

超低温冷冻同种异体软骨的研究进展

洪郭驹

(阿尔伯塔大学医学院, 加拿大 埃德蒙顿 T6G 2R3)

摘要 同种异体软骨移植是治疗关节软骨缺损的有效手段,可解决自体骨软骨来源有限的问题,但如何长期保存同种异体软骨是亟待解决的问题。区别于主流的低温冷冻同种异体软骨的方法,超低温冷冻技术在添加冷冻保护剂情况下,预期可以实现同种异体软骨的长期保存。然而,此技术目前仍处于探索阶段,缺乏成熟的临床转化条件。本文介绍了同种异体软骨的超低温冷冻法,着重阐述了超低温冷冻法中的玻璃化冷冻技术,并重点综述了超低温冷冻同种异体软骨的临床应用。

关键词 组织保存;低温保存;玻璃化作用;软骨,关节;移植,同种;综述

超低温冷冻是在极低温度下冷却和储存细胞、组织或器官,以保持其生存能力的一种技术。超低温冷冻通常会捐赠组织或器官在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (某些情况下温度为 $-196\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) 保存数月乃至数年^[1]。与低温保存($4\sim10\text{ }^{\circ}\text{C}$)相比,超低温冷冻同种异体软骨可以极大地延缓同种异体软骨的新陈代谢,延长其保存时间,增加其利用率^[2-3]。然而,超低温冷冻所产生的冰晶会对细胞膜产生负面影响,并可能降低软骨细胞的活性和破坏细胞的完整性^[4]。Pallante 等^[5]研究发现,低温冷冻的同种异体软骨在软骨的承重功能、软骨细胞的活性和基质含量等方面与新鲜软骨一致;相比之下,超低温冷冻软骨的硬度较低温保存软骨降低了 80%,基质含量降低了 55%,细胞活性降低了 96%^[3]。因此,有学者认为,超低温冷冻很难保存同种异体软骨^[3,6-7]。尽管超低温冷冻技术目前还不成熟,但从长远来看,它在未来的组织保存领域仍具有极大的潜力。本文从同种异体软骨的超低温冷冻法和超低温冷冻同种异体软骨的临床应用 2 个方面对超低温冷冻同种异体软骨的研究进展进行了综述。

1 同种异体软骨的超低温冷冻法

同种异体软骨的超低温冷冻法主要包括慢速冷冻法和快速冷冻法。这 2 种方法的主要负面作用是冷却过程中形成的结晶物质会伤害正常组织^[8-9]。如冷冻保存中所形成的冰晶,可能会损坏软骨的成分、结构及其性能^[10]。Muldrew 等^[11]总结了超低温冷冻方法可能会破坏细胞和细胞外基质的机制:一是异常冷却导致冰核产生,这会形成软骨中的冰层面,阻止冷冻保护溶液从外向内扩散;二是冷冻过程中产生的冰晶会破坏纤维连接蛋白片段和其他细胞外基质成分,并触发基质降解蛋白酶的释放,诱导细胞凋

亡。快速冷冻过程中添加冷冻保护剂,有助于防止超低温冷冻过程中组织结冰^[10],这也是快速冷冻较慢冷冻同种异体软骨在维持软骨细胞活性方面效果更佳的重要原因^[12]。

目前,快速冷冻法主要指玻璃化冷冻技术^[1,3]。玻璃化冷冻过程除了在冷冻速度上加快,还会添加一定浓度的冷冻保护剂^[13-14]。当温度快速降低时,组织会迅速产生玻璃样变化,从而对组织起到保护作用,其原因为冷冻保护剂可以避免组织内冰晶的形成^[13,15]。玻璃化冷冻技术可以在短时间内实现组织保存,减少组织的热传递,节省组织降温时间,避免组织受到损坏^[9]。在组织的玻璃化保存过程中会添加不同浓度的冷冻保护剂,以减少在超低温条件下冰晶的形成,但冷冻保护剂会对细胞产生毒性,而选择何种浓度的冷冻保护剂最佳至今尚无定论^[9,16-17]。目前,玻璃化冷冻过程中所采用的冷冻保护剂的总量通常为总溶液的 30%~60%^[3,14]。二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)^[18]、甘油(glycerol, GC)^[7]、丙二醇(propylene glycol, PG)^[19]、乙二醇(ethylene glycol, EG)^[7]和甲酰胺(formamide, FM)^[16]这几种冷冻保护剂已被证明可用于细胞、组织和器官的冷冻保存中^[20]。DMSO 可提高软骨细胞的存活率^[18]。在超低温条件下,DMSO 对保存的软骨细胞没有毒性,甚至可以维持细胞的完整结构^[21]。Jomha 等^[16]分离出猪关节软骨细胞,并将 DMSO、EG、PG、GC 和 FM 这 5 种冷冻保护剂分别以 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度对软骨细胞进行干预;结果发现,浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时这 5 种冷冻保护剂不会对细胞产生毒性作用,但浓度为 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可观察到这 5 种冷冻保护剂会对细胞产生不同程度的毒性,且 EG 和 GC 对细胞产生的毒

