

基于气态氮梯度降温的低共熔保护剂降温速率优化研究

王莹

上海理工大学健康科学与工程学院, 上海

收稿日期: 2025年3月22日; 录用日期: 2025年4月15日; 发布日期: 2025年4月24日

摘要

低温生物医学领域中, 低共熔保护剂体系凭借其氢键网络介导的冰晶抑制能力与低渗透损伤特性, 被视为替代传统低温保护剂(如DMSO、甘油)的革新方向。然而, 其优势的实现高度依赖精准的降温速率控制: 过慢冷却易引发过冷态冰晶生长, 过快冷却则导致热应力损伤。当前主流的程序降温仪虽可调控速率, 但其高昂成本与操作复杂性限制了推广应用; 被动降温装置虽成本低廉, 但其固定速率(约 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)无法适配低共熔体系的中等速率需求。针对这一矛盾, 本研究提出一种基于液氮蒸汽层的梯度降温策略, 通过气态氮温度场的分布实现降温速率的灵活适配。结合COMSOL Multiphysics多物理场耦合模型, 分析了冻存管在气态氮梯度温度(-196°C 至 -56°C)下的传热特性。数值模拟表明: 气态氮温度梯度可精准控制冻存管内部降温速率。例如, 在 -196°C 至 -56°C 的液氮蒸汽下, 实现了 -22.37 至 $-7.98^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率, 可以满足低共熔保护剂体系的降温需求。研究结果为低共熔保护剂的应用提供了兼具经济性与灵活性的解决方案, 推动低温保存技术从“设备驱动”向“环境调控”的范式转型, 为活性生物样本的长期储存奠定了理论与技术基础。

关键词

细胞冷冻保存, 气态氮梯度降温, 低共熔保护剂, 降温速率优化, 温度场调控

Research on the Optimization of Cooling Rates of Deep Eutectic Protectants Based on the Gradient Cooling with Gaseous Nitrogen

Ying Wang

School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

Received: Mar. 22nd, 2025; accepted: Apr. 15th, 2025; published: Apr. 24th, 2025

Abstract

In the field of cryobiomedicine, deep eutectic cryoprotectant systems are regarded as a revolutionary alternative to traditional cryoprotective agents (e.g., DMSO, glycerol) due to their hydrogen bond network-mediated ice crystal inhibition capability and reduced osmotic damage. However, the efficacy of these systems critically depends on precise cooling rate control: excessively slow cooling may trigger ice crystal growth in the supercooled state, while overly rapid cooling can induce thermal stress damage. Although mainstream programmable cooling devices allow adjustable rates, their high costs and operational complexity hinder widespread adoption. Passive cooling devices, though cost-effective, offer a fixed cooling rate (approximately $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), which fails to meet the intermediate rate requirements (-20 to $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$) of deep eutectic systems. To address this challenge, this study proposes a gradient cooling strategy based on liquid nitrogen vapor layer dynamics, achieving flexible cooling rate adaptation through the spatial modulation of gaseous nitrogen temperature fields. By employing a COMSOL Multiphysics-based multiphysics coupling model, we analyzed the heat transfer characteristics of cryovials under gaseous nitrogen gradient temperatures (-196°C to -56°C). Numerical simulations demonstrate that gaseous nitrogen temperature gradients enable precise control of internal cooling rates. For instance, within a liquid nitrogen vapor temperature range of -196°C to -56°C , cooling rates of -22.37 to $-7.98^{\circ}\text{C}/\text{min}$ were achieved, effectively satisfying the cooling demands of deep eutectic cryoprotectant systems. These results provide an economically viable and adaptable solution for the application of deep eutectic protectants, driving a paradigm shift in cryopreservation technology from “equipment-driven” to “environmentally modulated” approaches. This work lays a theoretical and technical foundation for the long-term storage of viable biological specimens, with implications for regenerative medicine and organ transplantation.

Keywords

Cell Cryopreservation, Gaseous Nitrogen Gradient Cooling, Deep Eutectic Cryoprotectant, Cooling Rate Optimization, Temperature Field Modulation

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

低温生物医学领域的细胞与组织冷冻保存技术是生物样本长期储存及临床应用的核心保障[1][2]。传统的低温保护剂(如二甲基亚砜、甘油等)虽已广泛应用,但其潜在的细胞毒性和解冻后功能恢复效率的局限性促使研究者转向新型低共熔(deep eutectic)保护液体系[2]。此类体系通过特定组分间的氢键作用形成低共熔特性,显著降低冰晶成核风险,同时减少渗透压损伤,展现出更高的生物相容性[3]。然而,低共熔体系的优势高度依赖于降温速率的精确控制:过慢的降温易引发溶液过冷导致的冰晶生长,而过快的降温则可能因热应力造成微观结构损伤[4]。当前,实现可控降温的两种主要技术——程序降温仪与被动降温装置——均存在显著局限性,严重制约了低共熔体系的实际应用。

