

文章编号:0253-4339(2016)05-0106-06

doi:10.3969/j.issn.0253-4339.2016.05.106

冷冻保护剂添加-去除过程对猪 MII 期卵母细胞损伤研究

杨 云¹ 周新丽¹ 戴建军² 张德福² 邵文琪¹ 衣星越¹ 陶乐仁¹

(1 上海理工大学生物热科学研究所 上海 200093; 2 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106)

摘 要 在卵母细胞的低温保存过程中,冷冻保护剂的添加与去除是一个必不可少的步骤,但高浓度的冷冻保护剂会对细胞造成渗透损伤和毒性损伤。为研究冷冻保护剂添加与去除过程对猪 MII 期卵母细胞的损伤,本文采用传统的方法(一步法、两步法)来添加和去除冷冻保护剂,探究冷冻液、解冻液、稀释液对细胞存活率的影响。实验结果表明:在冷冻保护剂添加-去除过程中,卵母细胞的渗透损伤主要发生在卵母细胞从冷冻液转移至解冻液,以及保护剂去除阶段;解冻液浓度与平衡时间对卵母细胞存活率有很大影响;卵母细胞保护剂的去除与添加过程是相关的,解冻液浓度和平衡时间的选择依赖于细胞在冷冻液中的浓度和平衡时间。此研究结果将为猪 MII 期卵母细胞的低温保存方案提供参考。

关键词 低温保存;冷冻保护剂;渗透损伤;卵母细胞

中图分类号:TB61⁺1; R318.52; Q27

文献标识码: A

Study on Injuries of Porcine MII-stage Oocytes during Cryoprotectants Addition and Removal Processes

Yang Yun¹ Zhou Xinli¹ Dai Jianjun² Zhang Defu² Shao Wenqi¹ Yi Xingyue¹ Tao Leren¹

(1. Institute of Biothermal Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China; 2. Animal and Veterinary Research Institute, SAAS, Shanghai, 201106, China)

Abstract Cryoprotectants addition and removal are essential steps during oocytes cryopreservation, however, high concentration of cryoprotectants may cause osmotic and toxic injuries to oocytes. In order to study the injuries of porcine MII-stage oocytes during cryoprotectants addition and removal processes, cryoprotectant was loaded and unloaded to/from oocytes with traditional methods (one-step method, two-step method), the effects of vitrification solution, thawing solution and dilution solution on the survival rate of oocytes were investigated. The experimental results showed that the osmotic injuries to oocytes happened mainly in two stages: the transfer process from vitrification solution to thawing solution, and the cryoprotectants removal process. The concentration of thawing solution and equilibrium time had a great influence on the survival rate of oocytes. The cryoprotectants removal process was highly correlated with addition process, and the selection of thawing solution concentration and equilibrium time relied on the vitrification solution concentration and equilibrium time. These results could provide a reference for cryopreservation protocols of porcine MII-stage oocytes.

Keywords cryopreservation; cryoprotectants; osmotic injury; oocyte

自从 1986 年 Chen C^[1]首次成功地冷冻保存人的卵母细胞并受精后获得后代以来,卵母细胞的低温保存一直是低温生物学界的热点课题,该技术的发展在人类辅助生殖及生物胚胎技术领域有着广阔的应用前景^[2-3]。卵母细胞的低温保存方法主要有两种:慢速冷冻和玻璃化冷冻。近年来,学术界一致认为玻璃化冷冻效果明显优于慢速冷冻,因为玻璃化冷冻是高浓度冷冻保护剂溶液在超快速冻结过程中形成一种介于液态和固态之间的、透明的、非晶态物质

的过程,避免了细胞内外冰晶的产生^[4-5]。为了实现卵母细胞的玻璃化冷冻,研究学者提出了微滴喷射法^[6]、开放式麦管法、冷冻环法^[7]、Cryotop 法^[8-9]等多种提高降温速率的方法。尽管如此,目前临床上卵母细胞解冻复温后的存活率、受精率、胚胎率及分娩率依然很低。Kawayama M 等^[10]报道了 Cryotop 法玻璃化冷冻 111 个人 MII 期卵母细胞,获得活胚分娩的机率仅为 10% 左右。

影响卵母细胞玻璃化冷冻效果的因素有很多,

基金项目:国家自然科学基金(51376132)资助项目。(The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51376132).)

