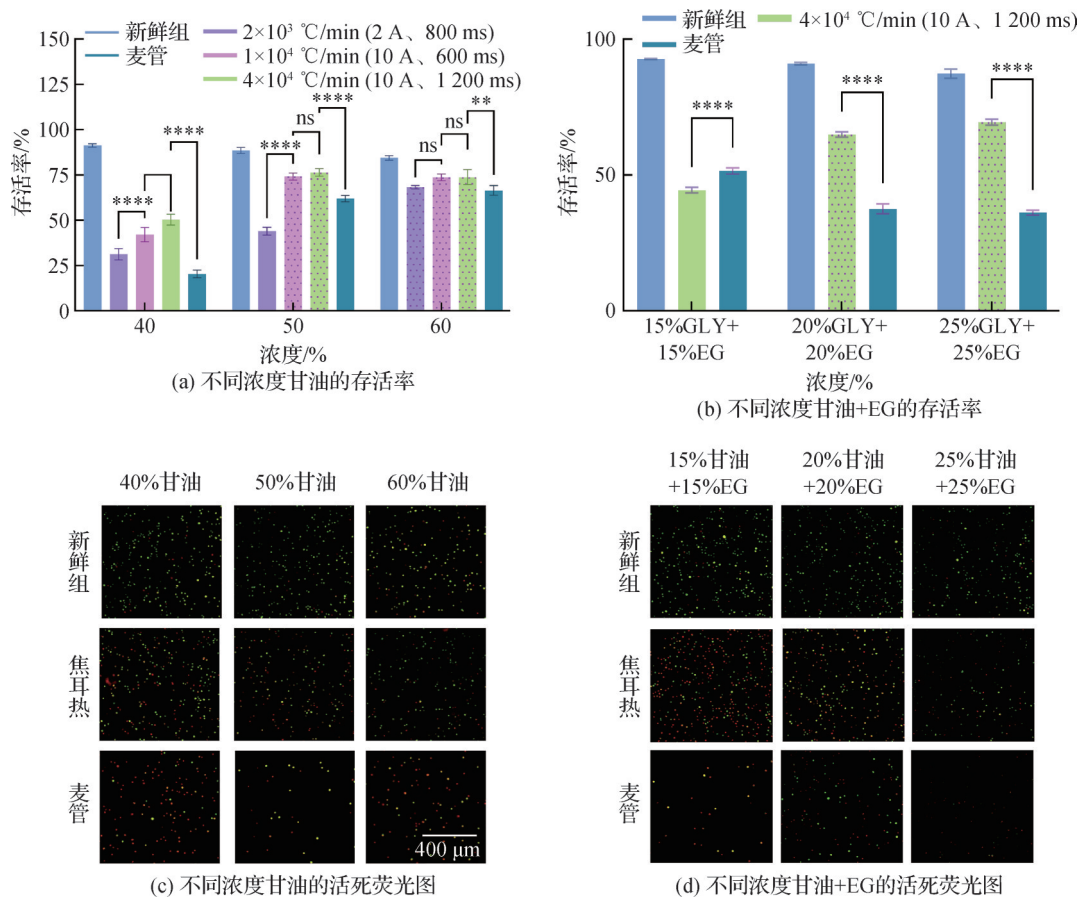


图 5 系统细胞低温保存效果

Fig.5 Cryopreservation effect of equipment cells

下结论:

1) 本系统能够实现可控快速降温, 降温速率随着下降速率的增加而增大, 最高可达  $1.8 \times 10^4$  °C/min, 降低了低温保护剂玻璃化的浓度。观察到液滴在降温过程中随着降温速率的改变出现多种状态, 包括结晶、半结晶半玻璃化以及完全玻璃化现象。

2) 同时在可控复温阶段, 本系统同样表现出色, 升温速率最高达  $4 \times 10^4$  °C/min。通过对不同电流大小和加热时间的精确控制, 避免了较低浓度保护剂的反玻璃化现象, 并观察到了液滴在升温过程中的 3 种不同现象: 完全反玻璃化、顶部反玻璃化以及未反玻璃化。

