

文章编号:0253 – 4339(2018) 04 – 0063 – 07
doi:10. 3969/j. issn. 0253 – 4339. 2018. 04. 063

最小体积法玻璃化保存的研究进展

张宵敏 周新丽

(上海理工大学医疗器械与食品学院 上海 200093)

摘 要 在低温保存领域,玻璃化能有效防止冰晶的形成,具有良好的保存效果。玻璃化保存需要的条件是极快的降温速率和高浓度的低温保护剂,但高浓度低温保护剂会对细胞造成渗透损伤和毒性损伤。最小体积法能通过减小样本体积,大大提高降温速率,降低实现玻璃化所需的保护剂浓度。本文综述了最小体积法玻璃化保存的最新研究进展,包括有载体的微滴玻璃化保存、喷射微滴玻璃化保存、生物打印微滴玻璃化保存和微流体封装微滴玻璃化保存。其中,喷射微滴玻璃化保存、生物打印微滴玻璃化保存及微流体封装微滴玻璃化保存,是将新型的微滴产生技术与玻璃化技术相结合,因其能迅速产生大小均匀的微滴,具有高通量特点,在低温保存领域具有很大的发展潜力。

关键词 最小体积法;玻璃化;喷射微滴;生物打印;微流体封装
中图分类号:TB61⁺1; R318. 25 **文献标识码**: A

Research Progresses in Vitrification by Minimum Volume Method

Zhang Xiaomin Zhou Xinli

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China)

Abstract Vitrification is an effective method in the field of cryopreservation since it can prevent the formation of ice crystals. Vitrification requires ultra-fast cooling rates and high concentrations of cryoprotective agents. However, osmotic injury and toxic damage can be caused by high concentration of cryoprotective agents. The minimum volume methods can significantly increase the cooling rate and reduce the concentration of cryoprotective agents in vitrification. In this paper, the latest research progresses in vitrification by minimum volume methods are reviewed. The minimum volume methods include carrier-based droplet vitrification, spray droplet vitrification, bio-printing droplet vitrification, and microfluidic encapsulation droplet vitrification. Among these, spray droplet vitrification, bio-printing droplet vitrification, and microfluidic encapsulation droplet vitrification are the combination of emerging droplet generation technology and vitrification technology. Because of the rapid generation of uniform droplets and high throughput, they have great potential in the field of cryopreservation.

Keywords minimum volume methods;vitrification;spray droplet;bio-printing;microfluidic encapsulation

低温环境下,细胞或组织的代谢活动会削弱甚至完全停止。低温环境为细胞、组织的长期有效储存提供条件,使其可广泛应用于组织工程、再生医学和辅助生殖等多个领域^[1]。目前实现细胞低温保存的方法有慢速冷冻法和玻璃化法。慢速冷冻法于 20 世纪 70 年代早期出现,它是先将冻存管放在程序降温盒中以 1 ~ 2 ℃/min 的降温速率缓慢降至某一中间温度,然后置于液氮中保存。慢速冷冻法需要 1 ~ 2 mol/L^[2] 的低温保护剂(cryoprotectant agents, CPAs),冷冻过程中易形成冰晶,冰晶对细胞结构具有破坏作

用^[3],保存效果不理想。玻璃化是将液体直接转化为非晶态(玻璃态)的固体,在此过程中无冰晶形成。与慢速冷冻法相比,玻璃化法需要更高的 CPAs 浓度,如 6 ~ 8 mol/L,以及更高的降温速率,如 10⁵ ℃/min^[4]。

实现玻璃化有两种方法,一种是提高 CPAs 浓度,另一种是提高冷却速率。高浓度 CPAs 会对细胞造成渗透休克及毒性损伤,具有致命性损伤^[4],因此该方法有较大的局限性。研究表明,实现玻璃化过程中,降温速率与保护剂浓度间存在一定对应关系,降

