

超声植冰协同海藻糖冷冻保存 L-02 肝细胞研究

李维杰¹, 申敬¹, 宋立勇¹, 周新丽¹,
王建信², 刘宝林^{1,3}

(1. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093; 2. 原能细胞科技集团, 上海 201203;
3. 上海市肿瘤能量治疗技术与器械协同创新中心, 上海 200093)

摘要: 采用海藻糖代替具有生物毒性的二甲基亚砷, 利用自行搭建的超声植冰装置研究了超声植冰以及不同浓度海藻糖对 L-02 肝细胞冷冻保存的影响。结果表明, 添加 0.3 mol/L 海藻糖结合超声植冰的细胞冻存组的肝细胞存活率较高 ((87.6±2.0)%), 与传统植冰组 ((84.3±1.0)%) 无显著性差异, 与非植冰组 ((76.9±3.1)%) 存在显著性差异。

关键词: 超声植冰; 海藻糖; 肝细胞; 冷冻保存

中图分类号: R 318.52 **文献标志码:** A

Cryopreserving L-02 hepatocytes with trehalose by ultrasonic ice seeding

LI Weijie¹, SHEN Jing¹, SONG Liyong¹, ZHOU Xinli¹, WANG Jianxin², LIU Baolin^{1,3}

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;
2. Origincell Technology Group, Shanghai 201203, China; 3. Co-innovation Center for Energy Therapy of Tumors, Shanghai 200093, China)

Abstract: Effects of ultrasonic ice seeding and different concentrations of trehalose on the cryopreservation of L-02 hepatocytes were studied by replacing bio toxic dimethyl sulfoxide with trehalose in a self-built ultrasonic ice seeding device. The results show that the survival rate of hepatocytes (87.6±2.0)% is higher when cryopreserving L-02 hepatocytes with 0.3 mol/L trehalose by ultrasonic ice seeding, which is not significantly different from the traditional ice seeding group (84.3±1.0)%, and a significantly different from the non-ice seeding group (76.9±3.1)%.

Keywords: ultrasonic ice seeding; trehalose; hepatocyte; cryopreservation

随着人工肝脏及肝细胞移植研究的开展, 肝细胞保存的临床需求不断增加。传统的肝细胞低温保存多使用渗透性保护剂二甲基亚砷 (Me₂SO),

通过程序降温或者玻璃化的方法保存肝细胞。虽然 Me₂SO 作为低温保护剂可以得到较高的细胞存活率, 但是, 该物质在实验室和临床应用中的副

收稿日期: 2022-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51776130)

第一作者: 李维杰 (1983-), 男, 副教授。研究方向: 低温生物医学。E-mail: 13651731551@139.com

通信作者: 刘宝林 (1968-), 男, 教授。研究方向: 生物样品低温保存、仪器研发等。E-mail: blliuk@163.com

作用也很明显。有报道显示,使用 Me_2SO 可能会出现一些副作用,如恶心、呕吐、腹泻、溶血、皮疹、肾衰竭、高血压、心动过缓、肺水肿等^[1-5],以及可能会对胚胎及卵母细胞的发育造成影响^[6]。因此,将冷冻保存的肝细胞用于患者体内之前,必须清除保护剂。有临床结果表明,没有完全清除 Me_2SO 的肝细胞植入患者体内时会引发多种并发症,如血管内溶血、血清转氨酶升高等^[7]。因此,迫切需要一种降低 Me_2SO 的方法以避免临床使用冻存肝细胞时可能出现的并发症。海藻糖是具有抗氧化功能和非渗透性冷冻保护功能的非还原性二糖,具有很好的生物相容性,可以降低 Me_2SO 的使用。海藻糖的非热力学平衡相变研究显示,海藻糖能够消除生理盐水中共晶的形成,抑制冰晶生成^[8]。2019年,有学者在红细胞冷冻保存时加入少量的海藻糖使得细胞冷冻存活率从 69% 升高至 90%^[9]。但是,一般需经过复杂的孵育过程将海藻糖输送到细胞内^[10-12],或者和其他保护剂如 Me_2SO 、甘油^[13] 等复配以提高细胞存活率。

