

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.44.021 [http://www.crter.org]  
刘召庆, 亓建洪. 异体软骨组织移植物的体外液体保存[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(44):7785-7790.

## 异体软骨组织移植物的体外液体保存\*

刘召庆, 亓建洪(泰山医学院运动医学研究所, 山东省泰安市 271000)

### 文章亮点:

1 在当前各种治疗关节软骨损伤的措施中, 人工关节置换疗效较为可靠, 但不适合年轻患者, 自体骨软骨移植因来源受限且进行二次手术限制了此方法的临床应用。自体软骨细胞移植技术因其软骨细胞培养费用高, 难以在临床推广使用。而异体软骨移植因取材相对容易且不用二次手术, 为关节重建和肢体功能恢复提供有力条件, 因此值得深入探究。

2 异体骨软骨移植仍存在诸多问题, 其中最重要的核心问题便是异体骨软骨如何在体外进行更长时间的保存, 并且仍具有良好的移植效果, 众学者提出了多种不同的保存方法, 通过对各种保存方法的对比发现液体保存法在保持软骨组织活性、提高细胞成活率方面具有一定优越性。

3 通过回顾已发表中英文文献, 分别从异体软骨组织体外液体保存方法、液体培养环境以及培养液成分、软骨细胞存活率等几个方面, 阐述体外液体保存法对于异体软骨组织移植的意义。

### 关键词:

器官移植; 器官移植综述; 异体移植; 软骨移植; 软骨移植综述; 骨软骨; 体外保存; 液体保存; 软骨细胞; 培养液; 软骨细胞成活率; 研究进展

### 主题词:

骨移植; 软骨, 关节; 移植, 同种; 低温保存

### 摘要

**背景:** 由于关节软骨无神经和血管, 其营养主要来源于滑液和滑膜血管的渗透作用, 自身修复能力有限, 因而如何更好的修复关节软骨损伤成为亟待解决的医学难题。

**目的:** 回顾近年来关于软骨损伤修复方法以及异体软骨体外保存方法的文献研究, 找到适合异体软骨组织体外保存的最佳保存条件以及培养液介质成分, 从而提高异体软骨组织体外保存效果。

**方法:** 计算机检索 PubMed 数据库和中国期刊全文数据库(CNKI)于 1990 年 1 月至 2013 年 2 月有关异体软骨组织移植体外液体保存方法的研究, 检索关键词分别为“Osteochondral allograft; tissue culture; chondrocyte survival rate; *in vitro*”和“关节软骨; 异体移植; 液体保存”, 排除发表时间较早或重复研究。

**结果与结论:** 目前主要有 2 种方法体外保存异体骨软骨。低温冷冻保存法保存后的软骨细胞存活率降低明显, 影响移植效果, 因此临床应用较少。液体保存法能够提高细胞成活率, 保持组织活性, 但保存时间不长, 不能广泛应用。学者们又进一步改良液体培养环境以及培养液成分, 延长了软骨组织体外保存时间, 提高了软骨组织保存效果。

## *In vitro* liquid preservation of allogeneic cartilage graft

Liu Zhao-qing, Qi Jian-hong (Taishan Medical University Institute of Sports Medicine, Taian 271000, Shandong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Because of deficiency of nerves and blood vessels of articular cartilage, its nutrition is mainly derived from the synovial fluid or synovial vascular osmosis. Limited in their ability to repair itself, so how to repair articular cartilage damage better become medical problems to be solved.

**OBJECTIVE:** To review to the literatures on the repair of cartilage damage method and allogeneic cartilage *in vitro* preservation method in recent years, and to find the optimal preservation conditions and the culture medium composition that suitable for *in vitro* preservation of allogeneic cartilage tissues, thus enhancing the effect of allogeneic cartilage *in vitro* preservation.

