

冷冻保存异体软骨移植免疫排斥反应的研究状况*

吴雅迪¹, 张刚²

Immunological rejection reaction and cryopreserved cartilage allograft

Wu Ya-di¹, Zhang Gang²

Abstract

BACKGROUND: At present, cryopreserved method is used to reduce immunological rejection after cartilage allograft transplantation, but allograft source, cryopreservation method, and frozen storage conditions still need in-depth studies.

OBJECTIVE: To retrospectively analyze the action mechanism related to immunological rejection reaction following transplantation of cryopreserved cartilage allograft, and to compare the characteristics of different preservation methods.

METHODS: The search by the first author was performed to retrieve PubMed and Wanfang databases for articles about immunological rejection following transplantation of cryopreserved cartilage allograft and cryopreservation effects on cartilage transplantation published 1990 to 2008.

RESULTS AND CONCLUSION: Cartilage allograft transplantation is better than other treatments for patients with articular cartilage defects. The cryopreservation method maintains the properties and biological activity of cartilage tissues, and based on this method, we can choose date for joint reconstruction and have plenty of time to complete the detection of a number of indicators so as to prevent the spread of bacteria, viruses and infectious diseases carried by the donor, and to reduce the antigenicity of cartilage tissue, with great clinical value. However, in all aspects of cryopreservation, such as, the application of cryoprotectant, cooling and rewarming speed, there are still many problems. And after cartilage transplantation, there is occurrence of cartilage resorption, degeneration and so on. With the development of frozen biology and revealing of frozen injury mechanism, these problems will be met, cartilage cryopreservation technology will be further improved.

Wu YD, Zhang G. Immunological rejection reaction and cryopreserved cartilage allograft. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(18):3387-3390. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前多采用冷冻保存方法来降低异体软骨移植免疫排斥反应, 但有关异体软骨的取材、冷冻保存方法、冷冻保存条件仍然需要深入的研究探讨。

目的: 对于冷冻保存异体软骨移植后免疫排斥反应机制的研究进行回顾分析, 并对不同保存方法的特点进行比较分析。

方法: 由第一作者检索 1990/2008 PubMed 数据及万方数据库有关异体软骨移植后免疫排斥反应及冷冻保存方法对软骨移植影响等方面的相关文献。

结果与结论: 异体软骨组织移植治疗关节软骨缺损治疗效果明显优于其他治疗方法。冷冻保存异体关节软骨保持了软骨组织的性状和生物学活性, 而且可择期完成关节重建, 并且有充裕的时间完成多项指标检测, 防止供体携带细菌病毒和传染性疾病的传播, 并且降低了软骨组织的抗原性, 具有较大的临床应用价值。但冷冻保存的各个环节, 如: 低温保护剂的应用、降温 and 复温速度等方面还存在诸多问题, 软骨移植后仍然会出现软骨吸收、退变等现象。随着冷冻生物学的不断进步, 冷冻损伤机制的不断揭示, 这些问题终将会解决, 软骨组织冷冻保存技术会得到进一步的完善。

关键词: 软骨移植; 冷冻保存; 免疫原性; 免疫排斥; 异体软骨

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.18.038

吴雅迪, 张刚. 冷冻保存异体软骨移植免疫排斥反应的研究状况[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(18):3387-3390. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前软骨组织移植已经广泛运用于临床外科之中, 尤其是运动医学, 骨科, 整形外科等专业在修复重建方面常用的治疗手段, 而异体软骨具有来源广泛、贮存方便、治疗费用低、功能恢复较满意等优点, 越来越多地被应用于临床。但实施移植手术后同种异体软骨的免疫排斥反应和退行性变仍是一个十分复杂、非常棘手而又不可避免的问题, 也是同种异体软骨

移植在临床应用中尚未完全解决的关键技术问题。

如何保持关节软骨细胞的生物学活性和降低其存在的免疫排斥反应影响是目前研究不容忽视的问题。而目前多采用冷冻保存方法来降低异体软骨移植免疫排斥反应, 但有关异体软骨的取材、冷冻保存的方法、冷冻保存的条件需要进行研究探讨, 保证异体软骨的保存质量, 确保临床异体软骨移植成功。本文对冷冻保存异体软骨移植后免疫排斥反应机制的研究进行回顾分析, 并对不同保存方法的特点进行比较分析。

¹Sports Medicine Institute, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China; ²Third Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of TaiShan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China.

