

纳米粒子浓度等条件对 VS55 反玻璃化结晶的影响

向兴雪¹, 胥义², 刘志峰¹

(1. 中国科学技术大学热科学和能源工程系, 安徽合肥 230026; 2. 上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093)

摘要: 借助低温显微镜系统, 运用等温扫描和连续扫描法, 对磁性纳米粒子浓度、等温温度以及降温速率对低温保护剂 VS55 在反玻璃化过程中的结晶行为进行了观察。结果显示: 随着磁性纳米粒子浓度和等温温度的增加, 冰晶生长速率、初始尺寸及结晶密度整体上都增大, 冰晶生长得到促进; 对含有不同磁性纳米粒子浓度的 VS55 进行连续扫描, 结果与等温扫描结论一致, 添加磁性纳米粒子的溶液反玻璃化冰晶生长明显; 降温速率增长至 5 °C/min 时, 冰晶初始尺寸和冰晶数量显著提高, 生长速率也略有增加, 5 °C/min 以上的降温速率对冰晶的影响差别不大; 随着复温速率的增大, 冰晶尺寸、生长速率都减小, 冰晶数量减少。

关键词: 磁性纳米粒子; VS55; 低温显微镜; 反玻璃化

中图分类号: TB383 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2020.06.014

引用格式: 向兴雪, 胥义, 刘志峰. 纳米粒子浓度等条件对 VS55 反玻璃化结晶的影响[J]. 中国科学技术大学学报, 2020, 50(6): 819-824.

XIANG Xingxue, XU Yi, LIU Zhifeng. Effect of magnetic nanoparticle concentration and other conditions on ice crystal growth of VS55 solution during devitrification[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2020, 50(6): 819-824.

Effect of magnetic nanoparticle concentration and other conditions on ice crystal growth of VS55 solution during devitrification

XIANG Xingxue¹, XU Yi², LIU Zhifeng¹

(1. Department of Thermal Science and Energy Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; 2. Institute of Bio-thermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The effects of the concentration of magnetic nanoparticles, isothermal temperature and the rate of cooling/rewarming on the crystallization behavior of VS55 during the devitrification process under isothermal scanning and continuous scanning methods were studied using a cryomicroscope system. The results show that: With the increase of nanoparticle concentration and isothermal temperature, the growth rate, initial size and crystal density of ice crystals increase generally, promoting the growth of ice crystals. Continuous scanning of VS55 with different magnetic nanoparticle concentration groups was performed, and the results were consistent with the isothermal scanning conclusions. The crystal devitrification growth of the magnetic nanoparticle-added solution was obvious. When the cooling rate is increased to 5 °C / min, the initial size of ice crystals and their number increase significantly and the growth rate also increases slightly. A cooling rate above 5 °C / min has little effect on the growth of ice crystals. As the heating rate increases, the ice crystal size, growth rate, and number of ice crystals decrease.

Key words: magnetic nanoparticle; VS55; cryomicroscope; devitrification

0 引言

低温保存是指在低温环境中(通常 -196 °C 的液氮)保存活细胞、组织、器官或者其他生物体, 以便于生物体的长期存储、运输、繁殖、移植等^[1]. 玻璃化保存是目前低温保存方法中最理想的方法^[2-4], 这种方法使得在降温过程中细胞周围的保护剂形成高黏度的玻璃态, 而不会产生冰晶, 因此不会对细

胞造成冰晶带来的细胞质损伤。但是, 若是复温过程不理想, 过程中的反玻璃化转变导致的重结晶和再结晶现象仍会使生物体遭到严重损伤, 因此需要避免反玻璃化转变结晶。

磁性纳米粒子(magnetic nanoparticles, mNPs)复温是一个近年来发展的新型复热方式^[5-11], Fe₃O₄等纳米粒子由于其生物相容性和超顺磁特性, 被广泛应用在医药行业^[12]. 近年有众多团队加入 mNPs

收稿日期: 2020-03-11; 修回日期: 2020-06-27

作者简介: 向兴雪, 女, 1995年生, 硕士生, 研究方向: 低温生物医学. E-mail: XXXUE@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 刘志峰, 博士/副教授. E-mail: lzf123@ustc.edu.cn

