

基础研究

不同代次兔髓核细胞冻存后的生物学特性比较

徐学振, 于占革, 杨 威, 魏 伟, 李念龙, 张 东

(哈尔滨医科大学附属第一医院骨科 150001 哈尔滨市)

【摘要】目的:比较不同代次兔髓核细胞冻存后的生物学特性,找出适合作为种子细胞冻存的兔髓核细胞代次。方法:取 3~4 月龄新西兰大白兔 10 只,麻醉后在严格无菌条件下分离胸腰椎间盘(T1/2~L7/S1)髓核细胞,体外传代培养,分别取一、二、三、四、五代细胞冻存 2~3 个月后备复,取一代未冻存细胞作为对照组(A 组, $n=10$);一、二、三、四、五代冻存后复活的细胞作为实验组(分别为 B、C、D、E、F 组, 各组 $n=10$),在相同条件下培养 2 周,培养第 2 天时采用台盼蓝染色测定细胞成活率;培养第 2d、5d、10d、14d 时采用 MTT 法检测细胞生长活性,采用间苯三酚分光光度法测定蛋白多糖(PG)含量;培养第 14d 时采用阿利新兰染色法测定糖胺聚糖(GAG)合成总量,用 RT-PCR 法检测各组细胞 II 型胶原基因的表达情况。检测细胞浓度均为 1×10^5 个/ml。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。结果:培养第 2d 时 B、C 组细胞成活率接近 A 组($P>0.05$);D、E、F 三组细胞成活率明显低于 A、B、C 组($P<0.05$)。不同时间点各组细胞均有不同程度的增殖, A、B、C、D 四组生长趋势较接近, A、B、C 三组相同时间点生长活性比较差异无统计学意义($P>0.05$), D 组与同一时间点 A 组比较有显著性差异($P<0.05$), E 组第 10d 和第 14d 以及 F 组各时间点间比较差异无显著性($P>0.05$); A、B、C 三组各时间点的 PG 含量及 GAG 含量高于相应时间点 D、E、F 组($P<0.05$); A、B、C 三组的 II 型胶原基因表达量高于 D、E 组($P<0.05$), 明显高于 F 组($P<0.01$)。结论:不同代次兔髓核细胞冻存后生物学特性不同,第一、二代细胞冻存后能较好地保持髓核细胞特性,可作为种子细胞进行低温保存。

【关键词】髓核细胞;冻存;不同代次;细胞活力;细胞培养;兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.08.12

中图分类号:Q813, R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2011)-08-0680-05

Comparison of characteristics of different generations of rabbit nucleus pulposus cells after cryopreservation/XU Xuezheng, YU Zhan'ge, YANG Wei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(8):680~684

【Abstract】Objective: To compare the characteristics of different generations of rabbit nucleus pulposus cells (NPC) after cryopreservation and search for the best generation suitable for cryopreservation as seed cells. Method: 10 New Zealand white rabbits (3~4 months old) were used, and the thoracic and lumbar (T1/2~L7/S1) NPC were separated immediately after general anesthesia under strictly aseptic conditions and cultured in vitro: control group (group A, $n=10$), the original generational cells; group B, C, D, E and F respectively representing the first, second, third, fourth and fifth generation cells (each group $n=10$ and cell concentration $1 \times 10^5/\text{ml}$) were cryopreserved for 2~3 months and then continued for two weeks after recovery. The Trypan Blue and MTT were used for detecting cell survival rates and cell growth activity respectively; the proteoglycan (PG) synthesis and glycosaminoglycans (GAG) accumulation were tested; and the expression of type II collagen gene were evaluated by RT-PCR. All the results were analyzed statistically using the SPSS 13.0 software package. Result: Cell survival rate of group B and C was close to that of group A on the 2nd day ($P>0.05$) and group D, E and F had obviously lower cell survival rate than that of group A, B and C ($P<0.05$). Cells of each group proliferated in different degrees. The growth tendency of group A, B, C and D was closer, and group A, B and C showed no time-related difference ($P>0.05$), while group D had worse cell survival rate than group A ($P<0.05$). The proliferation of group E on the 10th and 14th days as well as each time point of group F showed