收稿日期:2016 年 1 月 18 日

除了冷冻载体、升降温速率等,冷冻保护剂的使用所带来的副作用也是一个重要的因素。在冷冻保护剂添加与去除过程中,由于胞外渗透压的急剧变化,大量水或保护剂快速流出或流入细胞,从而引起细胞体积的收缩或膨胀,造成细胞膜结构的损伤;同时冷冻保护剂自身的化学毒性,会对卵母细胞造成毒性损伤^[11]。为了减小保护剂渗透作用和化学毒性对卵母细胞的损伤,目前通常采用分步添加和分步去除保护剂的方法。Mullen S F 等^[12]研究表明分步法向人卵母细胞导入 6.4 mol/L 乙二醇(EG)时,以四步添加最为理想。解政鼎等^[13]认为添加高浓度低温保护剂时,采用等渗透压差、渗透时间间隔逐渐减小的分步添加方法,可以减轻细胞的渗透损伤和毒性损伤。前人研究的侧重点在于保护剂添加-去除程序的优化,而对于分步添加-去除过程中每一步对细胞的损伤程度有多大,并没有定量的数据,从而不能准确地了解细胞渗透损伤发生在哪个阶段;此外,上述研究多是孤立地优化添加过程或去除过程,而事实上,保护剂去除过程中稀释液浓度与平衡时间的选择都依赖于保护剂加载过程(冷冻液浓度、平衡时间),保护剂的加载过程与去除过程需要相匹配。

本研究首先采用一步法、两步法对猪 MII 期卵母细胞进行冷冻保护剂的添加与去除,逐步分析加载-去除过程中每一步对细胞存活率的影响,对渗透损伤发生在哪个阶段有更准确的认识。然后对两步法中渗透损伤明显的阶段进行优化,讨论冷冻液浓度、稀释液浓度、以及平衡时间等因素对细胞存活率与发育率的影响,进一步说明细胞保护剂添加过程与去除过程的相关性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

组织培养液(tissue culture medium 199, TCM199)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, Me₂SO)、蔗糖、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司,美国。实验中所用其他试剂除特别说明外,均购自美国 Sigma 公司。

1.2 玻璃化冷冻液、解冻液、稀释液

一步法:基础液:TCM199 + 20% FBS;玻璃化冷冻液(vitrification solution, VS₂):基础液 + 30% (v/v) Me₂SO;解冻液(thawing solution, TS):基础液 + 0.5 mol/L 蔗糖;稀释液(dilution solution, DS₂):基础液。两步法:基础液:TCM199 + 20% FBS;玻璃化冷

冻液 1(VS₁):基础液 + 15% (v/v) Me₂SO;玻璃化冷冻液 2(VS₂):基础液 + 30% (v/v) Me₂SO + 0.5 mol/L 蔗糖;解冻液(TS):基础液 + 0.5 mol/L 蔗糖;稀释液 1(DS₁):基础液 + 0.25 mol/L 蔗糖;稀释液 2(DS₂):基础液。

1.3 猪卵母细胞的采集与体外成熟

实验中所用的猪卵母细胞取自上海市嘉定区某屠宰场采集的新鲜卵巢,放在 37 ℃ 的保温杯中 1 h 内运回实验室,选择卵巢表面直径为 2 ~ 6 mm 的卵泡,用 10 mL 的一次性注射器将卵母细胞复合体连同卵泡液一起吸出。将抽出的液体置于 10 mL 的离心管中,在 39.5 ℃ 的恒温水浴中静置 15 ~ 20 min,移除上清液。取胞质均匀且有 3 层以上致密卵丘细胞包裹的细胞,即 GV 期卵母细胞。

将 GV 期卵母细胞在 TCM199 中洗涤三次后,置于已经平衡 4 h 以上的成熟培养液中,成熟液是 TCM199 + 10% FBS + 10% 猪卵泡液 + 0.1% 孕马血清促性腺激素(PMSG) + 0.1% 人体毛膜促性腺激素(hCG),然后再放入 CO₂ 培养箱(39 ± 0.5 ℃、5% CO₂, BC-J160S, 上海博讯实业有限公司, 中国)中,成熟培养 44 ~ 46 h,得到 MII 期卵母细胞。II 期卵母细胞用 0.1% 透明质酸酶消化以去除卵丘细胞,再用 TCM199 洗涤 3 ~ 5 次,备用。