植冰法是一种有效提升细胞冷冻存活率的方法,这是由于在实际降温过程中,细胞溶液中会出现过冷现象,较大的过冷度会使细胞溶液因释放潜热而温度上升,潜热释放完全后,可能会出现很高的降温速率,引起细胞不可控的结晶,造成细胞大量死亡^[14]。过冷度越小,低温保存过程中产生的晶核数量越少,冰晶的生长速率越慢,形成的冰晶棱角较小,对细胞产生的伤害越小^[15]。通过植冰的方法,人为地加入冰核,可以降低过冷度,避免胞内冰的损伤,且在细胞复温的过程中可以避免细胞重结晶,提高细胞存活率。目前主要有 6 种^[16] 植冰技术诱导成核,能够诱导溶液在较高的零下温度下成核,降低溶液的过冷度,改变冰晶的形态,避免胞内冰的损伤。一般使用冰成核诱导剂^[17-18] 或者预冷的镊子探针等进行人工置核,由于接触式置核可能会对细胞造成污染,非接触式置核在逐渐兴起,如超声波诱导冰晶成核。王葳等^[19] 发现超声波能够对水的过冷结冰过程产生影响,在 800 kHz 的超声波下超声波能够大幅降低水的过冷度。李维杰等^[20] 用自行组装的超声植冰装置研究了不同的超声强度、不同的预冻温度及不同浓度的 Me_2SO 对肝细胞存活率的影响,研究发现,超声波植冰能够显著提高肝细胞的存活率(高达 97% 左右),与新鲜组无显著性差异。目前利用超声波诱导冰晶形成的研究尚不

完善,主要用于食品、药品、疫苗的冷冻浓缩和冷冻干燥等^[21-23],用于细胞冻存的研究相对较少。2005年,Chow 等^[24] 较早提出在超声波存在时,即使蔗糖溶液的浓度不同,都始终在较高的温度下成核,认为冰成核与超声波的功率与空化气泡有关。超声诱导晶体的形成可以分为 2 个过程:当溶液初始无晶体存在时,超声诱导溶液发生一次成核,在没有固体表面和杂质的情况下,发生均相成核^[25];有晶体存在引起的成核为二次成核,无论是初始存在的还是一次成核形成的晶体,在晶体固体界面的成核都称为非均相成核。

本实验以 L-02 肝细胞为研究对象,使用非渗透性的海藻糖作为冷冻保护剂,结合自行研发的超声波植冰装置研究去除渗透性保护剂 Me_2SO 的低温保存方案。

1 材料和方法

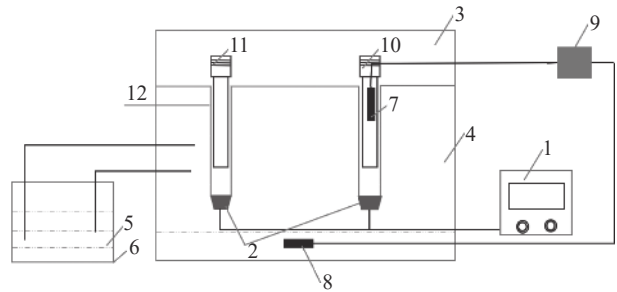
1.1 材料和试剂

实验所用的主要材料和试剂:L-02 正常人类肝细胞系(中科院上海细胞生物研究所),98% 胎牛血清(型号 900108, GEMINI 公司),RPMI-1640 培养基(型号 11875093, GIBCO 公司),0.25% 胰蛋白酶(型号 TE2004Y, 天津灏洋公司),无水海藻糖(型号 D110019, 阿拉丁公司),磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲液)(型号 PB2004Y, 天津灏洋公司),乙二醇(型号 E103319, 麦克林公司),AO/PI 双染试剂盒(型号 BB20071, BestBio 公司),TC 处理的 T-25 细胞培养瓶(型号 707003, NEST 耐思公司),50 mL 离心管,15 mL 离心管,2 mL 冻存管(NEST 耐思公司)。

1.2 仪器和设备

作者自行搭建的超声波植冰装置如图 1 所示。超声波植冰装置主要由可放置多个冻存管的超声容器、带有 2 个热电偶电极及数据采集模块的温度采集系统、带有超声波振子和超声波发生器的超声波诱导成核系统、加载有体积分数为 38.5% 的乙二醇作为控温相变液的冷却循环系统这 4 个部分组成。超声波显微系统主要由带有超声波振子和超声波发生器的超声波系统、带有生物显微镜和高速摄像的光学记录系统^[26-27]、由烧杯和特制载玻片组成的特制载物台、温度检测系统、冷却循环系统所组成。

