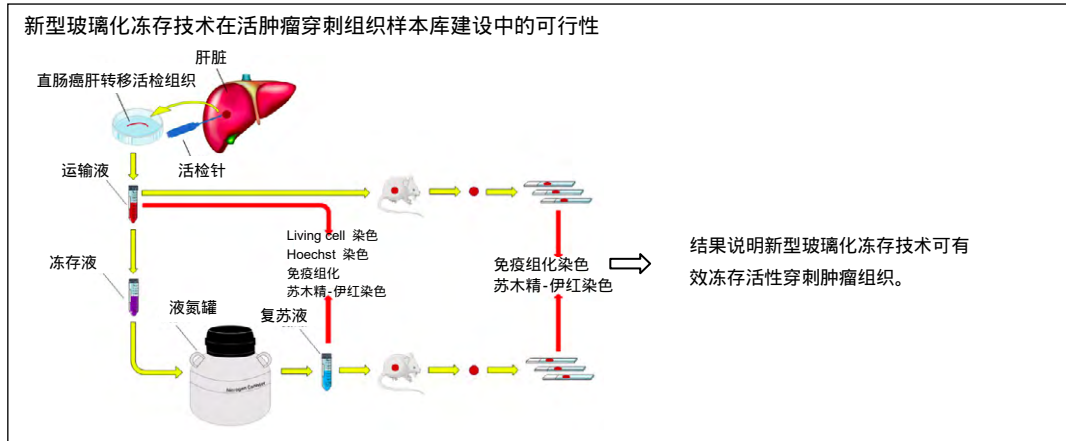


新型玻璃化冻存技术在活肿瘤组织样本库建设中的应用

张源, 杨秋蕊, 张洪丹, 朱雪晶, 李伟建, 王振宇, 景宏舒, 翟博(上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤介入科, 上海市 200127)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0095 ORCID: 0000-0003-0140-9935(张源)

文章快速阅读:



张源, 男, 1992年生, 上海市人, 汉族, 上海交通大学医学院在读硕士, 主要从事肝脏等实体良恶性肿瘤的临床与基础研究。

通讯作者: 翟博, 博士, 主任医师, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤介入科, 上海市 200127

中图分类号: R318

文献标识码: B

稿件接受: 2017-12-16



文题释义:

玻璃化冻存技术: 活性组织与高浓度冻存液充分反应后快速降温, 转变为玻璃样半透明状, 并予以低温保存。组织在冻存过程中细胞内外无冰晶形成, 避免了细胞的结构破坏, 可高度保存组织活性。

活肿瘤穿刺组织样本库: 按严格技术标准采集活性肿瘤穿刺组织, 经玻璃化冻存处理后低温长期储存, 同时匹配建立与之相关的临床治疗、病理、随访、知情同意等资料库及其质量控制、信息管理与应用系统。

摘要

背景: 玻璃化冻存是一种新型的低温保存技术, 在临床活肿瘤组织样本库的建设中具有潜在的应用价值。

目的: 探讨新型玻璃化冻存技术的有效性以及在活肿瘤穿刺组织样本库建设中的可行性。

方法: 将新鲜直结肠肝转移活检组织样本随机分为 2 组, 实验组作玻璃化冻存处理, 对照组不作处理。取部分复苏后活检组织和部分新鲜活检组织分别接种于小鼠背部皮下, 建立人源化移植瘤模型。对比观察活检肿瘤组织冻存前后生物学活性和组织学特征的变化。Calcein-AM 活细胞染色和 Hoechst33342 染色反映细胞活性变化, Ki67 标记免疫组织化学及苏木精-伊红染色反映组织的增殖能力和形态学特征变化。初步收集 105 例直结肠肝转移活检组织并作玻璃化冻存, 建立活性肿瘤穿刺组织生物样本库。

结果与结论: 直结肠肝转移活检组织在玻璃化冻存前后未发生显著的生物学活性和形态学特征改变($P > 0.05$), 说明新型玻璃化冻存技术可有效冻存活性穿刺肿瘤组织, 并对生物样本库的建设具有实际应用价值。

