

## 二甲基亚砷充当保护剂灌注兔离段肢体局部药物浓度的相对回收率

安卓玲<sup>1</sup>, 丁琨<sup>2</sup>, 刘春生<sup>2</sup>, 朱泽兴<sup>2</sup>, 周静超<sup>2</sup>, 张朕<sup>2</sup>, 张树明<sup>2</sup>, 王丹<sup>2</sup>(<sup>1</sup>首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京市 100020; <sup>2</sup>解放军第二炮兵总医院, 北京市 100088)

### 文章亮点:

实验通过增量法及减量法对不同浓度二甲基亚砷微透析探针相对回收率进行体外校正, 实验结果表明回收率随二甲基亚砷浓度的变化较小, 并且两种方法测得的相对回收率基本相同; 采用减量法测得二甲基亚砷微透析探针的体内相对回收率, 结果也显示体内回收率随二甲基亚砷浓度的变化较小。

### 关键词:

组织构建; 组织工程; 二甲基亚砷; 微透析; 相对回收率; 校正; 国家自然科学基金

### 主题词:

二甲基亚砷; 微透析

### 基金资助:

全军十一五医药卫生科研基金项目(08G051); 国家自然科学基金项目(81301662、81341015)

### 摘要

背景: 二甲基亚砷冷冻保护剂的效果在低温医学应用中得到了大量验证, 目前尚无利用微透析技术对二甲基亚砷进行检测的文献报道。

目的: 考察不同浓度断肢再植冷冻保护剂二甲基亚砷微透析的相对回收率。

方法: 应用增量法及减量法检测体外不同浓度(2%、5%、8%)二甲基亚砷微透析线性探针的相对回收率, 并进行体内校正实验, 以减量法估算二甲基亚砷在兔离断肢体的相对回收率。

结果与结论: 增量法检测 2%、5%、8%浓度二甲基亚砷的相对回收率分别为(49.49±3.56)%, (46.30±1.48)%, (52.66±2.54)%, 平均回收率为(49.48±3.18)%; 减量法检测 2%、5%、8%浓度二甲基亚砷的相对回收率分别为(50.99±6.89)%, (43.86±1.35)%, (50.67±0.75)%, 平均回收率为(48.51±4.03)%, 两种方法检测的二甲基亚砷微透析探针相对回收率基本相同。体内校正实验显示回收率随二甲基亚砷浓度的变化较小, 平均回收率为(15.45±4.80)%。结果表明不同浓度二甲基亚砷的微透析探针相对回收率无明显差异。

安卓玲, 丁琨, 刘春生, 朱泽兴, 周静超, 张朕, 张树明, 王丹. 二甲基亚砷充当保护剂灌注兔离段肢体局部药物浓度的相对回收率[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(24):3855-3859.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.24.016

## Dimethyl sulfoxide acts as a protective agent to perfuse rabbit amputated limbs: the relative recovery of local drug concentrations

An Zhuo-ling<sup>1</sup>, Ding Kun<sup>2</sup>, Liu Chun-sheng<sup>2</sup>, Zhu Ze-xing<sup>2</sup>, Zhou Jing-chao<sup>2</sup>, Zhang Zhen<sup>2</sup>, Zhang Shu-ming<sup>2</sup>, Wang Dan<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China; <sup>2</sup>the Second Artillery General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100088, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** The effect of dimethyl sulfoxide cryoprotectants has been got a lot of verification in the low-temperature medical applications. But there is no literature addressing microdialysis detection of dimethyl sulfoxide cryoprotectants.

**OBJECTIVE:** To investigate the microdialysis relative recovery of different concentrations of dimethyl sulfoxide cryoprotectants used for limb reattachment.

**METHODS:** *In vitro* linear probe relative recovery of different concentrations of dimethyl sulfoxide (2%, 5%, 8%) was detected by retrodialysis gain and loss method. The correction *in vivo* experiment was done to estimate dimethyl sulfoxide relative recovery in rabbit amputated limbs.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The relative recoveries of different concentrations of dimethyl sulfoxide (2%, 5%, 8%) were (49.49±3.56)%, (46.30±1.48)%, (52.66±2.54)% using retrodialysis gain method and (50.99±6.89)%, (43.86±1.35)%, (50.67±0.75)% using retrodialysis loss method. The average recoveries were (49.48±3.18)% and (48.51±4.03)%, respectively. There was no difference in the relative recovery of dimethyl sulfoxide detected using two methods. The change of dimethyl sulfoxide concentration could not influence the retrodialysis gain and loss method calibration results. The recovery was (15.45±4.8)% *in vivo*. These findings indicate that the microdialysis technology is suitable for dimethyl sulfoxide sampling *in vivo* that has no obvious influence on the relative recovery.