复温的研究探索中. Wang 等^[13]对嵌入超顺磁纳米微粒的冷冻样品在微波复温过程进行了数值模拟, 结果表明, 增加纳米粒子样本的复温速率更快, 温度分布更加均匀. 可认为超顺磁纳米微粒对冷冻保存的样品微波复温有积极作用. 同年美国 Bischof 教授研究组^[14], 首次进行了基于射频激发 mNPs 快速复温冷冻溶液的初步探索, 结果表明: 加有 mNPs 的水和低温保护剂能在交变磁场下获得足够高的加热速率来减轻或消除反玻璃化现象. 1 mL mNPs 溶液(Fe 离子浓度为 10 mg/mL)在低温段的最大升温速率可达 200 °C/min, 比常规水浴加热复温速率高好几倍. 并认为这是一种很有潜力能实现较大器官的快速且均匀的解冻复温方法. 王建业等^[15]将 mNPs 的磁性复热效果运用于人体脐带间充质干细胞的复温过程上, 并探究了对细胞复温效果最佳的 mNPs 浓度和交变磁场电流值. 此外磁性复温也使得干细胞在玻璃化冷冻保存复温后保留其完整的干细胞特性和多向分化潜能.

同年, Eisenberg 等^[16]利用 mNPs 加热的方法, 证实可减少玻璃化冷冻保存中的热机械应力. Manuchehrabadi 等^[17]报道了在保护剂 VS55 中加入射频激发的介孔二氧化硅涂层 mNPs 的纳米加热技术, 以高于 130 °C/min 的复温速率均匀快速加热 1 至 80 mL 的样品量. 与未经处理的新鲜对照猪动脉相比, 纳米升温后血管长度或弹性模量没有明显的生物力学特性变化. Pan 等^[18]利用具有动态反馈控制和供电优化的电磁共振加温系统达到了 200 °C/min 以上的速率, 样品量在数十毫升. 与其他基于 mNPs 的加热应用相比, 其使用的纳米粒子剂量非常低(Fe 离子浓度为 0.1 mg/mL).

尽管已有不少的研究成果, 但是对 mNPs 复温效果的探索有待深入, 如 mNPs 对保护剂溶液的微观冰晶观察研究还不够充分. 于红梅等^[19-20]观察了 Fe₃O₄ mNPs 对典型玻璃化溶液 VS55 在反玻璃化过程中冰晶生长的影响, 其中的工作包括: 通过使用差式扫描量热仪确定加入 mNPs 的 VS55 的玻璃化转变温度和反玻璃化温区; 不同等温温度、降温速率以及 mNPs 表面改性对 VS55 反玻璃化冰晶生长的影响, 为后续实验垫定了重要的实验基础. 但在该文中, 对应降温速率和等温扫描的研究, 对升温速率以及连续扫描方法的探索尚缺乏深入的研究, 此外采用的 Fe₃O₄ mNPs 浓度单一. 因此本文将在这项工作的基础上, 进一步探索多种 mNPs 浓度以及其他更多条件对 VS55 反玻璃化结晶的影响, 本文开展的研究内容如下:

实验 1. 探究不同浓度组在不同等温温度扫描下的反玻璃化现象;

实验 2. 探究不同浓度组在连续温度扫描下的反玻璃化现象;

实验 3. 探究不同降温速率下的在等温温度扫描下的反玻璃化现象;

实验 4. 探究不同升温速率下的在连续温度扫描下的反玻璃化现象.

我们期望通过研究进一步增加和完善对 mNPs

在保护剂溶液复温过程中影响的探索, 对将来的 mNPs 复温技术能提供一定的基础. 对比于红梅等^[20]的研究, 本文旨在深入对 VS55 中加入纳米粒子的反玻璃化特性影响的研究, 增加了对多种浓度纳米粒子的探究, 增加了对不同温度扫描方法的探究, 还增加了对不同升温速率带来影响的研究.

1 实验方法

1.1 材料与方法

本研究所用 mNPs 为 Fe₃O₄ 纳米粒子, 来自美国的 Sigma-Aldrich 公司, 平均粒径为 10 nm 左右. 使用的玻璃化溶液是非常有利于生物样本冻结过程中转化成玻璃态, 被广泛应用在各类低温保存中的 VS55^[21]. 该溶液总浓度为 8.4 mol/L, 由 3.1 mol/L 二甲基亚砷、2.2 mol/L 1,2-丙二醇、3.1 mol/L 甲酰胺以及 EuroCollins 溶液组成. 由于在该溶液中, 除 EuroCollins 以外的其他所有溶质的总质量浓度为 0.55 g/mL, 因此该配方的玻璃化保护剂被命名为 VS55, 以类似方式命名的玻璃化保护剂还有 VS70、VS83 等. 目前 VS55 玻璃化溶液已经成功应用于静脉、角膜、兔肾以及关节软骨等多个方面的低温保存^[21-24], 是较为典型的玻璃化溶液, 因此本文将以此为研究对象.