Wu Ya-di★, Master, Teaching assistant, Sports Medicine Institute, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China
kuaile-320@163.com

Received: 2011-02-15
Accepted: 2011-03-15

¹泰山医学院运动医学研究所, 山东省泰安市 271000; ²泰山医学院附属医院骨科, 山东省泰安市 271000

吴雅迪★, 女, 1982年生, 山东省泰安市人, 汉族, 2009年泰山医学院毕业, 硕士, 助教, 主要从事运动康复方面研究。
kuaile-320@163.com

中图分类号:R617
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2011)18-03387-04

收稿日期: 2011-02-15
修回日期: 10010-03-15
(20110302007/GW-W)

1 资料和方法

1.1 资料来源 由第一作者检索 1990/2008 PubMed 数据库及万方数据库。英文检索词“Cartilage transplantation; cryopreservation; immunogenicity; immune rejection”, 中文检索词为“软骨移植, 冷冻保存, 免疫原性, 免疫排斥”。检索文献量总计 55 篇。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①文章所述内容需与异体软骨移植后免疫排斥反应及冷冻保存方法对软骨移植的影响等方面相关的文献。②同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

排除标准: 重复性研究。

1.3 数据提取 共检索到文献 55 篇, 其中中文文献 36 篇, 英文文献 19 篇, 排除与研究目的相关性差及内容陈旧、重复的文献 23 篇, 纳入 32 篇符合标准的文献进行综述。

1.4 质量评价 符合纳入标准的 32 篇文献中, 文献[1-13]探讨了异体软骨移植后免疫排斥反应机制, 文献[14-32]探讨了各种冷冻方法对异体软骨移植后免疫排斥反应的影响。

2 结果

2.1 软骨免疫原性的来源 关节软骨为透明软骨, 本身无血供、神经和淋巴分布, 由关节液完成物质能量的交换。关节软骨的主要功能是: 在承载机体负荷时通过自身变形吸收能量, 缓解对软骨所对应上下骨的冲击, 提供一个低摩擦系数的接触表面, 保证将关节运动时的摩擦少到最小^[1-2]。有许多实验研究和临床观察证实异体软骨移植通常不引起较为剧烈的免疫反应。然而分离出的异体软骨细胞移植可引起强烈的免疫反应。

软骨细胞表面的主要组织相容性抗原: 软骨细胞同其他有核细胞一样表面也表达主要组织相容性抗原 I 类分子^[3], 供者和受者细胞间主要组织相容性抗原分子不匹配所诱发的细胞和抗体介导的细胞毒免疫反应是引起同种异体软骨移植免疫反应的关键^[4]。

软骨细胞特异性分化抗原: Langer 等^[5]通过分析白细胞游走试验发现, 大鼠经同种基因软骨细胞注射或软骨刨削后可发生自身反应, 首次证实了软骨细胞特异分化抗原的存在。Moskalewski 等^[6]在同种异体软骨移植的大鼠模型研究中发现, 间隔接受二三次大鼠软骨细胞移植的兔血清中含有高滴度抗软骨细胞的细胞毒抗体, 同时对新鲜或培养 24 h 软骨细胞溶胞产物的 Western blot 蛋白分析中检测到了一种抗原, 而在成纤维细胞及内皮细胞中未检测到同种抗原, 表明软骨细胞特异性抗原在

移植免疫中发挥了重要作用。

软骨细胞外基质: 软骨组织由丰富的细胞外基质和少量软骨细胞组成, 细胞外基质将软骨细胞包裹在软骨陷窝内, 隔绝了软骨细胞与宿主免疫原性分子的相互接触, 形成免疫屏障, 预防或延缓了同种异体软骨移植的免疫排斥反应^[7-8]。软骨基质主要由 II 型胶原和多聚蛋白聚糖组成, 蛋白多糖中的核心蛋白具有抗原性, 但被其周围无抗原性的酸性糖胺多糖所遮盖, 致使其不具有抗原性^[9]。

免疫细胞及相关组分: 自然杀伤细胞对正常软骨细胞具有自发的细胞毒效应, Romaniuk 等^[10]在大鼠同种异体软骨移植研究中指出, CD8⁺ 是参与移植软骨直接破坏的重要细胞, 而 CD8 标记物在自然杀伤细胞上也有分布, 表明自然杀伤细胞对移植的软骨细胞也有杀伤作用。而树突状细胞的抗原提升作用, 单核细胞、巨噬细胞以及少许非主要组织相容性抗原等在软骨移植中均发挥了重要作用。