3) 与传统麦管保存方法相比, 本系统采用的焦耳热复温方法展现出显著优势。在 50% 甘油浓度下的存活率为 78.56%, 显著高于麦管的 61.80%, 当保护剂变成复合组分时同样适用。当复温速率大于临界复温速率时细胞存活会显著提升。

该系统为细胞微液滴玻璃化保存领域提供了创新性解决方案, 在生物医学领域具有广阔的应用前景, 尤其适用于细胞、组织及生物样本库中各类生物材料的长期保存。该系统可为干细胞、精子、卵子及

胚胎等重要生物样本的保存提供更优化的技术方案。然而, 在复温过程中, 水蒸气的存在会导致液滴形态发生变化, 这可能会影响保存效果。针对该问题, 后续研究可考虑采用环境除湿、真空环境操作或添加疏水涂层等方法进行优化。此外, 未来的研究重点将集中于细胞回收系统的优化, 以满足高通量保存需求, 从而为玻璃化高通量液滴细胞储存和复苏技术的广泛应用奠定坚实的理论基础和技术支撑。

#### 参考文献

- [1] MENEGHEL J, KILBRIDE P, JOHN MORRIS G. Cryopreservation as a key element in the successful delivery of cell-based therapies-a review [J]. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 592242.
- [2] TAYLOR M J, WEEGMAN B P, BAICU S C, et al. New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs [J]. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2019, 46(3): 197-215.
- [3] WENG L, BEAUCHESNE P R. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: a review [J]. *Cryobiology*, 2020, 94: 9-17.