本实验采用的仪器是英国 Linkam 公司的低温显微系统, 其温度范围是 -196~125 °C, 扫描速率为 0.01~150 °C/min. 系统由程序控制仪、液氮、显微镜及电脑组成, 实验中采用 20 倍镜放大观察.

扫描方法为连续扫描和等温扫描. 等温扫描是将溶液降温至玻璃化转变温度以下后, 再升温至反玻璃化温区的某个温度, 选择一个温度进行等温, 观察随着等温时间的增加对应冰晶的生长情况. 连续扫描, 则是先将溶液降温至玻璃化转变温度以下, 然后连续升温至室温, 分析样品在动态升温过程中的晶体变化情况. 其分别可用于观察冰晶生长速度和模拟实际应用中的复温冰晶生长, 两种模式都是指导优化复温过程的重要方法.

1.2 实验方案设计

实验 1 不同浓度组在不同等温温度扫描下的反玻璃化实验设计: mNPs 浓度设置为 0.00 mg/mL、0.05 mg/mL、0.10 mg/mL 和 0.15 mg/mL. 控温程序先以预设的 50 °C/min 的速率(降温速率较高, 保证溶液能够玻璃化)从室温降至 -135 °C, 再以 10 °C/min 升温至某等温温度(-70 °C、-75 °C 或 -80 °C)(等温温度的选取参考已有的研究^[19]), 并等温 10 min, 记录复温过程的冰晶变化.

实验 2 不同浓度组在连续温度扫描下的反玻璃化实验设计: 以 50 °C/min 的速率从室温降至 -135 °C, 再以 10 °C/min 升温至室温, 记录复温过程.

实验 3 探究不同降温速率下的在等温温度扫描下的反玻璃化实验设计: 降/复温速率设置为 100 °C/min、60 °C/min、40 °C/min、20 °C/min、10 °C/min、5 °C/min 和 1 °C/min. 浓度和等温温度的选取从实验 1 的结果中选择, 选取效果最明显、最

利于观察条件作为实验 3 的条件预设. 以不同降温速率从室温降至 $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$, 再以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至某等温温度, 并等温 10 min , 记录复温过程.

实验 4 探究不同升温速率下的在连续温度扫描下的反玻璃化实验设计: 选取与实验 3 相同的 mNPs 浓度, 并且基于实验 3 选取降温速率. 以某一降温速率从室温降至 $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$, 再以不同复温速率升温至室温, 并记录过程.

本文使用的低温显微系统, 由于受技术限制和其他因素的影响, 当设置的降温速率较高时, 实际降温速率将无法达到设定值, 其影响将在后文讨论.

2 结果

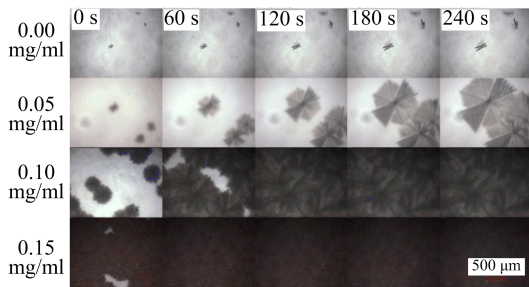
2.1 不同浓度组在不同等温温度扫描下的反玻璃化结晶观察

图 1(a)、图 2(a)和图 3(a)分别是 4 个 mNPs 浓度组在等温温度为 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的等温冰晶生长情况. 其中, 浓度最高的第 4 组 (0.15 mg/mL mNPs) 由于冰晶密度非常大, 且生长速度过快, 导致到达等温温度后很快或者到达等温温度前冰晶就已长满整个视野, 因此无法计算其冰晶生长速率, 只能对前三个浓度组进行定量分析.

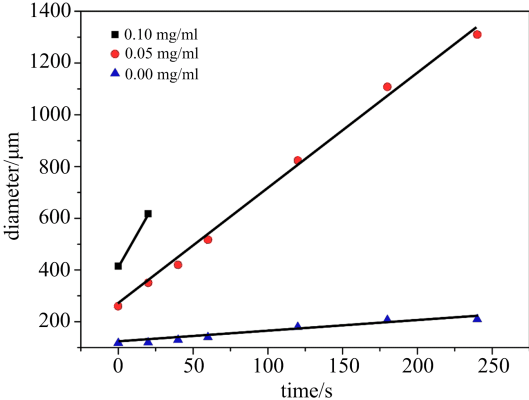
等温过程的冰晶生长速率用单位时间内的单个冰晶直径增长值表示, 并分别将数据提取出来, 如图 1(b)、图 2(b)和图 3(b), 由图可以看出冰晶生长直径符合经典的线性关系, 即