基金项目:黑龙江省攻关课题项目(编号:GC06C414)

第一作者简介:男(1984-), 硕士研究生, 研究方向:脊柱外科

电话:(0451)85555131 E-mail: xuxuez@126.com

通讯作者:于占革 E-mail: zhangeyu1967@yahoo.com.cn

no significant difference ($P>0.05$). PG synthesis and GAG accumulation of group A, B and C at each time point were higher than that of group D, E and F at the corresponding time point ($P<0.05$). The collagen II gene expression of group A, B and C was higher than that of group D and E ($P<0.05$), and group F had lowest expression ($P<0.01$). **Conclusion:** After cryopreservation, different generations of cells present varied characteristics. The first and second generations are suitable as seed cells after cryopreservation due to their better maintenance of NPC characteristics.

【Key words】 Nucleus pulposus cells; Cryopreservation; Different generation; Cell viability; Cell culture; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China

近年来组织工程方法治疗椎间盘退变的研究不断深入,对髓核种子细胞的研究也日趋成为热点^[1-3]。体外培养的椎间盘髓核细胞在传至一定的代次后会出现老化现象,不再适合作为组织工程的种子细胞^[4]。在研究过程中,将培养的髓核细胞冻存以解决细胞生命周期难以满足实验时间要求的问题,但复苏后哪些代次髓核细胞的生物学功能仍然保持良好,适合作为组织工程椎间盘的种子细胞,是亟待解决的问题。本研究对兔正常椎间盘组织的髓核细胞进行体外传代培养,比较不同代次髓核细胞冻存复苏后的形态学和生长动力学特性,寻找生物学性能最佳的细胞代次,为实验室选取和保存组织工程髓核种子细胞提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

2~3 月龄清洁级健康雌性新西兰大白兔 10 只,体重 2.5~3.0kg,由哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心提供。细胞冷冻液:小牛血清、二甲基亚砷 (DMSO)、DMEM/F12 培养液按体积比 3:1:1 混匀, -20℃ 保存。

1.2 髓核细胞的分离培养及形态学鉴定

麻醉处死动物,在严格无菌操作条件下迅速解剖分离胸腰椎间盘 (T1/2~L7/S1) 髓核,采用胰蛋白酶和 II 型胶原酶联合消化法^[5]分离髓核细胞,接种在 75cm² 的培养瓶中,在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养至 80% 融合时传代,共传 5 代。一代髓核细胞培养调整浓度后,于 6 孔培养板中进行爬片,24h 后取出,分别进行 II 型胶原免疫细胞化学染色和甲苯胺蓝染色。

1.3 分组

将未冻存的一代细胞直接培养作为对照组 (A 组);冻存的一代、二代、三代、四代、五代细胞

复苏后培养作为实验组,依次为 B、C、D、E、F 组。各组分别进行各项生物学指标检测,细胞浓度均为 1×10⁵ 个/ml。

1.4 细胞冻存和复苏

将各代细胞培养瓶取出,用 75% 乙醇棉球消毒瓶底;用吸管吸弃旧培养基,更换吸管后加入等量细胞洗涤液,轻轻摇晃使其覆盖整个瓶底,吸弃细胞洗涤液,更换吸管后重复洗涤一次。加入少量细胞消化液,37℃、镜下观察消化情况,当细胞明显回缩后,加入少量新鲜细胞培养基终止消化,轻柔吹打底面 2~3 次后,收集所有液体入新离心管中,1000r/min 离心 5min,弃上清,沉淀用适量 4℃ 细胞培养液悬浮,细胞计数后调整细胞密度至 1×10⁶ 个/ml,将细胞悬液与冻存液等体积混匀,1.5ml/管,标记日期、细胞批次和密度于管壁外,置于 4℃ 10min, -20℃ 30min, -80℃ 过夜后于液氮槽中保存。

