

同种异体软骨低温保存技术的应用现状及影响因素

洪郭驹¹, 韩晓蕊²

(1. 阿尔伯塔大学医学院, 加拿大 埃德蒙顿 T6G 2R3;

2. 华南理工大学医学院, 广东 广州 510641)

摘要 同种异体软骨移植作为一种新兴的治疗方法, 主要用于重建关节中的软骨结构。低温保存技术作为该疗法实施过程中的一项关键技术, 可以保持同种异体软骨结构完整及软骨细胞活性直至移植。低温保存介质、低温保存的时间及移植软骨的体积等因素均会对同种异体软骨低温保存的效果产生影响, 最终影响同种异体软骨移植的疗效。本文从同种异体软骨组织低温保存技术的应用现状和同种异体软骨低温保存的影响因素 2 个方面对该技术的研究进展进行了综述。

关键词 组织保存; 低温保存; 软骨; 关节; 移植; 同种

关节软骨病变是骨科医生所面临的挑战之一^[1], 如果不及时治疗, 可导致关节运动障碍并致残^[2-3]。目前, 针对此类病变的非手术干预措施包括物理疗法、改变生活方式、口服或注射药物, 手术方式主要包括关节置换和关节镜手术等方法^[4-5]。但活动量大的年轻人作为关节软骨病变的主要人群, 外科治疗并非首选^[6]。

人体组织保存技术的发展、器官捐献人群的增加及组织库的兴起, 为新兴的同种异体软骨移植技术的发展应用奠定了基础^[7-9]。不同于骨髓刺激技术和自体软骨细胞移植技术, 同种异体软骨移植在软骨重建中效果良好, 可用于治疗部分或整个关节的软骨缺损^[10]。目前, 在 4℃ 低温保存仍是最实用的方法^[11], 但要长期保存同种异体软骨, 且软骨体积较大时, 仍存在较大的困难。

鉴于同种异体软骨保存技术在软骨重建领域的重要性, 本文从同种异体软骨组织低温保存技术的应用现状和同种异体软骨低温保存的影响因素 2 个方面对该技术的研究进展进行了综述。

1 同种异体软骨组织低温保存技术的应用现状

组织低温保存是指在生物体死亡后 24 h 内, 收集新鲜组织于 2~10℃ 保存^[12]。迄今为止, 大多数研究都采用低温保存技术来储存从供体分离出来的同种异体软骨组织, 以维持其活性^[11]。经过长期的观察发现, 与冰冻保存相比, 低温保存可以保持软骨的硬度, 并更好地保持软骨细胞和基质的完整性^[13]。

Williams 等^[14]的研究表明, 在低温保存条件下, 软骨细胞可在自供体收集后的 29 d 内保持较高的活性, 其中第 1 天为 100%、第 2 天为 98.2%、第 15 天为 80.2%、第 29 天为 80.6%, 之后开始下降, 45 d 后为 64.6%, 60 d 后又下降为 51.6%。Laprade 等^[15]的研究结果也证实, 低温条件下 28 d 内软骨细胞活性较高。Cook 等^[16]对同种异体软骨进行了长达 2 个月的保存, 并将其植入成年雌性狗体内; 结果显示, 在 4℃ 或 25℃ 且无血清保存条件下, 软骨细胞活性可达 70%。

此外, 低温保存同种异体软骨移植在临床试验中也取得了令人满意的结果^[7,11]。在一项为期 7 年的前瞻性研究中, 采用低温技术保存的同种异体软骨移植治疗骨坏死, 未见失败病例, 而且没有患者需要二次手术^[17]。Giannini 等^[18]将低温保存的同种异体软骨用于踝关节病变的治疗中, 术后患者的美国足与踝关节协会评分从 31 分提高到 65 分, 同种异体软骨存活率超过 70%。Balazs 等^[19]报道了 11 名运动员的治疗记录(涉及 14 个缺损位置), 所有缺损均通过关节切开术进行了低温保存的异体骨软骨移植, 术后恢复时间的中位数为 14 个月, 术后运动水平可恢复至伤前的 80%。