$$Y = AX + B \tag{1}$$

其中, Y 为冰晶尺寸 (μm); X 为时间 (s); A 为斜率,

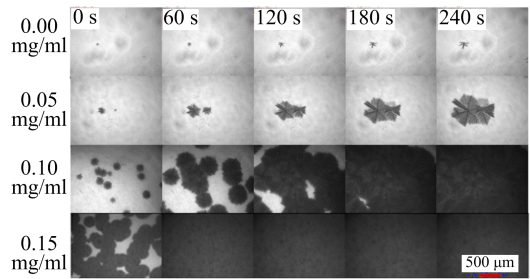


(a)冰晶生长图像

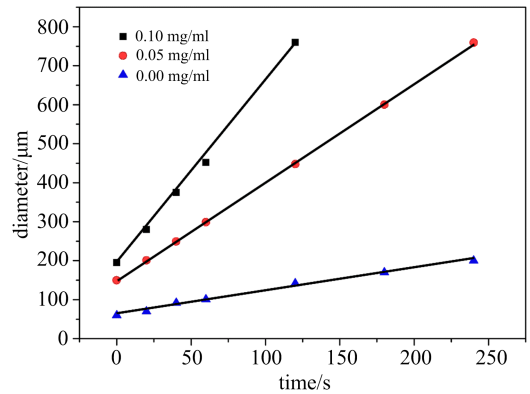


(b)冰晶随时间生长的直径增长图

图 1 等温温度为 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的反玻璃化冰晶生长结果
Fig. 1 Ice crystal devitrification growth results at isothermal temperature of $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

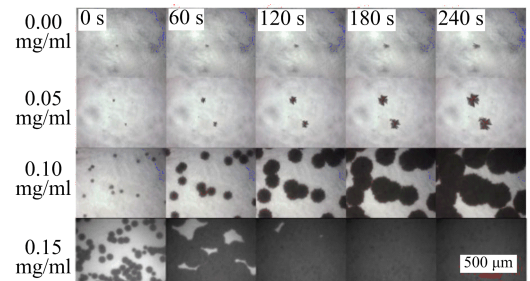


(a)冰晶生长图像

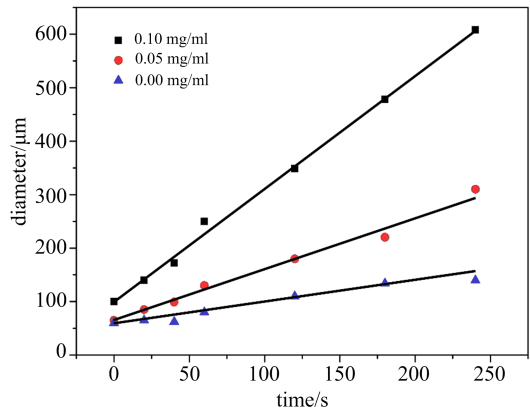


(b)冰晶随时间生长的直径增长图

图 2 等温温度为 $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的反玻璃化冰晶生长结果
Fig. 2 Ice crystal devitrification growth results at isothermal temperature of $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$



(a)冰晶生长图像



(b)冰晶随时间生长的直径增长图

图 3 等温温度为 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的反玻璃化冰晶生长结果
Fig. 3 Ice crystal devitrification growth results at isothermal temperature of $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

即表示生长速率; B 为截距, 即表示发现冰晶时的初始尺寸. 对每组结果进行方程式拟合, 方程参数

如表 1, 其中 N 为图中对应的冰晶数, 表征密度。

从以上结果可以看出: 随着 mNPs 浓度增大, 冰晶生长速率增大, 冰晶初始尺寸也增大, 结晶密度也相应增大; 随着等温温度的升高, 相同地有, 冰晶生长速率增大, 冰晶初始尺寸也增大。

此规律与溶液冻结过程结晶的异相成核机理类似。我们可以推测: 随着 mNPs 浓度增高, 溶液中溶质增加, 不纯度增加, 相当于“杂质”更多, 这些杂质就作为成核基体, 成为晶核生长的晶种, 使得晶核生长所需要克服的成核势垒和需要的吉布斯自由能降低, 结晶更加容易。因此, 随着 mNPs 浓度增加, 冰晶生长得到全面促进, 密度增加, 生长速率快, 初始尺寸也增大。随着等温温度的升高, 基于已有研究测得的 0.1 mg/mL 浓度 mNPs 与 VS55 的混合溶液的反玻璃化转变温度为 $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$, 而在低于反玻璃化转变温度的温度范围内, 越接近该温度, 反玻璃化结晶越明显^[1], 因此, $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的结晶现象比 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 明显, 冰晶直径生长率从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 2.15

