

## 玻璃化冻存对羊软骨细胞的影响

黄佩龙<sup>1</sup>, 张绍志<sup>2</sup>, 虞效益<sup>2</sup>, 胡军祥<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江大学 制冷与低温研究所, 浙江 杭州 310027)

**摘要:** 对玻璃化冻存后羊 *Ovis aries* 软骨细胞的存活率和琥珀酸脱氢酶(SDH)活性进行了初步研究。结果表明: 细胞存活率随着冻存时间的延长而逐渐下降, 但下降速度不明显; SDH 活性在玻璃化冻存 1~20 d 变化幅度较大, 20~30 d 下降趋势减弱, 保持相对稳定。从各项指标来看, 认为玻璃化溶液 VSb 组的冻存效果最好, 在经过 5, 10, 15, 20 和 30 d 的冻存后, 其存活率分别为  $85.47\% \pm 1.78\%$ ,  $80.73\% \pm 1.81\%$ ,  $78.62\% \pm 2.06\%$ ,  $76.35\% \pm 2.58\%$  和  $73.83\% \pm 1.49\%$ , 细胞 SDH 活性吸光度值分别为  $0.49 \pm 0.064$ ,  $0.444 \pm 0.073$ ,  $0.394 \pm 0.039$ ,  $0.354 \pm 0.082$  和  $0.339 \pm 0.053$ 。该玻璃化冻存方法对长期冻存羊软骨细胞具有一定的实际应用意义。图 4 表 2 参 17

**关键词:** 动物学; 玻璃化冻存; 软骨细胞; 存活率; 琥珀酸脱氢酶; 绵羊

中图分类号: Q954.54; S826 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2011)02-0269-06

## Vitrification of chondrocyte from *Ovis aries*

HUANG Pei-long<sup>1</sup>, ZHANG Shao-zhi<sup>2</sup>, YU Xiao-yi<sup>2</sup>, HU Jun-xiang<sup>1</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China;

2. Institute of Refrigeration and Cryogenics, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China)

**Abstract:** The effects of vitrification on survival rate and succinate dehydrogenase (SDH) activity of ovine chondrocytes were studied. Results showed that the SDH activity decreased remarkably within 20 d after vitrification, whereas the survival rate decreased slowly. VSb selected according to the trend of survival rates and vitality of SDH. After being cryopreserved for 5, 10, 15, 20 and 30 days, the survival rates were  $85.47\% \pm 1.78\%$ ,  $80.73\% \pm 1.81\%$ ,  $78.62\% \pm 2.06\%$ ,  $76.35\% \pm 2.58\%$  and  $73.83\% \pm 1.49\%$ , and the vitality of SDH showed  $0.49 \pm 0.064$ ,  $0.444 \pm 0.073$ ,  $0.394 \pm 0.039$ ,  $0.354 \pm 0.082$  and  $0.339 \pm 0.053$ . This indicated that cryopreservation of ovine chondrocytes by vitrification had some practical value. [Ch, 4 fig. 2 tab. 17 ref.]

**Key words:** zoology; vitrification; chondrocytes; survival rate; succinate dehydrogenase(SDH); *Ovis aries*

软骨损伤和缺损是临床上常见的病变, 缺损后的软骨自身修复和重建能力十分有限, 若不及时治疗极易导致更严重的软骨退变<sup>[1]</sup>。关节软骨无神经支配, 无血液、淋巴供应, 细胞密度及活性相对较低, 软骨移植所引起的免疫反应也相对较为缓和<sup>[2]</sup>。因此, 软骨移植是目前治疗软骨病变的主要修复方法之一。软骨材料的来源是制约软骨移植手术的主要瓶颈, 探索较理想的软骨细胞保存方法是一个亟待解决的重要课题。自 Rall 和 Fahy 成功冻存小鼠 *Mus musculus* 胚胎之后, 玻璃化冷冻方法在红细胞、胰岛、卵母细胞、精子、胚胎和卵巢等保存中均取得良好效果<sup>[3]</sup>。在软骨细胞的冻存过程中, 不仅要求软骨细胞在复温后具有正常的形态, 更重要的是保持软骨细胞的生物学特征, 即保持分裂增殖和分泌基质的能力<sup>[4]</sup>。质膜是细胞在冷冻过程中受到损伤的主要部位, 细胞膜的完整性是评判冻存后细胞活性的最重要的指标之一。本研究通过不同玻璃化配方对软骨细胞存活率和琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的变化来研究玻璃化冻存对羊 *Ovis aries* 软骨细胞的影响。