**METHODS:** A computer-based online search was performed in the PubMed database and the CNKI database to search papers on the *in vitro* liquid preservation of allogeneic cartilage graft published from January 1990 to February 2013. The key words were “osteochondral allograft, tissue culture, chondrocyte survival rate, *in vitro*” in English and “articular cartilage; allogeneic transplantation; liquid preservation” in Chinese. The articles published earlier and repetitive researches were excluded.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At present, there are two methods for the preservation of allogeneic osteochondral grafts. After cryopreservation, the survival rate of chondrocytes is decreased significantly which can affect the transplantation effect, therefore there is less clinical application. Liquid preservation method can enhance the survival rate of cells, maintain the organization activity, but the preservation time is short that cannot

刘召庆★, 男, 1985 年生, 山东省邹城市人, 汉族, 泰山医学院在读硕士, 主要从事关节软骨损伤修复方面的研究。  
liuzq3385@163.com

liuzq3385@163.com

通讯作者: 亓建洪, 博士, 教授, 泰山医学院运动医学研究所, 山东省泰安市 271000

jhq@tsmc.edu.cn

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)44-07785-06

收稿日期: 2013-03-26

修回日期: 2013-05-24

(201303260/M·C)

Liu Zhao-qing★, Studying for master's degree, Taishan Medical University Institute of Sports Medicine, Taian 271000, Shandong Province, China  
liuzq3385@163.com

Corresponding author: Qi Jian-hong, M.D., Professor, Taishan Medical University Institute of Sports Medicine, Taian 271000, Shandong Province, China  
jqh@tsmc.edu.cn

Received: 2013-03-26

Accepted: 2013-05-24

be widely used. Scholars have further improved the environment of liquid preservation and composition of liquid culture medium, extended the *in vitro* preservation time of cartilage tissue, and improved the effectiveness of cartilage tissue preservation.

**Subject headings:** bone transplantation; cartilage, articular; transplantation, autologous; cryopreservation

Liu ZQ, Qi JH. *In vitro* liquid preservation of allogeneic cartilage graft. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(44):7785-7790.

## 0 引言 Introduction

随着近年来人们生活水平的提高以及体育运动的全面普及, 关节软骨损伤患者显著增多, 然而关节软骨无神经和血管, 其营养主要来源于滑液和滑膜血管的渗透作用, 自身修复能力有限, 因而如何更好的修复关节软骨损伤成为亟待解决的医学难题。目前, 临床上治疗关节软骨缺损的方法主要有微骨折法、组织工程治疗法、自体软骨细胞移植、关节置换、关节软骨移植法。人工关节置换的疗效较为可靠, 但不适合年轻患者, 自体软骨移植因来源受限且进行二次手术而限制了此方法的临床应用。自体软骨细胞移植术因其软骨细胞培养费用高, 难以在临床推广使用。而异体软骨移植因取材相对容易且不用二次手术的特点值得探究以及临床应用<sup>[1]</sup>。而如何将供体取下的异体软骨体外进行更长时间的保存, 且仍具有良好的保存效果, 成为众学者争相研究的焦点。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 由第一作者应用计算机检索中国期刊全文数据库和PubMed数据库(1990年1月至2013年3月)的相关文献。检索词“关节软骨; 异体移植; 液体保存”和“Osteochondral allograft; tissue culture; chondrocyte survival rate; *in vitro*”, 限定文章检索的语言种类为中文和英文。

