

过冷保存技术在移植物保存中的应用研究进展

赵恒 冯锦腾 于邦瑞 李益行 白浩田 黄海水 张广健

【摘要】 过冷保存技术作为器官保存领域的一项突破性创新，通过将器官置于接近冰点或低于冰点的低温环境中，显著降低细胞的代谢率并抑制冰晶形成，延长了器官保存时间并保持其生物活性。相较于传统4℃低温保存，过冷保存技术能够有效避免细胞损伤和代谢物累积问题，在细胞、组织和器官保存中表现出显著优势。近年来，在冷冻保护剂优化、抗冻蛋白应用、玻璃化技术改进及纳米复温技术等领域取得了重要进展，为解决过冷保存过程中面临的毒性、冰晶形成及复温速率不均等挑战提供了新路径。本综述总结了过冷保存的基本原理以及关键技术的应用及其在器官移植中的实际成效，同时分析了其面临的毒性、复温效率等挑战，以期为未来优化器官低温保存技术和推动临床应用提供理论支持和研究方向。

【关键词】 过冷保存；器官移植；冰晶；冷冻保护剂；降温；复温；抗冻蛋白；纳米技术

【中图分类号】 R617, R329 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2025) 03-0008-10

Research progress in the application of supercooling preservation technology in graft preservation Zhao Heng*, Feng Jinteng, Yu Bangrui, Li Yixing, Bai Haotian, Huang Haishui, Zhang Guangjian. *Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Key Laboratory of Enhanced Recovery after Surgery of Integrated Chinese and Western Medicine, Xi'an 710061, China
Corresponding author: Zhang Guangjian, Email: michael8039@xjtu.edu.cn

【 Abstract 】 Supercooling preservation technology, as a groundbreaking innovation in the field of organ preservation, significantly reduces the metabolic rate of cells and inhibits ice crystal formation by placing organs in a low-temperature environment near or below the freezing point. This technology extends the preservation time of organs and maintains their biological activity. Compared with the traditional low-temperature preservation at 4 °C, supercooling preservation effectively avoids cell damage and the accumulation of metabolic products, demonstrating significant advantages in the preservation of cells, tissues and organs. In recent years, important progress has been made in the optimization of cryoprotectants, the application of antifreeze proteins, the improvement of vitrification technology, and the development of nanotechnology-based rewarming techniques. These advancements provide new pathways to address the challenges of toxicity, ice crystal formation and uneven rewarming rates during supercooling preservation. This review summarizes the basic principles of supercooling preservation, the application of key technologies, and their practical effects in organ transplantation. It also analyzes the challenges of toxicity and rewarming efficiency, aiming to provide theoretical support and research directions for the future optimization of organ low-temperature preservation technology and its clinical application.

【 Key words 】 Supercooling preservation; Organ transplantation; Ice crystal; Cryoprotectant; Cooling; Rewarming; Antifreeze protein; Nanotechnology

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2025030

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82470107); 陕西省卫生健康肺移植基础及临床转化科研创新平台(2024PT-09)

作者单位: 710061 西安, 西安交通大学第一附属医院胸外科 中西医结合加速康复外科实验室(赵恒、冯锦腾、李益行、白浩田、张广健); 西安交通大学生命科学与技术学院生物医学信息工程教育部重点实验室 西安交通大学仿生工程与生物力学研究所(于邦瑞、黄海水)

作者简介: 赵恒(ORCID 0000-0002-8431-6285), 博士研究生, 研究方向为移植器官的保存, Email: zhaoheng0629@stu.xjtu.edu.cn

通信作者: 张广健(ORCID 0000-0003-0663-6256), Email: michael8039@xjtu.edu.cn



作者简介:张广健, 主任医师, 国家优秀青年医师获得者, 三秦英才特支计划-陕西省科技创新领军人才, 陕西省中西医结合加速康复重点实验室主任, 陕西省临床重点专科—胸外学科带头人。兼任中华医学会器官移植学分会质控学组委员、中华医学会器官移植学分会肺移植学组委员、中国老年保健协会肺癌专委会常务委员、中国医药教育协会胸外科专委会常务委员、中国医师协会胸外科医师分会委员、中国抗癌协会肺癌整合康复专业委员会常务委员、中国康复医学会外科加速康复专委会副主任委员、中国健康促进基金会肺癌专委会副主任委员、中国研究型医院学会胸外科分会委员。受邀担任《中国胸心血管外科临床杂志》中青年编委, *Disease of Esophagus*、《器官移植》《现代肿瘤医学》《临床医学研究与实践》编委, 国家自然科学基金评审专家。获得省部级二等奖2项。获陕西省中青年创新领军人才、青年科技奖及五四青年奖章等。

随着器官移植需求的增加, 移植前延长器官保存时间和提高保存质量成为医学领域的关键研究问题之一^[1]。目前的器官保存方法主要依赖于4℃低温冷藏技术, 虽然可以避免冰冻温度下的冰晶形成, 但其在长时间保存中面临代谢物累积和细胞代谢物消耗等限制。这些问题不仅影响器官的生物活性, 还可能导致不可逆的组织功能损伤。近年来, 过冷保存技术作为一种新兴的突破性方法受到了广泛关注。该技术通过显著降低器官的代谢速率并抑制冰晶形成, 有效延长了器官保存的时间窗口。相比传统的4℃静态保存, 过冷保存技术通过降低温度至0℃以下, 几乎使器官进入“休眠”状态, 从而减少细胞代谢相关的损伤。尽管已有研究在冷冻保护剂(cryoprotectant, CPA)优化、玻璃化技术改进以及纳米技术的应用方面取得显著进展, 但仍存在诸多技术和实际应用的挑战。本研究旨在探讨过冷保存技术的原理、关键技术和当前应用, 并总结其在器官移植保存中的潜在前景和挑战, 以期为临床应用提供理论支持和技术指导。

1 过冷保存的原理与机制

1.1 基本原理

过冷保存近年来在器官保存领域获得了显著的关注, 作为一种突破性保存技术, 它通过将器官置于较低的温度环境中, 更大程度上降低器官细胞的代谢速率, 从而延长器官的保存时间^[2-5]。与传统的4℃低温保存技术相比, 深度过冷保存通过将器官温度降至0℃以下, 进一步降低细胞代谢活动, 同时抑制液体中冰晶的形成, 保持了细胞膜的完整性, 从而为移植器官提供更长的保存时间^[6-7]。在此过程中, 器官几乎进入了“休眠”状态, 这一过程能够有效抑制细胞代谢, 减少由于代谢活动引起的损伤^[8]。在常规低温保存中, 器官细胞的代谢速率虽得到了降低, 但