$\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 增加到 $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 $4.34\ \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 。当复温温度继续升高, 达到 $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 冰晶发生反玻璃化转变, 由玻璃态向晶态转变, 因此冰晶更加快速长大, 其生长率和初始尺寸较 $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时有显著地提高, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的生长速率增加到 $10.08\ \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, 正是因为随等温温度上升, 冰晶的生长率和生长尺寸增大, 单个冰晶吸收的冷量高, 因此冰晶数目减少, 即密度降低。

通过该组实验, 可以发现, 等温温度越高, 反玻璃化越明显, 因此可对后续复温过程做出的推测是: 若将复温过程分段加热, 那么在复温前期, 在反玻璃化以下的温度区域, 可以使用较低的复温速率, 因为这个阶段冰晶生长缓慢; 但是一旦超过反玻璃化转变温度, 复温速率必须得到提高, 因为在该温度以上的温度范围, 反玻璃化现象非常明显, 必须迅速越过危险区域, 以避免反玻璃化结晶带来的致命损伤。

表 1 不同浓度组等温结晶的反玻璃化冰晶生长曲线方程式拟合

Tab. 1 Parameters for the equation fitting of isothermal crystal ice crystal devitrification growth curves of different concentration groups

等温温度	$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$			$-75\text{ }^{\circ}\text{C}$			$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$		
参数	A	B	N	A	B	N	A	B	N
0.00 mg/mL	0.52	113.23	3	0.58	71.67	1	0.37	57.51	1
0.05 mg/mL	4.59	259.62	3	2.53	149.44	2	0.99	64.46	2
0.10 mg/mL	10.08	431.60	11	4.34	197.43	14	2.15	96.68	17

2.2 不同浓度组在连续温度扫描下的反玻璃化结晶观察

图 4(a) 是 4 个 mNPs 浓度组在温度变化下的连续扫描冰晶生长情况。并将数据提取出来, 如图 4(b), 曲线通过 origin 软件的模拟分析, 可以看出冰晶生长直径曲线符合指数增长关系:

$$Y = A \times e^{\left(\frac{X}{T}\right)} + Y_0 \quad (2)$$

该方程式中的变量只是纯粹的数学关系式, 仅仅表示数据的拟合, 无确定的意义。

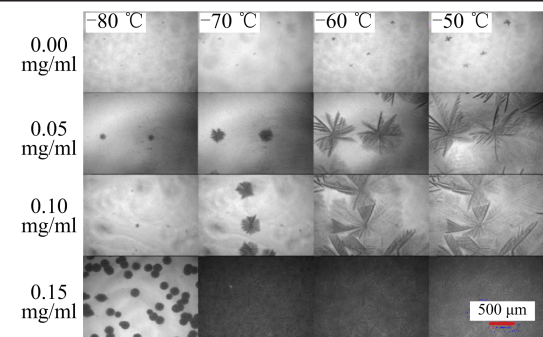
从图 4 可以看出: 随着 mNPs 浓度增大, 冰晶生长率增大, 而且添加 mNPs 的浓度组明显比单独 VS55 的生长明显, 初始尺寸变化不大。这和等温扫描的结果一致, 说明 mNPs 可以促进反玻璃化冰晶的生长。

2.3 不同降温速率下的等温扫描冰晶生长结果

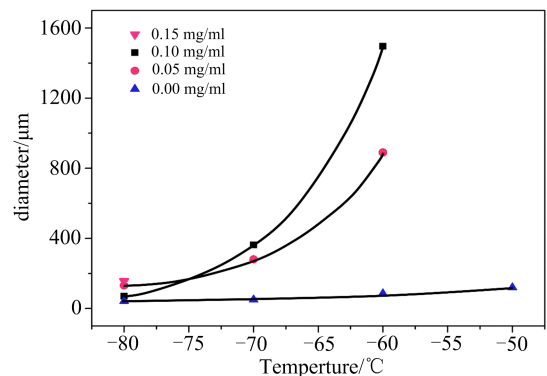
综合前面实验, 发现 0.10 mg/mL 的 mNPs 浓度组冰晶密度大, 便于找到冰晶进行观察。而等温温度为 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时生长速率不会过快导致冰晶图像无法进行直径测量, 因此在探究不同降温速率影响时, 采用 0.10 mg/mL 的 mNPs 浓度组在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下等温扫描观察。

图 5(a) 为等温过程中不同时间的冰晶图像, 图 5(b) 为冰晶生长直径图, 其中, 降温速率为 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时, 样本在降温过程至 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时就已全部结晶, 因此没有玻璃化及反玻璃化转变, 因此生长过程不包含在图 5(b) 中。