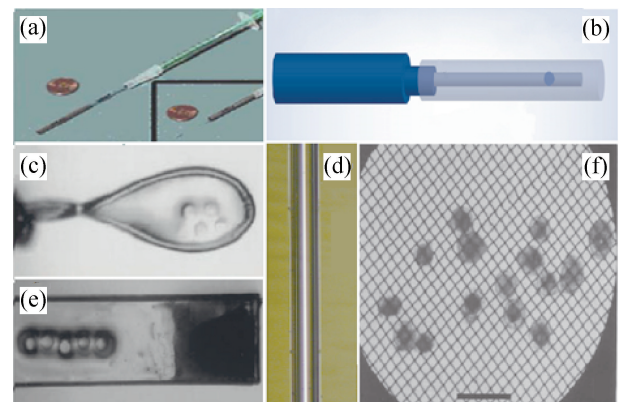
温速率越高,实现玻璃化所需要的 CPAs 浓度越低。理论显示,当冷却速度大于 $10^6\text{ }^\circ\text{C/s}$ 时,甚至纯净水也可以实现玻璃化^[5]。提高降温速率有两种方法:1) 提高传热系数,如将液滴直接喷入液氮中或优化载体传热特性。Y. S. Song 等^[6]发现液滴与液氮直接接触时,液滴表面易形成一层氮气膜,这层薄膜会降低热传递效率,降温速率并未得到明显提升。采用优化载体传热特性的方法,如石英毛细管法,对胚胎干细胞玻璃化,降温速率高于 $10^5\text{ }^\circ\text{C/min}$,在较低的 CPAs 浓度下,如 2 mol/L 丙二醇和 0.5 mol/L 海藻糖即可实现玻璃化^[5,7-8];2) 通过降低微滴体积提高降温速率。研究表明,当微滴尺寸降低至 0.1 μL 时,微滴从表面到中心的降温速率均超过 $10^5\text{ }^\circ\text{C/min}$ ^[9-10],能成功实现玻璃化。

最小体积法玻璃化保存,即通过降低微滴体积实现玻璃化。微滴体积足够小时,可显著提高降温速率,减少玻璃化所需的 CPAs 浓度,有助于提高保存后细胞的活性和功能。本文综述了最小体积法玻璃化保存的最新研究进展,包括有载体的微滴玻璃化保存、喷射微滴玻璃化保存、生物打印微滴玻璃化保存、微流体封装微滴玻璃化保存。其中,喷射微滴玻璃化保存、生物打印微滴玻璃化保存及微流体封装微滴玻璃化保存,是将新型的微滴产生技术与玻璃化保存技术相结合。因其能迅速产生大小均匀的微滴,具有高通量的特点^[9-11],在低温保存领域具有很好的发展前景。

1 有载体的微滴玻璃化保存

目前,最小体积法玻璃化保存的研究大都集中于有载体的微滴玻璃化保存,如开放式拉伸麦管法(open pulled straw, OPS)^[1],半麦管法(Hemi-straw)^[8],冷冻环法(Cryoloop)^[8],石英毛细管法(quartz microcapillary, QMC)^[3],Cryotop 法^[8],电镜铜网法(electron microscopic grids, EMG)^[12]等,如图 1 所示。基于载体的微滴玻璃化保存需靠载体影响传热,因此载体的选择至关重要,通常选导热性良好的材质。通过合理设计载体几何结构,使所容纳的冷冻液体积尽可能少,以提高降温速率。如 EMG 是以铜纱网作为冷冻载体,冷冻时,将其直接投入液氮中以实现高的冷冻速率,冷却速率约为 $3\ 000\text{ }^\circ\text{C/min}$ ^[13]。OPS^[14]是利用虹吸原理将含有细胞的微滴吸入拉伸麦管细端,然后快速投入液氮中进行冷冻,降温速率约 $16\ 000\text{ }^\circ\text{C/min}$ 。Hemi-straw 是将 0.25 mL 的麦管开口端剪成长 1 cm,宽 0.5 mm 的薄片,冷冻时将含

有细胞的冷冻液直接移到薄片上,该方法克服了 OPS 易漂浮的缺点。由于冷冻液与液氮接触面增加,降温速率明显提升,超过 $20\ 000\text{ }^\circ\text{C/min}$ ^[12,15-16]。Cryotop 采用一个很窄的塑料薄膜带作为冷冻载体,连接一根硬塑料杆作为手柄,并带有一个安全帽。冷冻时,含有细胞的微滴被加载在薄膜带上,然后用毛细管将细胞周围的溶液全吸走,直到留一层薄薄的膜足够覆盖细胞,迅速插入液氮冷冻。采用这种方法降温速率可达 $40\ 000\text{ }^\circ\text{C/min}$ ^[17-19]。QMC 是选取传热速率更好的石英材料制作微管,管外径为 0.2 mm,厚度为 0.01 mm,可实现更快的降温速率,超过 $250\ 000\text{ }^\circ\text{C/min}$ ^[5]。Cryoloop 是借助表面张力在尼龙线圈上形成一层冷冻液薄膜,由于缺少固体物的支持,样本降温速率高达 $700\ 000\text{ }^\circ\text{C/min}$ ^[20-21]。



