

深低温冷冻技术的研究进展

初超 侯利民[△] 刘明辉

(哈尔滨医科大学附属第一医院急诊外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 细胞及组织的深低温保存有较高的临床应用和研究价值,在冷冻保存技术中两个关键领域首先发展的是冷冻控制率。冷冻保护剂能增加溶液粘性,提高冷冻速率从而保护细胞及组织免受冷冻损伤。对最佳冷冻保护剂的研究为保存临床应用的组织工程产品提供了理论依据。而玻璃化冷冻近年来越来越受到人们的关注,玻璃化冷冻技术具有冷冻速度快、冻融损伤小,操作简单等优点,能够提高复苏后的存活率。本文对深低温保护剂的组成、分类、应用及冷冻保存的重大进展和障碍进行了综述。

关键词 玻璃化;深低温;冷冻保护剂

中图分类号:R318 R318.08 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)19-3766-04

Research Progress of Profound Hypothermia

CHU Chao, HOU Li-min[△], LIU Ming-hui

(First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Emergency Surgery, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

ABSTRACT: Deep cryopreservation of cells and tissues has high clinical and research value. Controlled-rate freezing, one of the two key fields in cryopreservation techniques, is the first one to be developed. Cryoprotectants protect cells and tissues from freezing injury by increasing the solution viscosity and the freezing rate. Researches on the optimal Cryoprotectant provide the theory basis for preservation and clinical application of tissue-engineered products. Vitrification in recent years is getting more and more attention. Vitrification has the merits such as frozen fast, less freeze-thaw damage and easy operation. It can improve the survival rate after cryopreservation. In this review, the composition, classification, application and development of Cryoprotectant are demonstrated and the major strides and obstacles in cryopreservation will be reviewed.

Key words: Vitrification; Profound hypothermia; Cryoprotectant

Chinese Library Classification(CLC): R318, R318.08 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)19-3766-04

据报道,全球每年有上千万人遭遇到各种创伤,数百万人因疾病导致重要器官发生纤维化而丧失功能。近年来对组织工程的研究促进了再生医学的发展,但是对细胞及组织的深低温保存是目前急需解决的问题。

冷冻保存过程包括冷冻保护剂的加载、冷冻降温、低温储存、解冻以及冷冻保护剂的移出。上述每一步均可对冷冻后细胞及组织的存活率及结构功能产生影响。

细胞冷冻和解冻过程中细胞内形成冰和细胞脱水是影响冷冻过程细胞活性的主要因素^[1]。溶质损伤效应是指水的冻结使细胞间隙内的液体浓缩,从而使电解质的浓度增加。在冷冻过程中的某一温度范围内溶质损伤效应是最明显的,这一温度介于水的冰点和该溶液完全固化的温度之间,在冷冻过程中若能一较高的冷却速率越过这一温度范围,能大大减少溶质损伤效应产生的不良后果。机械损伤效应是细胞内外产生的冰晶对细胞的损伤。冷冻时形成的冰晶直接损伤细胞的膜结构,从而影响细胞的生理及代谢功能的正常发挥。

传统的低温保存采用慢速冷却低温保存法^[2-6]。但这一方法受冷却速率的影响,对保存的细胞及组织造成损伤。若降温速

率过快会形成胞内冰,这些胞内冰会在解冻复温时发生再结晶使细胞受损。若降温速率过慢细胞过度收缩,并且细胞处于高浓度溶液中也会受损。

玻璃化是指由液态转为非晶态(玻璃态)的固化过程,其本质是液体在冷冻固化过程中,形成高度粘稠状态,其内部无晶体或仅少量结晶形成。在此状态下,由于分子的运动受到高度的束缚,物质的结构、成分可长期保持稳定不变^[7]。

溶液实现玻璃化一般有两条途径,即极大的提高冷却速率和增加溶液浓度。采用快速或超快速的冷却方法在低浓度保护剂作用下实现玻璃化,但是由于热传导的原因,不可能使整个系统都达到如此高的冷却速率。在纯水中加入溶质,可以降低玻璃化所需的冷却速率。玻璃化所需浓度的范围为0.4~0.6 g/cm³这对于多数细胞或组织来说是有害的。因此,深低温保存研究的重点是,寻找细胞毒性较小且容易实现玻璃化的冷冻保护剂。此外,冷却速度是用液氮或半融雪状液氮取得的,在使用液氮时,将样品放入后,导致样品的每分钟降温达到数百摄氏度,这取决于容器、体积、导热系数、溶液的组成等^[8],为了实现液氮的半融雪状需要将液氮冷却至接近冰点(-210℃),这可以使用IMT公司生产的VitMaster,这一装置可以通过负压将液氮的温度降至-205℃至-210℃之间。半雪融状的液态氮可以显著提高冷却速度,这样可以提高被保存样品的存活率。