收稿日期: 2010-05-19; 修回日期: 2010-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50606032); 浙江省自然科学基金资助项目(Y304053)

作者简介: 黄佩龙, 从事动物生理学和低温生物学研究。E-mail: hpl19851128@163.com。通信作者: 胡军祥, 教授, 博士, 从事低温生物学和动物细胞工程学研究。E-mail: hjxy060222@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 软骨细胞悬液的制备

取成年绵羊 *Ovis aries*, 放血处死后, 迅速取出膝关节和髌关节<sup>[5]</sup>。羊软骨细胞的分离根据三步酶消化法<sup>[6-7]</sup>进行改进: 将关节移入超净工作台, 磷酸盐缓冲液(PBS)润洗3遍, 用解剖刀切下软骨, 放置在PBS中, 剪成约1 mm<sup>3</sup>大小的小块, 转移到无菌离心管中。加入5倍体积2.5 g·L<sup>-1</sup>胰蛋白酶液和0.2 g·L<sup>-1</sup>乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)消化液(由PBS配置), 在37℃恒温摇床中消化30 min, 500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min, 去上清, 并迅速加入含100.0 mL·L<sup>-1</sup>胎牛血清(FBS)的DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养液终止反应。加入10倍体积2.0 g·L<sup>-1</sup> II型胶原酶消化液(100.0 mL·L<sup>-1</sup> DMEM配制), 置于37℃恒温摇床中过夜消化。消化液经150目滤网过滤, 迅速加入含100.0 mL·L<sup>-1</sup> FBS的DMEM培养液终止消化, 并转移到10.0 mL离心管内1 500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min, 去上清。加入10.0 mL PBS, 震荡、吹打使细胞充分分散。重复漂洗离心1次后, 加入DMEM完全培养液(含100.0 mL·L<sup>-1</sup> FBS, 10.0 g·L<sup>-1</sup> 谷氨酸, 1 667 μkat·L<sup>-1</sup> 双抗)分置于37℃, 含50.0 mL·L<sup>-1</sup> 二氧化碳的细胞培养箱中进行培养<sup>[8]</sup>, 隔天换液, 原代细胞长满后传代, 取对数生长期细胞作实验用, 控制悬液浓度为10<sup>7</sup>个·mL<sup>-1</sup>。

### 1.2 软骨细胞的玻璃化溶液的配方设计

实验根据均匀设计表, 以二甲基亚砜(Me<sub>2</sub>SO)为主因子, 辅以乙二醇、丙三醇、乙酰胺、海藻糖、聚乙二醇(数均分子量为4 000)和蔗糖等保护剂成分, 根据是否含有海藻糖分成2组, 共11种玻璃化溶液(表1~2), 分别进行玻璃化冻存实验。

表1 不含海藻糖的玻璃化溶液

Table 1 Vitrification solutions without trehalose

玻璃化溶液 处理组	渗透性保护剂				非渗透性保护剂	
	二甲基亚砜/(g·L <sup>-1</sup> )	乙二醇/(g·L <sup>-1</sup> )	丙三醇/(g·L <sup>-1</sup> )	乙酰胺/(g·L <sup>-1</sup> )	聚乙二醇/(g·L <sup>-1</sup> )	蔗糖/(mol·L <sup>-1</sup> )
VS1	100	160	90	120	30	0.6
VS2	120	100	80	150	50	0.4
VS3	140	180	70	110	70	0.2
VS4	160	120	60	140	20	0.7
VS5	180	200	50	100	40	0.5
VS6	200	140	40	130	60	0.3