**1.2 纳入标准** ①软骨损伤修复方法以及异体软骨体外保存方法的对比研究。②异体软骨液体培养环境以及培养液成分的相关对比研究。③同一领域内容选择新近发表在权威杂志上的文章。

**1.3 排除标准** 报道时间较早的研究或重复研究。

**1.4 质量评估** 收集132篇相关文献, 阅读标题和摘要后初步筛选, 排除51篇研究目的与此文无关的研究, 重复研究共计40篇, 共保留41篇文献做进一步分析。

**1.5 数据提取** 由3名评价员独立阅读所获文献标题、摘要和全文, 以确定符合纳入标准的文献。如有不同意见相互讨论协商解决最终得出完整纳入文献

篇目。

## 2 结果 Results

**2.1 纳入文献基本情况** 异体软骨组织不同保存方法研究4篇, 异体软骨组织体外保存环境以及培养液成分研究23篇, 体外软骨细胞培养研究14篇。

**2.2 关节软骨特点** 人体正常的关节软骨呈亮白色、透明状, 表面光滑, 它是组成滑膜关节面的有弹性的负重组织, 可减轻关节反复滑动中关节面的摩擦, 具有润滑和耐磨损的特性, 并且还能吸收机械性振荡, 传导负重致软骨下骨, 它对维持关节运动具有重要意义。关节软骨内无血管、淋巴管及神经组织, 组织代谢活性较低, 其营养源仅限于关节液, 因此关节软骨自身修复能力非常有限<sup>[2]</sup>。当关节剧烈活动或遭受外来因素造成关节过度扭转或承受超负荷压力时, 不仅可能造成关节内及关节周围支持韧带的损伤, 也可能造成部分或全层的软骨缺损, 一旦关节软骨损伤, 其修复的可能性很小。对于关节软骨的部分缺损, 一般认为软骨细胞没有修复能力, 也有人认为可以修复, 但修复过程极为缓慢; 对于软骨的全层缺损, 一般认为其修复过程主要为松质骨中的纤维结缔组织生长渐变为纤维软骨。由于病变关节的不可逆病变, 最终导致骨性关节炎的发生和关节功能的丧失, 给患者的生活带来极大的痛苦。

**2.3 关节软骨损伤修复方法** 在当前的各种治疗措施中, 人工关节置换的疗效较为可靠, 但不适合年轻患者, 自体骨软骨移植因来源受限且进行二次手术而限制了此方法的临床应用。自体软骨细胞移植术因其软骨细胞培养费用高, 难以在临床推广使用<sup>[3]</sup>。低温冷冻保存法保存后的软骨细胞存活率降低明显, 影响移植效果, 临床应用较少<sup>[4]</sup>。而异体软骨取材相对容易, 具有“免疫豁免”特性, 使之移植后免疫排斥显著降低, 并且不用二次手术, 为关节重建和肢体功能恢复提供有力条件, 因此值得探究以及临床应用。目前来看这种方法不失为治疗软骨损伤的最佳治疗方法。然而异体骨软骨移植仍存在诸多问题, 如新鲜异体骨软骨移植后临床应用时间紧迫, 运输不方便, 且供体常不确定以及存在免疫原性等。

**2.4 异体软骨组织移植物体外保存方法** 冷冻保存法即在低温条件下保存异体软骨组织,应用时直接取出手术修复缺损。随着低温保护剂、冷冻程序等方面的不断改进,此方法取得了长足进步。Onuma等<sup>[5]</sup>对传统降温方法和玻璃化法做了大量的研究认为:传统的降温方法会对软骨细胞造成巨大伤害,同时显著降低软骨细胞的存活率。而亓建洪等<sup>[1]</sup>通过对人异体骨软骨移植体保存方法的研究证实了这一论断,同时证明了玻璃化法保存后的细胞存活率仍较低,对降温 and 复温要求太高。因此,低温冷冻保存法保存后的软骨细胞存活率降低明显,影响移植效果,临床应用较少。

组织培养技术则是在体外的液体环境中模拟体内细胞生长条件<sup>[6-7]</sup>,从而更加有效的为细胞提供营养的生长环境,使之保持较高的细胞活性。这一方法在器官移植领域已经投入使用,如可以作为肾移植、心脏移植等使用的UW保存液,腹部器官移植使用的HTK保存液,以及近年对肾移植过程中有良好保存效果的IGL-1保存液。这些保存液已经为大多数移植中心所应用,取得了满意的短期及长期的保存效果。对于异体骨软骨的液体保存研究始于20世纪70年代,而后随着社会的高速发展,人们医疗需求的不断提高,各国纷纷建立自己的骨组织库。特别是进入21世纪以来,关于液体保存异体骨软骨的研究大量开展,这些研究主要集中在如何提高骨软骨移植体质量(即移植软骨细胞成活率、细胞活性、软骨基质生物化学及生物力学特点等)和延长体外组织培养保存时间两方面进行了深入研究,具体体现在组织培养保存介质成分优化、温度与环境、保持软骨细胞活力的因子以及阻止软骨细胞凋亡的机制等方面,这些研究为建立骨组织库奠定了良好的科研基础。Malinin等<sup>[8]</sup>采用成人股骨、髌骨软骨组织进行了液体保存实验,在第21天时细胞的存活率尚能达到88%,到第25天则迅速下降至64%,之后更是直线下降。宋洪强等以猪的膝关节软骨组织进行了液体保存实验,也发现在一定时间内保存的异体骨软骨组织,其软骨细胞成活率以及组织活性可以保持在一个较高的水平。由此可见,相对于冷冻保存法,液体保存法能够提高细胞成活率,保持组织活性,但保存时间不长成为不能广泛临床发展的诟病。