并未完全停止, 仍然存在低温下的代谢产物积累以及细胞能量的消耗, 从而可能导致细胞状态失稳、低温损伤或器官功能衰退^[9]。过冷保存通过将温度降至更低的极限, 使细胞的代谢几乎停止, 从而为器官提供了更长时间的保存窗口。根据著名的Arrhenius方程, 新陈代谢率随着温度的降低呈指数下降, 因此在较低温度下保存器官以延长保存期是可行的。研究表明, 温度每降低10℃, 酶活性就会下降1.5~2.0倍^[10]。因此, 在温度降至0℃以下时, 细胞的代谢活动几乎完全停滞, 这为器官的长期保存创造了可能。

1.2 生物体的冰晶形成与细胞损伤

在过冷技术的应用中, 冰晶的形成是造成细胞损伤的主要原因之一。冰晶的形成过程主要分为均相成核和非均相成核, 以后者更为常见。液态水分子通过热力学驱动力自发地排列成冰晶的初始结构称为均相成核, 这种方式往往在-20℃以下才能发生^[11]。非均相成核发生在液态与其他介质接触的界面处, 外界介质的存在(如尘埃颗粒或表面活性分子)提供了冰核的成核位点, 降低了成核能垒, 使得成核过程更容易发生^[12]。冰晶的形成不仅会破坏细胞膜的完整性, 还会导致细胞功能的丧失, 进而影响整个器官的保存效果^[13-14]。低温下细胞内外的冰核一旦形成, 会在整个生物样本中迅速传播, 冰晶的生长会对细胞膜产生机械性压力、引发细胞内渗透压的剧烈变化, 进而造成细胞结构完整性破坏、细胞膜破裂和内容物的泄漏, 最终导致细胞死亡。

除了冰晶对细胞的直接损伤外, 在低温状态下细胞内的大分子功能受到抑制, 转录翻译的过程减慢和无氧代谢增加都会对其功能造成损害^[15]。细胞内的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)通过氧化磷酸化产生, 依赖于线粒体的功能, 然而在低温下线粒体的功能会受到严重抑制。此时, ATP的合成速率

显著降低, 导致细胞内能量的供给不足, 进而引发细胞内代谢失衡。缺乏足够的 ATP 不仅会影响细胞的基础生理功能, 还会导致钠钾泵等重要膜蛋白的功能障碍, 进一步加剧细胞内离子失衡^[16]。低温还可能引发线粒体膜的通透性改变, 诱发线粒体内外的离子交换失调, 从而造成线粒体膜电位丧失和内源性氧化应激的产生。Ou 等^[17]研究发现, 低温可以触发人类神经元细胞的线粒体应激、活性氧过量产生和溶酶体膜通透性增高, 导致微管破坏影响神经元的功能。氧化应激不仅损伤线粒体本身, 还会通过激活细胞内的各种信号通路, 导致细胞凋亡或坏死的发生。此外, 蛋白质结构会随着温度降低而发生改变, 进一步导致膜流动性降低、离子运输速率下降以及应激耐受性降低; 抗氧化酶和线粒体电子传递链受损导致大量活性氧的积累, 再灌注后会不可避免地发生缺血-再灌注损伤。低温下 ATP 消耗、线粒体功能障碍、氧化应激、代谢物积累、炎症反应和缺血-再灌注损伤是器官冷保存面临的主要挑战^[18]。

2 过冷保存的关键技术与方法

2.1 冷冻保护剂

CPA 在深度过冷保存中的应用是确保细胞和器官在低温环境中存活的重要手段之一。CPA 的主要作用是降低细胞内外水的冰点、调节渗透压和改变热力学特性, 从而减少冰晶在细胞内外的形成^[7]。CPA 分为透膜性 [如甘油、二甲亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 和乙二醇等] 和非透膜性 (如聚乙烯醇和氨基酸类物质) 两类。通过将 CPA 应用于深度过冷保存中, 能够有效避免冰晶形成对细胞的损害, 从而保证细胞膜的完整性和细胞内环境的稳定。Tessier 等^[2]对比了甘油、乙二醇和丙二醇等经典 CPA 在过冷肝保存中的效果, 成功将大鼠肝脏的保存时间延长了 5 倍。但高浓度 CPA 会对细胞内的蛋白质、脂质和其他生物大分子产生毒性作用, 进而影响细胞活性。因此, 糖类、氨基酸等天然小分子 CPA 因其具有毒性小、生物相容性好的优势, 越来越多的应用于实践当中。Dou 等^[19]成功利用脯氨酸和海藻糖保存红细胞, 在复温后发现细胞仍具有很高的活性。此外, Ma 等^[7]利用苯丙氨酸或蛋氨酸保存绵羊的红细胞, 其存活率高达 85% 和 71%, 而细胞在甘油中的存活率仅为 32%。另一种天然 CPA 甜菜碱在细胞快速冷冻的应用中发挥了巨大的潜力, 大大

提高了细胞复苏后的存活率^[20]。尽管 CPA 可以有效降低冰晶形成, 且灵活性高, 适用性广, 但是应用高浓度 CPA 所带来的化学毒性及渗透压失衡等问题仍值得深入探索。此外, 在大型器官的深低温保存中, CPA 难以均匀分布, 并且在复温过程中常常引发的再结晶进一步限制了其应用。当前技术多集中于短期低温保存, 针对长期深低温保存的研究较少, 尤其是器官级别保存效果尚未完全解决。未来需要通过开发低毒性 CPA、优化 CPA 与复温技术相结合来解决这些问题。针对复杂器官保存, 研究 CPA 在组织间隙中的分布优化策略, 结合动态机械灌注系统提升保存效果, 并推动其在器官保存和临床应用中的进一步发展。