将数据提取出来可以看出, 数据呈明显的线性增长关系, 符合方程式(1)。



(a) 冰晶生长图像



(b) 冰晶随时间生长的直径增长图

图 4 不同浓度组温度连续扫描的反玻璃化冰晶生长结果
Fig. 4 Ice crystal devitrification growth results of temperature continuous scanning at different concentration groups

从图 5 和表 2 可以看出, 降温速率在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上时, 不同速率对冰晶的影响差别不大, 只有在

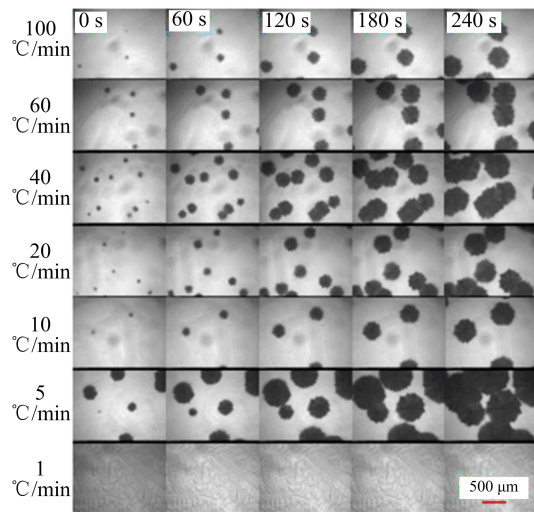
5 °C/min 时,能看到显著差异:冰晶初始尺寸变大,冰晶数量增多,生长速率也略有增加.这与前面所述,VS55 的临界降温速率在 5 °C/min 左右一致.对高于 5 °C/min 的不同速率值,其冰晶生长速率、初始尺寸及冰晶数量都是随着降温速率的降低有起伏,暂时无法得出其规律,尚待进一步探究.

表 2 不同复温速率下冰晶反玻璃化生长直径曲线拟合参数
Tab. 2 Parameters of curve fitting of ice crystal devitrification growth diameter at different reheating rates

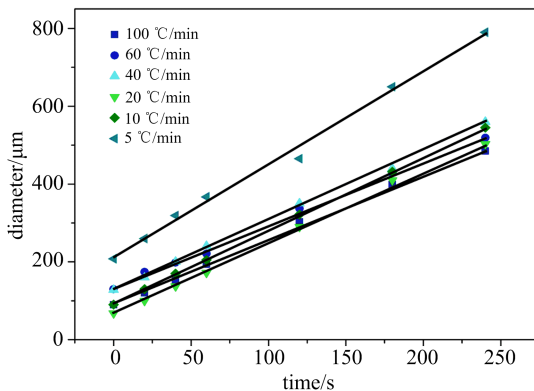
参数	降温速率/(°C · min ⁻¹)					
	100	60	40	20	10	5
A	1.69	1.64	1.78	1.85	1.89	2.38
B	90.84	130.27	130.95	64.61	93.07	213.66
N	6	7	12	9	4	8

2.4 不同升温速率下的连续扫描冰晶生长结果

与实验 3 相同,选用 0.10 mg/mL 的 mNPs 浓度作为复温速率实验的条件.图 6(a)为连续扫描过程中不同温度节点的冰晶图像,图 6(b)为冰晶生长直径图.其中,复温速率为 1 °C/min、5 °C/min 和 10 °C/min 时冰晶生长过快,导致无法取得足够多的数据点而不能进行曲线拟合,因此在图 6(b)中无法进行数据体现.