其他: Osiecka-Iwan 等^[11]研究使用顶体酶抑制剂和胶原酶处理的软骨细胞与脾细胞混合培养, 结果显示加 TLCK 处理组并未引起脾细胞的刺激作用, 而未加 TLCK 组却相反, 说明在软骨分离时所用的 II 型胶原酶是致免疫源, 而该酶在软骨细胞中的残留也是软骨移植免疫反应的一个来源。另外, 基础实验研究中缺损模型的制备方法以及所选动物的近交程度均对软骨移植的免疫排斥有影响。

2.2 软骨免疫反应机制 同种异体软骨移植与其他实质脏器移植不同, 按照严格的定义, 同种异体软骨是植入物, 而不是移植物。免疫排异结果不仅是移植骨存活细胞的被杀灭, 而主要表现为移植骨被吸收, 没有爬行替代修复和血液循环重建的征象。

软骨细胞表达主要组织相容性抗原 I 类分子, 有些动物还表达主要组织相容性抗原 II 类分子, 如兔和小鼠^[12-14]。而人和猪只表达主要组织相容性抗原 I 类, 受体和供体的主要组织相容性抗原分子不匹配所诱导的 T 细胞介导的细胞毒反应是同种异体软骨移植发生免疫排斥反应的关键。骨移植免疫反应发生的途径包括: ① CD8⁺T 细胞, 即杀伤 T 细胞识别主要组织相容性抗原 I 类分子而引起的对靶细胞的直接杀伤作用。② NK 细胞对异体细胞的杀伤作用。③ 诱导性的主要组织相容性抗原 II 分子-CD4⁺T 细胞间接识别免疫途径。④ 树突状细胞对靶细胞的作用, 即抗原提呈作用。而在整个免疫排斥反应中淋巴细胞因子如白细胞介素 1、白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 6、干扰素 γ 等发挥了重要作用。

同种异体软骨移植后, 移植物外周暴露的软骨细胞上的主要组织相容性抗原 I 分子被受体 CD8⁺T 细胞识别, 并与其表面受体结合, 进而激活 Tc 细胞, 活化

的 Tc 细胞会释放胞浆内颗粒: 穿孔素和颗粒酶, 前者在靶细胞膜上穿孔, 后者是胰蛋白酶或糜蛋白酶类物质, 它们对靶细胞的杀伤作用很快, 使软骨细胞在数分钟内迅速被溶解, 同时它释放的效应分子可活化靶细胞内核酸酶, 破坏靶细胞的 DNA, 从而诱导软骨细胞凋亡, 另外, 活化的 Tc 细胞还表达配体 FasL, 它可与靶细胞上的受体 Fas 分子(又称 CD95)结合, 促使靶细胞凋亡, 而 T 细胞表面也表达有 Fas, 故 Tc 活化后也可杀死自身或相邻表达 Fas 的 T 细胞, 即为活化诱导的细胞死亡, 此过程对免疫应答的负调节或维持自身耐受很重要^[15-18]。Tc 细胞活化后还会释放细胞因子如干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 β 等。干扰素 γ 可刺激抗原提呈细胞表达主要组织相容性抗原 II 类分子, 进而被宿主的 CD4⁺T 细胞所识别促进 Th1/Th2 活化, 释放白细胞介素 2 等因子, 引起更强烈的免疫排斥反应。柳子星等^[19]将干扰素 γ 与软骨细胞共培养后发现软骨细胞可表达主要组织相容性抗原 II 类分子, 使其发挥类似抗原提呈细胞功能, 这进一步证实了干扰素 γ 的刺激作用, 并说明软骨细胞移植后还诱导了主要组织相容性抗原 II 类分子表达, 从而激活了主要组织相容性抗原 II 分子-CD4⁺T 细胞免疫反应途径。同时干扰素 γ 还具有增强自然杀伤细胞的细胞毒性, 促进细胞毒性 T 淋巴细胞成熟等特点。正常情况下, 主要组织相容性抗原 I 类分子和自然杀伤细胞的抑制性受体相结合, 有效阻止了自然杀伤细胞对自身正常组织的攻击, 但杀伤细胞免疫球蛋白样受体不能识别同种异基因或异种细胞的主要组织相容性抗原 I 类分子, 故在同种异体软骨移植中无法转导负向调节信号, 致使自然杀伤细胞处于激活状态, 从而杀伤异体软骨细胞^[20]。另外由 T 细胞介导的免疫反应中所释放的细胞因子如干扰素 γ 和白细胞介素 2 均可进一步增强自然杀伤细胞的细胞毒性。