(a) 拉伸麦管法 OPS^[1]; (b) 半麦管法 Hemi-straw^[8];
(c) 冷冻环法 Cryoloop^[8]; (d) 石英毛细管法 QMC^[3];
(e) Cryotop 法^[8]; (f) 电镜铜网法 EMG^[12]。

图 1 有载体的微滴玻璃化保存方法
Fig. 1 Methods of carrier-based droplets
vitrification preservation

有载体的微滴玻璃化保存主要应用于卵母细胞和胚胎的玻璃化保存。采用不同载体玻璃化保存的结果,如表 1 所示。可知玻璃化保存卵母细胞时,不同载体对卵母细胞的保存效果有很大差异。如 M. Kuwayama 等^[17-18]对牛卵母细胞玻璃化保存,相较于 OPS,采用 Cryotop 保存的卵母细胞受精率和囊胚发育率更高,且纺锤体结构和染色体形态更正常。J. K. Choi 等^[22]采用 QMC 玻璃化保存卵母细胞,相较于采用 Hemi-straw^[16],所用的 CPAs 浓度降低,且保存后卵母细胞的发展潜力更大。有载体的微滴玻璃化保存也可用于干细胞等小体积细胞,如 He Xiaoming 等^[5]采用 QMC 玻璃化保存鼠胚胎干细胞。但每次仅可对少量的细胞进行玻璃化保存,且均需手动操作,对于再生医学和组织工程等临床需求量较大的

细胞,有载体的微滴玻璃化保存方法往往不可行,应用范围受限。

表 1 有载体的微滴玻璃化保存结果
Tab. 1 The results of carrier-based droplets vitrification

玻璃化方法	细胞种类	CPAs 浓度	存活率	参考文献
电镀铜网法	囊胚	40% 乙二醇 (v/v), 18% 聚蔗糖 (w/v), 10.26% 蔗糖 (w/v)	>73%	[12-13]
拉伸麦管法	胚胎	16.5% 二甲基亚砷 (v/v), 16.5% 乙二醇 (v/v), 0.5 mol/L 蔗糖	>70%	[14]
半麦管法	卵母细胞	20% 乙二醇 (v/v), 20% 二甲基亚砷 (v/v), 0.75 mol/L 蔗糖	>85%	[12, 15-16]
Cryotop 法	卵母细胞	5 mol/L 乙二醇, 1 mol/L 蔗糖	>90%	[17-19]
石英毛细管法	卵母细胞	8% 乙二醇 (v/v), 8 二甲基亚砷 (v/v), 1 mol/L 海藻糖	>90%	[22]
	干细胞	2 mol/L 丙二醇, 0.5 mol/L 海藻糖	>70%	[5]
冷冻环法	卵母细胞	10%~20% 二甲基亚砷 (v/v), 10%~20% 乙二醇 (v/v)	>80%	[20-21]

注:表中 v/v 为体积分数,w/v 为质量浓度。

2 喷射微滴玻璃化保存

喷射微滴玻璃化保存,是利用装置的喷嘴将含有细胞的悬浮液离散成微滴,然后在液氮中进行玻璃化保存。采用此方式喷射出的微滴呈无序状态。U. Demirci 等^[23-26]曾提出采用声学驱动微机械喷射器产生液滴,该喷射阵列的每个元素均由一个弯曲单晶硅圆薄膜构成,膜中心刻蚀一个孔。通过声波驱动压电换能器,使膜发生共振位移,即可喷射出微滴。采用该装置进行水喷射实验,在 0.47、1.24、2.26 MHz 频率下操作,产生的液滴直径相应为 6.5、5.0、3.5 μm。该装置产生的微滴尺寸微小,但缺点是当喷射液体浓度增大时易导致喷嘴堵塞。随后,U. Demirci 等^[27]又提出一种开放式无喷嘴喷射系统。该装置由交错的金属环按需产生声波,声波在微流道中空气和流体之间的界面聚焦,产生液滴。该装置可产生直径约 37 μm 的微滴,成功应用于胚胎干细胞、成纤维细胞、AML-12 肝细胞、人类 Raji 细胞和 HL-1 心肌细胞等不同类型细胞,且喷射后细胞活性均超过 89.8%。装置每秒可生成 10 000 个微滴,具有高通量特点。但是由于该装置为开放式聚焦,声波不宜形成径向耦合,因此不利于稳定喷射。