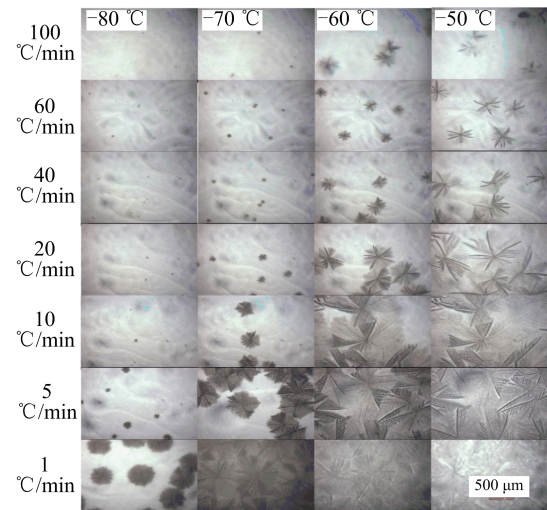
(a)冰晶生长图像



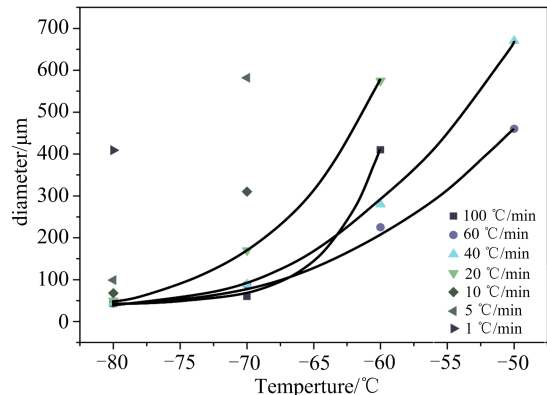
(b)冰晶随时间生长的直径增长图

图 5 不同降温速率下的反玻璃化冰晶生长结果

Fig. 5 Ice crystal devitrification growth results at different cooling rates



(a)冰晶生长图像



(b)冰晶随时间生长的直径增长图

图 6 不同复温速率等温温度为 -80 °C 的反玻璃化冰晶生长结果

Fig. 6 Ice crystal devitrification growth results at isothermal temperature of -80 °C under different reheating rates

从图 6 可以看出,整体而言,随着复温速率的增大,冰晶尺寸、生长速率和冰晶数量都降低.但是对于 100 °C/min,前期冰晶生长符合一般规律,但在 -60 °C 时冰晶生长加速,反常地变大,可能是 100 °C/min 升温时,冰晶数量少,导致快速升温样本体系吸收的热量用于这几个冰晶的生长,因此单个冰晶争得的热量多,冰晶生长驱动力大,冰晶在 100 °C/min 加热的热冲击下,很快生长并随后立马融化.导致这一原因的具体机理尚不明确,有待进一步探究.

本文实验中所用的冷热台,由于受仪器本身条件和其他状态等的限制和影响,当降温速率设置为 100 °C/min 时,仪器产生的实际降温速率无法达到这一数值,与设定值偏差较大,但是当设置的降温速率逐渐降低时,实际降温速率值与设定值逐渐趋于一致.虽然有所偏差,但是设定的从 1 °C/min 逐渐到 100 °C/min 的降温速率值,在实际过程中,对应的降温速率也是逐渐增加的.

因此,讨论降温速率偏低对实验的影响是很有必要的.在实验 1、实验 2 和实验 4 中,实验变量并不是降温速率,且这 3 个实验中的降温速率值都是选取的预设值 50 °C/min,实际偏低的降温速率值相当于选取了较低的预设值.此外,从图 5 可以看出,在 50 °C/min 上下的 60 °C/min 和 40 °C/min,这

两种降温速率下的冰晶生长情况类似,因此可以认为设定的降温速率为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时,降温速率值偏低不会对实验结果有明显的影 响作用。

对于实验 3,由于降温速率本身是变量,因此需要考虑降温速率值偏低对实验结果的影响。实验设定的降温速率为 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 $100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,当设定的降温速率在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 及以下时,实际降温速率值与设定值基本是一致的,而随着降温速率的增大,设定值和实际值的偏差逐渐增大,因此可认为当降温速率为 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时,实验结果无偏差。对于高于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率组,从图 5 可以看出,其冰晶生长情况都类似,没有明显的特征,因此高于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率对冰晶生长没有显著影响,因而整体而言,降温速率带来的误差对实验结果没有显著性差异。

3 结论

磁性纳米粒子的复热技术是玻璃化保存中抑制反玻璃化结晶的重要手段,目前对磁性纳米粒子对保护剂的影响效果在微观层面观察还不够全面,因此本文在已有的基础上,进一步研究了多种条件下添加磁性纳米粒子对经典保护剂 VS55 的反玻璃化结晶影响,旨在为后期选择合适的 mNPs 奠定一定的基础。得到的结论如下:

(I)对不同 mNPs 浓度组进行等温扫描,结果显示,随着 mNPs 浓度和等温温度的提高,冰晶生长速率、初始尺寸及结晶密度都整体上增大,对冰晶的生长有明显的促进作用。

(II)对不同 mNPs 浓度组进行连续扫描,结果显示,随着 mNPs 浓度的增大,冰晶生长速率增大,与等温扫描结论一致。而且添加 mNPs 的 VS55 冰晶生长明显比不添加 mNPs 的生长明显,初始尺寸变化不大。

(III)对 0.10 mg/mL 的 mNPs 浓度组在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行不同降温速率的实验,结果发现,降温速率在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时,冰晶初始尺寸和冰晶数量显著提高,生长速率也略有增加。而对于 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上的降温速率,对冰晶的影响差别不大。