关键词:

生物样本库; 低温冻存; 玻璃化冻存; 活性保存; 肝恶性肿瘤; 直结肠肝转移; 组织构建; 活检穿刺组织; 国家自然科学基金

主题词:

低温保存; 肝肿瘤; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81472845)

A novel vitrified cryopreservation method for the establishment of tumor tissue biobank

Zhang Yuan, Yang Qiu-ru, Zhang Hong-dan, Zhu Xue-jing, Li Wei-jian, Wang Zhen-yu, Jing Hong-shu, Zhai Bo (Department of Interventional Oncology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

Abstract

BACKGROUND: Vitrified cryopreservation is a novel method for specimen preservation, which has a potential application value in the establishment of tumor biopsy biobank.

OBJECTIVE: To investigate the effectiveness of vitrified cryopreservation and the feasibility in the establishment of tumor biopsy biobank.

METHODS: The fresh biopsy specimens of liver metastasis from rectal cancer were randomized into vitrified

Zhang Yuan, Studying for master's degree, Department of Interventional Oncology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Corresponding author: Zhai Bo, M.D., Chief physician, Professor, Department of Interventional Oncology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

cryopreservation and control groups. Then, the biopsy specimens from each group were implanted subcutaneously into the mouse back to establish the humanized mouse xenograft model. The biological characteristics and histological changes of tumor tissues in each group were detected by Calcein-AM/Hoechst33342 staining, as well as immunohistochemistry and hematoxylin-eosin staining. Totally 105 biopsy tissues of liver metastasis from rectal cancer were preliminarily collected and cryopreserved to establish the tumor biopsy biobank.

RESULTS AND CONCLUSION: No significant differences in biological viability or histological features of tumor biopsy was detected before and after cryopreservation ($P > 0.05$), suggesting that vitrified cryopreservation can effectively preserve tumor biopsy and is favorable for the establishment of tumor biopsy biobank.

Subject headings: Cryopreservation; Liver Neoplasms; Tissue Engineering

Funding: The National Natural Science Foundation of China, No. 81472845

0 引言 Introduction

直肠癌是一种常见的恶性肿瘤,患者预后差,死亡率高^[1]。临床上15%-20%的直肠癌患者同时伴有远处转移,其中肝脏是最易转移的器官^[2]。直肠癌肝转移现阶段主要采取外科切除治疗,其术后5年生存率在25%-45%,术后配合化疗可以显著缓解症状并有效提高生存率^[3]。目前大多数药物相关抗肿瘤基础研究均基于肿瘤细胞系,但由于细胞在传代过程中逐渐丧失原始肿瘤的生物特性,导致大量临床前药敏试验最终失败^[4-5]。虽然人源化移植瘤模型也广泛应用于科学研究^[6-8],但模型建立的成功率不够稳定,且耗时很长,不利于活肿瘤标本的长期利用。

临床上的新鲜活肿瘤组织保留了原始肿瘤完整的组织结构和异质性,是科学研究的理想载体^[9]。然而由于传统的标本保存方法会使活肿瘤组织完全失去活性,导致大量宝贵的临床活肿瘤样本因无法得到及时利用和长期活性保存而被浪费,极大地限制了活性肿瘤组织的临床与基础研究^[10]。

自1985年Rau和Fahy研制出玻璃化冻存液,通过快速降温成功冻存小鼠胚胎后^[11],玻璃化冻存技术开始逐步被应用于卵母细胞、精子细胞以及多种干细胞的低温保存^[12-15]。通过使用高浓度低温保护剂,玻璃化冻存技术实现了细胞的活性保存,但组织相关的活性冻存始终没有得到突破性进展^[16]。

随着精准医学的兴起,生物样本库的重要性日益突出,活性肿瘤组织的高效利用开始成为当前医学研究的关注焦点。医学研究的发展需要大规模、高质量的疾病资源支持,高效标准的生物样本库可以为深入研究个体疾病的机制与发展提供足量资源。虽然国内不同层次的临床生物样本库相继建立,但是实际上临床标本资源并没有得到及时有效的利用^[17-18]。由于目前绝大部分样本库的标本资源均无法实现活性保存,所以目前国内尚无真正意义上的活肿瘤组织生物样本库。