程序降温仪(如液氮程控设备)能够通过闭环反馈系统精确调控冷却速率(通常为 -0.1 至 $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$),为不同细胞类型提供优化的降温曲线[5]。然而,其高昂的设备成本、复杂的操作流程以及样本转移过程中可能产生的温度波动(例如从程序降温仪转移至液氮储存时),限制了其在临床和工业场景的普及[6]。

相比之下,被动降温装置(如聚苯乙烯盒或异丙醇浴结合 -80°C 冰箱的方法)虽具有成本低、操作简便的优势,但其降温速率固定(约 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$),无法满足多样化的细胞类型或新型保护剂体系(如低共熔溶液)对降温速率的差异化需求[7]。例如,低共熔体系常需中等降温速率(如 -5 至 $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)以平衡冰晶抑制与热应力损伤,而现有被动装置提供的单一慢速显然无法适配这一要求[8] [9]。

针对上述矛盾,本研究提出一种基于液氮蒸发相变过程的梯度降温策略,通过调节气态氮环境温度实现降温速率的主动调控。与依赖复杂机电系统的程序降温仪不同,该方案利用液氮蒸发产生的梯度温度场,构建低成本、可扩展的降温环境。通过气态氮温度梯度的空间分布,直接控制冻存管外壁的热流边界条件,进而实现内部溶液降温速率的精准匹配。为此,本研究采用 COMSOL Multiphysics 建立多物理场耦合模型,探究气态氮温度梯度对冻存管内部降温速率的影响。量化不同气相温度(如 -60°C 至 -196°C 梯度分布)下冻存管内部温度分布。为低共熔保护剂的推广应用提供兼具经济性与灵活性的降温方案,避免程序降温仪的高成本与操作复杂性。通过 COMSOL 的定量分析,预期可确定不同降温速率所需的气态氮温度梯度阈值,助力新型生物材料在再生医学及器官移植中的规模化应用。

2. 数值模拟

2.1. 模型几何

本研究基于 COMSOL Multiphysics® 仿真平台构建了冻存管三维几何模型,旨在探究液氮蒸发形成的温度梯度场对冻存管内部降温过程的影响。模型由聚丙烯材质的冻存管、冻存液相域及上部气相域三部分组成。冻存管总高度为 40 mm,外径 11 mm,壁厚 1 mm,内径 9 mm;液相域填充体积 1 mL 的冻存液,剩余部分为空气域。

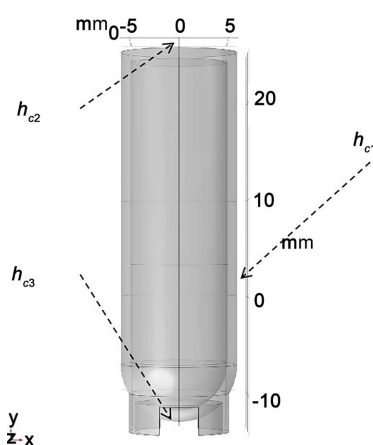


Figure 1. Schematic diagram of the geometric model and boundary conditions
图 1. 几何模型及边界条件示意图

仿真工具选用 COMSOL Multiphysics®, 其核心优势体现在多物理场耦合能力与动态网格优化特性。相较于传统计算流体力学软件,该平台可无缝集成传热模块与流体流动模块,直接求解导热、对流及相变过程的耦合方程,避免了跨软件数据传递引入的误差。针对冻存管薄壁结构与气液界面处的复杂热流场,软件内置的边界层网格生成器自动加密关键区域网格,并随瞬态计算动态调整单元密度。材料库中预置的聚丙烯、空气温度依赖型热物性参数,确保了物性输入的可靠性。外部气态氮温度梯度通过实验测得,实现了外部边界条件设定。

2.2. 边界条件

为了进一步研究冻存管在不同气态氮温度条件下降温过程中的详细温度分布,使用 COMSOL 模拟了冻存管内部的冷却特性。液氮蒸汽温度梯度的设定来自于实验测定,冻存液及冻存管材料的物性参数如表 1 所示。

在冷却过程中,装有 CPA 溶液的冻存管被放置在气态氮内,该冷冻过程被假定为以传导主导的传热系统,边界条件如图 1 所示。

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = Q + k \cdot \nabla^2 T \quad \text{式(1)}$$