(IV)随着复温速率的增大,冰晶尺寸、生长速率和冰晶数量都降低。

参考文献(References)

- [1] 华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京:科学出版社,1994.
- [2] FAHY G M, MACFARLANE D R, ANGELL C A, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 1984, 21(4):407-426.
- [3] KULESHOVA L L, LOPATA A. Vitrification can be more favorable than slow cooling [J]. *Fertility and Sterility*, 2002, 78(3):449-454.
- [4] RALL W F, FAHY G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ by vitrification[J]. *Nature*, 1985, 313(6003):573-575.
- [5] HOU Y, LU C, DOU M, et al. Soft liquid metal nanoparticles achieve reduced crystal nucleation and ultrarapid rewarming for human bone marrow stromal cell and blood vessel cryopreservation[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 102: 403-415.
- [6] LI W J, ZHOU X L, LIU B L, et al. Effect of nanoparticles on the survival and development of vitrified porcine GV oocytes[J]. *Cryo Letters*, 2016, 37(6): 401-405.
- [7] PAN J J, SHU Z Q, ZHAO G, et al. Towards uniform and fast rewarming for cryopreservation with electromagnetic resonance cavity: Numerical simulation and experimental investigation [J]. *Applied Thermal Engineering*, 2018, 140:787-798.
- [8] RING H L, GAO Z, SHARMA A, et al. Imaging the distribution of iron oxide nanoparticles in hypothermic perfused tissues [J]. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2020, 83(5):1750-1759.
- [9] WANG T, ZHAO G, DENG Z S, et al. Theoretical investigation of a novel microwave antenna aided cryovial for rapid and uniform rewarming of frozen cryoprotective agent solutions[J]. *Applied Thermal Engineering*, 2015, 89:968-977.
- [10] ZHANG M, ZHAO G, GU N, et al. Applying nanotechnology to cryopreservation studies: Status and future[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(21): 2180-2190.
- [11] ZHOU X, LI W, FANG L, et al. Hydroxyapatite nanoparticles improved survival rate of vitrified porcine oocytes and its mechanism[J]. *Cryo Letters*, 2015, 36(1):45-50.
- [12] MORNET S, VASSEUR S, GRASSET F, et al. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14(14):2161.
- [13] WANG T, ZHAO G, LIANG X M, et al. Numerical simulation of the effect of superparamagnetic nanoparticles on microwave rewarming of cryopreserved tissues [J]. *Cryobiology*, 2014, 68(2):234-243.
- [14] ETHERIDGE M L, XU Y, ROTT L, et al. RF heating of magnetic nanoparticles improves the thawing of cryopreserved biomaterials[J]. *Technology*, 2014, 2(3): 229-242.
- [15] WANG J, ZHAO G, ZHANG Z, et al. Magnetic induction heating of superparamagnetic nanoparticles during rewarming augments the recovery of hUCM-MSCs cryopreserved by vitrification [J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 33:264-274.
- [16] EISENBERG D P, BISCHOF J C, RABIN Y. Thermomechanical stress in cryopreservation via vitrification with nanoparticle heating as a stress-moderating effect [J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2015, 138(1):011010.
- [17] MANUCHEHRABADI N, GAO Z, ZHANG J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles [J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(379): eaah4586.
- [18] PAN J J, REN S, SEKAR P K, et al. Investigation of electromagnetic resonance rewarming enhanced by magnetic nanoparticles for cryopreservation[J]. *Langmuir*, 2019, 35(23):7560-7570.
- [19] XU Y, YU H, NIU Y, et al. Effects of superparamagnetic nanoparticles on nucleation and crystal growth in the vitrified Vs55 during warming[J]. *Cryo Letters*, 2016, 37(6):448-454.
- [20] 于红梅,胥义,柳珂,等. 磁纳米粒子对 Vs55 溶液反玻璃化等温结晶行为的影响[J]. *化工学报*, 2017, 68(3): 1262-1268.
- [21] SONG Y C, KHIRABADI B S, LIGHTFOOT F, et al. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(3): 296-299.
- [22] BOURNE W M, NELSON L R. Human corneal studies with a vitrification solution containing dimethyl sulfoxide, formamide, and 1,2-propanediol. [J]. *Cryobiology*, 1994, 31(6):522-530.
- [23] KHEIRABADI B S, FAHY G M. Permanent life support by kidneys perfused with a vitrifiable (7.5 molar) cryoprotectant solution. [J]. *Transplantation*, 2000, 70(1):51-57.
- [24] BROCKBANK K G M. C-20: Tissue vitrification [J]. *Cryobiology*, 2014, 69(3):507.