2.2 冰晶形成控制技术

控制冰晶形成是低温保存中一个重要的挑战, 尤其是在细胞和组织的保存过程中, 冰晶会破坏细胞膜及其内部结构, 导致细胞死亡。为了防止冰晶形成, 研究者们开发了多种冰晶形成控制技术, 包括油封技术和抑制冰晶形成的材料。研究人员发现, 通过使用不混溶液体 (如油、烷烃或醇类) 密封水表面, 从而实现大体积水和红细胞悬浮液的长期深度过冷保存而不产生冰晶。该方法通过有效减少水和空气界面上的异质成核, 成功地在 -20 °C 的温度下维持水的液态长达 100 d, 克服了传统深度过冷技术中的体积和时间限制。进一步的实验表明, 这项技术在红细胞保存中表现出显著优势, 通过深度过冷技术, 红细胞在低温下得以保存 100 d, 且解冻后具有较高的恢复率和良好的形态^[21]。这项研究的成果为器官深度过冷保存迈出了重要的一步。此外, 冰晶抑制材料如抗冻蛋白、低分子量聚合物及纳米材料的应用为过冷保存开拓了新的方向。Niu 等^[22]通过研究高原蛙肠道微生物组的特定菌株, 发现促进丙二醇产生的微生物有助于增强宿主的冻耐受能力, 高原蛙还通过调节体液中溶质 (如葡萄糖和甘油) 的浓度, 实现深度过冷保存以避免细胞损伤。Miya 等^[23]研究发现南极鳕鱼产生的血清抗冻糖蛋白使得它们在低温环境中具有更强的抗冻能力, 该研究揭示了血清抗冻糖蛋白通过抑制冰晶形成和生长来降低冰晶成核点的功能, 尤其是关于如何利用抗冻糖蛋白的结构和机制来优化冷冻保护策略, 为器官长期保存和运输提供可能的新路径。当前针对抗冻蛋白的具体作用机制尚未完全揭示, 抗冻蛋白如何精准调控冰晶的形成和生长需要进一步研究。未来

通过解析抗冻蛋白的三维结构,优化其功能以应用于人工 CPA 的设计具有重要的意义,这将为细胞、组织和器官的低温保存以及医疗、制药领域的突破性进展提供广阔的前景。

2.3 降温和复温灌注速率的控制

过冷保存技术的核心在于通过精确控制降温和复温灌注的速率,以最大限度地减少低温环境对细胞和组织的物理损伤。冻融过程对细胞构成双重应力,即热应力和高渗应力,它们在降温过程中同时起作用。在这个过程中,不同细胞的最佳冷却速率是不一样的,主要取决于细胞大小和膜转运水分子的能力^[24]。理论上,如果降温的速率足够慢,细胞可以足够快地流出胞内的水分到胞外从而防止结冰^[25],但在实际中需要添加高浓度 CPA,并且使用冷冻机控制冷却速率^[26]。Mahadevan 等^[27]研究表明,与 1 °C/min 或 87 °C/min 的降温速率相比,人类精子在降温速率为 10 °C/min 时存活率更高。Dumont 等^[24]研究结果提示,细胞存活率和降温速率之间存在“U 形曲线”关系,即较低降温速率 (<100 °C/min) 和超高的降温速率 (>1 000 °C/min) 具有较高活性,而在高降温速率 (100~1 000 °C/min) 下活性较低,造成这一现象的原因主要与水分子的跨膜运输和热传导有关。因此,降温速率的精确控制对实现高效过冷保存至关重要。复温速率同样是过冷保存中的关键参数,如果加热速率不足,残余液体可能发生再结晶,从而对细胞和组织造成不可逆的物理破坏。而对于某些复杂器官,单一的复温速率可能导致局部热梯度过大而导致热应力积累,从而增加组织裂解的风险。Schopp 等^[28]的研究中,猪肾脏在经历 18 h 的 4 °C 静态保存,缓慢温和的复温方式显著缓解了线粒体稳态障碍的发生,这种温和的再生移植物复温理念为减轻器官缺血-再灌注损伤提供了新策略。

复温速率不均是器官过冷保存的主要挑战之一,传统复温方法存在冰晶重结晶和局部热应力积累的问题。纳米技术的引入为均匀降温以及高效复温等关键环节提供了全新解决方案。在降温过程中,通过引入纳米颗粒或纳米材料作为 CPA,能够通过调控局部热传导性或改变水的成核行为,显著降低冰晶对细胞的损害,并且可以降低 CPA 的浓度^[29]。此外,纳米颗粒可通过交变磁场产生快速局部加热,实现高效的复温。这种方法不仅加热速度快,还能够显著降低温度梯度,从而避免因局部过热或热应力引发的组织损

伤。Hou 等^[30]合成具有高光热转换效率的液态金属纳米颗粒,并使用激光照射加热玻璃化的人骨髓间充质干细胞和小鼠尾巴,结果干细胞的存活率高达 78%,复温小鼠尾巴的血管包含完整的结构。Manuchehrabadi 等^[31]使用二氧化硅涂层氧化铁纳米颗粒加入 CPA 保存猪动脉,并使用射频场对玻璃化材料进行复温,结果显示纳米加热后血管长度或弹性模量没有显著的生物力学特性变化。此外,纳米材料的良好生物相容性和可修饰性使其能够与其他保存技术相结合,通过表面涂层调节颗粒的分散性或靶向性,提高其在组织中的分布均匀性。激光纳米加热可以快速复温体积相对较小的生物样品,如细胞、胚胎等^[32-34]。射频纳米加热则以相对较低的复温速率在较大体积的系统中工作,这种方法可以应用于复杂器官的保存中^[35]。降温和复温速率的精准控制依赖于先进的温控系统和热传导技术的发展。通过结合计算机模拟和实验验证,研究者们正在不断优化不同组织器官的降温-复温曲线,以进一步减少低温相关损伤,提升深度过冷保存的效果。此外,重点深入研究细胞和组织在降温和复温过程中的分子生物学反应,揭示热应力和渗透应力的分子作用机制,以及研究细胞内外溶质浓度动态变化对存活率的影响,为优化降温和复温策略提供理论依据。

3 过冷保存的当前应用领域

3.1 细胞保存

深度过冷保存技术在细胞保存领域已经得到了广泛应用,特别是在血细胞、干细胞和生殖细胞等高价值细胞的长期保存中具有不可替代的作用。通过将细胞置于接近冰点或更低的过冷状态,深度过冷保存能够显著抑制细胞代谢活动,延缓细胞老化和损伤,从而为细胞的长时间存储提供可靠的技术支持。Huang 等^[21]利用油相对水进行表面密封来显著抑制水-空气界面处的冰晶成核,在深度过冷状态下将人类红细胞保存 100 d 后,红细胞仍具有完整的结构。在干细胞保存中,深度过冷保存技术被广泛用于胚胎干细胞、诱导多能干细胞以及间充质干细胞的长期保存^[36]。在深度过冷保存中,通过使用 CPA,结合缓慢降温和快速复温策略,能够有效减少冰晶形成对细胞结构的破坏,同时最大程度地保留干细胞的活性和多能性。这一技术已经被应用于干细胞库的建设,为再生医学、药物研发以及疾病模型研究提供了重要资源^[37]。