性低于 PG、DMSO 和 FM。在另一项研究中, Fahmy 等^[19] 将从人体分离出来的软骨片暴露于上述 5 种冷冻保护剂中, 并设置不同的浓度梯度; 结果显示, 冷冻保护剂的浓度与细胞损伤之间并不存在线性关系, 但是在逐步提高冷冻保护剂浓度的过程中, 可以发现添加 GC 时细胞活性最低, 其次是 PG 和 DMSO, 而 EG 的毒性最小。

玻璃化冷冻的效果是否与冷冻保护剂的使用策略有关, 目前仍存在争议。Jomha 等^[16] 研究认为, 使用浓度为 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的冷冻保护剂进行 120 min 的超低温冷冻所造成的细胞毒性较高, 而降低冷冻保护剂的浓度或减少其扩散时间, 都能减少细胞毒性。在 Forriol 等^[22] 的研究中, 同种异体软骨被分别保存在不同的溶液(包含 DMSO 或不包含 DMSO)、不同的冷冻温度($-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-186 \text{ }^{\circ}\text{C}$), 结果发现在行软骨移植的成年绵羊模型中, 软骨细胞的存活率没有明显差异。Jomha 等^[16] 建立了多种冷冻保护剂组合的不同超低温冷冻策略, 其中包括 20 种双冷冻保护剂方案和 15 种三冷冻保护剂方案, 结果显示在不同冷冻保护剂组合下, 各个方案在维持细胞膜的完整性及其代谢活性方面存在差异, 其中 EG - Me2SO - Gly 组合方案可有效提高软骨细胞的存活率。Brockbank 等^[14] 也认为, EG、FM 和 PG 的不同组合, 可提高软骨细胞的存活率, 有助于全层厚度软骨的保存。

冷冻保护剂在组织内的扩散也是影响玻璃化冷冻同种异体软骨效果的因素之一^[2, 23]。由于冷冻保护剂的扩散极大地受限于软骨组织的厚度, 这可能导致冷冻保护剂在软骨内的分布不均, 进而导致同种异体软骨深层区域的过度冰冻^[17]。冷冻保护剂扩散率的计算一般采用物理学上的 Fick 定律, 该定律也是首先用于计算 DMSO 在组织中分布和扩散的应用型定律^[23-24]。Zhang 等^[17] 采用三相模型来计算冷冻保护剂的扩散率, 并将其计算结果与 Fick 定律计算的结果进行比较, 结果显示在计算软骨中冷冻保护剂的扩散率时, 三相模型计算的结果与 Fick 定律计算的结果没有明显差异。但是, 也有研究者指出, 用 Fick 定律计算时低估了冷冻保护剂的分布, 这就意味着用 Fick 定律计算冷冻保护剂在组织中的扩散率可能会导致误差^[23]。Abazari 等^[25] 通过 MRI 测量软骨中 DMSO 的渗透量, 结果显示基质胶原蛋白对冷冻保护剂在组织内的扩散和分布阻碍较小。Abazari 等^[26] 将非理想溶液的热力学参数和天然胶原蛋白的参数整