其余所使用的仪器和设备为:普通光学显微



1. 超声波发生器 2. 超声波振子 3. 超声内盒体 4, 5. 控温相变液 6. 低温恒温槽 7. 第一热电偶 8. 第二热电偶 9. 温度数据采集模块 10. 对照冻存管 11. 细胞冻存管 12. 样本槽管。

图1 超声波植冰细胞冻存装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of ultrasonic ice planting cell cryopreservation device

镜(型号 YS100, 日本尼康公司), 荧光显微镜(型号 TS100, 日本尼康公司), 低速台式离心机(型号 TDL-80-2B, 上海安亭公司), CO₂ 细胞培养箱(型号 BC-J80S), 超低温冰箱(型号 DW-86L828, 青岛海尔特种电器有限公司), 程序降温盒(型号 5100-0001, 赛默飞世尔生物化学制品有限公司), 低温恒温槽(型号 DC-0506, 宁波天恒公司), 智能多路温度测试仪(型号 BB20071, 常州安柏精密仪器有限公司)。

1.3 超声植冰装置参数测定

为了确定超声植冰实验时实际消散在细胞溶液中的超声波功率 P_s , 用量热法进行测定, 选取功率为 30, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 W 的超声波测定实际消散在不同浓度 Me₂SO 细胞溶液的超声波功率 P_s 。量热法是假设释放出的超声波能量均能被液态传声媒介吸收转化成热能。实验发现不同体积分数(0%, 3%, 5%, 10%)的 Me₂SO 的比热容无显著性差异, 为了便于计算, 本实验选取 4 种浓度 Me₂SO 的比热容的平均值作为细胞溶液的比热容。细胞溶液比热容为 3.997 J/(g·℃)。

1.4 肝细胞培养

在补充有体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养 L-02 肝细胞, 添加体积分数为 1% 的双抗(青霉素和链霉素), 将它们放在 37℃、体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。实验过程中观察培养瓶中细胞的生长情况, 当细胞在培养瓶中贴壁约 80%~90% 时, 轻轻吸去除培养瓶中的上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤长满肝细胞的培养瓶, 然后用胰蛋白酶消化, 将细胞从培养瓶中洗出, 用移液枪对培养瓶底部反复吹打, 确保全部细胞脱离底壁进入溶液中。将细胞从培养瓶

中取出, 在转速为 1000 r/min 的离心机中离心 4 min, 然后重悬于 PBS 溶液中备用。

1.5 肝细胞的冷冻保存

首先用 PBS 重悬细胞配制成细胞悬浮液备用。肝细胞的冻存采用自制的超声植冰装置及程序降温盒。使用体积分数为 38.5% 的乙二醇作为装置载冷剂, 将不同质量的无水海藻糖加入重悬备用的细胞悬浮液中, 配制成浓度为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mol/L 的海藻糖细胞溶液。将细胞悬浮液预脱水, 4 种不同浓度的海藻糖细胞溶液均设置 3 个平行重复实验。另取冻存管添加等量不含肝细胞的保护剂溶液作为对照, 将对照冻存管和 4 个细胞冻存管同时放置在超声植冰细胞冻存装置的样本槽中。另设置新鲜组、添加体积分数为 10% 的 Me₂SO 的慢速冷冻组^[28]形成对照。选择保存效果好的海藻糖组进一步研究植冰对肝细胞冻存的影响, 同浓度海藻糖慢速冷冻作为对照组。实验设计如表 1 所示, 其中, *表示对照组, Δ表示实验组。

表 1 肝细胞冻存实验设计表

Tab.1 Experimental design table for hepatocyte cryopreservation

肝细胞冷冻方式	保护剂种类及浓度	实验组别
慢速冷冻-程序降温盒	10% Me ₂ SO	*
超声植冰-自搭建超声植冰装置	0.1 mol/L 海藻糖	Δ
超声植冰-自搭建超声植冰装置	0.3 mol/L 海藻糖	Δ
超声植冰-自搭建超声植冰装置	0.5 mol/L 海藻糖	Δ
超声植冰-自搭建超声植冰装置	0.7 mol/L 海藻糖	Δ
传统植冰-冰浴-4℃预冷细胞后用液氮预冷的镊子触碰实现植冰	0.3 mol/L 海藻糖	Δ