式中: ρ 为密度($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), C_p 为比热容($\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), k 为导热系数($\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T 为温度(K), t 为时间(s)。 Q 是相变潜热,这里取纯水的数值 333 (kJ/kg)。

冻存管的侧面、顶部和底部表面的边界条件显示在下级方程中。

$$-k \frac{\partial T}{\partial t} = h_{c1} (T_{\text{ext}} - T_{\text{sur}}) \quad \text{式(2)}$$

$$-k \frac{\partial T}{\partial t} = h_{c2} (T_{\text{ext}} - T_{\text{sur}}) \quad \text{式(3)}$$

$$-k \frac{\partial T}{\partial t} = h_{c3} (T_{\text{ext}} - T_{\text{sur}}) \quad \text{式(4)}$$

式中: h_{c1} 、 h_{c2} 和 h_{c3} 分别表示侧面、顶部和底部的对流传热系数; T_{ext} 和 T_{sur} 分别代表液氮蒸汽温度和表面温度;

$$h_{c1} = \frac{K}{L_1} \left(0.68 + \frac{0.67 Ra_L^{1/4}}{\left(1 + (0.492/Pr)^{9/16} \right)^{4/9}} \right) \quad \text{式(5)}$$

$$h_{c2} = \frac{K}{L_2} 0.54 Ra_L^{1/4} \quad \text{式(6)}$$

$$h_{c3} = \frac{K}{L_3} 0.54 Ra_L^{1/4} \quad \text{式(7)}$$

式中: L_1 、 L_2 和 L_3 分别表示冻存管侧壁高度、顶部和底部宽度; Pr 表示普朗特数; Ra 表示瑞利数。

Table 1. Physical properties of materials

表 1. 材料的物理性质

Materials	c_p ($\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	k ($\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	ρ ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
PP	1680	0.22	900
2M DMSO -180°C~9.4°C	1958.3	$7.63\text{e}^{-10}\text{x}^4 + 1.60\text{e}^{-7}\text{x}^3 + 9.58\text{e}^{-6}\text{x}^2 - 6.01\text{e}^{-3}\text{x} + 1.32$ [10]	110.4
2M DMSO -9.4°C~0.2°C		$1.41\text{e}^{-3}\text{x}^2 - 6.86\text{e}^{-2}\text{x} + 6.06\text{e}^{-1}$ [10]	

2.3. 温度监测方法

采用 T 型热电偶测量温度变化。超细 T 型热电偶位于冻存管中心,以获得准确的温度读数。使用数

据采集开关单元(34,972 A, Agilent)记录温度测量值。

2.4. 网格无关化与模型有效性验证

首先进行了网格敏感性分析, 比较了 3309 至 167,720 的网格数。以整体降温曲线及 30 min 时中心点的温度为验证标准, 网格划分如图 2(A)所示。图 2(B)、图 2(C)显示了整体降温曲线及 40 min 时中心点温度随网格数的变化。结果显示, 当网格数达到 167,720 时, 仿真结果的差异足够小。因此, 网格总数为 5026 用于后续计算。同时, 比较了在液氮蒸汽层温度为 -80°C 时, 实验测试数据与模拟数据的差异, 结果如图 2(D)所示。结果显示模拟结果与实验测定结果基本吻合, 表明了模型建立的可靠性。