本研究优化了现存的玻璃化冻存技术,建立了一套标准的活性肿瘤穿刺组织冻存复苏方法,通过对直肠癌肝转移活检组织进行冻存复苏,对比观察肿瘤组织冻存前后及其移植瘤的生物变化,并将组织冻存复苏技术引入肿瘤组织样本库的建设,通过收集105例直肠癌肝转移活检组织样本建立起一个小型生物样本库,探索冻存技术的有效性及其在活肿瘤组织样本库建设中的应用价值,为将建立大规模、高质量的活肿瘤生物样本库奠定

基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 组织学水平的对比观察实验。

1.2 时间及地点 于2016年10至2017年6月在上海市赛立维生物科技有限公司研发中心和上海市肿瘤研究所共同完成。

1.3 材料

肿瘤标本: 105例直肠癌肝转移穿刺组织样本取自上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤介入科,患者均已签署知情同意书。本实验已通过仁济医院伦理委员会批准。

实验动物: 6-8周雌性NOD/SCID小鼠(上海灵畅生物科技有限公司),饲养于上海市肿瘤研究所动物房。动物实验已通过上海交通大学医学院动物伦理委员会批准。

实验用主要试剂和仪器: 组织运输液、组织冻存液与复苏液(上海赛立维生物科技有限公司),VF-300切片机(北京伯齐科技有限公司),Calcein-AM细胞活力试剂盒(南京凯基生物技术有限公司),Hoechst33342染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),免疫组织化学抗体(上海艾博抗贸易有限公司),Olympus BX51显微镜(日本Olympus公司),Leica TCS SP8激光扫描共聚焦显微镜(德国Leica公司)。

1.4 实验方法

肿瘤组织的获取: 直肠癌肝转移活检穿刺标本取自仁济医院肿瘤介入科,采集到的新鲜直肠癌肝转移组织样本移入装有组织运输液的标本瓶,记录标本获取时间和患者相关信息,4℃冰盒保存,并在2 h内运送至实验室进行玻璃化冻存处理。

组织的冻存与复苏: 新鲜组织分为玻璃化冻存组和阴性对照组。冻存时,冻存液1(V1),冻存液2(V2),冻存液3(V3)于26℃水浴加热。将新鲜直肠癌肝转移活检穿刺组织样本经PBS清洗2遍后依次放入5 mL V1,5 mL V2,5 mL V3,分别浸泡3,3,6 min。最后直接浸于液氮不少于5 min,移入冻存管,液氮低温保存。复苏时,将冻存直肠癌肝转移组织从冻存管内取出,迅速放入37℃水浴加热的10 mL复苏液1(T1)中浸泡3 min,然后依次转入5 mL复苏液2(T2),5 mL复苏液3(T3),分别浸泡5 min,10 min。将复苏后的穿刺组织用PBS清洗2遍,浸于无菌生理盐水,冰上保存,待用。

人源化移植瘤模型的建立: 将复苏后直肠癌肝转移活

检穿刺组织接种于免疫缺陷小鼠右背侧皮下, 建立人源化移植瘤模型, 每周测2次瘤体积, 待肿瘤大小达100-150 mm³, 处死小鼠, 剥瘤, 制备组织切片。

Calcein-AM/Hoechst33342染色: Calcein染色试剂盒与Hoechst33342染色试剂盒均于-20℃保存, 使用时从冰柜取出, 室温条件下避光放置30 min后, 分别稀释至1 μmol/L和2 mg/L。切片机制备300 μm厚度切片, 将混合染色液滴于切片表面, 浸染30 min后PBS冲洗2遍, 封固, 避光保存, 待共聚焦扫描。随机选取10个染色视野, 计算活细胞比例。