超声植冰装置冻存细胞: 植冰时将搭载好的超声容器与低温恒温槽连接, 将载冷剂注入超声内盒体和低温恒温槽中, 开启制冷循环系统, 待第二热电偶检测到超声容器内控温相变液温度达到指定需要的温度并保持恒温状态, 通过第一热电偶实时监测冻存管的温度, 当检测到温度达到植冰温度时, 启动超声波。植冰结束后关闭超声波, 细胞冻存管在控温相变液中平衡 5~10 min 使冰晶生长完全。平衡结束后将冻存管放入程序降温盒转移至-80℃冰箱进行低温保存过夜, 第二天再将冻存管转移至液氮冻存 24~48 h。

程序降温盒慢速冻存细胞: 将冻存管直接装

入程序降温盒置于-80 ℃ 的冰箱中进行低温保存过夜, 降温速率约为-1 ℃/min, 第二天再将冻存管转移至液氮冻存 24~48 h。

1.6 肝细胞存活率检测

实验采取 AOPI 荧光染色法检测细胞的存活率。为评估冷冻保存后细胞的存活率, 将离心后的细胞用培养基稀释成细胞悬液, 用 15 μL 移液枪吸取 15 μL 细胞悬液到 1.5 mL 离心管中, 避光加入 15 μL AOPI 染液, 轻轻混匀, 4 ℃ 避光孵育 10~20 min, 孵育完成后吸取 15 μL 的细胞染色液在载玻片的中央, 盖上盖玻片在荧光显微镜下观察, 进行细胞计数, 计数结果代入公式 $\beta = \frac{ab}{4} \times 10^4$, 计算细胞的分子浓度 β , 个 /mL, a 为 4 个大方格总数, b 为稀释倍数。计数规则按照计上不计下、计左不计右。荧光显微镜激发光源波长为 488 nm, 接受光波长为 520 nm。正常的细胞被染成绿色或者黄绿色, 死细胞被染成红色。

1.7 统计分析

获得的荧光图片采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析。数据采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件处理。每个样本重复 3 次, 所有数据使用平均数±标准差 (SD) 的形式体现, 以假设概率 $p<0.05$ 作为差异显著评判标准, 具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 超声波植冰装置参数的测定

使用自行组装的超声植冰装置测定不同功率的超声时, 冻存管内实验样品的温度随超声时间的变化关系如图 2 所示。在不同电功率下, 冻存管内纯水的温度随着超声时间的增加而增加, 具有非常明显的线性关系。采用 origin 8.0 软件拟合线性方程, 如表 2 所示, 对应各电功率下拟合的温度随时间变化的线性方程, 该线性方程可以近似地用来表示超声植冰装置内纯水温度随时间变化的关系曲线。根据公式 $P_s = MC_P \frac{dT}{dt} \Big|_{t=0}$ 可分别求得不同超声波电功率下实际消散在样品中的功率 P_s 。其中, M 为不同声波电功率下保护液的质量, C_p 为纯水的比热容, $\frac{dT}{dt} \Big|_{t=0}$ 为拟合方程中超声时间为 0 s 时, 冻存管保护液温度曲线的切线斜率。采用超声波强度 I_s 更好地表示超声植冰装置的参数对样品的影响, 超声波强度 I_s 可以用实际

消散在单位面积上的超声波功率表示。所得到的不同超声波电功率下超声作用时实际消散在冻存管中的功率 P_s 及超声强度 I_s 如表 3 所示。

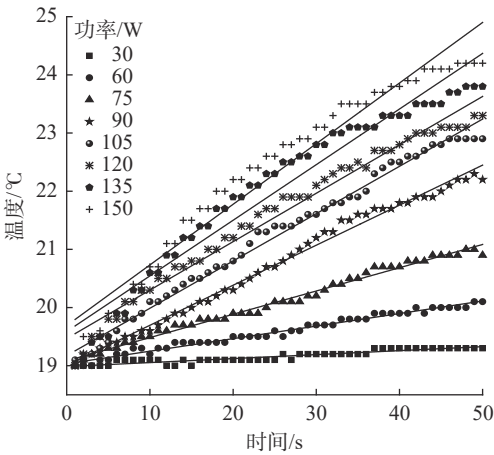


图 2 不同电功率超声波超声冻存管内保护液温度随时间的关系
Fig.2 Relationship between time and temperature of protective solution in ultrasonic cryopreservation tube with ultrasonic waves with different electric power

表 2 不同电功率超声波超声冻存管内保护液温度随时间拟合的线性曲线
Tab.2 Linear curve of protective solution temperature fitting with time in the cryopreservation tube using ultrasonic waves with different electric power