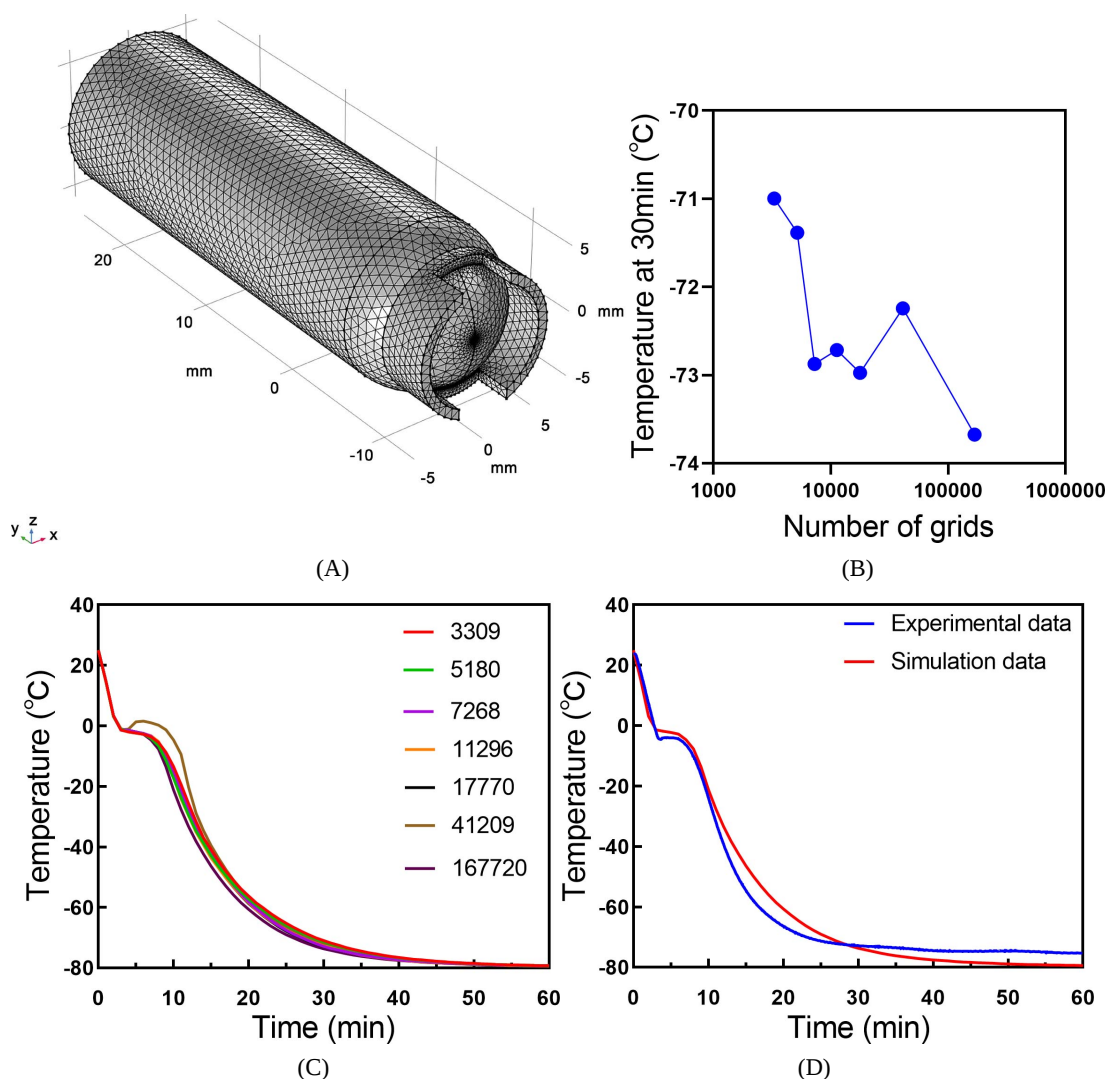


Figure 2. Grid independence verification and model validation. (A) Mesh generation. (B) Temperature variation at the central point of the cryovial 30 minutes after cooling initiation under an external temperature condition of -80°C , plotted against mesh density. (C) Cooling curves at the central point of the cryovial under an external temperature condition of -80°C for different mesh densities. (D) Comparison of experimental and simulated temperature profiles at the central point of the cryovial under an external temperature condition of -80°C .

图 2. 网格无关化与模型有效性验证。(A) 网格划分。(B) 外界温度条件为 -80°C 时, 降温开始后 30 min 冻存管内中心点温度随网格数的变化。(C) 外界温度条件为 -80°C 时, 冻存管内中心点降温曲线随网格数的变化。(D) 外界温度条件为 -80°C 时, 冻存管内中心点温度变化曲线的实验测定数据与模拟数据对比