苏木精-伊红染色/IHC染色: 免疫组织化学采用SP两步法, 4 μm厚度切片, 常规脱蜡水化, 体积分数3%双氧水灭活内源性过氧化物酶, 3%蛋白酶K抗原修复; 体积分数10%山羊血清封闭, 滴加抗(1:200), 4℃冰箱孵育过夜, 次日晨恢复至室温, PBS冲洗后滴加相应的抗室温孵育2 h, PBS冲洗后滴加DAB显色, 苏木精复染, 脱水透明, 中性树胶封固。光学显微镜下观察并拍照。

生物样本库的建立: 将获取的105例新鲜直肠癌肝转移穿刺组织样本严格按照标准的玻璃化冻存技术进行处理后, 转存于统一规格的组织冻存管, 管壁详细标记样本的处理日期、样本序号、组织种类, 置于大容量生物液氮罐内长期低温保存。实验记录簿作好对应标本的使用及相关信息记录, 有序整理并存储建立对应患者的临床治疗、病理、随访、知情同意等资料库及其质量控制、信息管理与应用系统。

1.5 主要观察指标 Calcein-AM/Hoechst33342染色观察肿瘤组织冻存前后细胞活性变化; 苏木精-伊红染色/IHC染色观察肿瘤组织及移植瘤冻存前后组织形态学特征和细胞增殖能力变化。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件对数据进行统计学处理, 两组间的数据比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 组织的冻存与复苏流程 活检组织的冻存复苏严格依照优化后的标准操作流程(图1A)。冻存液与复苏液见图1B。新鲜活检组织呈鱼肉状, 质地柔软, 颜色鲜红(图1C)。活检肿瘤组织冻存后呈半透明, 质地坚硬; 复苏后恢复光泽, 质地变软(图1D)。

2.2 组织冻存前后荧光染色及免疫组织化学结果 肿瘤穿刺组织冻存前活细胞比例为77.2%, 冻存后活细胞比例为75.7%, 无统计学差异(图2A, B)。肿瘤组织冻存前后组织学特征和增殖活力无显著变化(图2C)。

2.3 皮下移植瘤模型的建立 新鲜活检组织和复苏后活检组织均成功建立人源化移植瘤模型(图3A)。移植瘤的组织学特征和细胞增殖活力均未见明显变化(图3B, C)。

2.4 活肿瘤组织标本库的建立 本研究收集的105例直肠

癌肝转移活检组织样本均取自上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤介入科, 冻存后转入冻存管, 低温保存于生物液氮罐。

3 讨论 Discussion

玻璃化冻存技术是目前低温医学生物学领域研究的重要内容。近年来玻璃化冻存技术开始从生殖细胞领域转向应用于少量器官组织如卵巢的冻存^[19-30]。关于肿瘤组织活性冻存的研究, 报道甚少。如何优化冻存技术, 降低冻存试剂的毒性作用, 改善冻存效果, 最大程度保留原始肿瘤组织的生物学特性是本研究的关键。本研究优化并提出了一套标准的新型玻璃化冻存方法, 可以高度保留活检肿瘤组织的生物学特性和异质性结构, 有效提高活肿瘤标本的利用率, 对活肿瘤组织样本库的建设具有很大的应用价值。

活性肿瘤组织具有宝贵的研究价值, 广泛应用于肿瘤相关基础研究和药物研发^[5]。有研究表明, 肿瘤细胞与宿主微环境间的相互作用与肿瘤的发生发展联系紧密^[31-32]。因此, 保留肿瘤组织的生物学活性和完整的异质性结构对于研究肿瘤的发生发展至关重要。传统的组织保存方法主要包括福尔马林浸泡保存和液氮快速冷冻法, 虽然可以保留肿瘤的组织学特征, 但无法维持生物学活性^[33]。相比之下, 玻璃化低温冻存技术有效避免了冰晶对组织细胞的损害, 可以高度保持组织细胞的生物学活性^[34-36]。