超声波功率/W	线性回归方程	校正决定系数
30	$Y=0.006\ 8t+18.99$	0.8667
60	$Y=0.021\ 6t+19.03$	0.9788
75	$Y=0.040\ 0t+19.08$	0.9884
90	$Y=0.068\ 8t+19.01$	0.9919
105	$Y=0.081\ 3t+19.17$	0.9889
120	$Y=0.083\ 2t+19.47$	0.9770
135	$Y=0.095\ 6t+19.59$	0.9451
150	$Y=0.104\ 2t+19.69$	0.9503

2.2 不同浓度海藻糖对肝细胞存活率的影响

在保证植冰成功的前提下, 预冷温度应尽可能高。依据前期实验可知, 超声波强度为 0.1041 W/cm² 时效果最好^[20], 即功率 60 W、预冷温度为-4 ℃ 对肝细胞进行冷冻保存。选用海藻糖作为冷冻保护剂, 分别对浓度为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mol/L 海藻糖肝细胞悬液进行超声植冰, 阴性对照组是新鲜组, 阳性对照组是添加体积分数为 10% 的 Me₂SO 组。复苏后肝细胞存活率及细胞荧光染色图片如图 3 和图 4 所示。

2.3 超声植冰与传统植冰对肝细胞冻存的影响

对前面得出的肝细胞冻存后复苏存活率较高的 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组进一步实验, 对比

超声植冰和传统植冰冻存肝细胞的差异。图 4 为超声植冰与传统植冰对肝细胞存活率的影响，慢速冷冻作为对照组。图 4 为 0.3 mol/L 海藻糖+慢速表 3 不同电功率的超声波对应消散在样品中的实际功率和超声强度

Tab.3 Ultrasonic waves with different electric power correspond to the actual power and ultrasonic intensity dissipated in the sample

超声波功率/W	纯水的质量/g	$\left.\frac{dT}{dt}\right _{t=0}/(\text{℃}\cdot\text{s}^{-1})$	P_s/W	$I_s/(\text{W}\cdot\text{cm}^{-2})$
30	0.991	0.0068	0.0269	0.0329
60	0.986	0.0216	0.0851	0.1041
75	0.980	0.0436	0.1706	0.2088
90	0.984	0.0688	0.2706	0.3312
105	0.987	0.0813	0.3207	0.3925
120	0.977	0.0903	0.3527	0.4316
135	0.985	0.0956	0.3764	0.4607
150	0.986	0.1042	0.4107	0.5026

冷冻组，0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组和 0.3 mol/L 海藻糖+传统植冰组的肝细胞荧光图像。植冰预冷温度为-4 ℃，超声波强度为 0.1041 W/cm²。如图 4

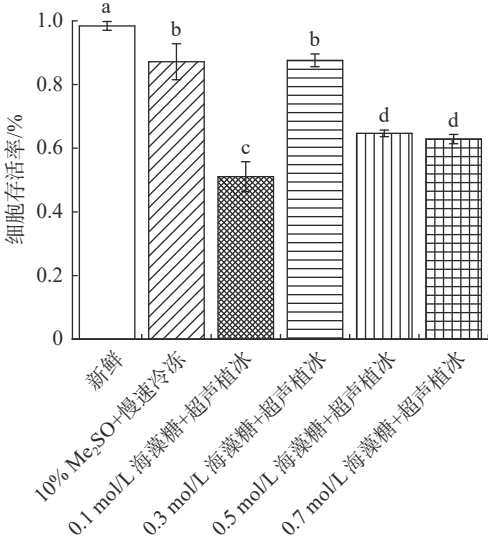
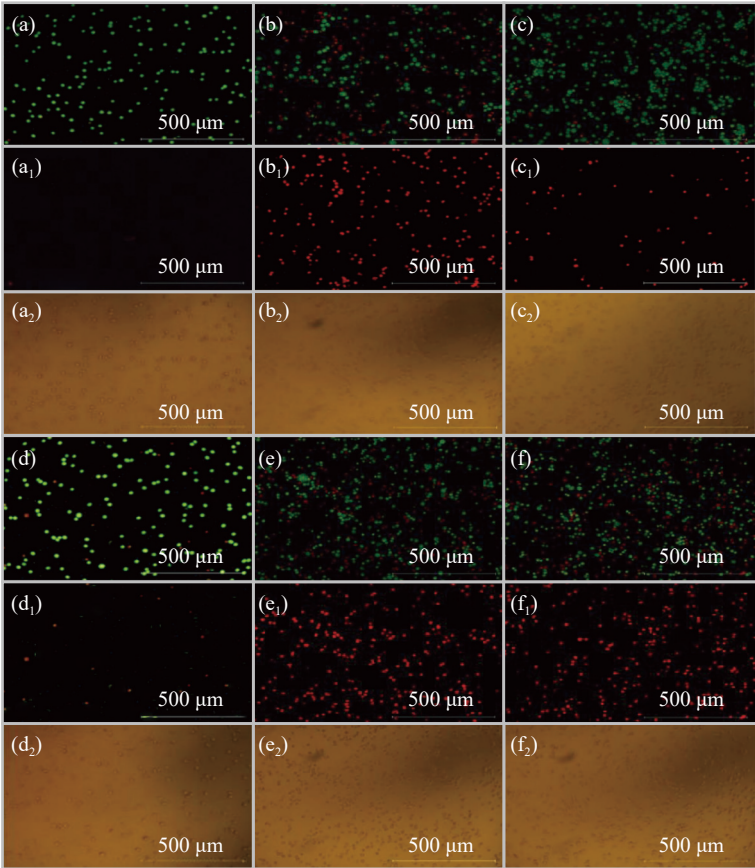