此外, 卵子和精子和胚胎的深度过冷保存广泛应用于辅助生殖技术中, 用于解决不孕症患者的生育需求以及癌症患者化学药物治疗前的生育能力保护。通过优化冷却和复温速率, 并结合新型 CPA, 深度过冷保存技术显著提高了生殖细胞的存活率和功能性, 为生殖医学的发展提供了重要支持^[38]。然而, 冰晶形成、复温过程的再结晶以及 CPA 的毒性等仍然是细胞保存所面临的重要挑战。其中, 冰晶的生成是细胞保存的主要威胁, 即使通过缓慢降温策略和 CPA 添加能部分减少损伤, 但仍无法完全避免, 且高浓度 CPA 会对细胞结构产生毒性。在复温过程中, 局部热梯度和再结晶效应会引发组织裂解和细胞损伤, 尤其当应用于大体积组织或器官的保存中问题更为显著。未来研究应聚焦于低毒性和多功能 CPA 的开发, 通过纳米技术优化复温速率, 结合动态复温策略以减少热应力。此外, 多学科协作需揭示冰晶形成和细胞损伤的分子机制, 并设计个性化的冷冻-复温曲线, 同时拓展技术在再生医学、辅助生殖及生态保护中的应用, 为器官移植和物种保护提供新可能。

3.2 组织保存

过冷保存技术广泛应用于皮肤、角膜、软骨和胰腺等移植需求较高的组织^[39-42]。以角膜为例, 其移植成功率和质量高度依赖于保存过程中内皮细胞的存活率^[43]。通过过冷保存技术, 结合适当的 CPA 能够显著减少冰晶形成对组织结构的破坏, 提高角膜移植的可行性和安全性。Ling 等^[44]使用 10% DMSO 和 10% 甘油作为保存介质, 在 -20 °C 和 -80 °C 下保存皮肤, 发现在 -20 °C 和 -80 °C 下, 10% DMSO 或甘油保存的大鼠皮肤能保持活性和渗透性至少 7~30 d, 与新鲜皮肤相比无明显变化。同样, 软骨组织的深度过冷保存为关节损伤的修复和再生医学研究提供了可靠的组织来源。Shajib 等^[45]利用微孔平台将骨髓基质细胞或关节软骨细胞组装成 3D 软骨微组织, 培养 5 d 或 10 d 后, 使用含血清和 DMSO 或无血清冷冻介质进行冷冻保存, 结果发现冷冻保存的微组织在解冻后依然保持较高的细胞活力和功能, 能够在低氧环境中进一步融合形成连续组织, 且生成的细胞外基质质量更优。这项研究证明了过冷保存软骨微组织的可行性, 为软骨修复和组织工程提供了新策略, 尤其适用于关节内低氧环境中的缺损修复。过冷保存技术能够有效维持骨基质的结构完整性和骨细胞的生物学活性, 为骨移植和骨再生医学提供了高质量的保存方法^[46]。此外,

过冷保存技术还用于保存血管组织, 特别是在心血管手术中, 血管移植物的保存是提高手术成功率的重要因素之一^[47]。值得注意的是, 过冷保存技术的成功依赖于精准的冷却和复温控制。组织因其三维结构复杂, 较大体积组织的冷却和复温容易导致内外温差过大, 从而引发热应力和组织裂解。近年来, 组织深低温保存的设备研发仍需突破精准控温、复温技术和低毒性保护等关键瓶颈。Şerban 等^[48]研发了一种用于大型器官组织保存的等容深低温保存装置, 通过在深低温环境中持续对温度和压力进行监控, 有效地保护了组织结构和器官功能。这项工程化的设备为深低温保存技术的发展和器官移植提供新技术, 同时为纳米加热复温技术等多设备联合应用奠定了基础。

3.3 器官保存

在肾脏、肝脏和肺脏等主要器官的保存中, 过冷保存技术已经取得了显著进展^[49]。以肾脏为例, 其移植后的功能恢复高度依赖于保存期间的低温稳定性。传统的低温静态保存方法在 4 °C 下可以维持肾脏数小时至 1 d 的活性, 而过冷保存结合玻璃化技术和纳米材料的使用, 可以将保存时间延长至数天甚至更长。同时, 过冷保存技术能够更好地维持肾小球和血管的结构完整性, 减少冷冻相关的损伤, 从而显著提高移植后的器官功能。Han 等^[6]玻璃化保存大鼠肾脏, 再利用交变磁场加热器官脉管系统内的纳米颗粒, 以实现快速和均匀的升温, 然后通过灌注去除纳米颗粒, 发现玻璃化的肾脏可以低温储存长达 100 d, 并通过纳米加温成功恢复完整的肾功能。在肝脏保存中, 由于肝细胞对低温的敏感性较高, 过冷保存技术通过优化冷却和复温速率以及使用高效 CPA 有效降低了细胞膜和微血管的损伤。Tessier 等^[2]利用不同 CPA 实现了肝脏在 -15~-10 °C 下的“部分冷冻”, 成功将器官保存时间延长了 5 倍。此外, 近年来过冷保存与机械灌注技术相结合, 为肝脏的保存提供了更加动态和灵活的解决方案。Bruinsma 等^[4]采用过冷技术将大鼠肝脏保存于 -6 °C 条件下, 在低温离体机械灌注加载 CPA, 成功将肝脏保存了长达 96 h。低温机械灌注法通过持续输送保存液, 进一步降低代谢物积累的风险, 提高了肝脏的生物学功能。Okamoto 等^[50]将大鼠肺脏储存在 -2 °C 的保存液中长达 17 h, 移植后结果显示过冷保存的肺脏比常规 4 °C 静态冷保存具有更好的肺功能、更完整的组织学形态以及更高的 ATP 水平。