表2 含海藻糖的玻璃化溶液

Table 2 Vitrification solutions with trehalose

玻璃化溶液处理组	渗透性保护剂		非渗透性保护剂	
	二甲基亚砜/(g·L <sup>-1</sup> )	乙酰胺/(g·L <sup>-1</sup> )	聚乙二醇/(g·L <sup>-1</sup> )	海藻糖/(mol·L <sup>-1</sup> )
VSa	130	180	60	0.05
VSb	140	160	20	0.15
VSc	150	140	80	0
VSd	160	120	40	0.10
VSe	170	200	100	0.20

### 1.3 软骨细胞的玻璃化冻存程序

1.3.1 冷冻前的预平衡 将软骨细胞悬液在0℃下进行预平衡, 预平衡时间为2 min。具体步骤如下: 取10<sup>7</sup>个·mL<sup>-1</sup>的软骨细胞悬液0.2 mL, 加入0.2 mL的玻璃化冷冻保护剂, 摇匀, 平衡若干时间(2, 4, 6和8 min)后, 加入1.6 mL的玻璃化冷冻保护剂, 分组装到2.0 mL的冷冻管中。

1.3.2 玻璃化冻存、复温 将上述冷冻管分别标记, 直接投入到液氮(-196 ℃)中保存, 冻存时间设定为: 5, 10, 15, 20 和 30 d。将不同冻存天数的冷冻管直接在 37 ℃ 的水浴中复温, 复温时间控制在 50 s。

1.3.3 冻存液的洗脱 样品复温后马上转移到无菌离心管中进行洗脱。先加入 2 倍体积的 1.5 mol·L<sup>-1</sup> 蔗糖溶液, 摇匀、静置 5 min, 在 2 500 r·min<sup>-1</sup> 下离心 5 min, 移去上清液; 然后再加入 2 倍体积的 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的蔗糖溶液重悬浮, 静置 5 min, 在 2 500 r·min<sup>-1</sup> 下离心 5 min, 移去上清液; 再加入 2 倍体积的 PBS 重悬浮, 在 2 500 r·min<sup>-1</sup> 下离心 5 min, 去上清; 最后加 PBS 调整细胞浓度到 10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup>。

## 1.4 检测指标

1.4.1 台盼蓝拒染法检测细胞存活率 用血球计数板计数, 测定细胞回收率。以台盼蓝拒染法检测细胞存活率。计算公式为: 细胞的存活率 = (洗脱后的活细胞数/洗脱后的细胞数) × 100%。

1.4.2 MTT[3-(4,5)-dimethylthiazoliazol(-z-y)-2,5-diphenyltetrazoliumromide]法检测软骨细胞琥珀酸脱氢酶(SDH)活性 根据 Mosmann<sup>[9]</sup>的方法稍加改进, 将冻存组细胞洗脱(1.3.3)。调整细胞浓度为 10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 取 96 孔无菌培养板, 软骨细胞悬浮液、培养液各 100 μL, 各孔均加入 5.0 g·L<sup>-1</sup> 的 MTT 20 μL, 置于 37 ℃ 的 50.0 mL·L<sup>-1</sup> 二氧化碳培养箱中孵育 4 h, 使 MTT 充分被还原, 然后加入 1.0 mL 二甲基亚砷, 摇匀 10 min, 使结晶物充分溶解后, 在酶标仪上检测(在 570 nm 处测量吸光度)。

## 1.5 统计学方法

以上方法均随机取多个样本, 各个样本多次重复。实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件中单因素方差分析(Oneway ANOVA)进行处理, 比较结果用字母 a, b, c, d 表示, 在图表中表示标准误差的误差线上方的字母相同表示差异不显著( $P>0.05$ ), 字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )。