## 2.5 异体软骨组织体外液体保存方法的研究进展

**2.5.1 液体培养环境的相关研究进展** 液体培养的环境与条件包括培养温度、pH值等。关于异体骨软骨体外液体保存温度,Pallante等<sup>[9]</sup>研究发现异体羊骨软骨组织在4℃条件下,经28 d的保存后软骨细胞成活率仍能保持在一个较高水平。Dontchos等<sup>[10]</sup>将4℃条件下保存的关节软骨分别保存在体积分数为5%CO<sub>2</sub>或空气中培养5-14 d,并与加HEPES平衡液组进行对比,结果发现在体积分数为5%CO<sub>2</sub>环境下

和加HEPES平衡液组,培养后细胞的存活率比单纯空气环境下的高。这是因为体积分数为5%CO<sub>2</sub>条件和HEPES平衡液一样能够帮助维持培养液的pH值维持在7.4左右,接近关节软骨生理情况下关节滑液的pH。因此可见恰当的保存温度和pH值对软骨细胞的生存起积极促进作用。

**2.5.2 培养液成分的相关研究进展** 液体保存移植物的核心在于体外的液体环境中模拟体内组织或者细胞生长条件,从而更加有效的为细胞提供营养的生长环境,使之保持较高的细胞活性。因此,液体中的成分成为能否提高异体软骨组织保存效果的最重要的一环,对延长保存时间有重要意义。众学者对此也进行了较为深入的探索研究。Onuma等<sup>[5]</sup>对乳酸林格式液、DEME、EC solution 和UW液培养保存的比较研究中发现,UW液取得了较好的效果,保存7 d后的细胞存活率超过50%,DEME的效果最差。Pennock等<sup>[11]</sup>的研究结果发现,以DMEM液作为培养液保存28 d后,细胞成活率仍能达到67%。EMEM作为一种最为常用的组织和细胞体外培养的液体,包含了各种组织和细胞维持生存和活性所需的最基本的成分,并有相关研究表明特异性适合软骨细胞生长。

由此,以各种培养基为体外软骨组织基础保存液的各种研究相继开展,取得了一定成绩<sup>[12]</sup>。Carl等<sup>[13]</sup>研究发现在培养液(EMEM)中加入200 μg维生素E,37℃条件下培养30 d能够使骨软骨块的弹性性能、承受剪应力的能力和时间依赖性变形率方面维持在新鲜骨软骨块的水平,在生化代谢活性及组织形态的维持上较对照组也有更好的结果。Bae等<sup>[2, 14]</sup>发现RPMI-1640液20 mL加入1 mL EGCE能够提高4℃下保存2周以及进行动物移植4周后移植物的细胞存活率、软骨基质的含量以及移植后的功能恢复。

Andrew等<sup>[15]</sup>的研究结果发现,MEME加入体积分数为10%浓度小牛血清的培养液保存28 d后,细胞活性百分比为67%,高于不加血清的培养液(27%),活细胞的密度(8 964/mm<sup>3</sup>)大于不加血清的培养液(3 251/mm<sup>3</sup>),<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>摄取率200.8 cpm/mg大于30.0 cpm/mg。但是Biain等<sup>[16]</sup>的研究结果指出,骨软骨块培养加入血清后出现了细胞的过快增生,软骨细胞的表型发生了变化,细胞出现水肿较明显、软骨块的体积出现了膨胀。这对于组织的移植应用以及之后的存活是不利的。Andrew等<sup>[15]</sup>的文章同时指出,虽然血清的加入能够利于细胞的生长,但是血清毕竟是异种成分,其造成的潜在的免疫反应和疾病的传染也是不容忽视的。总之,血清对于骨软骨组织的液体培养是利还是弊仍存在争论<sup>[17]</sup>。

Teng等<sup>[18]</sup>将DMEM液与加入了ZVAD-fmk的DMEM液进行骨软骨组织培养做了比较,从第3周开

始加入 ZVAD-fmk 组细胞存活率为 52.4%，高于 DMEM 液组的 31.2%。这说明加入 ZVAD-fmk 后这种细胞凋亡抑制剂能够在一定程度上提高细胞成活率进而改善组织培养效果。Bae 等<sup>[2]</sup>对兔的关节软骨进行研究，发现在 4 °C 条件下培养液中加入 EGCG 后，基质中蛋白多糖的含量显著增加，提高了骨软骨组织的细胞活性，并通过体内植入实验证明其能改善骨软骨移植后的效果。对此其在进一步的实验中证明了培养液中加入 EGCG 后，软骨细胞多由 G<sub>0</sub> 期进入 G<sub>1</sub> 期，软骨细胞活性显著增加，进而也在体内植入实验中取得了良好的效果。刘刚等<sup>[19]</sup>体外单层培养兔关节软骨细胞实验证实，碱性成纤维细胞生长因子能够促进关节软骨细胞的增殖和基质的代谢，从而缩短细胞周期，达到促进细胞分裂增殖的目的。