安卓玲, 女, 1989年生, 黑龙江鸡西市人, 汉族, 硕士, 主要从事骨创伤学研究。

通讯作者: 王丹, 主管药师, 解放军第二炮兵总医院, 北京市 100088

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)24-03855-05

稿件接受: 2015-05-18

http://www.crter.org

An Zhuo-ling, Master, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Corresponding author: Wang Dan, Pharmacist in charge, the Second Artillery General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100088, China

Accepted: 2015-05-18

**Subject headings:** Dimethyl Sulfoxide; Microdialysis

**Funding:** the Medicine and Health Research Foundation of PLA during the Eleventh Five-Year Period, No. 08G051; the National Natural Science Foundation of China, No. 81301662, 81341015

An ZL, Ding K, Liu CS, Zhu ZX, Zhou JC, Zhang Z, Zhang SM, Wang D. Dimethyl sulfoxide acts as a protective agent to perfuse rabbit amputated limbs: the relative recovery of local drug concentrations. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(24):3855-3859.

## 0 引言 Introduction

二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)作为一种含硫的有机化合物,是一种无色无臭、高沸点、高吸湿性的非质子极性溶剂。由于它对化学反应具有特殊溶媒效应及对许多物质的溶解特性,并且毒性极低,被称为“万能溶媒”和“万能药”,其作为药物辅助治疗剂、细胞冷冻保护剂、生物膜融合剂和膜渗透剂,已被广泛应用于生物、化学和药学领域<sup>[1]</sup>。

二甲基亚砷是一种重要的渗透型细胞保护剂,能够快速穿透细胞膜渗透到细胞中,在细胞内外产生一定的摩尔浓度,使细胞内水分不会过分外渗,避免细胞过分脱水皱缩;而且能够降低细胞冰点,延缓冻存过程,同时提高细胞内离子浓度,减少细胞内冰晶的形成,从而减少细胞损伤;二甲基亚砷是羟自由基的清除剂,可减轻由超氧阴离子和过氧化氢经Haber-weiss或Fenton反应生成的自由基对细胞的损害,增加生物膜对电解质、药物、毒物和代谢产物的通透性<sup>[2]</sup>。因此,在深低温(-200 °C)保存细胞时冻存过程中,为防止细胞内液冰晶形成、渗透压改变、细胞结构紊乱等导致的损伤,有必要使用含有二甲基亚砷的冷冻保护剂。

在深低温时二甲基亚砷的细胞毒性受到抑制,但有研究表明,常温下培养液中二甲基亚砷浓度为10%时,细胞生长抑制率近100%;0.1%浓度时抑制率为35%,即使是0.004%的浓度,二甲基亚砷对细胞的生长也有不利影响。因此复苏时动作要快,尽快洗掉二甲基亚砷,否则会造造成对细胞的严重毒性。二甲基亚砷是目前最好的细胞冻存保护剂,但也是一种细胞毒性很大的化学试验剂。

微透析技术是一种将灌注取样和透析技术结合起来,并逐渐完善的一种从生物活体内进行动态微量生化取样的新技术。其以透析原理作为基础,通过对插入生物体内微透析探头在非平衡条件下微量地对细胞液进行流动性灌注,物质沿浓度梯度逆向扩散,使被分析物质穿过膜,扩散进入透析管内,并被透析管内连续流动的灌流液不断带出,从而达到活体组织取样的目的,具有微创、长时间连续取样、实时分析等特点<sup>[3-7]</sup>。但由于在某一个灌注速度下,连续流动的灌流液使探头中的待测物与探头外细胞间的待测物不能达到绝对的平衡,所以透析液中待测物的浓度低于探头外细胞间待测物的浓度。因此,在需要了解待测部位的实际浓度时必须进行微透析探头的校正,即回收率的测定。