2 同种异体软骨低温保存的影响因素

尽管低温保存同种异体软骨已经成为软骨重建治疗中的一项成熟的保存技术, 但仍然有很多重要因素在影响着同种异体软骨的保存效果。这些因素包括储存介质、储存时间和移植软骨组织的体积等。

2.1 低温保存介质 从供体收集来的新鲜软骨通常需要低温保存于合适的培养基中,以维持关节软骨内的细胞活力^[11]。为了延长保存时间及保证储存的安全性,有若干种具有营养成分的介质可用于移植前低温条件下的组织保存。

2.1.1 乳酸林格氏溶液 Sammarco 等^[20]的研究证实,乳酸林格氏溶液在组织储存的初始阶段有效,特别是在储存的前 48 h 内细胞活性可达 100%,但储存 48 h 后细胞活性会迅速下降。另外,添加抗生素是乳酸林格氏溶液运用的常规方法。Levy 等^[21]将同种异体软骨保存在含有 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢唑林和 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 庆大霉素的乳酸林格氏溶液中,在移植手术后平均 13.5 年的随访中,同种异体软骨的存活率达到 53%,到随访终点时只有 24% 的患者去除了移植物。McCulloch 等^[22]采用同样的保存介质,对患者的关节功能进行了平均 2.9 年观察,其中 84% 的患者恢复了体力活动,影像检查可见病灶均基本愈合。而在另一项研究中,有 66 例接受膝关节软骨移植的患者,所用保存介质相同,5 年内同种异体软骨的存活率为 89.5%,10 年后为 74.7%^[23]。

2.1.2 无血清培养基 采用无血清培养基保存的研究中,临床效果并不理想。在一项针对 32 例患者的队列研究中,异体软骨组织储存在包含 L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和抗生素的无血清培养基中,结果有 6 例患者(19%)最终进行了关节置换手术,47% 的患者在 1 年的随访结束时发现患有骨关节炎^[24]。在另一项纳入 28 例患者的研究中,均采用无血清培养基保存软骨,移植的失败率高达 28.6%^[25]。采用无血清培养基保存的软骨进行软骨移植手术,术后并发症发生率较高。Hahn 等^[26]的研究中,38.5% 的患者术后出现了严重并发症。为此,研究者试图通过改进无血清培养基的配伍成分来提高疗效。在最近的一项研究中,研究者发现,在无血清培养基中添加含氮双磷酸盐可以极大地促进软骨细胞的活力并维持基质成分,在猪软骨损伤模型中移植后可改善软骨和骨的结合^[27]。

2.1.3 营养性培养基 相比之下,营养性培养基(如胎牛血清和 N-乙酰半胱氨酸)中保存的软骨则显示出比较恒定的高软骨细胞活性。研究指出,向培养基中添加胎牛血清对保持软骨细胞活性有益(细胞活性 68%),采用无血清培养基保存的软骨组织的细胞活

性则只有 23.5%^[28]。Görtz 等^[29]进行了一项针对骨坏死患者的研究,该研究使用含胎牛血清的培养基保存移植软骨,移植后软骨的成活率高达 89%。在 Calvo 等^[30]的研究中,采用以含有 1 mmol N-乙酰半胱氨酸 的培养基保存 4 周后的移植物,临床效果良好。Sadr 等^[31]在一项同种异体骨移植的临床试验中使用了未公布成分的营养培养基,最终手术失败率 8%,尽管长期随访有 54.2% 的患者接受了二次手术,但这并不影响移植手术的初期有效性。