图 3 超声植冰作用下不同海藻糖浓度肝细胞存活率

Fig. 3 Hepatocytes survival rate at different concentrations of trehalose under the effect of ultrasonic ice seeding



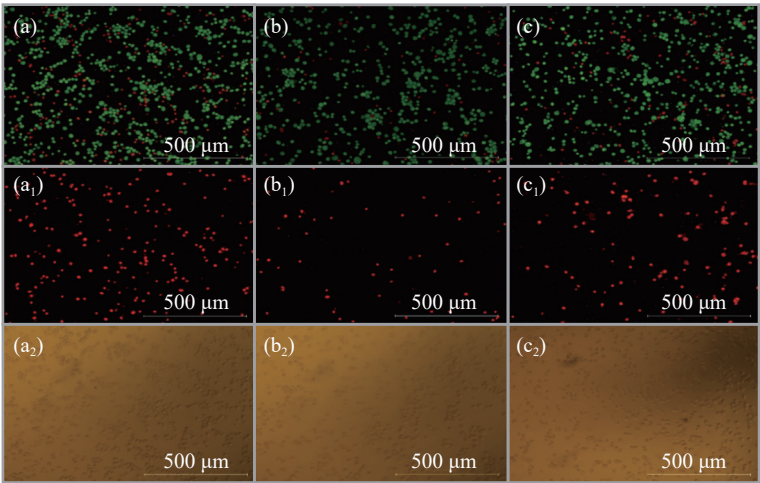
(a) 新鲜组；(b) 0.1 mol/L 海藻糖+超声植冰组；(c) 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组；(d)10% Me₂SO 慢速冷冻组；(e) 0.5 mol/L 海藻糖+超声植冰组；(f) 0.7 mol/L 海藻糖+超声植冰组；(a₁)—(f₁) 分别对应 (a)—(f) 的死细胞荧光图片；(a₂)—(f₂) 分别对应 (a)—(f) 的细胞明场图片

图 4 超声植冰作用下不同海藻糖浓度肝细胞的荧光图像

Fig.4 Fluorescence images of hepatocyte at different concentrations of trehalose under the effect of ultrasonic ice seeding

所示, 0.3 mol/L 海藻糖+慢速冷冻组 (图 4(a1)) 存在大量死细胞, 0.3 mol/L 海藻糖+传统植冰组 (图 4(c1)) 存在较多的死细胞, 而添加 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组 (图 4(b1)) 存在较少的死细胞。结合图 5 发现, 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组与 0.3 mol/L 海藻糖+传统植冰组细胞存活率无显著性差异; 传统慢速冷冻方案, 0.3 mol/L 海藻糖+慢速冷冻组细胞存活率为 $(76.9\pm3.1)\%$, 与超声植冰组和传统植冰组存在显著性差异; 如图 6 所示, 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组细胞存活率为 $(87.6\pm$