## 2 实验结果

### 2.1 玻璃化冻存对软骨细胞存活率的影响

图 1 表示的是不含海藻糖组的玻璃化冷冻保护剂对软骨细胞存活率的影响。在每组比较中, 经过 5 ~ 30 d 的冻存后, 软骨细胞的存活率随着冻存天数的增加而呈下降趋势。由图 1 可见, 在前 20 d 细胞的存活率下降幅度比较大, 在 20 ~ 30 d 之间细胞的存活率变化不大。VS1 组和 VS3 组的存活率在 5 ~ 15 d 之间存在显著差异 ( $P<0.05$ ); VS2 组和 VS4 组的存活率在 5, 10 和 20 d 之间存在显著差异( $P<0.05$ ); VS5 组的存活率在 5, 10 和 30 d 之间存在显著差异( $P<0.05$ ); 而 VS6 组的存活率在 5 d 和 15 d 之间存在显著差异( $P<0.05$ )。比较各组玻璃化冷冻保护剂对细胞存活率的影响, 发现 VS1 组冻存的软骨细胞的存活率最高, 经过 5, 10, 15, 20 和 30 d 冻存后, 细胞存活率分别为 83.83% ± 2.32%, 78.58% ±

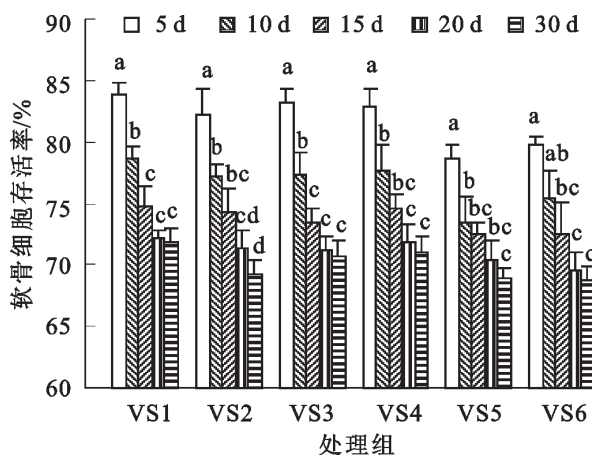


图 1 不含海藻糖玻璃化溶液(VS1 ~ VS6 组)对软骨细胞存活率的影响( $n = 6$ )

Figure 1 Survival rate of chondrocytes after vitrification in VS1 - VS6 ( $n = 6$ )

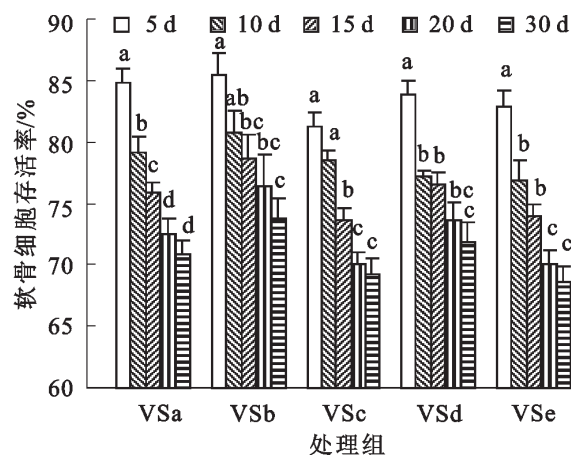


图 2 含海藻糖玻璃化溶液(VSa~VS e 组)对软骨细胞存活率的影响( $n = 6$ )

Figure 2 Survival rate of chondrocytes after vitrification in VSa - VS e ( $n = 6$ )