2.2 低温保存时间 同种异体软骨的保存时间(从供体处收集至移植到受体的时间),是影响软骨细胞活性的关键因素。目前,大部分同种异体软骨需要在供体死亡后的 24 h 内收集^[11]。同种异体软骨的低温保存时间为 1 周至 1 个月,甚至达到 43 d^[21,32-33]。通常情况下,收集的同种异体软骨在 7 d 内完成移植手术。Levy 等^[21]在 20 年的随访研究中发现,122 例患者在供体提供软骨 7 d 内进行了移植手术,最终结局是 66% 的移植存活率和 47% 的二次手术率。Haene 等^[34]的研究发现,在保存 7 d 的条件下,16 例进行踝关节骨软骨移植手术患者的移植失败率为 29.4%,并在影像检查时发现软骨下骨等部位存在多个溶骨性病变。Schmidt 等^[35]观察了移植物保存时间对临床疗效和移植物存活率的影响,移植物平均保存 6.3 d (1~14 d),他们认为选用延长保存时间的移植物对膝关节大面积软骨损伤是安全有效的。

但是,由于存在感染的风险,延长同种异体软骨的保存时间并非最好的选择。通常,血清学和微生物学测试会贯穿整个保存过程直至移植结束。如果 2 个测试均没有观察到微生物感染,则软骨可用于移植^[36]。有研究者认为,15~28 d 是移植物保存的最佳时间^[7]。但关于这一提法目前并没有较为一致的结论。有文献报道称,采用保存了 5~28 d 的移植物治疗软骨缺损或骨软骨炎后未见失败病例,术后患者的关节功能评分和关节活动度均有所提高^[15]。在另一个报道中,患者软骨移植手术后的关节功能改善高达 89%,随访 10 年后同种异体软骨的存活率为 78.1%^[37]。另一项随访 9.6 个月的研究中,移植物保存了 7~30 d,术后患有关节疾病的运动员生活质量得到改善,79% 的患者恢复了运动^[38]。相比较而言,保存相同时间的移植物在踝关节病变当中的表现要比在膝关节差。在 Bugbee 等^[39]的研究中,同种异

体软骨保存 7 ~ 28 d 后被用于踝骨关节炎患者的治疗中,最终 42% (86 例) 的患者需要二次手术。又如 Jeng 等^[40]追踪了 29 例接受软骨移植的踝关节病变患者,软骨保存 18 ~ 28 d,移植失败率为 48.3%。

关于异体软骨的最长低温保存时间至今没有一致的结论。Ranawat 等^[41]将新鲜的同种异体软骨植入山羊股骨中,软骨低温保存时间为 1 ~ 42 d;结果提示,与冷冻对照组相比,低温保存组软骨的蛋白聚糖含量更高。在人体研究中,软骨低温保存的时间也有超过 40 d 的案例。在一项膝关节软骨移植的研究中,移植物保存了 42 d,患者的满意率为 86%,并发症发生率为 2.4%^[42]。在另一项软骨缺损修复的研究中,新鲜的同种异体软骨保存了 17 ~ 42 d 不等,移植后软骨均能保持结构完整,患者关节功能恢复良好^[32]。在 Davidson 等^[43]的研究中,同种异体软骨的平均存储时间为 36 d (28 ~ 43 d),存储不同时间的软骨在软骨细胞密度和软骨细胞活性方面均无差异。Rauck 等^[44]还发现,低温保存时间与关节活动评分或移植物分层之间没有相关性。

2.3 移植软骨组织的体积 大尺寸的同种异体软骨为移植前的形状设计和修形提供了更多选择。然而在实操中,软骨的体积受到诸多限制。首先,术前很难完美匹配供体和受体(通常需要采用普通 X 线、CT 或 MRI 在术前进行匹配),而可用移植物的体积又取决于供体软骨的状态。另外,在保存过程中还需要考虑同种异体软骨的成分和结构,如果所用的保存介质因为移植物体积过大,难以快速、均匀地扩散到移植物中,极有可能导致移植失败。Meric 等^[33]的研究表明,同种异体移植物的体积与手术失败率之间存在明显的相关性。

3 小 结

低温保存技术作为同种异体软骨移植手术中的一项关键技术,目前在临床和基础研究中均被广泛应用。该技术的应用使得软骨组织在离开供体后很长时间内仍能保持完整,且其中有大部分软骨细胞的活性得以保存。为了提高同种异体软骨组织的低温保存效果,近年来很多研究者通过临床和基础研究对影响同种异体软骨组织低温保存效果的影响因素进行了不断的研究。这些研究表明,低温保存介质、低温保存时间及移植软骨组织的体积均会对同种异体软骨组织的低温保存效果产生影响,最终影响移植手