冷冻保护剂是在冷冻和复温过程中取代细胞或组织中的水分,从而减少冰晶的形成对细胞造成的损害,促进细胞内形

作者简介:初超(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:低温冻存技术,Tel:15244619813 E-mail:chuchao0922@163.com

[△]通讯作者:侯利民(1969-),男,教授,

E-mail:houlimin1969@163.com

(收稿日期:2012-02-28 接受日期:2012-03-23)

成无定形的玻璃态^[9]。冷冻保护剂能增加溶液粘性,提高冷冻速率从而保护细胞及组织免收冷冻损伤。目前研究发现大约有50多种药物或试剂被应用于冷冻保护剂^[10]。

1 冷冻保护剂的分类

冷冻保护剂可以根据他们在深低温保存中的作用分为两大类:渗透性和非渗透性保护剂。渗透性保护剂以多元醇类为主,包括乙二醇(EG)、二甲亚砜(DMSO)、丙二醇、丙三醇、甲酰胺和乙酰胺等^[11,12]。渗透性保护剂的作用是通过降低冰点,取代细胞内蛋白、DNA和其他成分周围的水分,减少或避免细胞内冰晶形成。冷冻时加入渗透性保护剂可以降低溶质的浓度,减少细胞对盐的摄入,而由保护剂替代摄取。冷冻保护剂进入细胞内,改变了细胞内过冷的状态,使细胞内外压相接近,减少或避免了细胞脱水引起的皱缩程度和速度。解冻复温时,渗透性保护剂进出细胞缓解了渗透性肿胀引起的损伤。

非渗透性保护剂主要包括低分子量的单糖(如果糖、葡萄糖、麦芽糖等)、双糖(蔗糖、海藻糖等)、多糖类(棉子糖等)以及分子量大于1000Da的高分子化合物(聚蔗糖、右旋糖酐、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、聚乙烯醇和羟乙基淀粉等)^[13,14,18]。非渗透性保护剂有利于改善保护液的玻璃化性质,提高冷冻保护效果,同时通过渗透作用促使细胞脱水,稳定细胞膜,降低达到玻璃化本身所需要的冷冻保护剂的用量,从而减少玻璃化溶液的毒性。研究证实,在玻璃化冷冻液中添加多种渗透性保护剂及不同的非渗透性保护剂对细胞和组织进行玻璃化冻存的效果更好,对细胞和组织解冻复温后的形态和存活率影响较小,一般情况下,玻璃化溶液中含有的渗透性保护剂的浓度大于30%,非渗透性保护剂蔗糖的浓度通常在0.1-1mol/L。

2 冷冻保护剂的应用

近些年来,一种能抑制冰晶生长具有特殊功能的蛋白,主要由糖肽和多肽组成的抗冻蛋白^[15]被应用于冷冻保护剂中。抗冻蛋白可以与冰晶结合并且控制其生长,在不影响细胞质渗透压的情况下降低体液的冰点。此外,抗冻蛋白的抗冻作用与本身的性质有关,而与数量无关,因此它对生物基质的渗透压影响很小。在温度波动时,冰晶进行重结晶,往往对生物造成致命伤害,而抗冻蛋白可以抑制重结晶,防止小的冰晶凝结成更大的冰晶,使形成的晶粒体积小且均匀。另外,有些学者尝试在冷冻保护剂中加入中药提取物人参总皂甙,人参应用于中医已有已有两千多年的历史,由于其广泛的药理作用受到众多学者的重视,其主要的成分包括人参总皂甙、人参多糖和多种活性肽等,这其中主要的成分是人参总皂甙,它能够抑制或延缓细胞的死亡^[16]。王建伟^[17]等人将不同剂量的人参总皂甙与复苏的骨髓造血细胞共培养,检测人参总皂甙对骨髓造血细胞冷冻损伤可恢复性的影响,结果他们发现一定浓度的人参总皂甙使部分受损的冻存造血祖细胞的生物学活性得以快速恢复,这一浓度为25~50μg/mL。

许多研究已经证实对细胞及组织进行低温冷冻保存时使用冷冻保护剂比不用冷冻保护剂效果更好^[18,19]。Stief^[20]等还观察比较了在不同的冷冻保护剂下,不同的降温速度对保存物所产生的影响,结果发现降温速度和冷冻保护剂均会对防冻效果