3. 结果分析

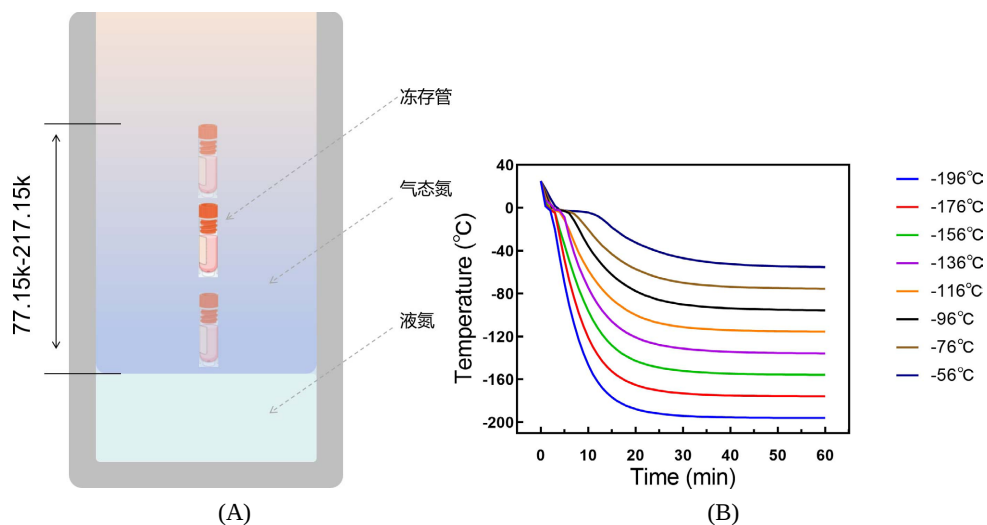
降温速率是决定生物样本冷冻保存效果的核心参数之一，其影响机制可通过“两因素假说”进行阐释：过快的降温速率会抑制细胞内水分外流，导致胞内冰晶(intracellular ice formation, IIF)的形成，破坏细胞膜与亚结构；过慢的降温速率则延长细胞暴露于高浓度溶质环境的时间，引发渗透压休克与化学毒性累积。最佳降温速率即平衡上述两种损伤的最小总损伤点，其数值取决于细胞类型与保护剂特性的协同作用：细胞体积、膜通透性及水分输运能力显著影响降温速率需求。例如，大型细胞(如卵母细胞)因水分扩散路径长，需较慢速率($1\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)以实现充分脱水；而小体积细胞(如红细胞)可耐受较快冷却($10\sim 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$)。渗透性保护剂(如 DMSO)通过降低冰点与促进脱水，允许更宽泛的降温窗口($5\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$)；非渗透性保护剂(如蔗糖)依赖胞外玻璃化，需超快速冷却($>50^{\circ}\text{C}/\text{min}$)以抑制冰晶生长。对于新型低共熔保护剂，其氢键网络可延缓冰核形成，最佳速率常介于 $20\sim 50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，兼顾冰晶抑制与热应力控制。

因此，制定冷冻方案时需综合细胞生物学特性与保护剂热力学行为，通过实验或计算模拟确定特定体系的最优降温速率，以实现细胞存活率与功能完整性的最大化。基于气态氮蒸发相变的梯度降温技术，为解决传统冷冻方法在适配新型低共熔保护剂体系中的瓶颈问题提供了创新性解决方案。相较于程序降温仪的高成本与被动降温装置的速率刚性，气态氮降温通过调控液氮蒸发产生的动态温度场，实现了降温速率的可调与低成本化。

为了进一步研究冻存管在不同气态氮温度条件下降温过程中的详细温度分布，使用 COMSOL 模拟了冻存管内部的冷却特性。结果如图 3 所示。

通过图 3(A)所示的实验系统，研究了生物样本在液氮蒸汽层不同温度梯度下的冷冻保存动力学特性。液氮蒸汽层的温度在较短时间内，没有较大空气扰动时，通常被认为是稳定的。首先通过温度采集装置测定不液氮蒸汽层的温度分布，结合建立的理论模型，确定了不同液氮蒸汽层温度下冻存管内部中心点的降温曲线、降温速率曲线及最大降温速率，结果如图 3(B)~(D)所示。

冻存管置于液氮蒸汽层中，蒸汽层温度覆盖 77.15 K 至 217.15 K 的宽域范围。该设计模拟了实际冷冻场景中对流换热(蒸汽层热传递)的作用，为后续温度场分析提供了物理原型基础。不同蒸汽层温度(-196°C 至 -56°C)下冻存管中心点温度随时间的变化曲线如图 3(B)所示。结果显示， -196°C 的液氮蒸汽可在 4 分钟内使样本快速降温至 -40°C ，而较高的液氮蒸汽温度(如 -56°C)达到相同温度需约 25 分钟。值得注意的是，所有曲线均呈现非线性降温特征，这与保护液过冷态冰晶成核释放的潜热相关。