2.69%,  $74.83\% \pm 3.92\%$ ,  $72.13\% \pm 1.82\%$ 和  $71.78\% \pm 2.80\%$ 。

图2表示,海藻糖组的玻璃化冷冻保护剂在经过不同天数的冻存后,软骨细胞存活率的变化。由图2可见,与不含海藻糖组的相似,软骨细胞的存活率也是存活率随着冻存天数的增加而呈下降趋势,5~20 d存活率下降幅度比较大,20~30 d之间变化不大。VSa组的存活率在5~20 d之间存在显著差异( $P<0.05$ ); VSb组在5, 15和30 d之间存在显著差异( $P<0.05$ ); VSd组的存活率在5, 10和30 d间存在显著差异( $P<0.05$ ); VSe组的存活率在5, 10和20 d间存在显著差异( $P<0.05$ )。比较各组存活率,发现VSb组冻存的软骨细胞的存活率最高,在经过5, 10, 15, 20和30 d的冻存后,其存活率分别为  $85.47\% \pm 1.78\%$ ,  $80.73\% \pm 1.81\%$ ,  $78.62\% \pm 2.06\%$ ,  $6.35\% \pm 2.58\%$ 和  $73.83\% \pm 1.49\%$ 。

## 2.2 玻璃化冻存对软骨细胞内琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的影响

如图3所示,不含海藻糖组的玻璃化冷冻保护剂对羊软骨细胞中琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的影响。由图3可知:随着冻存时间的延长,冻存后细胞内的SDH活性逐渐降低,在冻存20 d后,MTT实验检测到其吸光度基本达到相对稳定状态,冻存20 d与30 d的细胞经检测,其吸光度值无显著差别( $P>0.05$ )。在6组玻璃化溶液中,VS1所冻存的细胞SDH活性要高于其他5组,在经过5, 10, 15, 20和30 d的冻存后,检测到的吸光度值分别为  $0.475 \pm 0.056$ ,  $0.413 \pm 0.063$ ,  $0.365 \pm 0.065$ ,  $0.35 \pm 0.053$ 和  $0.326 \pm 0.02$ 。

图4显示海藻糖组的玻璃化冷冻保护剂对软骨细胞中琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的影响。由图4可知,与不含海藻糖组相似,细胞内SDH的活性随着冻存时间的延长而逐渐降低,冻存20 d后,MTT实验检测结果显示其吸光度基本达到稳定状态,冻存20 d与30 d的细胞的吸光度无显著差别( $P>0.05$ )。分析结果显示VSa和VSb在5~15 d内下降较快( $P>0.05$ ), VSd的SDH活性在10~20 d内下降较快( $P<0.05$ ), VSd组的SDH活性在5~10 d有显著变化( $P<0.05$ ), VSe在5~10, 15~20 d有显著变化( $P<0.05$ )。从整体上看,在5组玻璃化溶液中,VSb组所冻存的细胞SDH活性要高于其他4组,在经过5, 10, 15, 20和30 d的冻存后,检测到的吸光度分别为  $0.49 \pm 0.064$ ,  $0.444 \pm 0.073$ ,  $0.394 \pm 0.039$ ,  $0.354 \pm 0.082$ 和  $0.339 \pm 0.053$ 。

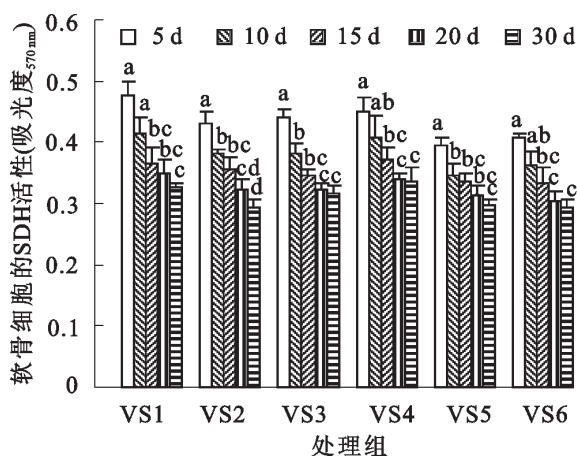


图3 VS1~VS6组软骨细胞SDH活性( $n=6$ )