术的效果。这些研究有助于外科医生更加深入地认识同种异体软骨低温保存的细节,为临床的实践提供参考价值,也为新一轮的低温保存技术革新提供了经验。

参考文献

- [1] BRITTBERG M, WINALSKI C S. Evaluation of cartilage injuries and repair[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85 - A (Suppl 2): 58 - 69.
- [2] LIEBERTHAL J, SAMBAMURTHY N, SCANZELLO C R. Inflammation in joint injury and post - traumatic osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23 (11): 1825 - 1834.
- [3] PATHRIA M N, CHUNG C B, RESNICK D L. Acute and stress - related injuries of bone and cartilage: pertinent anatomy, basic biomechanics, and imaging perspective [J]. Radiology, 2016, 280 (1): 21 - 38.
- [4] RICHTER D L, SCHENCK R C, WASCHER D C, et al. Knee articular cartilage repair and restoration techniques: a review of the literature [J]. Sports Health, 2016, 8 (2): 153 - 160.
- [5] HAMILTON T W, PANDIT H G, INABATHULA A, et al. Unsatisfactory outcomes following unicompartmental knee arthroplasty in patients with partial thickness cartilage loss: a medium - term follow - up [J]. Bone Joint J, 2017, 99 - b (4): 475 - 482.
- [6] MURRAY I R, BENKE M T, MANDELBAUM B R. Management of knee articular cartilage injuries in athletes: chondroprotection, chondrofacilitation, and resurfacing [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2016, 24 (5): 1617 - 1626.
- [7] FAMILIARI F, CINQUE M E, CHAHLA J, et al. Clinical outcomes and failure rates of osteochondral allograft transplantation in the knee: a systematic review [J]. Am J Sports Med, 2018, 46 (14): 3541 - 3549.
- [8] SHERMAN S L, GARRITY J, BAUER K, et al. Fresh osteochondral allograft transplantation for the knee: current concepts [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2014, 22 (2): 121 - 133.
- [9] BUGBEE W D, PALLANTE - KICHURA A L, GÖRTZ S, et al. Osteochondral allograft transplantation in cartilage repair: graft storage paradigm, translational models, and clinical applications [J]. J Orthop Res, 2016, 34 (1): 31 - 38.
- [10] MIN B H, TRUONG M D, SONG H K, et al. Development and efficacy testing of a "hollow awl" that leads to patent bone marrow channels and greater mesenchymal stem cell