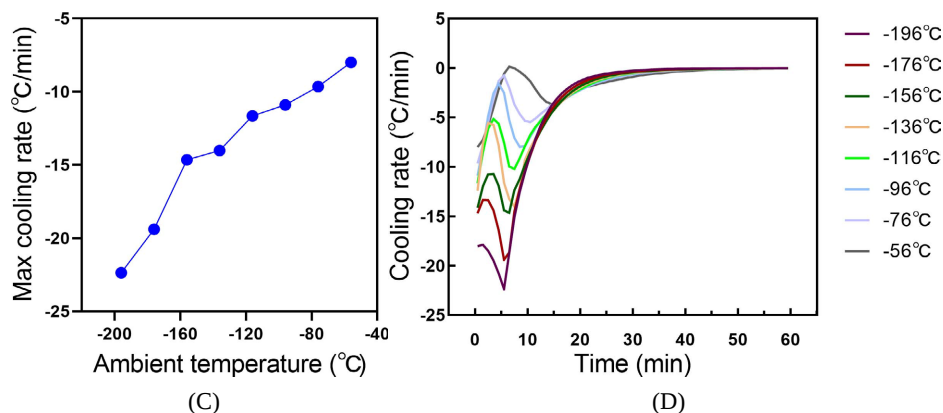


Figure 3. Cooling characteristics of the cryovial under different liquid nitrogen vapor layer temperatures. (A) Schematic diagram of the experimental setup. (B) Temperature evolution curves at the central point of the cryovial under different liquid nitrogen vapor layer temperatures. (C) Maximum cooling rates at the central point of the cryovial during cooling under different liquid nitrogen vapor layer temperatures. (D) Cooling rate profiles at the central point of the cryovial under different liquid nitrogen vapor layer temperatures

图 3. 不同液氮蒸汽层温度下冻存管的降温特性。(A) 实验装置示意图。(B) 不同液氮蒸汽层温度下冻存管内部中心点的温度变化曲线。(C) 不同液氮蒸汽层温度下冻存管内部中心点在降温过程中的最大降温速率。(D) 不同液氮蒸汽层温度下冻存管内部中心点的降温速率变化曲线

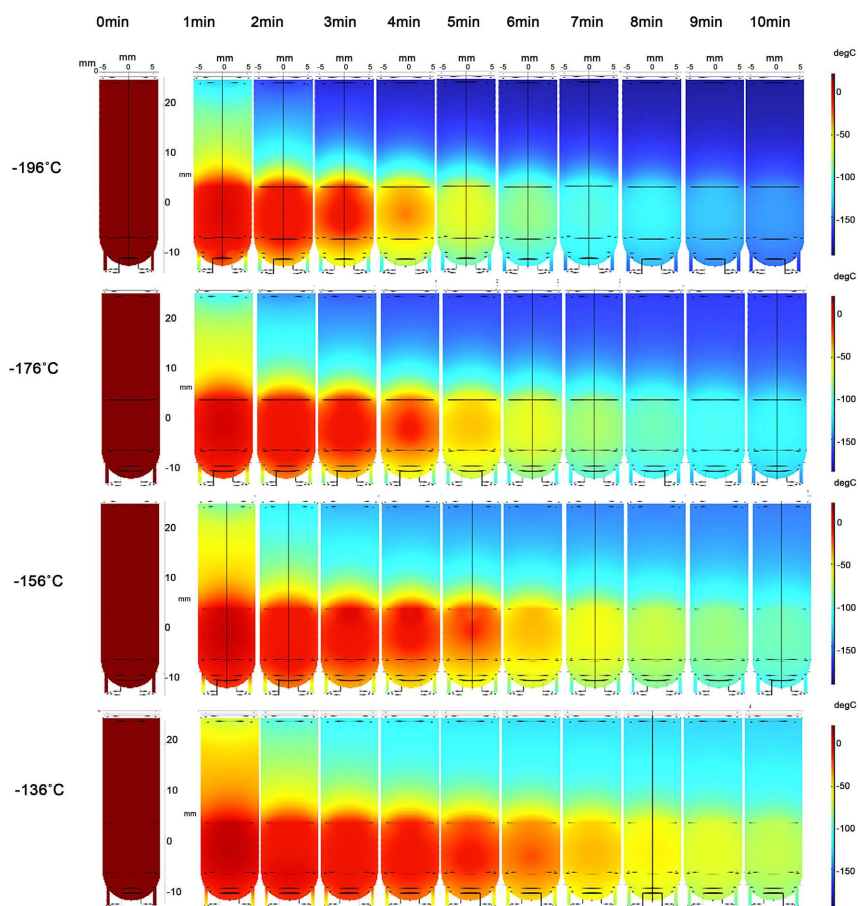


Figure 4. Temporal evolution of temperature distribution within the cryovial when the liquid nitrogen vapor layer temperature ranges from -196°C to -136°C

图 4. 当液氮蒸汽层温度为 -196°C ~ -136°C 时冻存管内部的温度分布随时间的变化

同时,统计了降温过程中的降温速率曲线,如图3(D)所示。结果显示,在降温过程中,经历过相变区间后,降温速率呈现先下降后上升的趋势,随后随着温度梯度的降低,趋于平稳。通过对降温过程中最大降温速率的统计,结果表明,其最大降温速率与液氮蒸汽温度显著相关,随着液氮层温度的下降,最大降温速率显著提升。在 $-196^{\circ}\text{C}\sim-56^{\circ}\text{C}$ 的液氮蒸汽下,实现了 $-22.37\sim-7.98^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率,可以满足低共熔保护剂体系的降温需求。图4与图5展示了不同液氮蒸汽温度下冻存管内部在关键时刻下的温度分布云图,同样证明了上述结论。