近年来,低温医学已成为组织再生研究的热点,低温

可以有效降低细胞代谢,减少细胞能量需求,从而保证组织细胞的活性,使得组织保存完整。二甲基亚砷冷冻保护剂在低温医学的应用得到了大量验证,但目前尚无利用微透析技术进行二甲基亚砷检测的文献报道。微透析线性探针相对回收率的准确测定,是监测肢体灌注局部药物浓度的关键。本实验主要通过增量法及减量法测定二甲基亚砷浓度对回收率的影响,并为二甲基亚砷作为保护剂灌注兔肢体的渗透性研究提供了可行性理论基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 专业理论设计。

**时间及地点:** 于2014年6月至12月在解放军第二炮兵总医院药剂科完成。

**材料:**

二甲基亚砷相对回收率实验的试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
二甲基亚砷	浓度≥ 99.5%, 细胞级, sigma 公司
生理盐水	石家庄四厂
脱毛膏 100 g	青岛德美公司
微透析设备(CMA 402 微透析灌注器推 进泵、CMA 470 冷却微量收集器、CMA 30 线性探针)	瑞典 CMA 公司
微透析体外回收率校正试验反应瓶	解放军第二军医大学, (ZL200620048875.4)
恒温水加热装置(ZL201420110925.7)	解放军第二炮兵总医院,
多功能微透析体内外实验仪器收纳与操作台	解放军第二炮兵总医院自制
冰点渗透压仪(OM806 型)	德国 Löser 公司
显微外科器械、外科缝合器械及针线	唐山先锋医疗器械公司

**实验动物:** 健康成年雄性新西兰大白兔5只, 体质量2.5-3.0 kg, 由北京维通利华实验动物技术有限责任公司提供, 动物许可证号: SCXK(京)2011-0006。

**实验方法:**

**冰点渗透压仪检测条件:** 二甲基亚砷检测范围为0.1%-10%(体积比), 回归方程为 $\hat{Y}=308.0+142.7X+31.181X^2$  ( $R^2=1.0$ ), 敏感性 $s=0.1%$ (体积比), 区分度 $d=0.1%$ (体积比), 不精确度 $c=\pm 2.35%$ 。

微透析取样过程中, 透析液中的药物含量只是细胞外液中的一部分。为了获得真实药物浓度, 必须通过体内外回收率进行折算, 采用增量法(反映真实回收率)和减量法

(反映反透析法测得的回收率)考察二甲基亚砜的体外回收率<sup>[6]</sup>, 目的是为了测定二甲基亚砜的探针回收率与传递率之间的关系, 以考察反透析法用于二甲基亚砜探针体内回收率测定的可行性。

### 二甲基亚砜微透析线性探针的体外校正:

**增量法测定二甲基亚砜浓度对回收率的影响:** 将线性微透析探针浸入装有100 mL浓度为2%二甲基亚砜溶液的微透析体外回收率校正实验反应瓶中, 恒温水浴箱温度为39℃。微透析以空白生理盐水为灌流液灌注探针, 灌流速度为2.2 μL/min, 平衡30 min(需按灌流液开始时间到连接管开始流出液体的时间间隔确定)。开始收集样本, 每隔15 min收集一个样本, 收集5个样本。更换浓度, 从低浓度到高浓度依次为2%、5%、8%的二甲基亚砜溶液, 每种浓度下平衡30 min, 收集5个样本。利用冰点渗透压仪测定透析液中样品渗透压, 通过增量法公式计算二甲基亚砜相对回收率。增量法相对回收率计算公式:

$$\text{公式1: } RG(\%) = C_{out}/C_{in} \times 100\%$$

其中,  $C_{out}$  为透析液中药物浓度,  $C_{in}$  为二甲基亚砜溶液浓度。

**减量法测定二甲基亚砜浓度对回收率的影响:** 将线性微透析探针浸入装有100 mL质量浓度为9 g/L生理盐水微透析体外回收率校正实验反应瓶中, 恒温水浴箱温度为39℃。注射器吸入浓度为2%二甲基亚砜溶液约0.6 mL装入微透析灌注器推进泵, 平衡30 min, 收集灌流液, 每隔15 min收集一个样本, 收集5个样本, 流速2.2 μL/min。低浓度收集完后, 更换高浓度, 依次为2%、5%、8%, 每种浓度下收集5个样本。利用冰点渗透压仪测定透析液中药物含量, 通过减量法公式计算二甲基亚砜相对回收率。减量法相对回收率计算公式为:

$$\text{公式2: } RL(\%) = (C_{in} - C_{out})/C_{in} \times 100\%$$

其中,  $C_{out}$  为透析液中药物浓度,  $C_{in}$  为二甲基亚砜溶液浓度。

**二甲基亚砜微透析线性探针的体内校正:** 取健康成年雄性新西兰大白兔5只, 给予腹腔注射麻醉后, 右后肢脱毛剂脱毛, 水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉, 静脉空气栓塞处死, 离断右后肢髌部, 自膝上2 cm处缝合皮肤、皮下及肌肉组织, 3 cm处离断大腿肌肉, 将断肢置于保温垫上, 设置为39℃, 将线性微透析探针置入断肢皮下。微透析分别以低中高浓度(依次为2%、5%、8%)的二甲基亚砜为灌流液, 灌流速度为2.2 μL/min, 平衡30 min, 开始收集样本, 每隔15 min收集一个样本, 每种浓度下收集5个样本, 每只大白兔共收集15个样本。代入公式2计算二甲基亚砜相对回收率。

**主要观察指标:** 二甲基亚砜的相对回收率。

## 2 结果 Results

2.1 冰点渗透压仪检测条件结果 此范围0.1%–10%(体

积比)内, 随着二甲基亚砜体积浓度的提高, 溶液渗透压随之提高, 线性关系良好, 且微透析样品中的小分子生理成分对此方法无干扰, 所建立的检测方法专属性高, 可行性强。

### 2.2 二甲基亚砜微透析线性探针的体外回收率

**增量法测定二甲基亚砜浓度对回收率的影响:** 结果表明, 增量法计算2%、5%、8%浓度二甲基亚砜的相对回收率随浓度变化较小, 分别为(49.49±3.56)%、(46.30±1.48)%、(52.66±2.54)%、, 平均回收率为(49.48±3.18)%、, 见图1。

**减量法测定二甲基亚砜浓度对回收率的影响:** 结果表明, 减量法计算2%、5%、8%浓度二甲基亚砜的相对回收率随浓度变化较小, 分别为(50.99±6.89)%、(43.86±1.35)%、(50.67±0.75)%、, 平均回收率为(48.51±4.03)%、, 见图1。

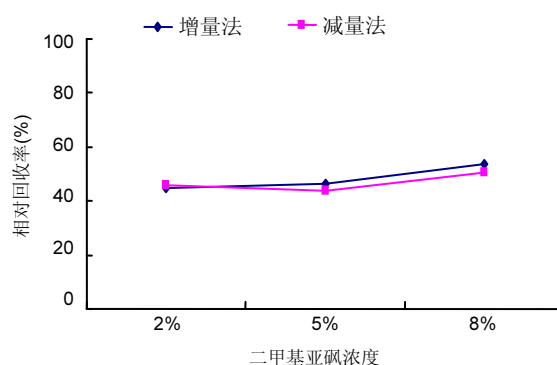


图1 不同浓度二甲基亚砜对微透析线性探针相对回收率的影响  
Figure 1 Influence of different concentrations of dimethyl sulfoxide on the relative recoveries

图注: 2%、5%、8%浓度二甲基亚砜的相对回收率随浓度变化较小。

**微透析探针体外回收率结果显示:** 微透析线性探针体外回收率不受二甲基亚砜浓度的影响, 二甲基亚砜在线性探针的回收率等于其传递率, 这是利用减量法测定体内回收率的前提, 微透析技术适宜应用于二甲基亚砜的深入研究。

2.3 二甲基亚砜微透析线性探针的体内校正 对5只大白兔进行微透析线性探针体内校正, 测得体内回收率随二甲基亚砜浓度的变化较小, 且5只大白兔得到的回收率基本一致, 平均回收率为(15.45±4.8)%、, 见图2。