J. Samot 等^[28]提出了纳升级喷射微滴玻璃化保存系统。该系统由氮气流输送装置、已加载 CPAs 的细胞悬浮液注射装置、薄膜收集装置三部分构成。喷嘴由 200 μL 移液枪头和 27G 斜口针头制作而成。其制作步骤是,距枪头尖端 2 cm 处从侧面插入 27G 针头,枪头尖端切去 2 mm,针头露出尖端 2 mm。枪头敞口端连接内径 3.2 mm 的连接管输入氮气流;27G 针头端输入已加载好 CPAs 的细胞悬浮液,悬浮

液注射速度由微注射泵控制。进行喷射实验时,由氮气流和含有细胞的悬浮液构成共流,利用氮气流将含有细胞的悬浮液吹打成微滴。产生的微滴用直径 8.5 cm 聚乙烯薄膜接收,然后用镊子夹取薄膜放入液氮中进行玻璃化。R. E. Assal 等^[29]将该系统应用于红细胞玻璃化保存,研究氮气流速、悬浮液注射速度、聚乙烯薄膜接收位置三个参数对微滴大小的影响。发现当氮气流速设置为 3 L/min、注射泵流速设置为 200 μL/min、聚乙烯薄膜距喷嘴 6~9 cm 处时,此时收集到的液滴尺寸最小,微滴直径 (55 ± 14) μm。然后将喷有微滴的聚乙烯薄膜浸入无菌液氮中进行玻璃化保存,结果显示,在低浓度保护剂 4.5% (v/v) 四氢嘧啶中,含有红细胞的微滴即可实现玻璃化,且复温后细胞活性较高。Zhang X. 等^[30]将该系统应用于卵母细胞保存,实现了卵母细胞的玻璃化保存。当实验条件设置氮气流速为 0.8 L/min 时,可产生最优尺寸的液滴,直径为 (140 ± 58) μm。结果表明,减小微滴体积能降低玻璃化保存时所需的 CPAs 浓度,在 1.4 mol/L 乙二醇、1.1 mol/L DMSO 和 1 mol/L 蔗糖条件下,即可实现卵母细胞玻璃化。采用该系统保存卵母细胞,细胞存活率较高,且孤雌激活后分裂率达 96%,囊胚率达 26%。

喷射微滴玻璃化保存系统产生的微滴足够小,将其直接喷入液氮,降温速率可明显提升。冷却速率超过 10⁵℃/min,是塑料麦管冷冻速率的 40 倍。可明显降低玻璃化保存时所需的 CPAs 浓度,避免了高浓度保护剂对细胞造成的渗透损伤和毒性损伤。然而,该系统尚存在不足之处,如 R. E. Assal 等^[29]提出的系统,仅用一个直径为 8.5 cm 的聚乙烯薄膜接收含红细胞的液滴,每次能够处理的细胞量仅为 80 μL。若

单次接收时间过长,则会造成微滴叠加,微滴体积的增大不利于玻璃化保存。Zhang X. 等^[30]采用喷射微滴玻璃化保存卵母细胞时,易造成细胞丢失。

3 生物打印微滴玻璃化保存

生物打印技术是对生物材料,如活细胞、生长因子、基因、药物等进行打印的一种技术,可产生有序微滴。按驱动机制不同,可分为压电喷墨打印、热式打印、基于阀门打印、激光直写打印、激光转移诱导打印等。现已成功应用于组织三维重建、再生医学移植和诊断、药剂学及高通量筛选、癌症研究等^[31]多个领域,并已逐步拓展到医用低温保存领域。