实验组保存至预定时间后,将冷冻管迅速由液氮转入到 37℃ 水浴中 (冷冻管的顶部保持在水面以上以避免污染),持续搅拌加速解冻 (< 2min);当细胞完全解冻后,用含 75% 乙醇的纱布擦拭冷冻管;将解冻后的细胞转移到含 4℃ 预平衡培养液的试管中,4℃ 下 1000r/min 离心 10min;弃上清,将细胞重新悬浮在新鲜培养液中;对照组取一代细胞直接制备单细胞悬液 (10⁵ 个/ml)。分别接种于 96 孔细胞培养板,每组 60 孔 (50 孔实验用,10 孔实验补充备用),每孔加 200μl 细胞悬液,置于 5%CO₂、37℃ 恒温培养箱内培养。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 细胞成活率检测 各组于培养第 2 天各取 5 孔,台盼蓝染色 (<30min),于细胞计数板上计数并计算活细胞率。活细胞率 (%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%

1.5.2 细胞生长活性测定 分别于培养 2d、5d、

10d、14d 时每组各取 5 孔,应用 MTT 比色法检测细胞的生长活性,用酶标仪检测波长 490nm 吸光度值(OD)。

1.5.3 细胞外基质的测定 分别于 2d、5d、10d、14d 时每组各取 5 孔,提取细胞总蛋白,加入 3% NaOH 1.0ml,置于恒温振荡器振荡 3h,控制温度在 40℃,用 HCl 调整溶液 pH 值至 8~9。加入 100μl 胰蛋白酶(100mg/ml),恒温振荡器中振荡酶解 1h,温度控制在 50℃。将酶解液用蒸馏水稀释至 10ml,摇匀后取 1ml,采用间苯三酚分光光度法^[6]测定光密度值,转换为量值作为蛋白多糖(PG)含量。

分别收集各组每次更换的培养液,-20℃冰箱保存,于 14d 时将所收集的各组培养液和等体积的新鲜培养液(作为空白液)分别加入 1.5 倍体积的异丙醇沉淀蛋白,应用阿利新兰染色法测定各组培养液中髓核细胞合成的糖胺聚糖(GAG)含量,以 6-硫酸软骨素(6-CS)溶液为标准品,计算各组细胞培养液中 GAG 含量。

1.5.4 II 型胶原基因表达测定 培养 14d 时,每组各取 5 孔,应用 Trizol 法提取细胞总 RNA,各取 2μl 总 RNA,用两步法 RT 试剂盒(invitrogen)进行反转录,PCR 扩增 II 型胶原和内参 β-Actin,均为 30 个循环。取每组标本 II 型胶原 mRNA 扩增产物 10μl,经 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察、拍照。采用 Quantity one(Bio-Rad)凝胶图像分析系统定量分析目的基因的表达水平。实验中

所有引物均遵循引物设计原则,应用 Primer 5.0 专业软件设计完成,经 Blast 比对^[7]为特异性引物(表 1)。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间先进行方差分析,符合方差齐性后再采用 *t* 检验进行两两比较。所得数据利用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 髓核细胞的形态学鉴定

培养的髓核细胞经 II 型胶原免疫细胞化学染色可见胞浆中有黄褐色颗粒沉着,以核周区为著(图 1a),苏木素复染后核呈蓝色(图 1b);甲苯胺蓝染色可见胞浆蓝染,长梭形和不规则形居多(图 1c)。可认为分离培养的细胞为兔髓核细胞。

2.2 细胞成活率

培养第 2 天 A、B、C、D、E、F 各组细胞成活率分别为 (93.68±2.74)%、(91.08±4.06)%、(90.06±2.01)%、(80.74±3.33)%、(78.56±4.69)%、(77.44±1.54)%。B、C 两组细胞成活率接近 A 组,三组间无统计学差异 (*P*>0.05),D、E、F 三组细胞成活率明显低于 A、B、C 三组,差异有统计学意义 (*P*<0.05),D、E、F 三组间较接近,差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