2.3 冷冻保存对软骨组织免疫排斥反应的影响 同种异体软骨移植后有较强的免疫排斥反应, 为了维持软骨移植后的存活率和稳定性, 目前多采用冷冻保存降低异体软骨移植免疫排斥反应的方法。

深低温冻存尤其是梯度降温可明显减轻软骨细胞抗原性, 从而预防性地降低移植后的免疫排斥反应^[21], 该现象可能的解释有: ①低温冷冻选择性去除或减少了过路淋巴细胞, 或丧失了对过路淋巴细胞的免疫刺激能力, 从而导致了抗原性降低。②深低温冻保存降低了移植软骨树突状细胞的数量和功能, 减少了抗原提呈作用^[22]。但该方法会影响细胞的活力, 董维平等^[23]研究表明, 冰冻较 4℃ 保存相比, 尽管可以提供更多数量的存活细胞, 但由于冰冻作用的坏死、渗透性的改变以及凋亡过程等都直接降低了细胞活力, 并且导致炎症物质的释放和基质金属蛋白酶的表达。有学者报道术前应用 ⁶⁰Co 照射肋软骨可降低同种异体肋软骨的抗原性,

减轻炎症反应, 减少软骨吸收^[24]。

在冷冻过程中保证软骨细胞有效的存活率和基质的完整性是关节软骨移植保持长期功能的关键。Muldrew 等^[25]对经过冷冻保存后的兔关节软骨自体移植后 3 个月~1 年检测结果表明许多软骨在复温后冷冻损伤虽不明显, 仍对长期移植效果有潜在性损伤作用。同时, 他把 20 只绵羊骨软骨冷冻保存后进行自体软骨移植并在 3, 12 个月观察, 实验表明移植后 1 年经过冷冻的移植体都有球形软骨细胞簇出现, 其平均大小从 3 个月的 4 个细胞到 1 年的 12 个细胞组成, 簇中的软骨细胞可产生新的 II 型胶原和 mRNA 合成, 有些软骨细胞有两个中心体, 说明成年软骨细胞保持着产生软骨基质的能力, 软骨移植治疗关节软骨缺损是可行的^[26]。也有实验研究表明, 冷冻后的关节软骨移植后软骨基质随时间延长呈进行性退化改变, 显微镜下可见软骨表面有裂口形成, 可能由于冷冻造成的生物力学特性改变不可避免的造成冷冻关节软骨移植后软骨的改变^[27]。软骨移植后远期效果不理想, 可能存在原因有: ①软骨细胞存活率多大才足以维持软骨基质的完整性目前尚无定论, 但传统冷冻保存的软骨细胞 50% 存活率太低。②存活软骨细胞的代谢活性下降, 不能合成足够的基质。③冷冻保存损伤了软骨基质的完整性, 而存活的软骨不能进行修复^[28]。

2.4 冷冻方法的比较性研究 同种异体关节软骨(细胞)移植的成功不仅要求软骨细胞能够耐受深低温的冷冻保存, 更主要的是要求存活的细胞必须保持关节软骨细胞的生物学特性, 即保持正常的细胞形态以及合成基质糖胺多糖和 II 型胶原的能力^[29]。目前软骨组织的保存还处于研究阶段。多数骨库都采用深低温冷冻或冷冻干燥的方法对大块关节移植体进行保存, 这些移植体复温后成活的软骨细胞量极少, 远远达不到维持正常关节功能的要求。研究表明, 软骨组织的冷冻保存并非只是一个低温存放的简单过程, 更重要的是在软骨组织冷冻前给予有效的冷冻保护措施, 尽量减轻冷冻对软骨细胞所造成的损害^[30]。一般认为单纯冷冻保存对软骨细胞的存活是不利的。冷冻过程中的各个环节: 降温速度、停留温度和时间长短、冷冻保护剂的种类和浓度以及复温过程的复温速度都对软骨组织有不同程度的影响。到目前为止, 经梯度降温的两步冷冻法被认为是保存软组织结构最好的冷冻保存方法。