产生很大影响,其中VS55和DP6是当前比较常用的由多种成分组成的冷冻保护剂。

另外,除了选择最佳浓度的保护剂和如何降低其毒性作用以外,在进行深低温冷冻过程中,不同的操作方法也会解冻复温后的细胞及组织的代谢活性、存活率产生不同的影响。Young S. Song^[21]等人制作了一个微流体装置,被保存的细胞从装置的中间通道注入,同时,冷冻保护剂从两侧流入微流体通道内,当细胞沿着通道移动时,冷冻保护剂也逐渐向通道内弥散。通过这一装置,细胞在沿着微流体通道移动时逐渐适应冷冻保护剂浓度的变化,因此,可以将由于渗透冲击所产生的损伤降到最小。通过调整冷冻保护剂和细胞液的流速,我们可以主动控制冷到保护剂的浓度。在解冻复温过程中,应用类似的装置将冷冻保护剂从已解冻的细胞中移除,这样使得冷冻保护剂的浓度逐渐降低,减少对细胞的损伤。

最后,通过对使用微流体装置进行低温保存的细胞和未使用该装置的细胞的活性进行观察,结果表明,通过微流体装置后大大减少渗透损伤的细胞,其解冻复温后的生物活性明显高于未使用该装置的细胞。在封闭的系统中可以实现高冷却速率的优势,并且操作起来更安全,更简单。

3 其他影响因素

减少玻璃化冷冻的体积和增加冷冻速率,可以使冷冻保护剂浓度缓慢下降,从而减少其毒性和渗透压的有害影响^[22]。另外,增加培养基的粘度可以是玻璃化转化温度变大,从而减少毒性。结合以上三个因素可以总结出玻璃化率的一般方程:玻璃化率=(冷却速率×粘度系数)/体积^[23]。

为了改善冷冻保存的成活率,几种可能的操作加强生物系统的薄弱环节,这些比较敏感的方面包括细胞膜、细胞骨架、细胞内脂质、细胞内水分等。

细胞膜对寒冷非常敏感,往往在冷冻过程中受损^[24]。细胞膜中含有胆固醇成分,胆固醇的含量及胆固醇与膜磷脂之间的比例很大程度上决定了细胞膜的通透性和对低温的敏感性^[25,26]。细胞骨架是在冷冻过程中经常受损的细胞成分之一^[27]。由于细胞骨架的稳定性,因此可以用来改善冻存后的存活率,这可以通过增加细胞骨架的成分,如在进行冷冻前可以在培养基中加入松胞菌素B或D或秋水仙碱,但是松胞菌素B可能造成不可逆转的肌动蛋白解聚,这可能影响冻存后的存活率^[28]。细胞内脂质的作用尚不完全清楚,有人认为它是细胞生长能量的来源^[29],有人认为它为细胞分裂提供能量^[30]。

4 冷冻保存技术在临床中的应用

目前,玻璃化冻存较多的应用于肝细胞和生殖系统的冻存及储存。例如,Claire Terry^[31]等人对用于肝移植的肝细胞的玻璃化超低温冷冻保存的研究发现,细胞密度、冷冻保护剂的添加、冷冻温度的设定及解冻方法都会影响解冻后肝细胞的功能及活性。他们发现冻存的细胞密度至少要大于 3×10^6 ,冷冻保护剂需要逐步加入,在细胞解冻时加入葡萄糖和果糖可以显著改善细胞的功能。Mona Sheikhi^[32]等人发现使用玻璃化冷冻保存后的人类卵巢组织中的卵泡的超微结构,在光学显微镜和电镜下无明显变化。此外,玻璃化冷冻保存组织工程化肌腱种子细

胞也取得了较好的效果^[33],其保存后的组织工程化肌腱种子细胞的胶原分泌功能、细胞生长曲线、细胞周期及染色体众数等不产生明显变化,可以作为人体成纤维细胞的保存方法。Konfron^[34]等也应用深低温技术保存组织工程骨取得了一定的成功,为创伤或肿瘤而致骨缺损的治疗提供了新的组织来源选择。

上个世纪低温生物学取得了快速的发展,在冷冻过程中发生的损害主要与寒害、渗透压、渗透保护剂的毒性、冰结晶有关^[35-37]。一般情况下,我们在进行玻璃化冷冻时增加冷却和复温率来减少这些损害。在过去,玻璃化冻存是以高的冷却速率和高浓度的冷冻保护剂为基础的,这会起化学毒性和渗透压的双重损害。在玻璃化冷冻领域取得的重大突破是将取样容积减小到冷冻保护剂浓度允许的水平。我们相信,玻璃化溶液和容器的商业化可以加快深低温冷冻保存领域的发展。在低温生物学领域的其他突破,将有助于这一领域的发展。尽管深低温保存技术在保存某些单细胞和简单多细胞方面取得了成功,但是,低温冷冻损伤的机制还未完全研究清楚。而且,深低温保存的成功与否还与不同的冷冻对象、冷冻保护剂、冷冻工具以及最佳降温速率等条件有关,因此,还需进一步的实验研究,提高其保存的成功率。