Figure 3 SDH activity of chondrocytes after vitrification in VS1 - VS6 ( $n=6$ )

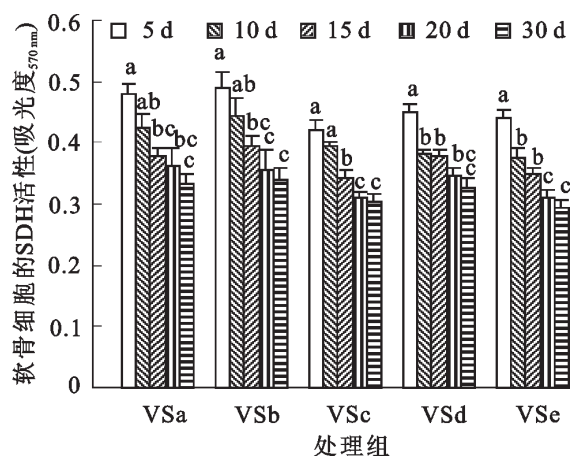


图4 VSa~VSe组软骨细胞SDH活性( $n=6$ )

Figure 4 SDH activity of chondrocytes after vitrification in VSa - VSe ( $n=6$ )

## 3 讨论

羊软骨细胞的冻存是否成功,使用合理的玻璃化液是关键因素。合理的玻璃化液涉及到溶液的组成成分及浓度,由于高浓度的单一成分冷冻保护剂毒性相当高,无法进行生物材料的玻璃化冻存。我们根据冷冻保护剂的渗透特性和玻璃化倾向以及毒性中和剂的特征,选用二甲基亚砜、乙酰胺、乙二醇和丙三醇等为渗透性保护剂成分,海藻糖、蔗糖和聚乙二醇等为非渗透性保护剂成分,配制成玻璃化溶液。

二甲基亚砜在大量实验中被证明具有易玻璃化和高渗透性等特点，但高浓度的二甲基亚砜对细胞的毒性和渗透损伤很高。乙酰胺是一种较小分子量和较高渗透性的保护剂，并且具有毒性中和能力，在植物材料和动物材料的玻璃化冻存中被广泛使用。甘油和乙二醇的毒性较小，但玻璃化形成能力差。在玻璃化溶液中加入非渗透性保护剂，提高了细胞外液的渗透压，同样也降低细胞玻璃化所需的渗透性保护剂的浓度，这样生物材料既形成玻璃化，又降低了渗透性保护剂对细胞的毒性。实验结果表明，不含海藻糖组的玻璃化溶液 VS1 和海藻糖组的 VSb 冻存软骨细胞后的存活率较高，分析原因可能是其组分能够有效减少高浓度冷冻保护剂对软骨细胞的化学和物理毒害，并能在冷冻过程中较好地形成玻璃化，从而达到良好的冻存效果。

细胞膜是细胞进行有序生理生化活动的天然屏障，其完整性决定细胞的存活与否。McGann 等<sup>[10]</sup>认为细胞膜是低温冻存过程中的第一损伤位点。生物材料在低温冻存过程中，由于在降温-复温过程中存在细胞膜受到损伤的主要因素，包括冰晶的形成和增长对膜的挤压撕裂、溶质浓度升高所产生的盐害、膜在低温下发生的相变、膜蛋白变性或构象改变所伴随的酶活性变化等因素，使膜的通透性改变，从而破坏膜的完整性<sup>[11-13]</sup>。本研究采用台盼蓝拒染法检测玻璃化冻存对软骨细胞的影响时发现，随着冻存天数的增加，细胞存活率基本上呈下降趋势。我们认为玻璃化冷冻保存对软骨细胞的存活率的影响与细胞膜有一定相关性。