2.3 细胞生长活性

各组细胞培养不同时间点的细胞活性见表

表 1 β-Actin 及 II 型胶原引物序列退火温度、循环次数和片段长度

引物序列		退火温度(℃)	循环次数	片段长度(bp)
β-Actin	上游 5'-AGTGCACGTGGACATCC-3'	58	30	295
	下游 5'-TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG-3'			
II 型胶原	上游 5'-CCAGAGGTGACCGTGCTGACAAA-3'	58	30	508
	下游 5'-GCTTCTCCCTTTGCTCCGTCAG-3'			



图 1 原代髓核细胞倒置显微镜下观察 a II 型胶原免疫细胞化学染色原代髓核细胞胞浆黄褐色颗粒沉着(×100),以核周区为著 b 苏木素复染后核呈蓝色(×400) c 甲苯胺蓝染色可见胞浆蓝染,形态为长梭形和不规则形居多(×100)

2。同组不同时间点细胞活性提示各组细胞均有不同程度的增殖, A、B、C、D 四组生长趋势较接近, A、B、C 三组相同时间点两两比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), D 组各时间点生长活性均较 A 组差 ($P<0.05$), E 组第 10d、14d 以及 F 组各时间点增殖均不明显 ($P>0.05$)。

2.4 细胞外基质含量

各组不同时间点的 PG 含量见表 3。各组不同时间点相比 PG 含量均有不同程度增加, 同一时间点 A、B、C 三组 PG 含量两两比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 各相应时间点 D 组 PG 含量较 A 组下降 ($P<0.05$), E、F 组则较 A 组明显下降 ($P<0.01$)。

培养 14d 时 A、B、C、D、E、F 组 GAG 含量分

别为 2.24 ± 0.06 、 2.24 ± 0.05 、 2.27 ± 0.07 、 2.03 ± 0.11 、 1.74 ± 0.33 、 1.46 ± 0.06 $\mu\text{g}/10^6$ 个细胞。A、B、C 三组 GAG 含量两两比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), D、E、F 组与 A 组相比 GAG 含量下降 ($P<0.05$), E、F 组 GAG 合成量明显低于 A 组 ($P<0.01$)。

2.5 II 型胶原基因表达情况

培养 14d 时, II 型胶原 mRNA 扩增产物电泳各泳道中有位于 Marker 所示的 500bp 和 750bp 区域之间靠近 500bp 的特异性条带, 大小为 508bp (图 2)。A~F 各组相对光密度依次为 0.77 ± 0.03 、 0.79 ± 0.02 、 0.76 ± 0.04 、 0.50 ± 0.05 、 0.46 ± 0.04 、 0.31 ± 0.02 。A、B、C 三组间无显著性差异 ($P>0.05$); D、E、F 三组明显少于 A、B、C 三组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 2 不同代次髓核细胞冻存复苏后培养不同时间点的细胞活性 (OD 值, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

	对照组 (A 组)	一代冻存组 (B 组)	二代冻存组 (C 组)	三代冻存组 (D 组)	四代冻存组 (E 组)	五代冻存组 (F 组)
2d	0.2811 ± 0.0035	0.2791 ± 0.0031^{①}	0.2789 ± 0.0035^{①}	0.2583 ± 0.0034^{②}	0.2015 ± 0.0042^{②}	0.1645 ± 0.0039^{②}
5d	0.3249 ± 0.0041^{③}	0.3258 ± 0.0047^{③}	0.3240 ± 0.0041^{③}	0.3012 ± 0.0047^{②③}	0.2397 ± 0.0037^{②③}	0.1809 ± 0.0035^{②③}
10d	0.4013 ± 0.0045^{③}	0.3974 ± 0.0063^{③}	0.3895 ± 0.0052^{③}	0.3685 ± 0.0035^{②③}	0.2925 ± 0.0061^{②③}	0.2103 ± 0.0042^{②④}
14d	0.5002 ± 0.0033^{③}	0.4927 ± 0.0037^{③}	0.4907 ± 0.0029^{③}	0.4753 ± 0.0043^{②③}	0.3157 ± 0.0039^{②④}	0.2307 ± 0.0051^{②④}