综合而言,蒸汽层温度通过改变对流换热强度与相变热力学过程,主导了冷冻速率与时间依赖性。对于低共熔保护体系,最优冷冻方案需权衡快速初冷(抑制冰晶生长)与后期控速(降低热应力损伤)的双重需求。本研究为开发基于蒸汽相热力学调控的自适应冷冻装置提供了理论依据,有望推动生物样本冷冻保存从“经验驱动”向“机理驱动”的范式转变,为低共熔体系的低温保存工艺优化提供了关键数据支撑。

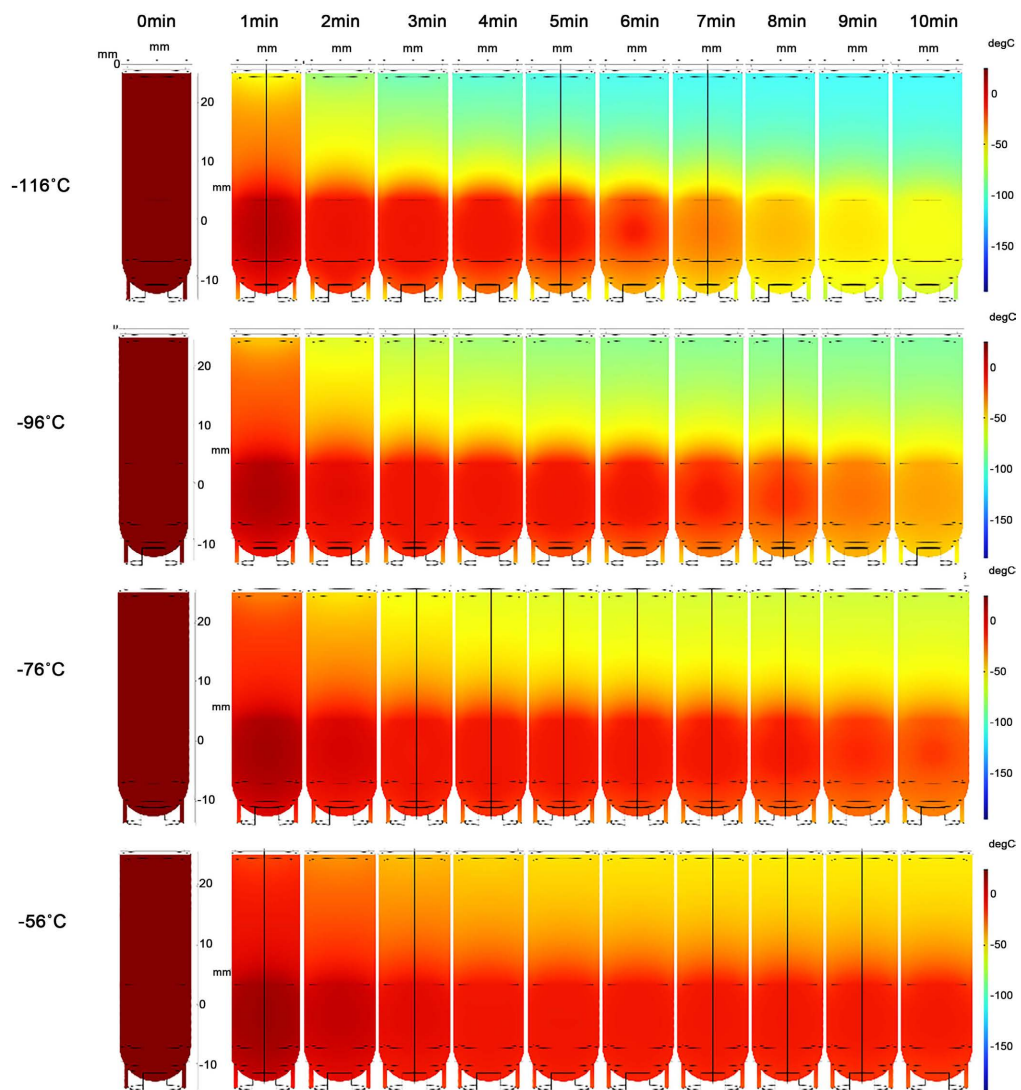


Figure 5. Temporal evolution of temperature distribution within the cryovial when the liquid nitrogen vapor layer temperature ranges from -116°C to -56°C