合到原始生物力学模型中, 以更准确的方式模拟冷冻保护剂的真实状态, 结果显示当冷冻保护剂在组织扩散时, 软骨会承受动态收缩应力, 并导致冷冻保护剂的渗透失衡。

除此之外, 还有其他因素也可以对玻璃化冷冻同种异体软骨的效果产生影响。Wu 等^[27] 通过比较多种冷冻保护剂的不同组合发现, 玻璃化作用的效果不仅与冷冻保护剂的扩散率相关, 还与冷冻软骨时所用容器的导热性相关。Wu 等^[28] 研究发现, 硫酸软骨素、氨基葡萄糖、2, 3, 5, 6 - 四甲基吡嗪和抗坏血酸这 4 种添加剂可改善暴露在高浓度冷冻保护剂中的软骨细胞存活率, 这为优化玻璃化冷冻同种异体软骨方案又提供了新的认识。

2 超低温冷冻同种异体软骨的临床应用

目前, 有关低温保存同种异体软骨的研究已取得了较丰富的成果^[29-31]; 而有关超低温冷冻同种异体软骨的研究还相对较少, 将超低温冷冻方法用于临床试验中并实现临床转化仍是一个巨大的挑战^[1, 32]。

与骨骼组织不同, 关节软骨内无神经、血管和淋巴管, 是软骨细胞附着于基质上的一种组织结构^[33]。既往的研究已表明, 按照超低温冷冻标准流程保存同种异体软骨, 可以较好地维持分离后的软骨细胞活力^[34-35], 而在维持整个软骨组织的活性方面效果较差^[13]。因此, 从简单细胞的超低温冷冻保存到完整组织的超低温冷冻保存仍充满挑战。玻璃化冷冻是在极快降温过程中, 将冷冻保护液从液态转变为黏度很高的类似玻璃状的固态, 此过程可避免细胞内冰晶的形成, 减少组织破坏, 因此它被认为是实现软骨超低温冷冻的关键途径^[3, 9, 36]。目前, 已经有研究者成功地将关节软骨玻璃化, 以长期有效地保存软骨细胞和细胞外基质^[2]。但无论如何, 从简单的细胞到组织再到器官的超低温冷冻保存, 都需获得更多的研究数据来支撑其进入临床应用的安全性和有效性。

目前, 尽管玻璃化冷冻技术仍处于探索阶段, 但是超低温冷冻法已被运用于临床实践。这些超低温冷冻方法一般不如玻璃化冷冻技术精细, 也较少采用复杂的冷冻保护剂组合。Pearsall 等^[37] 对采用超低温冷冻的同种异体软骨移植与自体软骨移植进行了临床疗效比较, 结果显示两者在关节功能改善方面无明显差异, 而唯一对临床疗效产生影响的相关因素是患者的年龄。Abrams 等^[38] 采用超低温冷冻同种异体膝关节软骨(连同半月板组织), 以用于膝关节移植手

术;结果显示,在 32 例受体患者中有 23 例患者行移植术后膝关节功能得到改善,但随访结束后这 23 例患者的二次手术率高达 25%。

近年来,超低温冷冻同种异体软骨移植取得了实质性进展。超低温冷冻同种异体软骨移植可以为治疗关节软骨病变提供可能性。Geraghty 等^[39]将一种超低温冷冻条件下的网状有孔同种异体软骨片运用于临床移植术中,结果显示该种同种异体软骨可促进软骨受损区域中间充质干细胞的修复,且同种异体软骨中的生长因子和细胞外基质蛋白均获得了较好的保护。Vangsness 等^[40]将网状有孔的超低温冷冻同种异体软骨移植于膝关节软骨缺损患者中,随访 2 年后发现,受体患者膝关节功能恢复良好;认为在超低温冷冻过程中,软骨细胞、细胞外基质的超微结构和软骨生长因子都得到了较好的维持;并提出同种异体软骨在较厚的部位可以采用有孔设计,不仅有利于冷冻保护剂向移植物的扩散,还可以提高其柔韧性,从而在匹配软骨缺损时可以获得更多的表面接触。上述研究也得到了 Woodmass 等^[41]的论证与支持,他们认为这种超低温冷冻网状软骨适用于 2 cm² 以内的软骨缺损,而韧带或半月板损伤严重的患者应排除在外;并强调术后 6 周内需部分负重行走和适度的关节运动,术后 6 周至 4 个月应在膝关节支架的支撑下逐渐负重,术后 4 个月膝关节可正常运动。这种网状有孔结构的超低温冷冻同种异体软骨具有突破性的实践价值,它使超低温冷冻从基础研究正式迈向临床实践。然而,这种网状有孔软骨并非最终选择,骨外科医生仍期望可以有如在低温保存领域当中的那种较为完整的软骨。