1.4 玻璃化冷冻液、解冻液、稀释液的渗透压测定

室温下,每次取已配制好的玻璃化冷冻液、解冻液、稀释液 200 ~ 250 μL,放入渗透压计(Model-3250 冰点渗透压计;Advanced, 美国)的检测管内测量其渗透压。每组溶液重复测量 3 次,取其平均值。

1.5 细胞渗透损伤的逐步确定

为了准确了解细胞渗透损伤发生在哪个阶段,实验组卵母细胞依次经过不同溶液,每转移一次,检测一次细胞存活率。每组所用卵母细胞个数约为 60 个,每组实验重复 2 ~ 3 次。对照组:新鲜细胞,不经过任何处理。一步法:将卵母细胞从基础液中移至玻璃化冷冻液中平衡 1 min,完成冷冻保护剂的加载。接着将卵母细胞移至解冻液中,浸没时间 3 min,然后移至 37 ℃ 的基础液中,浸没时间 6 min,完成保护剂的去除。两步法:将卵母细胞从基础液中移至 VS₁ 中,平衡时间 3 min,然后快速转移至 VS₂ 中,平衡时间 30 s,完成保护剂的加载。接着将卵母细胞移至 TS 中,浸没时间 3 min,然后移至 DS₁ 中,浸没时间 3 min,然后再放入 DS₂ 中,平衡时间 3 min。逐级脱除冷冻保护剂。

1.6 两步法解冻液浓度与平衡时间的优化确定

采用两步法添加保护剂后,选择不同浓度的解冻液以及其中的平衡时间,卵母细胞的存活率会有较大差异。为了选择合适的解冻液浓度和平衡时间,进行如下实验:首先将卵母细胞按照 1.5 中的两步法完成冷冻保护剂的添加,然后将卵母细胞分别转移至含 0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 四种不同浓度蔗糖的解冻液中,每种浓度解冻液中停留 60 s、120 s、180 s 三个平衡时间,从解冻液中取出后,检测细胞的存活率。

1.7 两步法去除与添加过程的优化匹配

卵母细胞在玻璃化溶液中平衡不同的时间后,其所对应的优化解冻条件也会有所改变。为了探讨添加过程和去除过程之间的匹配关系,进行如下实验:将卵母细胞从基础液中移至 VS₁ 中平衡 3 min,然后快速转移至 VS₂ 中,平衡时间分别为 30 s、45 s、60 s、90 s、120 s、180 s,接着将细胞快速转移至含 0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 四种不同浓度蔗糖的解冻液中,平衡时间 120 s,从解冻液中取出后,检测卵母细胞的存活率。

1.8 细胞存活率的判断

卵母细胞经过不同处理后,立即用荧光素双醋酸酯 (fluorescein diacetate, FDA) 染色 5 min,再用 TCM199 洗涤 3~4 次,在倒置荧光显微镜 (TS100 倒置荧光显微镜:Nikon,日本)下观察是否着色。有强荧光反应的细胞认为是活卵,无荧光反应或弱荧光反应的细胞认为是死卵。活卵数与细胞总数之比为细胞存活率,以此标准计算卵母细胞存活率。实验数据采用数据分析软件 SPSS Statistics 13.0 进行显著性分析, $p < 0.05$ 为显著性差异标准。

2 实验结果与讨论

2.1 所用溶液的渗透压

一步法与两步法所用冷冻液、解冻液、及稀释液的渗透压值如表 1 所示。从表中可以看出,玻璃化冷冻液的渗透压值远大于解冻液与稀释液,两种方法中,玻璃化冷冻液 VS₂ 与解冻液之间的渗透压差均达到了 5 000 mOsm/kg 左右。含 0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 四种不同浓度的蔗糖解冻液的渗透压值如表 2 所示,溶液的渗透压随着蔗糖浓度的增加而增加,形成渗透压梯度。