图 5. 当液氮蒸汽层温度为 $-116^{\circ}\text{C}\sim-56^{\circ}\text{C}$ 时冻存管内部温度分布随时间的变化

4. 结论

低温生物医学领域的冷冻保存技术正经历从传统保护剂向低共熔体系的转型,然而这一进程受限于降温速率控制技术的不足。传统程序降温仪虽能提供精确的线性冷却,但其高昂成本与操作复杂性限制了推广应用。被动降温装置虽成本低廉,但其固定速率无法满足低共熔保护剂对中等降温速率的需求,削弱了其抑制冰晶的潜力。本研究提出的气态氮梯度降温策略,通过液氮蒸发形成的梯度温度场实现速率灵活调控。数值模拟表明,合理调节温度梯度可使降温速率稳定在低共熔体系所需的范围内,平衡冰晶抑制与热应力缓解。降温速率的优化本质上是对冰晶损伤与溶质毒性平衡的探索[11]。低共熔保护剂的氢键网络虽能延缓冰核形成,但其热力学稳定性在快速相变中可能受到干扰。气态氮梯度降温通过“快-慢”耦合模式——初期快速冷却抑制冰晶成核,后期缓速降温缓解热应力——适配不同细胞类型的需求,同时改善温度场均匀性,为异质性组织保存提供了新思路。尽管潜力显著,该技术的实际应用仍面临挑战。环境因素可能影响液氮蒸发速率的稳定性,需开发闭环反馈系统以实现精准调控。此外,低共熔保护剂的氢键网络在深低温下的长期稳定性仍需通过多尺度实验进一步验证。从转化角度看,气态氮降温的模块化设计可扩展至不同规模的生物样本库,但其在实际样本冻存中的效能有待深入评估。

本研究通过融合热力学调控与生物损伤机制,推动了低温保存技术从“依赖设备”向“设计环境”的转型。气态氮梯度降温不仅解决了低共熔保护剂的速率适配难题,还以低成本、可扩展的特性提升了应用的可行性。未来研究需聚焦智能降温系统的开发,结合预测算法优化温度梯度参数,并探索保护剂与降温策略的协同作用,最终实现生物样本保存从经验驱动到数据驱动的跨越。

参考文献

- [1] 胥义, 郭宁, 杨国梁, 等. 生物样本库建设中的低温生物学[J]. 中国科学(生命科学), 2023, 53(7): 1021-1034.
- [2] 赵刚, 周学迅, 高大勇. 细胞低温保存原理与进展[J]. 中国科学(生命科学), 2024, 54(6): 1109-1128.
- [3] Hayyan, M., Mbous, Y.P., Looi, C.Y., Wong, W.F., Hayyan, A., Salleh, Z., et al. (2016) Natural Deep Eutectic Solvents: Cytotoxic Profile. *SpringerPlus*, 5, Article No. 913. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2575-9>
- [4] Castro, V.I.B., Craveiro, R., Silva, J.M., Reis, R.L., Paiva, A. and C. Duarte, A.R. (2018) Natural Deep Eutectic Systems as Alternative Nontoxic Cryoprotective Agents. *Cryobiology*, 83, 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.010>
- [5] He, W., Zhan, T., Han, H. and Xu, Y. (2023) Optimization of Deep Eutectic Solvents Enables Green and Efficient Cryopreservation. *Langmuir*, 40, 624-637. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c02808>
- [6] Huang, Y., Memon, K., Chapal Hossain, S.M., Peng, J., Wang, J., Shu, Z., et al. (2019) Heat Transfer Analysis of a Self-Designed Cooling Rate Controllable Device and Its Application for Cryopreservation of Biological Cells. *Applied Thermal Engineering*, 148, 768-776. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2018.10.128>
- [7] Marquez-Curtis, L.A., Janowska-Wieczorek, A., McGann, L.E. and Elliott, J.A.W. (2015) Mesenchymal Stromal Cells Derived from Various Tissues: Biological, Clinical and Cryopreservation Aspects. *Cryobiology*, 71, 181-197. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.07.003>
- [8] Kuwano, K., Aruga, Y. and Saga, N. (1994) Cryopreservation of the Conchocelis of *Porphyra* (Rhodophyta) by Applying a Simple Prefreezing System. *Journal of Phycology*, 30, 566-570. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00566.x>
- [9] Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M.T., Dionísio, M., et al. (2016) Properties and Thermal Behavior of Natural Deep Eutectic Solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 215, 534-540. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>
- [10] Ehrlich, L.E., Feig, J.S.G., Schiffres, S.N., Malen, J.A. and Rabin, Y. (2015) Large Thermal Conductivity Differences between the Crystalline and Vitrified States of DMSO with Applications to Cryopreservation. *PLOS ONE*, 10, e0125862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125862>
- [11] Best, B.P. (2015) Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*, 18, 422-436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>