参考文献(References)

- [1] Li A P. Overview. hepatocytes and cryopreservation a personal historical perspective [J]. *Chemico- Biological Interactions*,1999,121(1):1-5
- [2] Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing [J]. *Nature*,1971,233:125-126
- [3] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C [J]. *Science*,1972,178:411-414
- [4] Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing [J]. *Life Sciences*,1972,11:1071-1079
- [5] Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, et al. Deep freezing of sheep embryos [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*,1976,46:151-154
- [6] Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA. The viability of deep-frozen cow embryos [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*,1978,52:391-393
- [7] 李广武,郑从义,唐兵,等.低温生物学[M].湖南科学技术出版社,1997,69-71:101-105
Li Guang-wu, Zheng Cong-yi, Tang Bing, et al. *Cryobiology* [M]. Hunan Science and Technology Press,1997,69-71:101-105
- [8] Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions [J]. *Theriogenology*,2007,67:81-89
- [9] Kuleshova LL, Gouk SS, Huttmacher DW. Vitrification as a prospect for cryopreservation of issue-engineered constructs [J]. *Biomaterials*,2007,28(9):1585-1596
- [10] 郑军华,阎志廉,朱有华,等.器官保存学[M].第二军医大学出版社,2000:59-68,98-99
Zheng Jun-hua, He Zhi-lian, Zhu You-hua, et al. *Organ Preservation* [M]. Second Military Medical University Press,2000:59-68,98-99
- [11] Chen SU, Lien YR, Chen HF, et al. 2005b Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1, 2-propanediol plus sucrose followed by ICSI [J]. *Human Reproduction*,2005,20:1975-1980
- [12] Luz MR, Holanda CC, Pereira JJ, et al. Survival rate and in vitro development of in vivo-produced and cryopreserved dog embryos [J]. *Reproduction, Fertility, and Development*,2009,22:208-209
- [13] Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, et al. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability [J]. *Theriogenology*,2001,55:923-936
- [14] Barcelo-Fimbres M & Seidel GE Jr. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation [J]. *Molecular Reproduction and Development*,2007b,74:1395-1405
- [15] A.V. Makarevich, E. Kubovits, M. Popelkov, et al. Chrenek Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant [J]. Cambridge University Press, 2009, *Zygote* 18 (May):145-153
- [16] 赵文莉,张立实,李宁.人参皂甙的药理及毒性作用研究进展[J].国外医学卫生学分册,2008,35(3):165-169
Zhao Wen-li, Zhang Li-shi, Li Ning. The pharmacological and toxic effects of ginsenosides research progress [J]. *Foreign Medical Sciences (Section Hygiene)*,2008,35(3):165-169
- [17] 王建伟,王亚平,王莎莉,等.人参总皂苷对骨髓造血细胞冷冻损伤的可恢复性研究[J].中草药,2004,35(4):420-422
Wang Jian-wei, Wang Ya-jun, Wang Sha-li, et al. Effect of total saponins of Panax ginseng on recoverable ability from cryopreservation damage of human bone marrow hematopoietic stem cells [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*,2004,35(4):420-422
- [18] Zieger MA, Tredget EE, McGann LE. Mechanisms of cryoinjury and cryoprotection in split-thickness skin [J]. *Cryobiology*,1996,33(3):376-389
- [19] Leunig M, Yuan F, Bek DA, et al. Heating or freezing bone: Effect on angiogenesis induction and growth potential in mice [J]. *Acta Orthop Scand*,1996,67(4):383-338
- [20] Stief PS, Palastro M, Wan CR, et al. Cryomicroscopy of vitrification, Part II: Experimental observations and analysis of fracture formation in vitrified VS55 and DP6 [J]. *Cell Preserv Technol*,2005,3(3):184-200
- [21] Young S. Song, SangJun Moon, Leon Hulli, et al. Microfluidics for Cryopreservation [J]. NIH Public Access Author Manuscript,2009,9(13):1874-1881
- [22] Yavin S, Aroyo A, Roth Z, et al. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush [J]. *Human Reproduction*,2009,24:797-804
- [23] Joseph Saragusty, Amir Arav. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification [J]. *Reproduction*,2011,141:1-19
- [24] Zeron Y, Tomeczak M, Crowe J, et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity [J]. *Cryobiology*,2002,45:143-152
- [25] Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock [J].