基于生物打印技术,Xu Feng 等^[32]自主设计细胞打印机。该打印机以气动压力作为驱动机制,通过调节电磁阀开启时间来控制微滴大小。实验采取 160 滴每秒的速度对胚胎干细胞进行打印,通过合理控制液滴尺寸、细胞浓度及培养时间,最终形成统一尺寸的拟胚体。Shi Meng 等^[33]采用 Xu Feng 等^[32]的打印技术,设计了一款非接触式玻璃化装置。该装置由细胞室、液氮室及中间的一层 150 μm 超薄高导热速率银膜构成。实验时,先采用 Xu Feng 等^[32]的细胞打印机,将气动压力设定为 0.03 MPa,在细胞室形成一个 8×8 的均匀液滴矩阵。然后向液氮室注入液氮,利用液氮沸腾和超薄银膜热传递,即可迅速实现细胞玻璃化。该装置已成功实现 NIH3T3 细胞和 hASCs 细胞玻璃化保存,且避免了液氮对细胞造成的潜在污染。喷墨打印是利用压电元件驱动流体体积压缩,储液罐内压力增加,导致细胞悬浮液通过喷嘴喷出微滴。U. Demirci 等^[34-35]基于喷墨打印技术开发出新型的生物打印装置。装置利用脉冲激励时间控制微滴生成,产生的微滴均垂直滴入下方液氮中玻璃化。冻存细胞用直径 70 μm 的细胞筛收集,并迅速转移到解冻液中解冻。结果显示,用类似于慢速冷冻所用的低浓度低温保护剂,1.5 mol/L 丙二醇和 0.5 mol/L 海藻糖即可实现玻璃化,复温后细胞存活率超过 90%。目前,该方法已经成功应用于多种动物细胞类型的玻璃化保存,如鼠肝细胞、3T3 成纤维细胞、HL-1 心肌细胞、小鼠胚胎干细胞和淋巴母细胞^[34]。R. Dou 等^[36]同样采用喷墨打印技术,将含有小鼠成纤维细胞 3T3 和人类神经祖细胞的悬浮液,以 9×9 的矩阵形式打印在聚合物底板上,微滴体积约 380 皮升,然后转移到温度为 293 K 的冰箱内玻璃化。用 DMSO 作抗冻剂对 3T3 细胞进行玻璃化实验,结果显示解冻后细胞平均活性大于 90%,所需的 CPAs 浓度小于 0.8 mol/L。与其他玻璃化保存方法相比,所需

的 CPAs 浓度明显降低。对人类神经祖细胞进行玻璃化保存,复苏后细胞活性仅 55%,但与采用传统方法所获得的细胞存活率具有可比性,所需的 CPAs 浓度也明显降低。

生物打印技术能迅速产生大小均匀的液滴,精准控制液滴喷射位置和方向,具有简单性和敏捷性。然而在低温保存领域,生物打印技术的应用仍存在挑战,如生成微滴时,剪应力、毛细管力等机械力均可能引起细胞变形;将细胞打印到接收面时,接触面对细胞的冲击力易造成细胞损伤等。因此,采用生物打印微滴玻璃化保存时,还需进一步优化方案,如选择合适的微滴产生机制、选择具有生物相容性的喷头及合理设计接收面等。

4 微流体封装微滴玻璃化保存

微流体液滴生成技术是指将两种不相融的流体,一种作为连续相,另一种作为分散相,将分散相以微小体积($10^{-15} \sim 10^{-9}$ L)单元形式分散于连续相中,在表面张力与剪切力共同作用下,自发形成微滴^[37]。微滴生成方式可分为被动法和主动法,被动法是通过控制微管道结构及两相流速来控制微滴生成;主动法是通过外场驱动力,如热量、气压、压电、微阀和磁场等,来生成微滴^[38]。目前微流体技术已成功应用于 DNA、蛋白质、酶的生化分析及细胞的筛选、病毒检测等多个领域,逐步拓展到玻璃化保存领域。