- [4] AMINI M, BENSON J D. Technologies for vitrification based cryopreservation [J]. *Bioengineering*, 2023, 10 (5): 508.
- [5] AONO A, NAGATOMO H, TAKUMA T, et al. Dynamics of intracellular phospholipid membrane organization during oocyte maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle [J]. *Theriogenology*, 2013, 79(8): 1146–1152.e1.
- [6] XU Yi, WANG Ting, DENG Xiao, et al. Analysis on the Leidenfrost effect of cryoprotectant microdroplets on the liquid nitrogen surface [J]. *Scientia Sinica Technologica*, 2017, 47(2): 190–196.
- [7] SHARMA Y, SHARMA M. Biophysics of cryopreservation [J]. *International Journal of Thermodynamics*, 2022, 25 (1): 17–27.
- [8] VAJTA G, HOLM P, KUWAYAMA M, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 51(1): 53–58.
- [9] KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method [J]. *Theriogenology*, 2007, 67 (1) : 73–80.
- [10] LANE M, SCHOOLCRAFT W B, GARDNER D K, et al. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique [J]. *Fertility and Sterility*, 1999, 72(6): 1073–1078.
- [11] LIMA G L, LUZ V B, LUNARDI F O, et al. Effect of cryoprotectant type and concentration on the vitrification of collared peccary (*Pecari tajacu*) ovarian tissue [J]. *Animal Reproduction Science*, 2019, 205: 126–133.
- [12] 朱文欣, 潘平安, 黄永华, 等. 基于固体表面冷冻激光复温法的液滴冻融实验研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2023, 40 (5) : 973–981. (ZHU Wenxin, PAN Ping'an, HUANG Yonghua, et al. Droplet freeze-thawing system based on solid surface vitrification and laser rewarming [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2023, 40 (5) : 973–981.)
- [13] LANDA V, TEPLÁ O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops [J]. *Folia Biologica*, 1990, 36 (3/4): 153–158.
- [14] DEMIRCI U, MONTESANO G. Cell encapsulating droplet vitrification [J]. *Lab on a Chip*, 2007, 7(11): 1428–1433.
- [15] ZHANG X, KHIMJI I, SHAO L, et al. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation [J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(4): 553–564.
- [16] CUI Mengdong, ZHAN Taijie, YANG Jiamin, et al. Droplet generation, vitrification, and warming for cell cryopreservation: a review [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2023, 9(3): 1151–1163.
- [17] XU Yi, GUO Ning, YANG Guoliang, et al. Cryobiology for biobanking [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2023, 53 (7) : 1021–1034.
- [18] 韩恒鑫, 胥义, 刘宝林. 复杂组织器官低温保存研究进展 [J]. *真空科学与技术学报*, 2022, 42 (1) : 1–13. (HAN Hengxin, XU Yi, LIU Baolin. Advances in cryopreservation of tissues and organs [J]. *Chinese Journal of Vacuum Science and Technology*, 2022, 42 (1) : 1–13.)
- [19] SEKI S, MAZUR P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure [J]. *Cryobiology*, 2009, 59 (1) : 75–82.
- [20] PAN Jiaji, ZENG Qijin, PENG Ke, et al. Review of rewarming methods for cryopreservation [J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2024, 22(4): 304–308.
- [21] KLEINHANS F W, SEKI S, MAZUR P. Simple, inexpensive attainment and measurement of very high cooling and warming rates [J]. *Cryobiology*, 2010, 61(2): 231–233.
- [22] GUO Z, ZUCHOWICZ N, BOUWMEESTER J, et al. Conduction-dominated cryomesh for organism vitrification [J]. *Advanced Science*, 2024, 11(3): 2303317.
- [23] ZHAN Li, HAN Zonghu, SHAO Qi, et al. Rapid joule heating improves vitrification based cryopreservation [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6017.
- [24] HAN Hengxin, ZHAN Taijie, CUI Mengdong, et al. Investigation of rapid rewarming chips for cryopreservation by joule heating [J]. *Langmuir*, 2023, 39(31): 11048–11062.
- [25] PROFESSOR X X. Joule heating in electrokinetic flow [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(1): 33–43.
- [26] HAN Z, BISHOP J C. Perspective: critical cooling and warming rates as a function of CPA concentration [J]. *Cryo Letters*, 2020, 41(4): 185–193.
- [27] MAZUR P, SEKI S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  at  $95^{\circ}$  to  $70\ 000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and warmed at  $610^{\circ}$  to  $118\ 000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ : a new paradigm for cryopreservation by vitrification [J]. *Cryobiology*, 2011, 62(1): 1–7.
- [28] 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.
- [29] ARAV A, NATAN Y, KALO D, et al. A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2018, 35 (7) :

- 1161–1168.
- [30] SEKI S, KAWABE T, YAMAZAKI W, et al. Cryopreservation of rat embryos at all developmental stages by small-volume vitrification procedure and rapid warming in cryotubes[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 20903.
- [31] ZHU Y, ZHANG Q J, FENG H L, et al. Automation in vitrification and thawing of mouse oocytes and embryos[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1330684.
- [32] BEREJNOV V, HUSSEINI N S, ALSALED O A, et al. Effects of cryoprotectant concentration and cooling rate on vitrification of aqueous solutions [J]. *Journal of Applied Crystallography*, 2006, 39(2): 244–251.
- [33] WARKENTIN M, STANISLAVSKAIA V, HAMMES K, et al. Cryocrystallography in capillaries: critical glycerol concentrations and cooling rates [J]. *Journal of Applied Crystallography*, 2008, 41(4): 791–797.
- [34] HOPKINS J B, BADEAU R, WARKENTIN M, et al. Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions [J]. *Cryobiology*, 2012, 65(3): 169–178.

#### 通信作者简介

胥义,男,教授,上海理工大学生物系统热科学研究所,13917434302, E-mail: xuyi@usst.edu.cn。研究方向:低温生物医学技术。

#### About the corresponding author

Xu Yi, male, professor, Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, 86–13917434302, E-mail: xuyi@usst.edu.cn. Research fields: low temperature biomedical technology.