Cryobiology,1977,14: 466-470

- [26] Horvath G, Seidel GE Jr. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin[J]. Theriogenology,2006,66:1026-1033
- [27] Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification[J]. Biology of Reproduction,2000,62:564-570
- [28] Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TAE. 2005 Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos[J]. Reproduction,2005,129:789-798
- [29] Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development[J]. Reproduction in Domestic Animals,2009,44:50-58
- [30] Yoneda A, Suzuki K, Mori T, et al. 2004 Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos[J]. Journal of Reproduction and Development,2004,50:287-295
- [31] Claire Terry, Anil Dhawan, Ragai R. Mitry, et al. Optimization of the Cryopreservation and Thawing Protocol for Human Hepatocytes for Use in Cell Transplantation [J]. Liver Transplantation,2010,16:229-237
- [32] Mona Sheikhi, KjellHultenby, BoelNiklasson, et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue [J]. Human Reproduction,2011,26(3):594-603
- [33] 朱肖奇, 杨志明, 解慧琪, 等. 组织工程化肌腱种子细胞深低温保存的实验研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 23(1):159-165
Zhu Xiao-qi, Yang Zhi-ming, Xie Hui-qi, et al. Experimental Study on Cryopreservation of Seeding Cells of Tissue Engineered Tendons [J]. Journal of Biomedical Engineering,2006,23(1):159-165
- [34] Kofron MD, Opsitnick NC, Attawia MA, et al. Cryopreservation of tissue engineered constructs for bone[J]. Orthop Res,2003,21(6):1005-1010
- [35] Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells [J]. Experimental Cell Research,1972,71:345-355
- [36] Quinn PJ. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes[J]. Cryobiology,1985,22:128-146
- [37] Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, et al. Do physical forces contribute to cryodamage ? [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009,104:719-728

(上接第 3755 页)

- [23] Gharib SA, Dayyat EA, Khalyfa A, et al. Intermittent hypoxia mobilizes bone marrow- derived very small embryonic-like stem cells and activates developmental transcriptional programs in mice[J]. Sleep, 2010,33(11):1439-1446
- [24] Shin DM, Liu R, Klich I, et al. Molecular characterization of isolated from murine adult tissues very small embryonic/epiblast like stem cells (VSELs)[J]. Mol Cells,2010,29:533-538
- [25] Ratajczak MZ, Shin DM, Liu R, et al. Epiblast/germ line hypothesis of cancer development revisited: lesson from the presence of Oct-4+ cells in adult tissues[J]. Stem Cell Rev,2010,6:307-316
- [26] Ratajczak J, Zuba-Surma E, Klich I, et al. Hematopoietic differentiation of umbilical cord blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells[J]. Leukemia,2011,25(8):1278-1285
- [27] Ratajczak MZ, Shin DM, Ratajczak J, et al. A novel insight into aging: are there pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs) in adult tissues overtime depleted in an Igf-1-dependent manner?[J]. Aging,2010,2:875-883
- [28] Zuba-Surma EK, Wu W, Ratajczak J, et al. Very small embryonic-like stem cells in adult tissues-Potential implications for aging. [J]. Mechanisms of Ageing and Development,2009,130:58-66
- [29] Shin DM, Kucia M, Ratajczak MZ. Nuclear and chromatin reorganization during cell senescence and aging a mini-review. [J]. Gerontology, 2011, 57(1): 76-84
- [30] Bhartiya A, Shaikh P, Nagvenkar, et al. Very Small Embryonic-Like Stem Cells with Maximum Regenerative Potential Get Discarded During Cord Blood Banking and Bone Marrow Processing for Autologous Stem Cell Therapy [J]. Stem Cells Development,2012,21(1):1-6
- [31] Moranco A, Rosell A, Barcia-Bonilla L, et al. Metalloproteinase and stroke size; role for anti-inflammatory treatment [J]. Ann NY Acad Sci,2010,1207:123-133
- [32] Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review[J]. Comp Neurol,2009,515:125-144
- [33] Farin A, Liu CY, Langmoen IA, et al. Biological restoration of central nervous system architecture and function: part 3-stem cell- and cell-based applications and realities in the biological management of central nervous system disorders: traumatic, vascular, and epilepsy disorders[J]. Neurosurgery,2009,65:831-859
- [34] Paczkowska E, Kawa M, Klos P, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) -a promising new candidate for use in preclinical and clinical selection of pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSEL SCs) of high long-term repopulating hematopoietic potential [J]. Ann Transplant,2011,16(3):59-71