2.2 保护剂添加与去除过程对卵母细胞存活率的影响

为了对渗透损伤发生在哪个阶段有更准确的认

识,将卵母细胞依次经过玻璃化冷冻液、解冻液、稀释液的处理,探究每一步对细胞存活率的影响,结果如图 1 所示。从图 1(a)可知,卵母细胞经一步法添加 30% Me₂SO 后,细胞的存活率为 83.9%,显著低于对照组的 95.2%。细胞不经过冷冻保存,然后经过解冻液和稀释液处理后,细胞的存活率分别为 58.4%、58.7%。从图 1(b)可知,卵母细胞经两步法添加冷冻保护剂,每一步添加后的细胞存活率分别为 91.9%、92.1%,较对照组的 98.5% 有所降低。然后卵母细胞从冷冻液 VS₂ 中转移至解冻液中,细胞存活率减小至 84.0%,再经稀释液 WS₁、WS₂ 去除保护剂后,细胞存活率有显著减小,分别为 74.2% 和 69.8%。

表 1 一步法和两步法所用溶液的渗透压值/(mOsm/kg)

Tab. 1 The osmotic pressure values of the solutions used in one-step method and two-step method

组别	冷冻液	冷冻液	解冻液	稀释液	稀释液
	VS ₁	VS ₂	TS	WS ₁	WS ₂
一步法	—	5 087	672	—	289
两步法	2 362	5 867	668	510	288

表 2 不同浓度蔗糖解冻液的渗透压值

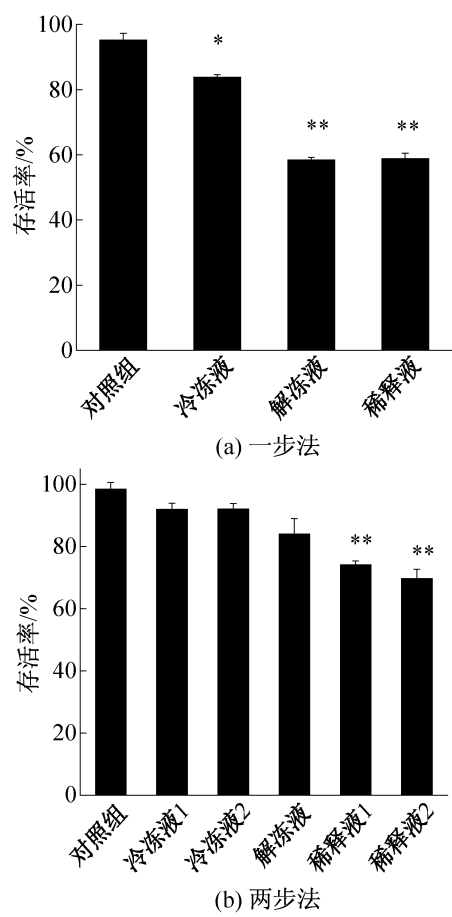
Tab. 2 The osmotic pressure values of the sucrose thawing solution with different concentration

浓度/(mol/L)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
渗透压/(mOsm/kg)	298	669	1 660	2 248	2 528

与一步法相比,两步法处理增加了卵母细胞冷冻保护剂添加与去除的步数,缩小了溶液间的渗透压差,从而减轻了溶液对细胞的渗透损伤,有利于细胞的冷冻保存。此外,对于一步法和两步法来说,卵母细胞从冷冻液转移至解冻液,以及冷冻保护剂去除的过程中,细胞的存活率会显著降低,说明溶液对卵母细胞的渗透损伤主要发生在这个阶段,这是因为细胞从冷冻液转移至解冻液中,细胞内外出现了极大的渗透压差,使得溶液跨膜扩散具有了更大的驱动力,导致大量水或冷冻保护剂快速流出/流入细胞,从而引起细胞体积的膨胀或收缩,对细胞造成致命的渗透损伤^[13]。

对于冷冻保护剂的添加过程,研究者已经做了大量的优化研究,包括保护剂浓度、添加步骤、每一步的时间等^[14-15]。然而,Wang L 等^[16]和 Liu J 等^[17]对冷冻保护剂添加和去除的全过程进行了研究,结果表明:冷冻保护剂的去除过程对细胞的渗透损伤要远大

于其他步骤,缩短冷冻保护剂的去除程序可能会减小细胞的渗透损伤。这与文中的实验结果是一致的。



注:与对照组相比, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

图 1 一步法、两步法添加与去除保护剂对猪卵母细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of addition and removal of CPA with one-step method and two-step method on survival rate of porcine oocytes