目前的低温冻存方法主要包括程控降温法和阶段降温法^[37]。但由于程控降温需要在相应仪器设备的辅助配合下进行, 运作成本高昂且操作十分繁杂, 实用性较低^[38]。阶段降温法虽然冻存成本低廉, 但冻存时间过长, 不利于大规模样本的处理^[39]。而现存的玻璃化冻存方法尚不成熟, 且无标准的操作流程, 组织冻存效果参差不齐。本研究在现存的玻璃化冻存技术基础上, 进一步缩短冻存时间, 简化实验步骤, 冻存仅需17 min, 复苏仅需18 min, 无需配合复杂的精密仪器, 操作更加简便。渗透性低温保护剂二甲基亚砜为最优的细胞保护剂, 但其对细胞的毒性作用很大^[16]。

本研究摒弃了二甲基亚砜的使用, 重组冻存试剂的有效成分, 极大程度降低了传统低温冻存试剂对组织活性的毒性损伤, 实验证明复苏后的活检肿瘤组织的生物活性和组织学特征均得到高度保留, 并可成功建立人源化移植瘤模型, 体内外改变均保持一致。

当前国内建立的大多数组织生物样本库多为手术切除的标本^[40]。由于手术切除标本的获取耗时长、效率低, 不利于大规模样本的收集。此外, 由于手术切除组织往往体积较大, 在操作过程中需要分解冻存, 这对冻存的操作和样本库的运行成本均产生巨大压力。本研究小组成功冻存105例直肠癌肝转移活检组织样本, 并置于液氮

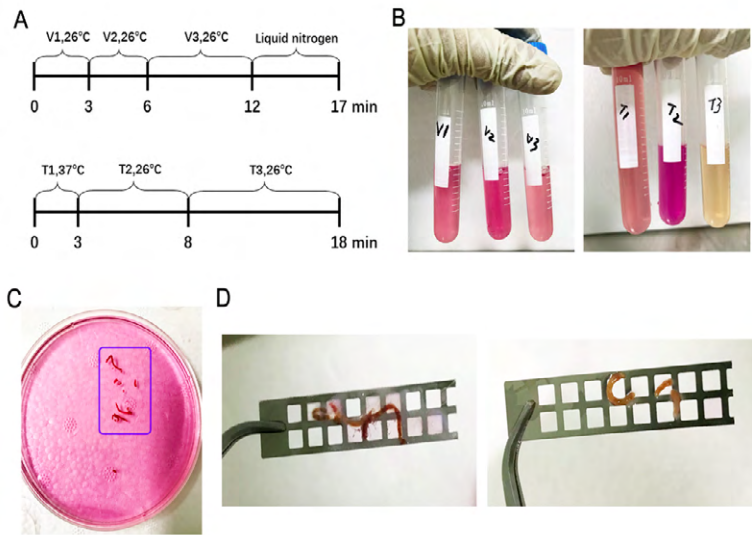


图1 直肠癌肝转移活检组织的冻存与复苏
Figure 1 Cryopreservation and resuscitation for the biopsy specimens of liver metastasis from rectal cancer
图注: 图A 上为冻存流程, 下为复苏流程; B 左为冻存液, 右为复苏液; C 为新鲜肿瘤活检穿刺组织; D 左为冻存后组织, 右为复苏后组织。