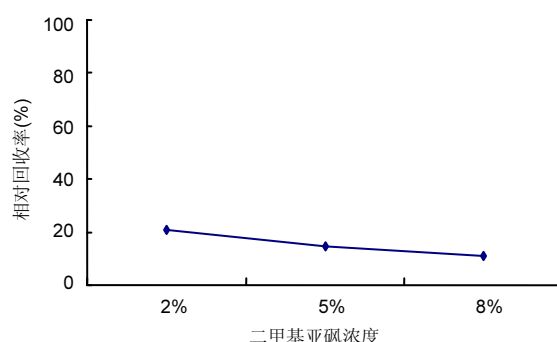


图2 减量法测定不同浓度二甲基亚砜微透析线性探针的体内相对回收率  
Figure 2 The in vivo relative recovery of different concentrations of dimethyl sulfoxide detected by retrodialysis loss method

图注: 2%、5%、8%浓度二甲基亚砜的相对回收率随浓度变化较小。

### 3 讨论 Discussion

二甲基亚砷作为一种含硫的有机化合物, 是一种非质子极性溶剂, 并且毒性极低, 具有增加生物膜通透性的能力, 是一种渗透性保护剂, 能够降低细胞冰点, 减少冰晶的形成, 减轻自由基对细胞损害, 改变生物膜对电解质、药物、毒物和代谢产物的通透性<sup>[6]</sup>。二甲亚砷所具有的特殊化学结构, 使其能够通过提高渗透性而不影响皮肤和身体膜的形态特征渗透屏障<sup>[7-9]</sup>, 其良好的渗透性在日常生产生活中得到广泛应用。在1972年, 二甲亚砷就被作为渗透性冷冻保护剂应用<sup>[10]</sup>。有人提出二甲亚砷利用其渗透特性, 通过保持冻融过程中蛋白质和磷脂膜的完整性来发挥作用<sup>[11-12]</sup>。二甲亚砷对皮肤有极强的渗透性, 有助于药物向人体渗透。

近年来, 二甲亚砷作为细胞冷冻保护剂应用于各种动植物组织器官的冷冻保存, 如下: ①二甲亚砷应用于生殖器官、组织与细胞的冷冻保存, 如猪卵母细胞与胚胎<sup>[13]</sup>、小鼠睾丸与卵巢<sup>[14-15]</sup>、牛睾丸<sup>[16]</sup>、鬃狼精子<sup>[17]</sup>、小鼠精原干细胞<sup>[18]</sup>、猪精液<sup>[1]</sup>、各种鱼类精子<sup>[19-24]</sup>、南美白对虾精子<sup>[25]</sup>、柳珊瑚精子等<sup>[26]</sup>。②二甲亚砷应用于造血干细胞与脐带血的冷冻保存<sup>[27-30]</sup>, 对骨髓移植治疗白血病或其他与血液和免疫系统有关的遗传疾病有重要意义。③二甲亚砷应用于其他组织器官的保存, 如骨关节<sup>[31]</sup>、人体皮肤<sup>[32]</sup>、间充质干细胞<sup>[33]</sup>、人软骨细胞<sup>[34-35]</sup>、内皮祖细胞<sup>[36]</sup>、骨膜组织<sup>[37]</sup>、脂肪肝细胞<sup>[38]</sup>、关节软骨等<sup>[39-40]</sup>。二甲亚砷在人与动物各种器官、组织、细胞的冷冻保存中得到广泛应用, 显著促进了器官移植、再植等各种疾病治疗技术的发展, 在未来临床治疗中将得到更广泛的应用与推广。

实验首次应用冰点渗透压仪测定微透析样品中二甲亚砷的渗透压, 其原理是根据溶液内的冰点温度下降值与渗透压摩尔浓度成线性关系而制成的<sup>[41]</sup>, 当一种溶质溶解到一种纯的溶液中, 其冰点和蒸汽压降低, 沸点和渗透压升高, 而同体积的溶液内溶解的溶质颗粒相同时, 其冰点下降值亦相同, 这又被称为拉乌尔冰点原理。而如上所述, 冰点和渗透压又呈线性关系, 故冰点渗透压仪可根据冰点的检测来检测二甲亚砷渗透压。