依据冷冻损伤理论, 采用梯度降温冷冻法, 缓慢降温达预定温度, 使冰晶缓慢生长, 可避免冰晶的大量形成, 同时以便有更多的时间使溶质弥散, 使细胞内外渗透压达到动态平衡。对于软骨组织冷冻保存过程中的冷冻损伤机制的深入认识, 能更好认识到冷冻过程各环节存在的问题。通过低温保护剂、降温速度与复温速度等各方面的改进, 可提高异体骨软骨移植物的存活

率。Jomha 等^[15]研究发现,低浓度二甲基亚砷中软骨基质有大量的冰晶形成,而在高浓度的二甲基亚砷中会出现周围溶液的玻璃化,并且基质中也有冰晶的存在。扫描电镜结果显示,在低浓度二甲基亚砷中可见大量的基质断裂征象,很可能是由于结冰造成的,而在高浓度的二甲基亚砷中基质断裂现象少见。在快速降温和高浓度二甲基亚砷条件下进行的关节软骨冷冻保存可能会导致部分软骨基质的玻璃化,基质断裂现象减少。Wingenfeld 等^[31]实验证明,将软骨组织浸泡于含 10% 二甲基亚砷的林格氏液中,在 4 °C 环境下保存 30 min,以提高软骨细胞的生存率,然后施行两阶段冷冻,先以缓慢速度(-15 °C/min)降温至-40 °C,再快速降温至-70 °C 环境下保存,可保存约时间,移植后效果好^[32]。有人曾研究了快速复温对冷冻保存后关节软骨的影响,实验结果表明各组软骨组织均保持典型的软骨样特征,这表明快速复温后的关节软骨能够存活,并保持原有的生物学活性。

3 讨论

异体软骨组织移植是治疗关节软骨缺损的主要方法之一,其治疗效果明显优于其他治疗方法^[15]。冷冻保存关节软骨保持了软骨组织的性状和生物学活性,而且可择期完成关节重建,并且有充裕的时间完成多项指标的检测,防止供体携带的细菌病毒和传染性疾病的传播,并且降低了软骨组织的抗原性,具有较大的临床应用价值。但是在冷冻保存的各个环节,如:低温保护剂的应用、降温和复温的速度等方面还存在诸多问题,软骨移植后仍然会出现软骨吸收、退变等现象。随着冷冻生物学的不断进步,冷冻损伤机制的不断揭示,这些问题终将会解决,软骨组织的冷冻保存技术会得到进一步的完善。

4 参考文献

[1] Schachar NS, Novak K, Hurtig M, et al. Transplantation of cryopreserved osteochondral Dowel allografts for repair of focal articular defects in an ovine model. *J Orthop Res.* 1999, 17 (6): 909-919.

[2] Lubke C, Sittiger M, Burmester GR, et al. Cryopreservation of artificial cartilage: viability and functional examination after thawing. *Cells Tissues Organs.* 2001; 169 (4): 368-376.

[3] 赵其纯, 周建生, 胡汝麒. 浸泡时间与关节软骨冷冻保存的关系[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(1): 46-48.

[4] Van der Kraan PM, Van den Berg WB. Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Curr Op in Clin Nutr Metab Care.* 2000; 3(3): 205-211.

[5] Langer F, Gross AE, Greaves MF. The auto-immunogenicity of articular cartilage. *Clin Exp Immunol.* 1972; 12(1): 31-37.

[6] Moskalewski S, Hyc A, Osiecka-Iwan A. Immune response by host after allogeneic chondrocyte transplantation to the cartilage. *Micr osc Res Tech.* 2002; 58(1): 3-13.

[7] Mamyama S, Hasegawa Y, Sakano S, et al. Experimental evaluation of the usefulness of osteochondral allograft for articular cartilage defects. *J Orthop Sci.* 2003; 8(4): 560-566.

[8] 宋红星, 曹峻岭. 同种异体软骨细胞移植修复兔膝关节软骨缺损的免疫反应[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9 (1): 32-34.

[9] 蔡伟平, 汤亭亭. 异体软骨细胞移植修复关节软骨缺损免疫反应及处理[J]. 国外医学: 骨科学分册, 2005, 26(3): 171-173.

[10] Romaniuk A, Malejczyk J, Kubicka U, et al. Rejection of cartilage formed by transplanted allogeneic chondrocytes: evaluation with monoclonal antibodies. *Transpl Immunol.* 1995; 3(3): 251-257.