- mobilization during bone marrow stimulation cartilage repair surgery[J]. Arthroscopy, 2017, 33(11): 2045 – 2051.
- [11] VALDIVIA Z C, DE CICCIO F L, TORRIE A M, et al. Osteochondral allograft [J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2015, 8(4): 413 – 422.
- [12] CAMERON A M, BARANDIARAN C J. Organ preservation review: history of organ preservation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2015, 20(2): 146 – 151.
- [13] PALLANTE A L, GÖRTZ S, CHEN A C, et al. Treatment of articular cartilage defects in the goat with frozen versus fresh osteochondral allografts: effects on cartilage stiffness, zonal composition, and structure at six months [J]. J Bone Joint Surg Am, 2012, 94(21): 1984 – 1995.
- [14] WILLIAMS R J, DREESE J C, CHEN C T. Chondrocyte survival and material properties of hypothermically stored cartilage: an evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation [J]. Am J Sports Med, 2004, 32(1): 132 – 139.
- [15] LAPRADE R F, BOTKER J, HERZOG M, et al. Refrigerated osteoarticular allografts to treat articular cartilage defects of the femoral condyles. A prospective outcomes study [J]. J Bone Joint Surg Am, 2009, 91(4): 805 – 811.
- [16] COOK J L, STOKER A M, STANNARD J P, et al. A novel system improves preservation of osteochondral allografts [J]. Clin Orthop Relat Res, 2014, 472(11): 3404 – 3414.
- [17] TÍRICO L, EARLY S A, MCCAULEY J C, et al. Fresh osteochondral allograft transplantation for spontaneous osteonecrosis of the knee: a case series [J]. Orthop J Sports Med, 2017, 5(10): 2325967117730540.
- [18] GIANNINI S, MAZZOTTI A, VANNINI F. Bipolar fresh total osteochondral allograft in the ankle: is it a successful long-term solution? [J]. Injury, 2017, 48(7): 1319 – 1324.
- [19] BALAZS G C, WANG D A, BURGE A J, et al. Return to play among elite basketball players after osteochondral allograft transplantation of full-thickness cartilage lesions [J]. Orthop J Sports Med, 2018, 6(7): 2325967118786941.
- [20] SAMMARCO V J, GORAB R, MILLER R, et al. Human articular cartilage storage in cell culture medium: guidelines for storage of fresh osteochondral allografts [J]. Orthopedics, 1997, 20(6): 497 – 500.
- [21] LEVY Y D, GÖRTZ S, PULIDO P A, et al. Do fresh osteochondral allografts successfully treat femoral condyle lesions? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2013, 471(1): 231 – 237.
- [22] MCCULLOCH P C, KANG R W, SOBHY M H, et al. Prospective evaluation of prolonged fresh osteochondral allograft transplantation of the femoral condyle: minimum 2-year follow-up [J]. Am J Sports Med, 2007, 35(3): 411 – 420.
- [23] BRIGGS D T, SADR K N, PULIDO P A, et al. The use of osteochondral allograft transplantation for primary treatment of cartilage lesions in the knee [J]. Cartilage, 2015, 6(4): 203 – 207.
- [24] GIANNINI S, BUDA R, GRIGOLO B, et al. Bipolar fresh osteochondral allograft of the ankle [J]. Foot Ankle Int, 2010, 31(1): 38 – 46.
- [25] GIANNINI S, BUDA R, RUFFILLI A, et al. Failures in bipolar fresh osteochondral allograft for the treatment of end-stage knee osteoarthritis [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2015, 23(7): 2081 – 2089.
- [26] HAHN D B, AANSTOOS M E, WILKINS R M. Osteochondral lesions of the talus treated with fresh talar allografts [J]. Foot Ankle Int, 2010, 31(4): 277 – 282.
- [27] MOORE D D, BAKER K C, BAKER E A, et al. Effect of bisphosphonate pretreatment on fresh osteochondral allografts: analysis of in vitro graft structure and in vivo osseous incorporation [J]. Orthopedics, 2018, 41(3): e376 – e382.
- [28] PENNOCK A, WAGNER F, ROBERTSON C, et al. Prolonged storage of osteochondral allografts – Does the addition of fetal bovine serum improve chondrocyte viability? [J]. J Knee Surg, 2010, 19(4): 265 – 272.
- [29] GÖRTZ S, DE YOUNG A J, BUGBEE W D. Fresh osteochondral allografting for steroid-associated osteonecrosis of the femoral condyles [J]. Clin Orthop Relat Res, 2010, 468(5): 1269 – 1278.
- [30] CALVO R, ESPINOSA M, FIGUEROA D, et al. Assessment of cell viability of fresh osteochondral allografts in N-Acetylcysteine-Enriched medium [J]. Cartilage, 2020, 11(1): 117 – 121.
- [31] SADR K N, PULIDO P A, MCCAULEY J C, et al. Osteochondral allograft transplantation in patients with osteochondritis dissecans of the knee [J]. Am J Sports Med, 2016, 44(11): 2870 – 2875.
- [32] WILLIAMS R J 3rd, RANAWAT A S, POTTER H G, et al. Fresh stored allografts for the treatment of osteochondral defects of the knee [J]. J Bone Joint Surg Am, 2007, 89(4): 718 – 726.
- [33] MERIC G, GRACITELLI G C, GÖRTZ S, et al. Fresh osteochondral allograft transplantation for bipolar reciprocal osteochondral lesions of the knee [J]. Am J Sports Med, 2015, 43(3): 709 – 714.