值得注意的是, 抗冻蛋白存在于某些耐寒的两栖类动物或昆虫体内, 通过利用抗冻蛋白达到增强CPA的效果, 可以显著提高器官保存的成功率^[51]。Biggar等^[52]将耐冻青蛙体内的抗冻蛋白在昆虫细胞中表达, 结果发现细胞在低温冻结条件下表现出更高的存活率, 表明这些蛋白能够有效保护细胞免受冻结引起的损伤。更加有趣的是, 哺乳动物北极地松鼠在冬眠期间能够将体温调节至零度以下, 但是仍能避免冰晶在体内形成, 从而保护重要器官免受冻伤。通过控制体内液体的组成和局部温度变化, 它们能够在极寒环境中生存并成功完成冬眠^[53]。这一发现为了解极寒适应机制及生物冷冻保护提供了重要线索。Kurtz等^[54]探讨了冬眠哺乳动物十三条纹地松鼠在进入冬眠季节时, 肠道和肝脏经历的生理重塑, 并以保护性的方式适应长期禁食、以及在冬眠觉醒周期中营养和氧气供应的重大波动。冬眠的长期禁食改变了脂质代谢和全身胆固醇动态, 还影响了肠道微生物群, 改变了微生物的丰度和多样性, 并通过影响它们产生的代谢产物来影响宿主。这项研究为我们提供了关于冬眠动物如何通过生理和微生物适应极端低温的深刻理解, 为器官冷冻保存技术提供了潜在的应用启示。笔者总结的过冷保存技术在细胞、组织和器官保存中的应用见表1。

4 组织器官深度过冷保存所面临的挑战

深度过冷保存技术虽然在器官移植和再生医学中展现出巨大潜力, 但其实际应用仍面临诸多挑战, 这些问题直接影响保存的成功率和器官功能的恢复。CPA的使用是深度过冷保存的重要环节, 但是高浓

度CPA所带来的不良反应也是显而易见的, 主要表现为对细胞膜结构的破坏、蛋白质变性以及代谢功能的抑制。特别是在长时间保存过程中, CPA的渗透可能导致细胞内渗透压的显著变化, 从而加剧细胞损伤。此外, 冰晶的形成和重结晶是深度过冷保存过程中最主要的物理性损伤来源。为了抑制冰晶的生成, 研究者开发了抗冻蛋白以及冰晶抑制剂, 这些物质通过改变水的成核机制和晶体生长模式, 显著降低了冰晶对组织的损害^[13, 55-56]。针对抗冻蛋白的应用, 冬眠动物在极端低温条件下表现出的抗冻机制为器官过冷保存技术提供了丰富的研究素材。冬眠生物能够在大幅度降低体温的情况下, 依然维持器官的基本功能, 避免因温度急剧下降导致的组织损伤或细胞死亡, 这一生理现象直接对应了器官保存中的低温诱导损伤问题。冬眠动物通过调节体内溶质(如葡萄糖、甘油等)的浓度, 避免细胞内外液体的冻结。某些冬眠动物在冬眠期间能够通过提高细胞内抗冻蛋白的表达, 减缓冰晶的形成, 并在低温环境下稳定细胞膜的结构。通过模拟或引入类似的抗冻蛋白表达, 器官在过冷保存过程中可能会更好地维持其结构和功能。其次, 冬眠动物的代谢调控能力也是其耐低温的重要生理特征。在冬眠过程中, 动物的代谢速率显著降低, 能量消耗最小化, 从而减少了氧化应激和细胞损伤。通过调节器官的代谢状态, 降低氧化应激或通过特定的生物标记物抑制细胞凋亡途径, 能够有效延长器官的存活时间, 并避免过冷过程中可能出现的生物化学损伤。肠道微生物群在冬眠动物的适应过程中也起到了重要作用, 冬眠动物的肠道微生物群能够在低温环境下通过调整其组成和功能来帮助宿主适应寒冷。在

表1 细胞、组织和器官过冷保存技术的应用

Table 1 Application of supercooling preservation for cells, tissues and organs

保存对象	应用技术	温度范围	常用的CPA	技术特点与应用
细胞	深度过冷保存	-196~ -80 ℃	40%~60%DMSO、 1.5 mol/L甘油等	用于血细胞、干细胞、精子、卵子等细胞的长期保存。CPA浓度和降温速率至关重要, CPA的浓度直接影响细胞存活率, 并且缓慢降温和快速复温策略能够最大限度减少冰晶对细胞结构的损害。采用油相封存方法, 减少冰晶形成, 延长存储时间
组织	过冷保存	通常为 -80~0 ℃	海藻糖、 5%~10%DMSO等	用于皮肤、角膜、软骨、胰腺等组织的保存, 减少冰晶对组织结构的破坏。CPA和降温速率的优化可以显著提升移植成功率
器官	过冷保存	4 ℃或接 近冰点	威斯康星大学保存液、Perfadex等非CPA器官灌注液	大型器官常使用低温保存和体外机械灌注维持, 可提高器官移植的成功率和功能性。但大型器官的长期保存技术仍面临挑战

器官保存中引入特定的微生物群或其代谢产物，可能增强器官在冷冻保存过程中的耐受性，促进器官恢复功能。未来，如何通过生物工程手段增强抗冻蛋白的作用，或者在体外快速重建抗冻蛋白表达系统，从而提高过冷保存的效果，将是器官深低温长期保存研究的重要方向。

完整器官的保存远比单细胞或小体积组织复杂。器官具有多样化的细胞类型和高度分支的血管网络，其热力学特性导致冷却和复温过程中出现显著的温度梯度。较大的温差可能导致器官内局部区域的冷冻损伤或热应力集中，进一步引发组织裂解或功能丧失。此外，器官不同部位的渗透特性差异会导致 CPA 分布的不均匀，从而影响保存效果。为解决这一问题，研究者提出了组合技术，如低温机械灌注和微流控系统，以确保 CPA 的均匀分布和温度的逐步平衡^[57-58]。未来设备研发的重点，应当聚焦于开发更精确的解冻技术，确保温度波动最小化，并保证器官的结构和功能不受损害。值得注意的是，复苏及复温是深度过冷保存技术的关键环节之一，其成败直接影响器官的最终功能恢复。在长期冷冻保存中，器官在保存阶段可以维持良好的形态，但是往往在复苏过程中，细胞可