Huang Haishui 等^[39]设计了一款 5 个入口的微流体聚焦装置,由此制备细胞微胶囊。通道中间入口注含有细胞的悬浮液,两侧注海藻酸水溶液,利用海藻酸水溶液将细胞限制在所生成的微胶囊内部。距聚焦口最近的两侧通氯化钙溶液,运用瑞利-高原不稳定性,含有细胞的悬浮液被连续流动的氯化钙溶液封装成微滴。在该流动条件下,形成的微滴具有高分散性,微胶囊直径约 220 μm 。研究表明,少量的钙离子能增加藻酸盐基质强度,有助于保持微胶囊玻璃化保存后的完整性^[40]。采用该装置封装小鼠胚胎干细胞(mESCs)和人类脂肪干细胞(hADSCs)。于通道末端收集细胞微胶囊,然后用 QMC 法和 OPS 法玻璃化保存。结果表明,用 1.5 mol/L 丙二醇和 0.5 mol/L 海藻糖作为低温保护剂即可实现玻璃化,且复温后细胞活性大于 80%。通过低温显微镜观察,发现海藻酸盐微胶囊能有效抑制复温后反玻璃化现象发生。在采用微流体技术封装细胞时,保证每个微滴中所含细胞数的均匀性是该技术的关键。M. Chabert 等^[41]设计了一种 T 型微流控装置,该装置运用纯粹的流体力学方法,在没有任何外部传感及反馈控制下,即可将

细胞封装成皮升级微滴。通道中间入口通含细胞的培养基,左右两侧通入油,以油作为连续相,在剪切流中可变形物体的横向漂移和挤压流中立体驱动分散作用下,每秒可对 160 个细胞进行连续封装和排序。结果表明,封装的微滴中仅含有一个细胞的纯度为 70%~80%,仅有 1% 的微滴可能为空液滴。J. F. Edd 等^[42]采用同样的装置对细胞进行封装排序,并检测细胞活性,92.9% 的细胞膜保持完整性,对照组为 96.2%。装置每秒可产生 14.9×10^3 个皮升级液滴,明显具有细胞封装微滴体积小、通量高的特点。此外,在实现微流控芯片一体化方面,A. E. Sgro 等^[43]曾尝试在微流体芯片上直接对 B 淋巴瘤细胞封装冷冻。他提出在 T 型微通道的蛇形通道下游放置热电制冷器,利用水溶液和不混溶油冰点差别大,通过热电制冷器控制微流控芯片的部分温度,直接冻结芯片上的微滴。该装置在微流体芯片封装微滴玻璃化保存一体化结构设计上具有启发性。

微流体封装液滴玻璃化保存具有细胞封装效率高、微滴体积小的优点。然而,目前微流体封装微滴玻璃化保存相关研究尚处于起步阶段,仍面临诸多挑战,如封装的微滴体积可达到皮升级,易造成细胞缺氧,针对此问题,一种包含空气供应和多喷嘴出口的三维微流体装置^[44]正在研发中。在材质选择上,微流体芯片选用具有疏水性的聚二甲基硅氧烷制作,但仍面临导热受限,无法在芯片上直接实现玻璃化的问题。

5 总结与展望

最小体积法玻璃化保存为细胞长期有效储存提供重要手段。本文综述了最小体积法玻璃化保存的最新研究进展,包括有载体的微滴玻璃化保存、喷射纳升级微滴玻璃化保存、生物打印微滴玻璃化保存、微流体封装微滴玻璃化保存。其中,新型的微滴生成技术,如喷射技术、生物打印技术、微流体封装技术,可迅速产生大小均匀、尺寸微小的液滴。将其与玻璃化保存相结合,有望解决高通量问题,且满足自动化要求,将是未来最小体积法玻璃化保存的发展趋势。

参考文献

[1] ASGHAR W, EL A R, SHAFIEE H, et al. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine [J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(7): 895–903.
[2] TAO T, VALLE A D. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2008, 25 (7): 287–296.
[3] RISCO R, ELMOAZZEN H, DOUGHTY M, et al. Thermal performance of quartz capillaries for vitrification [J].