本实验通过增量法及减量法对不同浓度二甲亚砷微透析探针进行体外校正<sup>[42]</sup>, 实验结果证明两种方法所测微透析探针相对回收率基本相同。而药物透析液浓度和实际细胞外浓度之间的关系取决于组织样本情况, 单纯通过体外校正探针相对回收率来估算体内相对回收率是不确切的。因此, 将此方法用于兔离断肢体二甲亚砷微透析探针的体内校正, 在相同实验条件下, 用减量法测得不同浓度二甲亚砷微透析探针的体内相对回收率, 因增量法及减量法所测不同浓度二甲亚砷的微透析探针相对回收率基本相同, 所以作者认为在体内校正实验中, 减量法所测定的探针相对回收率即是二甲亚砷充当保护剂灌注兔离段肢体局部药物浓度的相对回收率, 为冷冻保护剂二甲亚砷在冷

冻保护兔离断肢体的渗透性研究奠定了基础。

**作者贡献:** 第五、六进行实验设计、评估、成文、审校, 第一、二、三、四作者进行实验实施、资料收集。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 二甲亚砷是一种重要的渗透型细胞保护剂, 能够快速穿透细胞膜渗透到细胞中, 在细胞内外产生一定的摩尔浓度, 使细胞内水分不会过分外渗, 避免细胞过分脱水皱缩; 而且能够降低细胞冰点, 延缓冻存过程, 同时提高细胞内离子浓度, 减少细胞内冰晶的形成, 从而减少细胞损伤; 二甲亚砷是羟自由基的清除剂, 可减轻由超氧阴离子和过氧化氢经 Haber-weiss 或 Fenton 反应生成的自由基对细胞的损害, 增加生物膜对电解质、药物、毒物和代谢产物的通透性。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

### 4 参考文献 References

- [1] 马丽,李青旺,吴民耀.二甲亚砷对猪精液冷冻保存效果研究[J].动物医学进展,2014,35(5):56-61.
- [2] 方志聪,威智.二甲亚砷对生物膜的作用机理[J].生物物理学报,2012,28(8):638-643.
- [3] Holmgaard R,Nielsen JB,Benfeldt E.Microdialysis sampling for investigations of bioavailability and bioequivalence of topically administered drugs: current state and future perspectives.Skin Pharmacol Physiol.2010;23(5):225-243.
- [4] 吴兆恩,王丹巧.多位点微透析技术在药代动力学研究中的应用[J].中国中药杂志,2010,35(13):1765-1768.
- [5] 徐铭,李范珠.微透析取样技术及其在体内药物分析中的应用[J].药物分析杂志,2006,26(7):1030-1034.
- [6] 方志聪,威智.二甲亚砷对生物膜的作用机理[J].生物物理学报,2012,28(8):638-643.
- [7] KLIGMAN AM.TOPICAL PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF DIMETHYL SULFOXIDE. 1.JAMA. 1965; 193:796-804.
- [8] 王丹,石力夫,胡晋红,等.微透析联用反相高效液相色谱对大鼠皮肤葛根素的药代动力学研究[J].分析化学,2008,36(10):1391-1395.
- [9] Kligman AM. Dimethylsulfoxide-part 2.JAMA.1965; 193(11): 923-928.
- [10] Ashwood-Smith MJ,Warby C.Protective effect of low and high molecular weight compounds on the stability of catalase subjected to freezing and thawing.Cryobiology.1972; 9(2):137-140.
- [11] Arakawa T,Carpenter JF,Kita YA,et al.The basis for toxicity of certain cryoprotectants: An hypothesis.Cryobiology. 1990; 27(4):401-415.
- [12] Anchordoguy TJ,Rudolph AS,Carpenter JF,et al.Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology.1987;24(4):324-331.
- [13] Jin B,Higashiyama R,Nakata Y.Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes: its relevance to their higher tolerance to cryopreservation.Biol Reprod.2013;89(4):87.