能因为快速代谢恢复而遭遇急性代谢负担，尤其是与能量消耗相关的损伤。复苏过程中的代谢崩溃和急性损伤会显著降低器官的功能。在此阶段的研究重点是通过调节代谢网络来确保器官在复苏过程中逐步恢复功能，而非突然反弹造成损伤。复温速率过慢可能导致冰晶重结晶，而速率过快则可能引发热冲击和应力积累，尤其是在器官复杂的三维结构中，局部的温差可能导致不均匀复温。为了实现快速均匀的复温，近年来的研究聚焦于纳米技术的应用。如磁性纳米颗粒能够在交变磁场下产生快速且均匀的局部加热，显著改善复温效率^[59-60]。未来该领域的重点是引入控温解冻设备，如微波加热或纳米颗粒加热技术，实现快速且均匀的解冻，并结合解冻过程的在线监测技术，以动态调整复温策略。笔者总结的过冷保存关键技术比较见表 2。

5 小 结

深度过冷保存技术已显著提升器官保存时间和质量，但其临床应用仍受限于 CPA 的毒性、冰晶重结晶的物理损伤及复温过程中的热梯度等问题。冬眠动物的抗冻蛋白为解决这些挑战提供了全新视角。抗冻

表 2 过冷保存关键技术的比较

Table 2 Comparison of key technologies for supercooling preservation

保存技术	核心原理	优点	缺陷	效果
缓慢冷冻	缓慢降低温度，使细胞脱水减少冰晶形成	技术成熟，操作简单，适合单细胞和小型组织	易形成冰晶，对复杂器官保护效果有限	细胞存活率较高，但对大器官的保护效果较差
CPA	使用DMSO、甘油等CPA降低冰点	方便结合多种冷冻方法，在细胞、组织保存中应用广泛	高浓度CPA可能产生毒性，需要优化CPA配方和浓度	提高了大多数冷冻保存方法中的效果
微流控技术	利用微流控芯片精确控制CPA和温度分布	精确性高，可调控CPA用量及分布	技术复杂，成本较高，临床应用有限	提高了小型组织和细胞群的保存均匀性与存活率
玻璃化技术	快速冷却使组织液体形成无晶体的玻璃态	避免冰晶形成，对细胞和组织损伤小；适用于敏感器官	需要高浓度CPA，可能产生毒性，需要快速降温和专业设备	维持了复杂组织的功能
天然抗冻蛋白	模仿冬眠动物的抗冻蛋白，防止冰晶形成并稳定细胞膜	低毒性，高效防止冰晶形成，符合生物相容性要求	研发和生产成本高，对不同组织的适应性有待验证	在细胞和小型组织保存中的应用效果显著
低温灌注技术	在接近0℃或低于冰点的温度下，用特定灌注液持续灌注器官	可减少代谢活动，适合中大型器官	灌注设备复杂，控制不当可能造成组织损伤，适用范围有限	提高了器官的短期保存效果
快速解冻技术	使用微波、纳米加热技术或特定溶液快速升温，减少冰晶重结晶	解冻速度快，可减少组织损伤，适合玻璃化保存的器官解冻	技术设备昂贵，均匀性有待提高，不适合较大器官	提高了解冻过程的均匀性和器官功能恢复率

蛋白通过抑制冰晶形成和生长、稳定细胞膜结构,以及减缓低温诱导的氧化应激和代谢损伤,展现了卓越的生物保护能力。未来,针对抗冻蛋白的应用研究可从以下几个方向展开:(1)通过解析冬眠动物抗冻蛋白的结构与机制,开发人工合成的低成本高效抗冻蛋白,以实现其在多种器官和组织保存中的广泛应用;(2)探索抗冻蛋白与代谢抑制策略的协同作用,借鉴冬眠动物通过降低代谢速率减少细胞能量消耗的机制,以进一步优化器官保存效果;(3)结合纳米技术,将抗冻蛋白通过纳米颗粒载体进行精准传递,以增强其在器官保存中的分布均匀性和功能稳定性;(4)与动态灌注和微流控技术相结合,确保抗冻蛋白和CPA在器官内部的均匀分布,减少局部冰晶形成和温度梯度造成的损伤。通过这些多学科策略整合,抗冻蛋白有望成为器官深度过冷保存技术的核心驱动,为未来器官深低温保存提供突破性解决方案。此外,通过引入纳米技术、优化CPA、改良玻璃化技术,以及精确控制冷却和复温速率,研究者在降低保存损伤和提升器官保存时间方面取得了显著进展。这些技术的应用不仅在细胞、组织的保存中得到验证,还为复杂器官的长期保存和移植提供了可靠的支持。未来的研究需要更深入地整合材料科学、计算机模拟和纳米技术,以进一步优化保存体系和操作流程,为器官移植和再生医学的发展开辟新路径,同时为生命科学和医学研究提供广阔前景。

参考文献:

- [1] TRIPATHY S, DAS S K. Strategies for organ preservation: current prospective and challenges[J]. *Cell Biol Int*, 2023, 47(3): 520-538. DOI: 10.1002/cbin.11984.
- [2] TESSIER S N, DE VRIES R J, PENDEXTER C A, et al. Partial freezing of rat livers extends preservation time by 5-fold[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4008. DOI: 10.1038/s41467-022-31490-2.
- [3] BERKANE Y, HAYAU J, FILZ VON REITERDANK I, et al. Supercooling: a promising technique for prolonged organ preservation in solid organ transplantation, and early perspectives in vascularized composite allografts[J]. *Front Transplant*, 2023, 2: 1269706. DOI: 10.3389/frtra.2023.1269706.
- [4] BRUINSMA B G, BERENDSEN T A, IZAMIS M L, et al. Supercooling preservation and transplantation of the rat liver[J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(3): 484-494. DOI: 10.1038/nprot.2015.011.
- [5] PULLEN L C. Supercooling halts biological time: new technologies can multiply the number of hours that an organ remains viable for transplant[J]. *Am J Transplant*, 2023, 23(10): 1473-1475. DOI: 10.1016/j.ajt.2023.08.024.
- [6] HAN Z, RAO J S, GANGWAR L, et al. Vitrification and nanowarming enable long-term organ cryopreservation and life-sustaining kidney transplantation in a rat model[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3407. DOI: 10.1038/s41467-023-38824-8.
- [7] MA J, ZHANG X, CUI Z, et al. Investigation into antifreeze performances of natural amino acids for novel CPA development[J]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(18): 4042-4049. DOI: 10.1039/d3tb00131h.
- [8] DOU M, LU C, RAO W. Bioinspired materials and technology for advanced cryopreservation[J]. *Trends Biotechnol*, 2022, 40(1): 93-106. DOI: 10.1016/j.tibtech.2021.06.004.
- [9] MARTINS P N, WILLIAMS W W. To cool or not to cool - organ-preservation strategies in transplantation[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(5): 468-469. DOI: 10.1056/NEJMe2214715.
- [10] BELZER F O, SOUTHARD J H. Principles of solid-organ preservation by cold storage[J]. *Transplantation*, 1988, 45(4): 673-676. DOI: 10.1097/00007890-198804000-00001.
- [11] LIN M, XIONG Z, CAO H. Bridging classical nucleation theory and molecular dynamics simulation for homogeneous ice nucleation[J]. *J Chem Phys*, 2024, 161(8): 084504. DOI: 10.1063/5.0216645.
- [12] NANDY L, FENTON J L, FREEDMAN M A. Heterogeneous ice nucleation in model crystalline porous organic polymers: influence of pore size on immersion freezing[J]. *J Phys Chem A*, 2023, 127(30): 6300-6308. DOI: 10.1021/acs.jpca.3c00071.
- [13] CHANG T, ZHAO G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges[J]. *Adv Sci*, 2021, 8(6): 2002425. DOI: 10.1002/advs.202002425.
- [14] TAYLOR M J, WEEGMAN B P, BAICU S C, et al. New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs[J]. *Transfus Med Hemother*, 2019, 46(3): 197-215. DOI: 10.1159/000499453.
- [15] FAREWELL A, NEIDHARDT F C. Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(17): 4704-4710. DOI: 10.1128/JB.180.17.4704-4710.1998.
- [16] ALI A, WANG A, RIBEIRO R V P, et al. Static lung storage at 10°C maintains mitochondrial health and preserves donor organ function[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(611): eabf7601. DOI: 10.1126/scitranslmed.abf7601.
- [17] OU J, BALL J M, LUAN Y, et al. iPSCs from a hibernator provide a platform for studying cold adaptation and its potential medical applications[J]. *Cell*, 2018, 173(4): 851-863. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.010.
- [18] STENVINKEL P, PAINER J, KURO-O M, et al. Novel treatment strategies for chronic kidney disease: insights from the animal kingdom[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(4): 265-284. DOI: 10.1038/nrneph.2017.169.
- [19] DOU M, LU C, SUN Z, et al. Natural cryoprotectants combinations of l-proline and trehalose for red blood cells cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 2019, 91: 23-29. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.11.002.
- [20] LI H, LIU X, ZHANG L, et al. Plunge-freezing

- cryopreservation of tendons[J]. *Langmuir*, 2024, 40(27): 14007-14015. DOI: 10.1021/acs.langmuir.4c01215.
- [21] HUANG H, YARMUSH M L, USTA O B. Long-term deep-supercooling of large-volume water and red cell suspensions via surface sealing with immiscible liquids[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3201. DOI: 10.1038/s41467-018-05636-0.
- [22] NIU Y, LI X, ZHANG H, et al. Hepatic transcriptome and gut microbiome provide insights into freeze tolerance in the high-altitude frog, *Nanorana parkeri*[J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2023, 48: 101147. DOI: 10.1016/j.cbd.2023.101147.
- [23] MIYA T, GON O, MWALE M, et al. The effect of habitat temperature on serum antifreeze glycoprotein (AFGP) activity in *Notothenia rossii* (Pisces: Nototheniidae) in the Southern Ocean[J]. *Polar Biol*, 2014, 37(3): 367-373. DOI: 10.1007/s00300-013-1437-y.
- [24] DUMONT F, MARECHAL P A, GERVAIS P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 268-272. DOI: 10.1128/AEM.70.1.268-272.2004.
- [25] GAO D, CRITSER J K. Mechanisms of cryoinjury in living cells[J]. *ILAR J*, 2000, 41(4): 187-196. DOI: 10.1093/ilar.41.4.187.
- [26] MANDAWALA A A, HARVEY S C, ROY T K, et al. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: current progress and future prospects[J]. *Theriogenology*, 2016, 86(7): 1637-1644. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.07.018.
- [27] MAHADEVAN M, TROUNSON A O. Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa[J]. *Andrologia*, 1984, 16(1): 52-60. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1984.tb00234.x.
- [28] SCHOPP I, REISSBERG E, LÜER B, et al. Controlled rewarming after hypothermia: adding a new principle to renal preservation[J]. *Clin Transl Sci*, 2015, 8(5): 475-478. DOI: 10.1111/cts.12295.
- [29] HAN W, ZHONG L, ZHANG J, et al. Profiling the morphology effects of MoS₂ nanomaterials on ice suppression and rapid rewarming for cryopreservation[J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2024, 7(11): 12783-12794. DOI: 10.1021/acsanm.4c01324.
- [30] 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 Biomater*, 2020, 102: 403-415. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.11.023.
- [31] MANUCHEHRABADI N, GAO Z, ZHANG J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(379): eaah4586. DOI: 10.1126/scitranslmed.aah4586.
- [32] 朱文欣, 潘平安, 黄永华, 等. 基于固体表面冷冻激光复温法的液滴冻融实验研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2023, 40(5): 973-981. DOI: 10.7507/1001-5515.202305004.
- ZHU W X, PAN P A, HUANG Y H, et al. Droplet freeze-thawing system based on solid surface vitrification and laser rewarming[J]. *J Biomed Eng*, 2023, 40(5): 973-981. DOI: 10.7507/1001-5515.202305004.
- [33] 胡焕焕, 孙志彬, 赵泉阳, 等. 纳米技术在精子冷冻保存中的应用[J]. *生物化工*, 2024, 10(5): 207-214. DOI: 10.3969/j.issn.2096-0387.2024.05.047.
- HU H H, SUN Z B, ZHAO X Y, et al. Application of nanotechnology in cryopreservation of sperm[J]. *Biol Chem Eng*, 2024, 10(5): 207-214. DOI: 10.3969/j.issn.2096-0387.2024.05.047.
- [34] BOBROVA O, FALKO O, POLYAKOVA A, et al. Nanocrystalline cerium dioxide reduces recrystallization in cryopreservation solutions[J]. *Cryobiology*, 2025, 118: 105167. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2024.105167.
- [35] GAO Z, RING H L, SHARMA A, et al. Preparation of scalable silica-coated iron oxide nanoparticles for nanowarming[J]. *Adv Sci*, 2020, 7(4): 1901624. DOI: 10.1002/advs.201901624.
- [36] QIU J, YU B, REN C, et al. Deep-supercooling preservation of stem cell spheroids for chondral defect repairment[J]. *Stem Cell Reports*, 2024, 19(12): 1665-1676. DOI: 10.1016/j.stemcr.2024.10.008.
- [37] CAPLAN A I, WEST M D. Progressive approval: a proposal for a new regulatory pathway for regenerative medicine[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(5): 560-563. DOI: 10.5966/sctm.2013-0180.
- [38] RAMAZANI N, MAHD GHAREBAGH F, SOLEIMANZADEH A, et al. Reducing oxidative stress by κ -carrageenan and C60HyFn: the post-thaw quality and antioxidant status of azari water buffalo bull semen[J]. *Cryobiology*, 2023, 111: 104-112. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2023.04.003.
- [39] CAO J, XIE Y, WANG J, et al. Evaluating the effects of cryopreservation on the viability and gene expression of porcine-ear-skin fibroblasts[J]. *Genes*, 2023, 14(3): 751. DOI: 10.3390/genes14030751.
- [40] KIM J G, JUN J H. Therapeutic and tectonic keratoplasty with simple cryopreserved remnants of donor corneas: an 11 year retrospective case series[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 7331. DOI: 10.1038/s41598-022-10994-3.
- [41] CHEN P, WANG S, CHEN Z, et al. Nanowarming and ice-free cryopreservation of large sized, intact porcine articular cartilage[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 220. DOI: 10.1038/s42003-023-04577-9.
- [42] WAKABAYASHI T, KANEKO M, NAKAI T, et al. Nanowarming of vitrified pancreatic islets as a cryopreservation technology for transplantation[J]. *Bioeng Transl Med*, 2023, 8(4): e10416. DOI: 10.1002/btm2.10416.
- [43] LASS J H, GAL R L, DONTCHEV M, et al. Donor age and corneal endothelial cell loss 5 years after successful corneal transplantation. specular microscopy ancillary study results[J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(4): 627-632. DOI: 10.1016/j.ophtha.2008.01.004.
- [44] LING J, DU Y, SHENG Y, et al. Influence of cryopreservation methods of ex vivo rat and pig skin on the results of in vitro permeation test[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2023, 189: 109-121. DOI: 10.1016/j.ejpb.2023.06.004.
- [45] SHAJIB M S, FUTREGA K, FRANCO R A G, et al.