2.3 解冻液浓度与平衡时间对猪卵母细胞存活率的影响

以两步法添加冷冻保护剂,然后将卵母细胞从冷冻液 VS_2 中分别转移至 0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 四种不同浓度的蔗糖解冻液中,平衡时间分别为 60 s、120 s、180 s,细胞的存活率如图 2 所示。从图中可以看出,解冻液浓度与平衡时间都对卵母细胞存活率有很大影响,卵母细胞在四种不同浓度解冻液中暴露 60 s 的细胞存活率均显著低于暴露 120 s 和 180 s,这是因为细胞在溶解液中平衡时间短,胞内外未达到渗透平衡状态,细胞仍处于膨胀状态,此时胞内保护剂未能充分去除,高浓度保护剂对细胞有毒性损伤。卵母细胞在解冻液中暴露 180 s 的存活率要低于 120 s,但两者之间无显著性差异。

从图中还可以看出,浓度为 1 mol/L 的解冻液处理后细胞存活率要高于其他实验组。根据之前测得的溶液渗透压值可知,浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 的解冻液与 VS_2 之间的渗透压差分别是 5 198、4 207、3 619、3 339 mOsm/kg,说明并不是冷冻液 VS_2 与解冻液间的渗透压差越小,细胞的存活率就越高。这可能与低温保护剂的加载过程有关,卵母细胞在 VS_2 中仅平衡 30 s,细胞内渗透压远没有达到与 VS_2 平衡的渗透压 5 867 mOsm/kg,可能与 1 mol/L 的蔗糖溶液的渗透压 1 660 mOsm/kg 接近。当细胞被转移至不同浓度的解冻液中时,与细胞内渗透压最接近的解冻液,对细胞损伤最小。在本实验中,当解冻液浓度为 1 mol/L,平衡时间为 120 s 时,卵母细胞存活率最高,达到 80.6%。

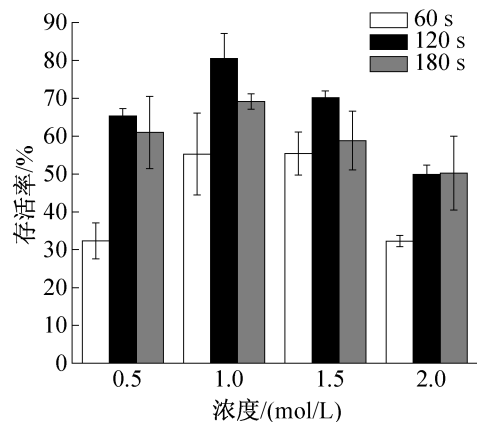


图 2 解冻液浓度与平衡时间对猪卵母细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of concentration of thawing solution and equilibration time on survival rate of porcine oocytes

2.4 保护剂添加过程与去除过程的相关性

采用两步法添加冷冻保护剂,并将卵母细胞在冷冻液 VS_2 中分别平衡 30 s、45 s、60 s、90 s、120 s、180 s,然后转移至 0.5 mol/L、1.0 mol/L、1.5 mol/L、2.0 mol/L 四种浓度的解冻液中平衡 120 s,卵母细胞的存活率如图 3 所示。从图中可以看出,当卵母细胞在 VS_2 中平衡时间为 30 s 时,解冻液浓度为 1 mol/L 处理的细胞存活率最高,2 mol/L 处理的细胞存活率最低;当卵母细胞在 VS_2 中平衡时间为 45 s、60 s、90 s、120 s、180 s 时,解冻液浓度为 2 mol/L 和 1.5 mol/L 处理的细胞存活率较高。说明卵母细胞在玻璃化溶液中的平衡时间改变后,其所对应的解冻液条件也随之发生变化。细胞在冷冻液 VS_2 中平衡时间短,应选择低浓度的解冻液;反之,则选择高浓度的解冻液。这可能是因为细胞内保护剂的渗透压随着平衡时间的延长而增加,增加解冻液浓度可以减小渗透压差,从而提高细胞存活率^[16]。Wang X 等^[18]对牛卵母细

胞进行了冷冻保护剂的分步添加和去除实验,结果表明四步添加结合两步去除的方案后细胞的卵裂率和囊胚率最高,说明冷冻保护剂的去除与添加过程是相关的,两者之间需要相匹配。此外,当卵母细胞在 VS_2 中平衡时间大于 60 s 时,所有浓度解冻液处理后的细胞存活率都随着平衡时间的增加而减小,说明细胞在高浓度冷冻液中的渗透损伤和毒性损伤很大,平衡时间不宜超过 60 s。