3 小 结

同种异体软骨使用量的增长与其保存技术的进步密切相关。超低温冷冻技术,特别是添加冷冻保护剂的玻璃化冷冻技术,将完全改变同种异体软骨移植的现状。但是,目前超低温冷冻技术仍处于探索阶段,缺乏成熟的临床转化条件。随着超低温冷冻体系和方法的逐步建立,以及超低温冷冻概念和理念的逐步革新,超低温冷冻技术在未来将作为保存同种异体软骨的一种主流选择而普遍适用于临床。

参考文献

[1] PEGG D E. Principles of cryopreservation[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1257: 3 - 19.
 [2] ABAZARI A, JOMHA N M, ELLIOTT J A, et al. Cryopr-

eservation of articular cartilage [J]. *Cryobiology*, 2013, 66(3): 201 - 209.
 [3] FAHY G M, WOWK B. Principles of cryopreservation by vitrification[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1257: 21 - 82.
 [4] BISSOYI A, NAYAK B, PRAMANIK K, et al. Targeting cryopreservation - induced cell death: a review[J]. *Biopreserv Biobank*, 2014, 12(1): 23 - 34.
 [5] 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.
 [6] HAHN J, LAOUAR L, ELLIOTT J A W, et al. The effect of additive compounds on glycerol - induced damage to human chondrocytes[J]. *Cryobiology*, 2017, 75: 68 - 74.
 [7] TAKRONI T A, YU H, LAOUAR L, et al. Ethylene glycol and glycerol loading and unloading in porcine meniscal tissue[J]. *Cryobiology*, 2017, 74: 50 - 60.
 [8] KARLSSON J O, TONER M. Long - term storage of tissues by cryopreservation: critical issues[J]. *Biomaterials*, 1996, 17(3): 243 - 256.
 [9] HUNT C J. Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1590: 41 - 77.
 [10] JANG T H, PARK S C, YANG J H, et al. Cryopreservation and its clinical applications [J]. *Integr Med Res*, 2017, 6(1): 12 - 18.
 [11] MULDREW K, NOVAK K, YANG H, et al. Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes[J]. *Cryobiology*, 2000, 40(2): 102 - 109.
 [12] SONG Y C, AN Y H, KANG Q K, et al. Vitreous preservation of articular cartilage grafts [J]. *J Invest Surg*, 2004, 17(2): 65 - 70.
 [13] JOMHA N M, ELLIOTT J A, LAW G K, et al. Vitrification of intact human articular cartilage [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(26): 6061 - 6068.
 [14] BROCKBANK K G, CHEN Z Z, SONG Y C. Vitrification of porcine articular cartilage [J]. *Cryobiology*, 2010, 60(2): 217 - 221.
 [15] MAEHARA M, SATO M, WATANABE M, et al. Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets [J]. *BMC Biotechnol*, 2013, 13: 58.
 [16] JOMHA N M, WEISS A D, FRASER FORBES J, et al. Cryoprotectant agent toxicity in porcine articular chondrocytes [J]. *Cryobiology*, 2010, 61(3): 297 - 302.
 [17] ZHANG S Z, PEGG D E. Analysis of the permeation of cryoprotectants in cartilage [J]. *Cryobiology*, 2007, 54(2):