- Method for manufacture and cryopreservation of cartilage microtissues[J]. *J Tissue Eng*, 2023, 14: 20417314231176901. DOI:10.1177/20417314231176901.
- [46] LISAN R A, MAHYUDIN F, EDWARD M, et al. Role of preservation methods using deep-freezing and liquid nitrogen in bone allograft characteristics: an in vitro study[J]. *Narra J*, 2024, 4(1): e757. DOI: 10.52225/narra.v4i1.757.
- [47] ASANO Y, OKANO D, MATSUSAKI M, et al. Construction of transplantable artificial vascular tissue based on adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by a cell coating and cryopreservation technique[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 17989. DOI: 10.1038/s41598-021-97547-2.
- [48] ŞERBAN A, NĂSTASE G, BEŞCHEA G A, et al. Prototype isochoric preservation device for large organs[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1335638. DOI: 10.3389/fbioe.2024.1335638.
- [49] CHEN J, LIU X, HU Y, et al. Cryopreservation of tissues and organs: present, bottlenecks, and future[J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10: 1201794. DOI: 10.3389/fvets.2023.1201794.
- [50] OKAMOTO T, NAKAMURA T, ZHANG J, et al. Successful sub-zero non-freezing preservation of rat lungs at -2°C utilizing a new supercooling technology[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2008, 27(10): 1150-1157. DOI: 10.1016/j.healun.2008.07.008.
- [51] FAN X, GENG W, LI M, et al. Cryoprotective effects and quality maintenance of antifreeze proteins and peptides on aquatic products: a review[J]. *Foods*, 2024, 13(6): 917. DOI: 10.3390/foods13060917.
- [52] BIGGAR K K, KOTANI E, FURUSAWA T, et al. Expression of freeze-responsive proteins, Fr10 and Li16, from freeze-tolerant frogs enhances freezing survival of BmN insect cells[J]. *FASEB J*, 2013, 27(8): 3376-3383. DOI: 10.1096/fj.13-230573.
- [53] BARNES B M. Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator [J]. *Science*, 1989, 244(4912): 1593-1595. DOI: 10.1126/science.2740905.
- [54] KURTZ C C, OTIS J P, REGAN M D, et al. How the gut and liver hibernate[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2021, 253: 110875. DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.110875.
- [55] ZHANG X, GE L, JIN G, et al. Cold-induced Foxo1 nuclear transport aids cold survival and tissue storage[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 2859. DOI: 10.1038/s41467-024-47095-w.
- [56] MURRAY K A, GIBSON M I. Chemical approaches to cryopreservation[J]. *Nat Rev Chem*, 2022, 6(8): 579-593. DOI: 10.1038/s41570-022-00407-4.
- [57] GREBENYUK S, ABDEL FATTAH A R, KUMAR M, et al. Large-scale perfused tissues via synthetic 3D soft microfluidics[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 193. DOI: 10.1038/s41467-022-35619-1.
- [58] SPERRY M M, CHARREZ B, FOTOWAT H, et al. Identification of pharmacological inducers of a reversible hypometabolic state for whole organ preservation[J]. *eLife*, 2024, 13: RP93796. DOI: 10.7554/eLife.93796.
- [59] RIVERA-RODRIGUEZ A, RINALDI-RAMOS C M. Emerging biomedical applications based on the response of magnetic nanoparticles to time-varying magnetic fields[J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2021, 12: 163-185. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-102720-015630.
- [60] LIU S, HAN Z, YE Z, et al. Magnetic-nanorod-mediated nanowarming with uniform and rate-regulated heating[J]. *Nano Lett*, 2024, 24(37): 11567-11572. DOI: 10.1021/acs.nanolett.4c03081.

(收稿日期: 2024-12-27)

(本文编辑: 方引超 邬加佳)