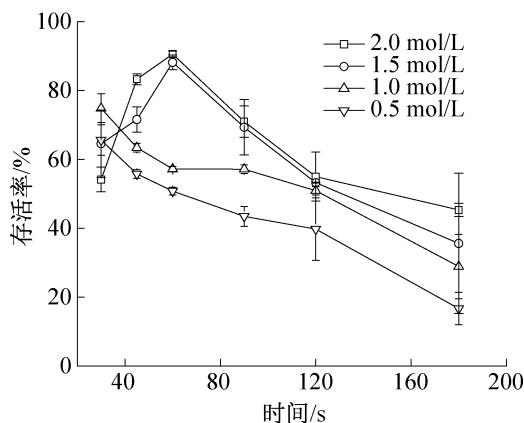


图 3 解冻液浓度与猪卵母细胞在 VS_2 中平衡时间的依赖关系

Fig. 3 The dependency between the concentration of thawing solution and the equilibration time in VS_2 to porcine oocytes

3 结论与展望

为了研究冷冻保护剂添加与去除过程对猪 MII 期卵母细胞的损伤,采用了一步法和两步法添加和去除冷冻保护剂,探究了冷冻液、解冻液、稀释液对细胞存活率的影响。在冷冻保护剂添加和去除过程中,各溶液之间的渗透压差是导致细胞损伤的重要因素,其中溶液渗透损伤主要发生在细胞从玻璃化溶液转移至解冻液,以及冷冻保护剂去除过程中。目前分步法是去除保护剂的常用方法,但卵母细胞保护剂的去除过程与加载过程是相关的,解冻液浓度和平衡时间的选择依赖于细胞在冷冻液中的浓度和平衡时间。尽管优化后的分步法减小了细胞的渗透损伤,但仍然无法避免细胞体积的骤变,而且实际操作的规范性不好掌握,实验重复性差。为了弥补这些缺点,提高卵母细胞低温保存效果,微流体法能实现冷冻保护剂的连续性去除,可能是一种有效的去除方法。

本文受上海市自然科学基金(13ZR1429200)和上海市国家重点实验室(1N15301101)项目资助。(The project was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 13ZR1429200) and the National Key Laboratory of Shanghai (No. 1N15301101).)

参考文献

- [1] Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation [J]. The Lancet, 1986, 327(8486): 884-886.
- [2] Chian R C, Wang Y, Li Y R. Oocyte vitrification: advances, progress and future goals [J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2014, 31(4): 411-420.
- [3] Stachecki J J, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation [J]. Reproductive Biomedicine Online, 2004, 9(2): 152-163.
- [4] 李维杰,周新丽,吕福扣,等. 纳米低温保护剂提高卵母细胞玻璃化保存效果的机理初探[J]. 制冷学报, 2014, 35(1): 114-118. (LI Weijie, ZHOU Xinli, LYU Fukou, et al. Preliminary study on the mechanism of promoting the survival rate of vitrified oocytes with nano-cryo-protectants[J]. Journal of Refrigeration. 2014, 35(1): 114-118.)
- [5] 郝保同,刘宝林,王伯春,等. 玻璃化保存后老鼠黏附成骨细胞形态及存活率的实验观测[J]. 上海理工大学学报, 2010, 32(6): 511-514. (HAO Baotong, LIU Baolin, WANG Bochun, et al. Effect of cryoprotectants on the morphology and viability of attached murine osteoblast cells [J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2010, 32(6): 511-514.)
- [6] Zhang X H, Khimji I, Shao L, et al. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation [J]. Nanomedicine, 2012, 7(4): 553-564.
- [7] Lane M, Schoolcraft W B, Gardner D K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique [J]. Fertility And Sterility, 1999, 72(6): 1073-1078.
- [8] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method [J]. Theriogenology, 2007, 67(1): 73-80.
- [9] 李维杰,周新丽,戴建军,等. 冷冻载体 Cryotop 降温速率的测量及系统优化[J]. 制冷学报, 2013, 34(5): 95-98. (LI Weijie, ZHOU Xinli, DAI Jianjun, et al. Cooling rate measurement and system optimization for Cryotop device[J]. Journal of Refrigeration, 2013, 34(5): 95-98.)
- [10] 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.
- [11] Karlsson J, Szurek E, Higgins A, et al. Optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes[J]. Cryobiology, 2014, 68(1): 18-28.
- [12] Mullen S F, Rosenbaum M, Critser J K. The effect of osmotic stress on the cell volume, metaphase II spindle and developmental potential of in vitro matured porcine oocytes