- 146 – 153.
- [18] JOMHA N M, LAW G K, ABAZARI A, et al. Permeation of several cryoprotectant agents into porcine articular cartilage[J]. *Cryobiology*, 2009, 58(1): 110 – 114.
- [19] FAHMY M D, ALMANSOORI K A, LAOUAR L, et al. Dose-injury relationships for cryoprotective agent injury to human chondrocytes[J]. *Cryobiology*, 2014, 68(1): 50 – 56.
- [20] JUDAS F, ROSA S, TEIXEIRA L, et al. Chondrocyte viability in fresh and frozen large human osteochondral allografts: effect of cryoprotective agents[J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(8): 2531 – 2534.
- [21] GARRITY J T, STOKER A M, SIMS H J, et al. Improved osteochondral allograft preservation using serum-free media at body temperature[J]. *Am J Sports Med*, 2012, 40(11): 2542 – 2548.
- [22] FORRIOL F, LONGO U G, ALVAREZ E, et al. Scanty integration of osteochondral allografts cryopreserved at low temperatures with dimethyl sulfoxide[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(7): 1184 – 1191.
- [23] ABAZARI A, THOMPSON R B, ELLIOTT J A, et al. Transport phenomena in articular cartilage cryopreservation as predicted by the modified triphasic model and the effect of natural inhomogeneities[J]. *Biophys J*, 2012, 102(6): 1284 – 1293.
- [24] SHARDT N, AL – ABBASI K K, YU H, et al. Cryoprotectant kinetic analysis of a human articular cartilage vitrification protocol[J]. *Cryobiology*, 2016, 73(1): 80 – 92.
- [25] ABAZARI A, ELLIOTT J A W, MCGANN L E, et al. MR spectroscopy measurement of the diffusion of dimethyl sulfoxide in articular cartilage and comparison to theoretical predictions[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(9): 1004 – 1010.
- [26] ABAZARI A, ELLIOTT J A W, LAW G K, et al. A biomechanical triphasic approach to the transport of nondilute solutions in articular cartilage[J]. *Biophys J*, 2009, 97(12): 3054 – 3064.
- [27] WU K, SHARDT N, LAOUAR L, et al. Comparison of three multi-cryoprotectant loading protocols for vitrification of porcine articular cartilage[J]. *Cryobiology*, 2020, 92: 151 – 160.
- [28] WU K, LAOUAR L, DONG R, et al. Evaluation of five additives to mitigate toxicity of cryoprotective agents on porcine chondrocytes[J]. *Cryobiology*, 2019, 88: 98 – 105.
- [29] TORRIE A M, KESLER W W, ELKIN J, et al. Osteochondral allograft[J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2015, 8(4): 413 – 422.
- [30] HUNT H E, SADR K, DEYOUNG A J, et al. The role of immunologic response in fresh osteochondral allografting of the knee[J]. *Am J Sports Med*, 2014, 42(4): 886 – 891.
- [31] 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.
- [32] PEGG D E, WANG L, VAUGHAN D, et al. Cryopreservation of articular cartilage[J]. *Cryobiology*, 2006, 52(3): 347 – 359.
- [33] CARBALLO C B, NAKAGAWA Y, SEKIYA I, et al. Basic science of articular cartilage[J]. *Clin Sports Med*, 2017, 36(3): 413 – 425.
- [34] XIA Z, DUAN X, MURRAY D, et al. A method of isolating viable chondrocytes with proliferative capacity from cryopreserved human articular cartilage[J]. *Cell Tissue Bank*, 2013, 14(2): 267 – 276.
- [35] RENDAL – VÁZQUEZ M E, MANEIRO – PAMPÍN E, RODRÍGUEZ – CABARCOS M, et al. Effect of cryopreservation on human articular chondrocyte viability, proliferation, and collagen expression[J]. *Cryobiology*, 2001, 42(1): 2 – 10.
- [36] FAHY G M, MACFARLANE D R, ANGELL C A, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 1984, 21(4): 407 – 426.
- [37] PEARSALL A W, MADANAGOPAL S G, HUGHEY J T. Osteoarticular autograft and allograft transplantation of the knee: 3 year follow – up[J]. *Orthopedics*, 2008, 31(1): 73.
- [38] ABRAMS G D, HUSSEY K E, HARRIS J D, et al. Clinical results of combined meniscus and femoral osteochondral allograft transplantation; minimum 2 – year follow – up[J]. *Arthroscopy*, 2014, 30(8): 964 – 970.
- [39] GERAGHTY S, KUANG J Q, YOO D, et al. A novel, cryopreserved, viable osteochondral allograft designed to augment marrow stimulation for articular cartilage repair[J]. *J Orthop Surg Res*, 2010, 10: 66.
- [40] VANGSNESS C T, HIGGS G, HOFFMAN J K, et al. Implantation of a novel cryopreserved viable osteochondral allograft for articular cartilage repair in the knee[J]. *J Knee Surg*, 2018, 31(6): 528 – 535.
- [41] WOODMASS J M, MELUGIN H P, WU I T, et al. Viable osteochondral allograft for the treatment of a full – thickness cartilage defect of the patella[J]. *Arthrosc Tech*, 2017, 6(5): 1661 – 1665.