注: 与同一时间点 A 组比较① $P>0.05$, ② $P<0.05$; 与同组前一时间点比较③ $P<0.05$, ④ $P>0.05$

表 3 不同代次髓核细胞冻存复苏后培养不同时间点细胞外基质中蛋白多糖 (PG) 含量 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, mg/100mg)

	对照组 (A 组)	一代冻存组 (B 组)	二代冻存组 (C 组)	三代冻存组 (D 组)	四代冻存组 (E 组)	五代冻存组 (F 组)
2d	2.56 ± 0.13	2.45 ± 0.30^{①}	2.46 ± 0.28^{①}	2.16 ± 0.19^{②}	1.86 ± 0.19^{③}	1.46 ± 0.17^{③}
5d	2.70 ± 0.12	2.72 ± 0.14^{①}	2.72 ± 0.14^{①}	2.38 ± 0.12^{②}	1.89 ± 0.08^{③}	1.47 ± 0.19^{③}
10d	2.80 ± 0.21	2.74 ± 0.14^{①}	2.75 ± 0.09^{①}	2.25 ± 0.23^{②}	1.96 ± 0.13^{③}	1.45 ± 0.16^{③}
14d	2.92 ± 0.10	2.87 ± 0.14	2.82 ± 0.07	2.58 ± 0.16^{②}	1.99 ± 1.13^{③}	1.67 ± 0.10^{③}

注: 与 A 组同一时间点比较① $P>0.05$, ② $P<0.05$, ③ $P<0.01$



图 2 培养 14d 时各组细胞 II 型胶原基因 RT-PCR 产物电泳, 各泳道中可见大小为 508bp 的特异性条带

3 讨论

修复医学和组织工程技术作为一种理想的方法, 已成为目前治疗椎间盘退变性疾病的研究热点^[8,9]。研究证实, 对椎间盘退变模型植入自身髓核细胞可以延缓退变过程^[10,11]。但是, 应用自体来源的髓核细胞存在困难: 一方面, 组织细胞数量

少, 分离细胞困难; 通过健康椎间盘活组织分离髓核细胞必然要穿刺椎间盘, 这样会损伤其结构甚至影响功能; 另一方面, 移去髓核组织会导致椎间盘退变加重^[12]。本研究将分离培养的髓核细胞传代扩增并冻存, 通过观察复苏后各组细胞的细胞特性, 选择合适代次的细胞, 以提高种子细胞的最大利用率。

自 1995 年 Bos-Mikich 等^[13]首次冻存鼠胚胎成功后, 冻存技术已经广泛应用于生物学领域, 包括人脐血干细胞^[14]、精子、卵细胞, 肝细胞^[15], 皮肤相关组织细胞^[16]等, 但冻存及冻存液本身对细胞均有一定的影响, 可导致细胞退变^[17,18]。本研究应用程序降温法, 将兔不同代次的髓核细胞于液氮中冻存, 复苏培养后发现一、二代细胞冻存后的成

活率及细胞活性与对照组相比无统计学差异 ($P > 0.05$), 说明冻存对一、二代细胞的生长活性无明显不良影响, 一、二代髓核细胞复苏后仍然保持了良好的细胞增殖能力, 可以保证足够的种子细胞数量。

复苏后一、二代细胞 PG 含量及 GAG 合成均与对照组细胞相近, 且无显著性差异, 说明一、二代髓核细胞复苏后仍然能很好地合成细胞外基质, 具有良好的生物性能, 可以作为种子细胞应用于组织工程治疗椎间盘退变; II 型胶原的基因表达量也与对照组细胞无差异, 说明一、二代髓核细胞冻存后仍然保持了良好的细胞特性, 可以作为椎间盘组织工程的种子细胞进行超低温保存。