$2.0)\%$, 略高于 0.3 mol/L 海藻糖+传统植冰组 $(84.3\pm1.0)\%$ 。利用一定浓度的海藻糖作为保护剂结合超声植冰, 可以有效地保存肝细胞, 其保存效果同使用 10% Me_2SO 效果类似, 该结果与 Huang 等^[29]的结果一致。由此可见, 利用超声波进行植冰配合非渗透性保护剂海藻糖代替传统渗透性保护剂 Me_2SO 是一种可行的方案。如果不使用超声波, 单纯使用海藻糖并不能获得较好的保存效果, 侧面印证了超声波植冰作为一种新型的保存手段, 在提高肝细胞保存效果时具有重要作用。



(a) 0.3 mol/L 海藻糖+慢速冷冻组; (b) 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组; (c) 0.3 mol/L 海藻糖+传统植冰组; (a1)—(c1) 分别对应 (a)—(c) 的死细胞荧光图片; (a2)—(c2) 分别对应 (a)—(c) 的肝细胞明场图片

图 5 超声植冰和传统植冰肝细胞荧光图像

Fig.5 Fluorescence images of hepatocytes in ultrasonic ice seeding and traditional ice seeding

3 结 论

超声波作用于过冷的溶液会诱导成核, 本文结合自行组装的超声植冰装置使用非渗透性保护剂海藻糖保存肝细胞。其中, 超声波频率为 40 kHz, 超声波强度为 0.1041 W/cm^2 , 预冷温度为 $-4\text{ }^\circ\text{C}$, 研究了不同海藻糖浓度对肝细胞存活率的影响, 结论如下:

a. 非渗透性保护剂海藻糖的浓度对肝细胞的保存有较大的影响, 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组肝细胞复苏存活率为 $(87.6\pm2.0)\%$, 与 0.1 mol/L 海藻糖+超声植冰组、0.5 mol/L 海藻糖+超声植冰组和 0.7 mol/L 海藻糖+超声植冰组存在显著性差异, 与传统的 10% Me_2SO 保存肝细胞的方法无显著性差异;

b. 超声植冰法可作为肝细胞保存的有效手段, 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰组与 0.3 mol/L 海藻糖+传统植冰组 $((84.3\pm1.0)\%)$ 细胞存活率无显著差异, 添加 0.3 mol/L 海藻糖+慢速冷冻组细胞存活

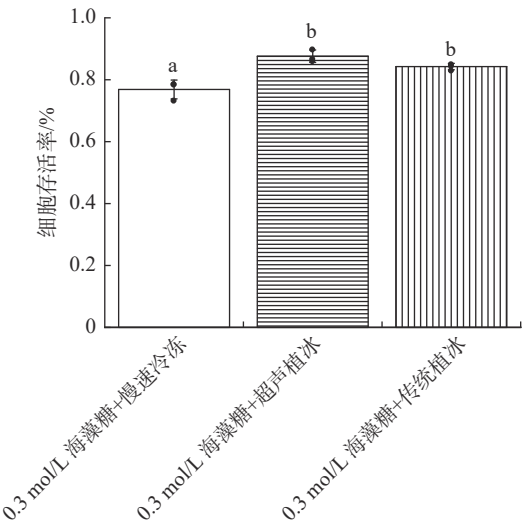


图 6 超声植冰和传统植冰肝细胞存活率

Fig. 6 Survival rate of hepatocytes in ultrasonic ice seeding and traditional ice seeding

率仅为(76.9±3.1)%, 添加 0.3 mol/L 海藻糖+超声植冰能提高肝细胞存活率;

c. 超声植冰与传统植冰的冷冻效果一致, 但操作更为简单, 且配合非渗透性海藻糖避免了临床上的副作用及冻存后保护剂的洗脱, 该冷冻方案有望推广到其他细胞的冷冻中, 为样本库的建设提供技术支持。

参考文献:

- [1] HAMEROFF S R, OTTO C W, KANEL J, et al. Acute cardiovascular effects of dimethylsulfoxide[J]. *Critical Care Medicine*, 1981, 9(12): 855–857.
- [2] PEGG D E, KEMP N H. Collection, storage, and administration of autologous human bone-marrow[J]. *The Lancet*, 1960, 276(7166): 1426–1429.
- [3] BAUM C M, WEISSMAN I L, TSUKAMOTO A S, et al. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(7): 2804–2808.
- [4] STRONCEK D F, FAUTSCH S K, LASKY L C, et al. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow[J]. *Transfusion*, 1991, 31(6): 521–526.
- [5] DAVIS J M, ROWLEY S D, BRAINE H G, et al. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion[J]. *Blood*, 1990, 75(3): 781–786.
- [6] VERHEIJEN M, LIENHARD M, SCHROODERS Y, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 4641.
- [7] SAMOSZUK M, REID M E, TOY P T. Intravenous dimethyl sulfoxide therapy causes severe hemolysis mimicking a hemolytic transfusion reaction[J]. *Transfusion*, 1983, 23(5): 405.
- [8] LIU W, HUANG Z Y, HE X W, et al. Impacts of trehalose and L-proline on the thermodynamic nonequilibrium phase change and thermal properties of normal saline[J]. *Cryobiology*, 2020, 96: 92–98.
- [9] SUI X J, WEN C Y, YANG J, et al. Betaine combined with membrane stabilizers enables solvent-free whole blood cryopreservation and one-step cryoprotectant removal[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(2): 1083–1091.
- [10] STOKICH B, OSGOOD Q, GRIMM D, et al. Cryopreservation of hepatocyte (HepG2) cell monolayers: impact of trehalose[J]. *Cryobiology*, 2014, 69(2): 281–290.
- [11] RAO W, HUANG H S, WANG H, et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(8): 5017–5028.
- [12] EROGLU A, TOTH T L, TONER M. Small amounts of microinjected trehalose protect mouse and human oocytes during freeze-thaw[J]. *Fertility and Sterility*, 2001, 76(3): S78.
- [13] SHEN L X, GUO X J, OUYANG X L, et al. Fine-tuned dehydration by trehalose enables the cryopreservation of RBCs with unusually low concentrations of glycerol[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(2): 295–306.
- [14] ZAVOS P M, GRAHAM E F. Effects of various degrees of supercooling and nucleation temperatures on fertility of frozen turkey spermatozoa[J]. *Cryobiology*, 1983, 20(5): 553–559.
- [15] 蒋沛, 火晓越, 刘宝林, 等. 细胞低温保存过程中冰晶成核的研究进展 [J]. *制冷学报*, 2020, 41(2): 159–166.
- [16] 李维杰, 宋立勇, 刘宝林. 植冰技术在低温生物学中的应用进展 [J]. *制冷技术*, 2021, 41(2): 11–16.
- [17] MÖHLER O, GEORGAKOPOULOS D G, MORRIS C E, et al. Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions[J]. *Biogeosciences*, 2008, 5(5): 1425–1435.
- [18] DESNOS H, BAUDOT A, TEIXEIRA M, et al. Relevant facts about SnoMax when used in DSC experiments[J]. *Cryobiology*, 2015, 71(3): 568.
- [19] 王戴, 张绍志, 陈光明, 等. 超声波对水的过冷度影响的实验研究 [J]. *制冷学报*, 2003, 24(1): 6–8.
- [20] 李维杰, 宋立勇, 刘宝林, 等. 超声波植冰对 L-02 肝细胞低温保存的影响 [J]. *制冷学报*, 2021, 42(4): 158–166.
- [21] PATAPOFF T W, OVERCASHIER D E. The importance of freezing on lyophilization cycle development[J]. *BioPharm International*, 2002, 15(3): 16–21, 72.
- [22] NAKAGAWA K, HOTTOT A, VESSOT S, et al. Influence of controlled nucleation by ultrasounds on ice morphology of frozen formulations for pharmaceutical proteins freeze-drying[J]. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 2006, 45(9): 783–791.
- [23] SEARLES J A, CARPENTER J F, RANDOLPH T W. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 90(7): 860–871.
- [24] CHOW R, BLINDT R, CHIVERS R, et al. A study on the primary and secondary nucleation of ice by power ultrasound[J]. *Ultrasonics*, 2005, 43(4): 227–230.
- [25] MOORE E B, MOLINERO V. Structural transformation in supercooled water controls the crystallization rate of ice[J]. *Nature*, 2011, 479(7374): 506–508.
- [26] 喻治俊, 彭润玲, 谷浩, 等. 基于电润湿效应的自变焦补偿光学系统 [J]. *光学仪器*, 2020, 42(4): 20–24.
- [27] 陈鲁, 李志强. 面板检测用显微镜光学系统设计 [J]. *光学仪器*, 2021, 43(1): 42–48.
- [28] WARE C B, NELSON A M, BLAU C A. Controlled-rate freezing of human ES cells[J]. *Biotechniques*, 2005, 38(6): 879–883.
- [29] HUANG H S, ZHAO G, ZHANG Y T, et al. Predehydration and ice seeding in the presence of trehalose enable cell cryopreservation[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, 3(8): 1758–1768.