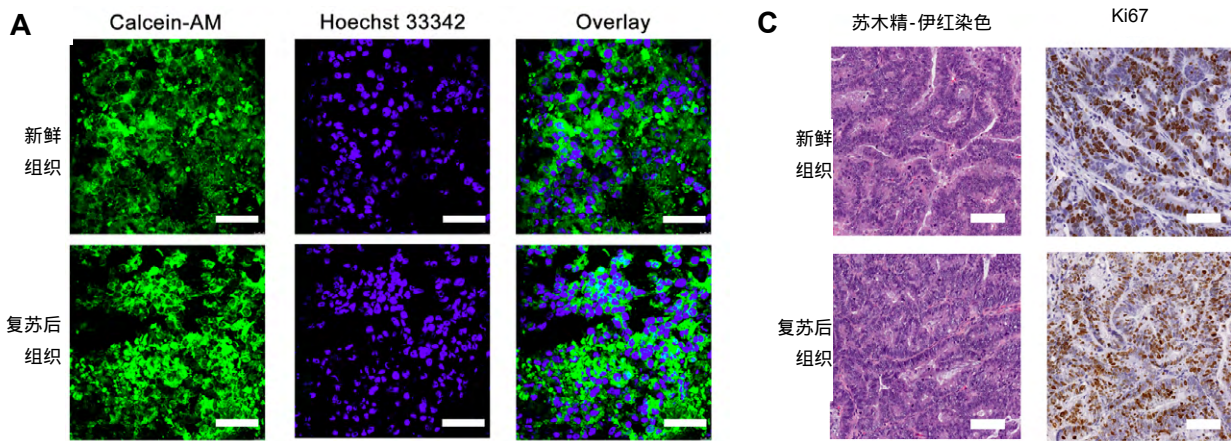


图2 组织冻存前后生物学活性及组织学特征变化
Figure 2 Biological viability and histological characteristics of the biopsy specimens of liver metastasis from rectal cancer before and after cryopreservation
图注: 图A 新鲜组织和复苏后组织的荧光染色结果, 绿色代表活细胞的细胞质, 蓝色代表细胞核; B 为新鲜组织和复苏后组织中活细胞比例($P=0.46$, $P > 0.05$); C 为组织冻存前后苏木精-伊红染色和 Ki67 标记免疫组织化学, 棕色为标记物阳性; 标尺=100 μm 。

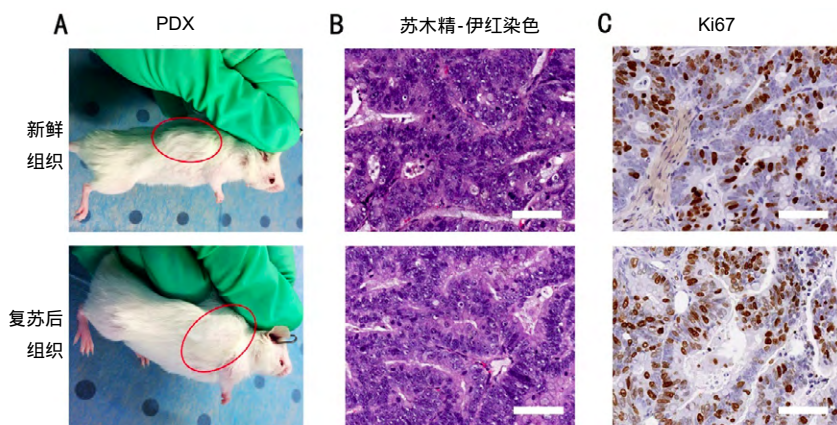


图3 组织冻存前后人源化移植瘤模型的建立
Figure 3 Establishment of humanized xenograft model before and after cryopreservation
图注: 图A 新鲜组织和复苏后组织均成功建立人源性移植瘤模型; B 为组织冻存前后苏木精-伊红染色; C 为组织冻存前后 Ki67 标记免疫组织化学, 棕色为标记物阳性; 标尺=100 μm 。

罐长期低温保存。实验结果说明,活检穿刺获取标本的效率相对手术切除高很多,短期内即可获取大量组织标本,冻存不需要分解处理,操作相对简便,样本库运行成本较低。

当然,活检组织的玻璃化冻存也有一定局限性:

(1)与手术切除标本相比,活检组织的组织量有限,在穿刺组织无法满足使用需求的情况下可在组织复苏后建立第一代移植瘤模型,以获取足够肿瘤组织用于后续的实验研究。

(2)本研究建立的样本库的规模较小,尚需进一步探索不同种类组织在玻璃化冻存过程中发生的活性改变机制,明确玻璃化冻存对不同种类细胞活性和功能的影响,统一玻璃化冻存对组织活性和功能改变的检测标准,为实现大规模的肿瘤活检组织样本库的建立与运行奠定理论基础,提供科学依据。