本研究结果表明, 将兔髓核细胞传代后作为种子细胞进行超低温保存是可行的, 然而与原代兔髓核细胞培养结果相比, 不同代次的细胞冻存后生物学特性不同, 二代髓核细胞增殖能力良好, 且经过扩增细胞数量充足, 作为种子细胞保存, 避免了因细胞数量不足增加原代细胞的取材量, 进而增加对健康椎间盘组织损伤的缺点。尽管一、二代兔髓核细胞均适合低温保存, 但是二代细胞经过扩增培养, 细胞数量远较一代细胞多, 所以更适合保存。三代及以后细胞复苏后发生了不同程度的退变, 不再适合作为种子细胞保存。

当然, 细胞冻存的时限, 冻存保护剂的选择, 复苏后能继续扩增传代的次数以及应用于髓核组织工程的实际价值, 以及在相关研究基础之上, 能否建立起人类的髓核细胞种子细胞库, 还有待继续深入研究。

4 参考文献

1. Sun YL, Hurtig M, Pilliac RM, et al. Characterization of nucleus pulposus tissue formed in vitro [J]. Orthop Res, 2001, 19(6): 1078-1084.
2. Ganey T, Libera J, Mcos V, et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. Spine, 2003, 28(23): 2609-2260.
3. Gomes ME, Bossano CM, Johnston CM, et al. In vitro localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor [J]. Tissue Eng, 2006, 12(1): 177-188.
4. Horner HA, Roberts S, Bielby RC, et al. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype [J]. Spine, 2002, 27(10): 1018-1028.
5. 于占革, 杨威, 温莹, 等. 兔不同节段椎间盘髓核细胞培养特性的比较 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(8): 689-693.
6. 高华, 刘坤, 于兹东, 等. 间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(5): 247-248.
7. 丁六松, 张宇伟. BLAST 序列比对与生物医学文献检索 [J]. 情报杂志, 2003, (4): 74-75.
8. O'halloran DM, Pandit AS. Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc [J]. Tissue Eng, 2007, 13(8): 1927-1954.
9. Richardson SM, Mobasheri A, Freemont AJ, et al. Intervertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies [J]. Histol Histopathol, 2007, 22(9): 1033-1041.
10. Meisel HJ, Siodla V, Ganey TM, et al. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. Biomol Eng, 2007, 24(1): 5-21.
11. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration [J]. Spine, 2005, 30(21): 2379-2387.
12. Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration [J]? Eur Spine J, 2008, 17(1): 2-19.
13. Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, et al. Cytogenetical analysis and development potential of vitrified mouse oocytes [J]. Biological of Reproduction, 1995, 53(9): 780-785.
14. 吴燕峰, 包蓉, 张绪超, 等. 人骨髓及脐血间充质干细胞体外大量扩增及建库的质量控制 [J]. 实用医学杂志, 2006, 22(1): 1-3.
15. McKay GC, Henderson C, Goldie E, et al. Cryopreservation of rat hepatocyte monolayers: cell viability and cytochrome P450 content in post-thaw [J]. Toxicol in Vitro, 2002, 16(1): 71-79.
16. Erdag G, Eraglu A, Morgan J, et al. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose [J]. Cryobiology, 2002, 44(3): 218-228.
17. Heng BC, Ye CP, Liu H, et al. Kinetics of cell death of frozen-thawed human embryonic stem cell colonies is reversibly slowed down by exposure to low temperature [J]. Zygote, 2006, 14(4): 341-348.
18. Park SY, Kim EY, Cui XS, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts [J]. Zygote, 2006, 14(2): 125-131.

(收稿日期: 2011-04-11 修回日期: 2011-05-30)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)