Cryobiology, 2007, 55(3): 222–229.
[4] 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.
[5] HE Xiaoming, PARK E Y H, FOWLER A, et al. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells [J]. *Cryobiology*, 2008, 56(3): 223–232.
[6] SONG Y S, JOSEPH D D. Vitrification and levitation of a liquid droplet on liquid nitrogen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(10): 4596–4600.
[7] JIAO Anjun, HAN Xu, CRITSER J K, et al. Numerical investigations of transient heat transfer characteristics and vitrification tendencies in ultra-fast cell cooling processes [J]. *Cryobiology*, 2006, 52(3): 386–392.
[8] ZHANG Xiaohui, CATALANO P N, GURKAN U A, et al. Emerging technologies in medical applications of minimum volume vitrification [J]. *Nanomedicine*, 2011, 6(6): 1115–1129.
[9] XU Feng, 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.
[10] XU Feng, MOON S J, ZHANG Xiaohui, et al. Multi-scale heat and mass transfer modelling of cell and tissue cryopreservation [J]. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2010, 368: 561–583.
[11] TASOGLU S, KAYNAK G, SZERI A J, et al. Impact of a compound droplet on a flat surface: A model for single cell epitaxy [J]. *Physics of Fluids*, 2010, 22(8): 569–578.
[12] PARK S P, KIM E Y, KIM D I, et al. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids [J]. *Human Reproduction*, 1999, 14 (11): 2838–2843.
[13] MARTINO A, SONGSASEN N, LEIBO S P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling [J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 54(5): 1059–1069.
[14] 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 & Development*, 1998, 51(1): 53–58.
[15] ISACHENKO E, ISACHENKO V, KATKOV I I, et al. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success [J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2003, 6

- (2):191–200.
- [16] LIEBERMANN J, TUCKER M. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification[J]. *Reproduction*, 2002, 124(4):483–489.
- [17] KUWAYAMA M, VAJTA G, KATO O, et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2005, 11(3):300–308.
- [18] MORATO R, IZQUIERDO D M, MOGAS T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development[J]. *Cryobiology*, 2008, 57(2):137–141.
- [19] KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method[J]. *Theriogenology*, 2007, 67(1):73–80.
- [20] 章志国, 苏天红, 邢琼, 等. 3种不同载体对卵母细胞玻璃化冷冻效果的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(8):908–911. (ZHANG Zhiguo, SU Tianhong, XING Qiong, et al. Effects of 3 different vectors on vitrification of oocytes[J]. *Journal of Medical University of Anhui*, 2012, 47(8):908–911.
- [21] VANDERZWALMEN P, BERTIN G, DE BAUCHE CH, et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing[J]. *Human Reproduction*, 2003, 18(7):1504–1511.
- [22] CHOI J K, HUANG H, HE X. Improved low-CPA vitrification of mouse oocytes using quartz microcapillary[J]. *Cryobiology*, 2015, 70(3):269–272.
- [23] DEMIRCI U, YARALIOGLU G G, HAEGGSTROM E, et al. 2D acoustically actuated micromachined droplet ejector array[J]. *IEEE Symposium on Ultrasonics*, 2003, 2:1983–1986.
- [24] DEMIRCI U, YARALIOGLU G G, HAEGGSTROM 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.
- [25] DEMIRCI U. Acoustic picoliter droplets for emerging applications in semiconductor industry and biotechnology[J]. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2006, 15(4):957–966.
- [26] DEMIRCI U. Droplet-based photoresist deposition[J]. *Applied Physics Letters*, 2006, 88(14):265.
- [27] DEMIRCI U, MONTESANO G. Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets[J]. *Lab on a Chip*, 2007, 7(9):1139–1145.
- [28] SAMOT J, MOON S, SHAO L, et al. Blood banking in living droplets[J]. *Plos One*, 2011, 6(3):69.
- [29] ASSAL R E, GUVEN S, GURKAN U A, et al. Bio-inspired cryo-ink preserves red blood cell phenotype and function during nanoliter vitrification[J]. *Advanced Materials*, 2014, 26(33):5815–5822.
- [30] ZHANG X, KHIMJI I, SHAO L, et al. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation[J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(4):553–564.
- [31] GUDAPATI H, DEY M, OZBOLAT I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: past, present and future[J]. *Biomaterials*, 2016, 102:20–42.
- [32] XU Feng, SRIDHARAN B P, WANG Shuqi, et al. Embryonic stem cell bioprinting for uniform and controlled size embryoid body formation[J]. *Biomicrofluidics*, 2011, 5(2):1399–1406.
- [33] SHI Meng, LING Kai, YONG K W, et al. High-throughput non-contact vitrification of cell-laden droplets based on cell printing[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:1–8.
- [34] DEMIRCI U, MONTESANO G. Cell encapsulating droplet vitrification[J]. *Lab on a Chip*, 2007, 7(11):1428–1433.
- [35] YOUN J R, SONG Y S. Cell-encapsulating droplet formation and freezing[J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 101(13):438–441.
- [36] DOU R, SAUNDERS R E, MOHAMET L, et al. High throughput cryopreservation of cells by rapid freezing of sub- μ l drops using inkjet printing-cryoprinting[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(17):3503–3513.
- [37] GARSTECKI P, FUERSTMAN M J, STONE H A, et al. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up[J]. *Lab on a Chip*, 2006, 6(3):437–446.
- [38] ZHU Pingan, WANG Lique. Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 17(1):34–75.
- [39] HUANG Haishui, CHOI J K, RAO Wei, et al. Alginate hydrogel microencapsulation inhibits devitrification and enables large-volume low-CPA cell vitrification[J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(44):6939–6850.
- [40] ZHANG Wujie, YANG Geer, ZHANG Aili, et al. Preferential vitrification of water in small alginate microcapsules significantly augments cell cryopreservation by vitrification[J]. *Biomed Microdevices*, 2010, 12(1):89–96.
- [41] CHABERT M, VIOVY J L, CHABERT M, et al. Chabert M & Viovy J-L Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(9):3191–3196.