酶是细胞赖以生存的基础，细胞所有的新陈代谢活动均需要酶所参与生化反应，进行氧化磷酸化或底物水平磷酸化等一系列的反应产生的腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)，代谢中间产物和及时消除细胞体内有毒物质等。线粒体的膜和嵴上分布了大量的酶，它们参与线粒体的生理生化反应，为细胞代谢提供能量<sup>[14]</sup>。在玻璃化冻存过程中，细胞酶活性的变化受到各种因素的影响。细胞在经过玻璃化冻存的降温和复温过程后，会部分损伤线粒体，使线粒体内的酶分布发生改变，甚至引起酶的释放。这些酶游离出来进入基质，影响了酶的稳定性和活性；玻璃化过程中冰晶的形成和析出，引起细胞内电解质浓度升高，pH 值变化等，从而改变酶的活性；而且低温本身也会引起酶的变化<sup>[15]</sup>。

琥珀酸脱氢酶(SDH)是线粒体内一种重要的酶，它参与线粒体内多种与细胞生命活动相关的反应，如呼吸链的电子传递、ATP 的合成等<sup>[16]</sup>。在玻璃化冻存中，软骨细胞的 SDH 的活性受到一定的影响。MTT 试验也称琥珀酸脱氢酶抑制反应，被广泛用来定量检测细胞增殖和细胞毒性<sup>[17]</sup>。通过 MTT 试验来检测软骨细胞内 SDH 的变化，一方面可以了解细胞的活性变化，另一方面也可以反映出细胞内相关功能的受损程度。从总体上看，软骨细胞通过玻璃化冻存后，细胞内 SDH 活性随着冻存时间的延长而逐渐降低的。玻璃化冻存 1 ~ 20 d，软骨细胞内的酶活性变化较大，20 ~ 30 d 下降趋势减弱，SDH 活性保持相对稳定。SDH 活性不仅受到低温影响，还与线粒体结构完整性有关。我们认为 SDH 降低的原因可能有以下几点：一是冷冻保护剂的高毒性引起酶复合蛋白体解聚，引起细胞内酶系结构和功能的变化；深低温造成酶分子内的氢键增加，导致酶活性中心与周围分子之间的作用增强，促使酶蛋白引起聚合反应，黏度增大，引起细胞内酶系比活性和数量的变化；玻璃化过程中造成细胞体内的部分膜结构破坏，导致附着在这些膜上的酶的数量、分布等发生变化。

在研究玻璃化冻存时间对羊软骨细胞存活率和 SDH 活性的影响时发现，随着冻存天数的增加，羊软骨细胞活性逐渐降低。分析原因，主要是在冻存过程中，冷冻保护剂的毒性、降温-复温过程的溶液效应损伤和冻存液洗脱过程的渗透压变化等因素对细胞的结构和功能造成一定的损伤。在玻璃化冻存的前 20 d 中，细胞的存活率、酶活力的下降程度较为明显；但在冻存 20 d 以后，细胞的各项生理功能都达到相对稳定的状态，各项指标的变化不明显。这说明该玻璃化冻存法在长期保存软骨细胞过程中虽然不能完全避免低温对细胞产生的损伤，细胞的活性仍有较大程度的下降，但冻存后的软骨细胞仍能保持较良好和较稳定的存活率和活性，具有一定的实际应用价值和前景。

#### 参考文献：

- [1] MOSKOWITZ R W, ALTMAN R D, HOCHBERG M C, *et al.* *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical Surgical/Management* [M]. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2007: 71 - 107.
- [2] ERIC M D, KYRIACOS A A. Biomechanical strategies for articular cartilage regeneration [J]. *Ann Biomed En*, 2003,