[11] Osiecka-Iwan A, Hyc A, Józwiak J, et al. Transplants of rat chondrocytes evoke strong humoral response against chondrocyte-associated antigen in rabbits. *Cell Transplant.* 2003; 12(4): 389-398.

[12] Rendal-Vazquez ME, Maneiro-Pampin E, Rodriguez-Cabarcos M, et al. Effect of cryopreservation on human articular chondrocyte viability, proliferation, and collagen expression. *Cryobiology.* 2001; 42(1): 2-10.

[13] Kubo T, Arai Y, Namie K, et al. Time-sequential changes in biomechanical and morphological properties of articular cartilage in cryopreserved osteochondral allografting. *J Orthop Sci.* 2001; 6(3): 276-281.

[14] Osiecka-Iwan A, Hyc A, Moskalewski S. Immunosuppression and rejection of cartilage formed by allogeneic chondrocytes in rats. *Cell Transpl.* 1999; 8(6): 627-636.

[15] Jomha NM, Anoop PC, McGann LE. Intramatrix events during cryopreservation of porcine articular cartilage using rapid cooling. *J Orthop Res.* 2004; 22 (1): 152-157.

[16] Tojo T, Kitamura S, Gojo S, et al. Epithelial regeneration and preservation of tracheal cartilage after tracheal replacement with cryopreserved allograft in the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 116(4): 624.

[17] 高静, 周刚. 深低温冻储在大鼠同种异体气管移植中免疫抑制作用[J]. 中国实用美容整形外科杂志, 2005, 16(4): 249-252.

[18] 王德春, 陈峙嵘, 宋后燕, 等. 聚乙二醇负载同种异体软骨细胞移植修复兔关节软骨缺损[J]. 中华创伤杂志, 1997, 13(4): 228-231.

[19] 柳子星, 张惠珍, 葛海良, 等. MHC II类抗原的诱导性表达和同种异体软骨细胞移植的免疫排斥[J]. 上海免疫学杂志, 2002, 22(30): 178-181.

[20] Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, et al. Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 106(5): 912-917.

[21] Oei FB, Stegmann AP, Vaessen LM, et al. Immunological aspects of fresh and cryopreserved aortic valve transplantation in rats. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71(5 Suppl): S379.

[22] Meyer SR, Campbell PM, Rutledge JM, et al. Use of an allograft patch in repair of hypoplastic left heart syndrome may complicate future transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005; 27(4): 554-560.

[23] 董维平, 张洪德, 胡远峰, 等. 冷冻保存对人对胰岛免疫原性的影响[J]. 上海免疫学杂志, 1997, 17(6): 355.

[24] 瞿玉兴, 董天华, 张志霖, 等. 超低温冷冻保存后同种异体神经移植的试验研究[J]. 中华手外科杂志, 2002, 18(1): 59-62.

[25] Muldrew K, Novak K, Yang H, et al. Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes. *Cryobiology.* 2000; 40(2): 102.

[26] 张惠珍, 王树军, 柳子星, 等. 猪软骨细胞同种异体移植的免疫排斥机制[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(2): 144-147.

[27] Stevenson S, Dannucci GA, Sharkey NA, et al. The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1989; 71(9): 1297-1307.

[28] 胡洪亮, 曹宜林, 陈婷婷, 等. 同种异体组织工程化软骨局部免疫豁免诱导的实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(14): 2757-2760.

[29] Csonge L. Transplantation immunology of bone and other collagen-based tissues. *Orv Hetil.* 1994; 135(25): 1347-1351.

[30] 沈雁, 陈涛, 唐毅, 等. II型胶原介导的细胞毒免疫学实验[J]. 国际医药卫生导报, 2004, 10(20): 8-10.

[31] Wingenfeld C, Egli RJ, Hempfing A, et al. Cryopreservation of osteochondral allografts: dimethyl sulfoxide promotes angiogenesis and immune tolerance in mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84(8): 1420-1429.

[32] Eiselt P, Kim BS, Chacko B, et al. Development of technologies aiding large tissue engineering. *Biotechnol Prog.* 1998; 14(1): 134-140.

关于作者: 第一作者构思并设计本综述, 分析并解析数据, 所有作者共同起草, 第一作者对本文负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 未涉及与伦理冲突的内容。

此问题的已知信息: 深低温冻存尤其是梯度降温可明显减轻软骨细胞抗原性, 从而预防性地降低移植后的免疫排斥反应。经梯度降温的两步冷冻法被认为是保存软组织效果最好的冷冻保存方法。