以组织细胞活性保存为核心的玻璃化冻存技术实用性强,拓展面广。基于冻存技术的活性组织样本库将来不仅可以用于个体患者肿瘤组织的复苏后培养,并作为药物筛选平台对临床常规药物进行体外药物敏感实验,提高临床药物或药厂新药的疗效,造福于广大癌症患者,同时建立完善一套标准的药物临床前评价体系。此外还可以应用于组织工程和器官移植,通过构建体外组织的3D培养框架,培养具备自体组织修复和功能重建的活性组织以用于组织缺损的修复与重建。

致谢:感谢上海市仁济医院肿瘤介入科、上海赛立维生物科技有限公司工作人员提供的帮助。

作者贡献:实验设计为张源、杨秋蕊,实施为张源、张洪丹,评估为朱雪晶,标本收集为李伟建、王振宇、景宏舒。翟博审校并对文章负责。

经费支持:该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(81472845)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章的第一作者/通讯作者声明在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

伦理问题:肿瘤标本的应用及实验方案获得仁济医院伦理委员会批准,动物实验获得上海交通大学医学院动物伦理委员会批准。

文章查重:文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审:文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明:第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Ozyurt H, Ozden AS, Ozgen Z, et al. Pre- and post-surgery treatments in rectal cancer: a long-term single-centre experience. *Current oncology. Curr Oncol*. 2017;24(1): e24-e34.
- [2] Kim KH, Shin SJ, Cho MS, et al. A phase II study of preoperative mFOLFOX6 with short-course radiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer and liver-only metastasis. *Radiother Oncol*. 2016;118(2):369-374.
- [3] Kindler HL, Shulman KL. Metastatic colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2001;2(6):459-471.
- [4] Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, et al. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res*. 2003;5(2):89-95
- [5] Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J*. 2014;9(9):1115-1128.
- [6] Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4): 547-573.
- [7] Gock M, Kühn F, Mullins CS, et al. Tumor Take Rate Optimization for Colorectal Carcinoma Patient-Derived Xenograft Models. *Biomed Res Int. Biomed Res Int*. 2016; 2016:1715053
- [8] Im KS, Kim JH, Graef AJ, et al. Establishment of a Patient-Derived Xenograft of Canine Enteropathy-Associated T-Cell Lymphoma, Large Cell Type. *J Comp Pathol*. 2017; 156(1):37-41.
- [9] Holliday DL, Moss MA, Pollock S, et al. The practicalities of using tissue slices as preclinical organotypic breast cancer models. *J Clin Pathol*. 2013;66(3):253-255.
- [10] Walsh AJ, Cook RS, Sanders ME, et al. Drug response in organoids generated from frozen primary tumor tissues. *Scientific Reports*. 2016;6:18889.
- [11] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. *Nature*. 1985;313(6003): 573-575.
- [12] 樊艳,张卫泽,陈永清,等. 成人脂肪间充质干细胞冻存前后的生物学特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(25): 4882-4886.
- [13] 王振玲,王金焕,郭青等. 多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞冻存前后的生物学特性[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(45): 7898-7903.
- [14] Lužnik Z, Bertolin M, Breda C, et al. Preservation of Ocular Epithelial Limbal Stem Cells: The New Frontier in Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951:179-189.
- [15] 杨琼霞,张绍志,俞雅芳,等. 动物组织细胞玻璃化冻存方法的研究进展[J]. *科技通报*, 2007, 23(2): 202-206.
- [16] 秦廷武,莫湘涛,杨志明. 生物活性产品玻璃化冷冻保存研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2005, 22(5): 1070-1074.
- [17] De Souza YG, Greenspan JS. Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits. *Aids. AIDS*. 2013;27(3): 303-312.
- [18] Caixeiro NJ, Byun HL, Descallar J, et al. Health professionals' opinions on supporting a cancer biobank: identification of barriers to combat biobanking pitfalls. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24(5):626-632.