- 31 (9): 1114 – 1124.
- [3] 胡军祥, 赵玉勤, 姜玉新, 等. 动物胚胎的玻璃化冻存[J]. 科技通报, 2005, 21 (6): 679 – 682.  
HU Junxiang, ZHAO Yuqin, JIANG Yuxin, *et al.* Vitrified cryopreservation of animal embryo [J]. *Bull Sci Technol*, 2005, 21 (6): 679 – 682.
- [4] RENDAL-VAZQUEZ M E, MANEIRO P E, RODRIGUEZ C M, *et al.* Effect of cryopreservation on human articular chondrocyte viability, proliferation and collagen expression [J]. *Cryobiology*, 2001, 42 (1): 2 – 10.
- [5] PEGG D E, WUSTEMAN M C, WANG L H. Cryopreservation of articular cartilage, part 1: conventional cryopreservation methods [J]. *Cryobiology*, 2006, 52 (3): 335 – 346.
- [6] 周强, 李起鸿, 戴刚, 等. 三步酶消化法高效分离兔原代关节软骨细胞及体外培养观察[J]. 中华外科杂志, 2005, 43 (8): 522 – 526.  
ZHOU Qiang, LI Qihong, DAI Gang, *et al.* Efficient isolation of chondrocytes from rabbit articular cartilage with three-step enzymatic digestion and observation of their biological characteristics during cultivation in vitro [J]. *Chin J Surg*, 2005, 43 (8): 522 – 526.
- [7] 高硕徽, 应洪亮, 张翹, 等. 阶段性酶消化法高效分离关节软骨细胞[J]. 中国实验诊断学, 2008(12): 835 – 837.  
GAO Suohui, YING Hongliang, ZHANG Qiao, *et al.* Effective isolation of articular chondrocytes by using staged enzymatic digestion [J]. *Chin J Labor Diagn*, 2008 (12): 835 – 837.
- [8] WU W T, LYU S R, HSIEH W H. Cryopreservation and biophysical properties of articular cartilage chondrocytes [J]. *Cryobiology*, 2005, 51: 330 – 338.
- [9] 陈宝安, 王俊, 薛萌, 等. MTT 比色法的改良及其在 LAK 细胞活性检测中的应用[J]. 东南大学学报: 医学版, 2001, 20 (3): 150 – 152.  
CHEN Baoan, WANG Jun, XUE Meng, *et al.* Improvements of MTT assay and its application to the detection of lymphokine activated killer cells' activity [J]. *J Southeast Univ Med Sci Ed*, 2001, 20 (3): 150 – 152.
- [10] MCGANN L E, YANG H Y, WALTERSON M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing [J]. *Cryobiology*, 1988, 25 (3): 178 – 185.
- [11] MAZUR P, FARRANT J, LEIBO S P, *et al.* Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing: interactions between protective solutes and cooling and warming rates [J]. *Cryobiology*, 1969, 6 (1): 1 – 9.
- [12] KASAI M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos [J]. *Ani Reproduct Sci*, 1996, 42: 67 – 75.
- [13] KATTERA S, CHEN C. Cryopreservation of embryos by vitrification: current development [J]. *Internat Surg*, 2006, 91 (supp 5): 55 – 62.
- [14] 赵承彦, 靖志安, 牛青霞. MTT 显色反应实验条件分析[J]. 河南医学研究, 2000, 9 (2): 107 – 116.  
ZHAO Chenyan, JING Zhian, NIU Qingxia. Examination and analyses to the coloring reacting of MTT [J]. *Henan Med Res*, 2000, 9 (2): 107 – 116.
- [15] WATSON P F. The effects of cold shock on perm cell membranes [M]// MORRIS G J, CLARKE A. *Effects of Low Temperature on Biological Membranes*. London: Academic Press, 1981: 189 – 218.
- [16] BARRETO M C, PINTO R E, ARRABACA J D, *et al.* Inhibition of mouse liver respiration by *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids [J]. *Toxi Lett*, 2003, 146 (1): 37 – 47.
- [17] SARGENT J M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples [J]. *Recent Result Cancer Res*, 2003, 161: 13 – 25.