- [14] Yildiz C, Mullen B, Jarvi K, et al. Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology*. 2013;67(1):70-75.
- [15] 刘新峰, 丁向彬, 郝志明. 昆明小白鼠卵巢玻璃化冷冻的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 57(1): 167-169.
- [16] Wu JY, Sun YX, Wang AB, et al. Effect of newborn bovine serum on cryopreservation of adult bovine testicular tissue. *Andrologia*. 2014;46(3):308-312.
- [17] Johnson AE, Freeman EW, Wildt DE, et al. Spermatozoa from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) display typical canid hyper-sensitivity to osmotic and freezing-induced injury, but respond favorably to dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 2014; 68(3):361-370.
- [18] Lee YA, Kim YH, Ha SJ, et al. Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. *Fertil Steril*. 2014;101(4):1165-1175.
- [19] Miliorini AB. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aqu Res*. 2011;42(2):17-187.
- [20] Varela Junior AS, Goularte KL, Alves JP, et al. Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Anim Reprod Sci*. 2015;157:71-77.
- [21] Sanches EG, Oliveira IR, Serralheiro PC, et al. Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. *An Acad Bras Cienc*. 2013;85(3):1083-1091.
- [22] Bai C, Wang X, Lu G, et al. Cooling rate optimization for zebrafish sperm cryopreservation using a cryomicroscope coupled with SYBR14/PI dual staining. *Cryobiology*. 2013; 67(2):117-123.
- [23] Robles V, Martínez-Pastor F, Petroni G, et al. Cryobiology of cephalopod (*Illex coindetii*) spermatophores. *Cryobiology*. 2013;66(3):288-294.
- [24] Liu Y, Xu T, Robinson N, et al. Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone *Haliotis laevigata*. *Cryobiology*. 2014;68(2):185-93.
- [25] 杨春玲, 赵永贞, 陈秀荔, 等. 南美白对虾精子超低温冷冻保存技术研究[J]. 南方农业学报, 2013, 44(8): 1382-1389.
- [26] Tsai S, Kuit V, Lin ZG, et al. Application of a functional marker for the effect of cryoprotectant agents on gorgonian coral (*Junceella juncea* and *J. fragilis*) sperm sacs. *Cryo Letters*. 2014;35(1):1-7.
- [27] Kozłowska-Skrzypczak M, Kubiak A, Bemnista E, et al. Analysis of the effect of cryoprotectant medium composition to viability of autologous hematopoietic cells collected by leukapheresis. *Transplant Proc*. 2014;46(8): 2535-2538.
- [28] de Wreede L, Scholten M. Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced Results of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventional study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide. *Transfusion*. 2014;54(10):2514-2522.
- [29] Fry LJ, Querol S, Gomez SG, et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang*. 2015. [Epub ahead of print]
- [30] 吴洁莹, 陆琰, 陈劲松, 等. 脐血血浆替代胎牛血清培养脐带间充质干细胞及冷冻保存[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(37): 5947-5954.
- [31] 杨强, 李建民, 夏群. 深低温保存的节段性部分脱钙异体骨关节移植修复兔骨关节缺损[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2013, 10(3): 11-16.
- [32] Jia X, Yu Y, Li D. Investigation on the effect of trehalose on alpha-actinin in cryopreserved human skin. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2008;22(4):446-469.
- [33] Roy S, Arora S, Kumari P, et al. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*. 2014;68(3):467-472.
- [34] Rajagopal K, Chilbule SK, Madhuri V. Viability, proliferation and phenotype maintenance in cryopreserved human iliac apophyseal chondrocytes. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(1): 153-163.
- [35] Forriol F, Longo UG, Alvarez E, et al. Scanty integration of osteochondral allografts cryopreserved at low temperatures with dimethyl sulfoxide. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011;19(7):1184-1191.
- [36] Wu J, Lu Z, Nie M, et al. Optimization of cryopreservation procedures for porcine endothelial progenitor cells. *J Biosci Bioeng*. 2012;113(1):117-123.
- [37] Kawase T, Kogami H, Nagata M, et al. Manual cryopreservation of human alveolar periosteal tissue segments: Effects of pre-culture on recovery rate. *Cryobiology*. 2011;62(3):202-209.
- [38] Liu G, Li Y, Sun J, et al. Effect of cryopreservation on growth and osteogenesis of human adipose-derived stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010;24(10):1224-267.
- [39] Xia Z, Duan X, Murray D, et al. A method of isolating viable chondrocytes with proliferative capacity from cryopreserved human articular cartilage. *Cell Tissue Bank*. 2013;14(2): 267-1222.
- [40] Kim BY, Nam BM, Lee KM. Effect of preservation conditions on cartilage tissue for cell transplantation. *Transplant Proc*. 2014; 46(4):1139-1144.
- [41] Atkins P. *Physical Chemistry 8ed*, New York: W. H. Freeman and Company, 2006:136-173.
- [42] 王丹, 石立夫, 胡晋红. 微透析技术探针回收率的影响因素研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 3(4):261-266.