- [J]. Cryobiology, 2007, 54(3): 281-289.
- [13] 解政鼎, 马学虎, 艾丹亭, 等. 低温保护剂对神经干细胞球添加过程的模拟分析 [J]. 化工学报, 2013, 64(11): 3956-3967. (XIE Zhengding, MA Xuehu, AI Danting, et al. Analysis of cryoprotectant addition for neural stem cell sphere[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2013, 64(11): 3956-3967.)
- [14] 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. Study on cryopreservation of human hepatoma Hep-G2 cell[J]. Journal of Refrigeration, 2015, 36(2): 95-100.)
- [15] 王欣, 华泽钊, 刘宝林, 等. Me_2SO 浓度及预处理条件对组织工程化真皮活性的影响 [J]. 上海理工大学学报, 2007, 29(4): 311-314. (WANG Xin, HUA Zezhao, LIU Baolin, et al. Effects of Me_2SO and loading conditions on the cell viability of tissue-engineered dermal replacement [J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2007, 29(4): 311-314.)
- [16] Wang L, Liu J, Zhou G B, et al. Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures[J]. Biology of Reproduction, 2011, 85(5): 884-

894.

- [17] Liu J, Phy J, Yeomans E. Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation [J]. Theriogenology, 2012, 78(8): 1641-1652.
- [18] Wang X, Al-Naib A, Sun D W, et al. Membrane permeability characteristics of bovine oocytes and development of a step-wise cryoprotectant adding and diluting protocol [J]. Cryobiology, 2010, 61(1): 58-65.

通信作者简介

周新丽, 女, 副教授, 上海理工大学生物热科学研究所, (021) 55270218, E-mail: zjulily@163.com。研究方向: 生物材料的低温保存。现在进行的项目有: 国家自然科学基金项目 (51376132)——卵母细胞微流体低温保存过程的理论与实验研究。

About the corresponding author

Zhou Xinli, female, associate professor, Institute of Biothermal Technology, University of Shanghai for Science and Technology, +86 21-55270218, E-mail: zjulily@163.com. Research fields: cryopreservation of biomaterials. The author takes on project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51376132); theoretical and experimental research on oocyte cryopreservation in microfluidic device.

(上接第 99 页)

- [16] 陈东芳. 微结构表面的喷雾冷却研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.
- [17] Abbasi B, Kim J, Marshall A. Dynamic pressure based prediction of spray cooling heat transfer coefficients [J]. International Journal of Multiphase Flow, 2010, 36(1): 491-502.
- [18] Abbasi B, Kim J. Prediction of PF-5060 spray cooling heat transfer and critical heat flux [J]. Journal of Heat Transfer, 2011, 133(10): 1504-1516.
- [19] Yan Z B, Toh K C, Duan F, et al. Experimental study of impingement spray cooling for high power devices [J]. Applied Thermal Engineering, 2010, 30(10): 1225-1230.
- [20] 司春强, 徐洪波, 唐明生, 等. 高功率固体激光器用气助式雾化无沸腾换热性能的实验研究 [J]. 光学学报, 2010, 30(10): 2958-2962. (SI Chunqiang, XU Hongbo, TANG Mingsheng. et al. Experimental study on the gas assisted atomization of non boiling heat transfer performance of high power solid state laser [J]. Journal of Optics, 2010,

30(10): 2958-2962.)

- [21] 孙纪远, 朱冬生. 低温表面大流量无沸腾喷雾冷却试验研究 [J]. 流体机械, 2009, 37(4): 60-63. (SUN Jiyuan, ZHU Dongsheng. Study on the high flow boiling spray cooling without boiling spray on the surface of low temperature [J]. Fluid Machinery, 2009, 37(4): 60-63.)
- [22] 赵锐. 喷雾冷却传热机理及空间换热地面模拟研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2009.

通信作者简介

李丽荣, 女, 在读研究生, 上海理工大学能源与动力工程学院, 18301932868, E-mail: llr_320@163.com。研究方向: 电子元件冷却技术。

About the corresponding author

Li Lirong, female, graduate student, School of Energy and Power Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, +86 18301932868, E-mail: llr_320@163.com. Research fields: electronic cooling.