(下转第88页)

- tric fluid [J]. *Applied Thermal Engineering*, 2011, 31 (11/12): 1983 – 1993.
- [9] 张伟, 王照亮. 微槽群表面喷雾冷却换热特性[J]. *北京工业大学学报*, 2014, 40(5): 765 – 770. (ZHANG Wei, WANG Zhaoliang. Heat transfer characteristics of micro-grooves surface spray cooling [J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2014, 40(5): 765 – 770.)
- [10] COURSEY J S, KIM J, KIGER K T. Spray cooling of high aspect ratio open microchannel [J]. *Journal of Heat Transfer-Transaction of ASME*, 2007, 129(8): 1052 – 1059.
- [11] 王亚青, 刘明候, 刘东, 等. 高功率激光武器喷雾冷却的实验研究 [J]. *强激光与粒子束*, 2009, 21(12): 1761 – 1766. (WANG Yaqing, LIU Minghou, LIU Dong, et al. Experimental study on spray cooling for high-power laser [J]. *High Power Laser and Particle Beams*, 2009, 21(12): 1761 – 1766.)
- [12] KLINE S J. Describing uncertainties in single sample experiments [J]. *Mechanical Engineering*, 1953, 75(1): 3 – 7.
- [13] HSIEH C C, YAO S C. Evaporative heat transfer charac-
- [42] EDD J F, DI C D, HUMPHRY K J, et al. Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops [J]. *Lab on a Chip*, 2008, 8(8): 1262 – 1264.
- [43] SGRO A E, AND P B A, CHIU D T. Thermoelectric manipulation of aqueous droplets in microfluidic devices [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(13): 4845 – 4851.
- [44] MAJEWSKI R L, ZHANG Wujie, MA Xiaojun, et al. Bioencapsulation technologies in tissue engineering [J]. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 2016, 14(4): 395 – 403.

teristics of a water spray on micro-structured silicon surfaces [J]. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2006, 49(5/6): 962 – 974.

- [14] CIOFALO M, CARONIA A, LIBERTO M D, et al. The Nukiyama curve in water spray cooling: its derivation from temperature-time histories and its dependence on the quantities that characterize drop impact [J]. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2007, 50(25/26): 4948 – 4966.

通信作者简介

蒋彦龙, 男, 教授, 博士生导师, 南京航空航天大学航空宇航学院, (025)84893361, E-mail: jiang-yanlong@nuaa.edu.cn. 研究方向: 高效换热, 飞机防除冰, 两相流换热技术。

About the corresponding author

Jiang Yanlong, male, professor, Ph. D. supervisor, College of Aerospace Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, +86 25-84893361, E-mail: jiang-yanlong@nuaa.edu.cn. Research fields: high efficiency heat exchange, aircraft anti-icing, two phase flow heat transfer technology.

(上接第 68 页)

通信作者简介

周新丽, 女, 博士, 副教授, 上海理工大学医疗器械与食品学院, 13817547878, E-mail: zjulily@163.com. 研究方向: 细胞低温保存。

About the corresponding author

Zhou Xinli, female, Ph. D., associate professor, School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, +86 13817547878, E-mail: zjulily@163.com. Research fields: cell cryopreservation.