- [19] Ochota M, Wojtasik B, Niżański W. Survival rate after vitrification of various stages of cat embryos and blastocyst with and without artificially collapsed blastocoel cavity. *Reproduction in domestic animals*. 2017; 52 (Suppl. 2): 281-287.
- [20] Paredes E, Mazur P. Dehydration Preparation of Mouse Sperm for Vitrification and Rapid Laser Warming. *Cryo Letters*. 2016;37(5):335-345.
- [21] Lužnik Z, Bertolin M, Breda C, et al. Preservation of Ocular Epithelial Limbal Stem Cells: The New Frontier in Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951: 179-189.
- [22] Yong KW, Choi JR, Wan Safwani WK. Biobanking of Human Mesenchymal Stem Cells: Future Strategy to Facilitate Clinical Applications. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951:99-110.
- [23] Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Weinfeld M. Key Issues Related to Cryopreservation and Storage of Stem Cells and Cancer Stem Cells: Protecting Biological Integrity. *Adv Exp Med Biol*. 2016;951:1-12.
- [24] Gunnala V, Schattman G. Oocyte vitrification for elective fertility preservation: the past, present, and future. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2017;29(1):59-63.
- [25] Oikonomou Z, Chatzimeletiou K, Sioga A, et al. Effects of vitrification on blastomere viability and cytoskeletal integrity in mouse embryos. *Iyqote*. 2017;25(1):75-84.
- [26] Zhou X H, Zhang D, Shi J, et al. Comparison of vitrification and conventional slow freezing for cryopreservation of ovarian tissue with respect to the number of intact primordial follicles: A meta-analysis. *Medicine(Baltimore)*. 2016;95(39): e4095.
- [27] Lima D, Silva T, Morais G, et al. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. *Reprod Domest Anim*. 2017;52 Suppl 2:235-241.
- [28] Talal A, Takroni, Hana Yu, Leila Laouar, et al. Ethylene glycol and glycerol loading and unloading in porcine meniscal tissue. *Cryobiology*. 2017;74:50-60.
- [29] Dang L, Zheng X, Chang Q, et al. Appropriate Osmotic Balance Duration for Different Volumes of Ovarian Tissue in Vitrification Solution: a Study of Ovary Tissue Vitrification and Transplantation in Sheep. *Cryo Letters*. 2016; 37(5):365-378.
- [30] Laronda MM, Mckinnon KE, Ting AY, et al. Good manufacturing practice requirements for the production of tissue vitrification and warming and recovery kits for clinical research. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(2):291-300.
- [31] Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18(6):884-901.
- [32] Naipal KA, Verkaik NS, Sánchez H, et al. Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *BMC Cancer*. 2016;16:78.
- [33] Zeng M, Yang QR, Fu GB, et al. Maintaining viability and characteristics of cholangiocarcinoma tissue by vitrification-based cryopreservation. *Cryobiology*. 2017;78: 41-46.
- [34] Wei M, Zhang B, Liu Z. [Experimental study on cryopreservation of arterial allografts by vitrification]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005;19(4): 251-254.
- [35] Elder E, Chen Z, Ensley A, et al. Enhanced tissue strength in cryopreserved, collagen-based blood vessel constructs. *Transplant Proc*. 2005;37(10):4625-4629.
- [36] Son WY, Chung JT, Gidoni Y, et al. Comparison of survival rate of cleavage stage embryos produced from in vitro maturation cycles after slow freezing and after vitrification. *Ferti Steril*. 2009;92(3):956-958.
- [37] 陈凯, 李欣然, 宣言. SD 大鼠骨髓间充质干细胞在-80 低温条件下的冻存[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(10):1433-1438.
- [38] 王艳盛, 谢莎莎, 王燕蓉, 等. 促卵泡刺激素干预改善绵羊卵巢组织玻璃化冻存后异种移植的效果研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(18):3301-3304.
- [39] 王秋实, 王欢, 杨巧妮. 阶段降温冷冻保存淋巴瘤患者自体造血干细胞临床应用观察[J]. *中国输血杂志*, 2008, 21(1):34-35.
- [40] Bruna A, Rueda OM, Greenwood W, et al. A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell*. 2016;167(1):260-274. e22.