**2.5.3 软骨细胞存活率的相关研究进展** 如何更好的保持软骨细胞存活率是实现临床异体骨软骨移植最核心的一环，软骨细胞成活率的高低直接决定了移植效果。但是在长时间的体外液体保存中，软骨细胞不但会受自然凋亡的影响，而且会因细胞代谢产生各种有毒物质造成不可逆的死亡，所以细胞成活率成为检验保存效果的金标准之一，由此而来的针对长时间液体保存中软骨细胞成活率的研究便相继展开。无论是 Pallante 等<sup>[4]</sup>研究不同温度对于保存效果的影响，还是 Teng 等<sup>[18]</sup>研究不同因子对于保存效果的影响，均采用软骨细胞成活率作为对体外液体保存效果好坏的评判金标准。所以，软骨细胞成活率的检测已经成为了国内外的主流，软骨细胞成活率成为检验保存效果的金标准之一。

**2.5.4 液体培养的保存天数与结果相关研究进展** 用于新鲜移植的保存时间一般为自捐献者心跳停止后 5 d 左右。这时软骨细胞的存活率大都在 90% 左右，培养法进行保存研究的时间一般选取 1, 7, 14, 28 d 为进行软骨功能检测的时间点。少量研究为 30 d 或超过 30 d，最多 60 d<sup>[20]</sup>。大部分实验的结果显示保存 7 d 的时候各项检测指标相当于新鲜移植物的 90% 左右水平，14 d 时细胞存活率以培养液成分的不同在 65%–88%，28 d 时出现比较明显的下降，少数实验能达到 65% 左右，但大多数实验为 20%–40%。相对于软骨细胞存活率的明显下降，软骨基质成分蛋白多糖，胶原蛋白和生物力学的变化下降速率较慢<sup>[6, 13, 21–23]</sup>。

### 3 讨论 Discussion

低温冷冻保存法保存后的软骨细胞存活率降低明显，细胞大面积死亡或者凋亡，已经失去活性，影响移植效果，因此临床应用较少。而体外液体保存法

在一定时间内保存的异体骨软骨组织，其软骨细胞成活率以及组织活性可以保持在一个较高的水平。由此，相对于冷冻保存法，液体保存法能够提高细胞成活率，保持组织活性，不失为保存异体软骨组织的一种有效方法。

随着液体保存方法的深入探讨，针对液体培养环境以及液体培养基的相关研究相继开展。为了保持所保存软骨组织细胞的活性，维持其基本的代谢活动，培养液的成分成为了影响保存效果的最重要的因素，很多研究人员的目光都投往了这一领域，选择了多种培养液，其中包括 DMEM<sup>[24–26]</sup>、EMEM<sup>[14, 27]</sup>、RPMI-1640<sup>[4, 20, 22]</sup>、X-vivo 10<sup>[24]</sup>、UW 液等<sup>[25]</sup>，取得了不同的保存效果。有人针对基础培养液以各常用液体培养基进行对比，得出 EMEM 为最佳培养基的结论<sup>[21, 26]</sup>。这是一种被广泛应用于组织和细胞体外培养的液体，包含了普通组织和细胞维持正常生存和代谢活性所需的最基本的成分。当前许多进行软骨组织体外液体保存的研究都采用了这种培养液。事实上，针对采用哪种培养液作为基础培养液的问题所进行的讨论并不多，在当前的研究中，对于配制出一种能够最大程度延长保存时间的液体作了很多有意义的尝试，发现了多种对于保存有益的成分。无论哪种培养基，无不在模拟软骨细胞的体内生长环境，使得软骨细胞在长时间的体外保存中，获得维持其生长的营养物质，因而使得一定时间保存后的软骨细胞成活率仍能保持较高的水平。而后又进行了在基础培养液中添加不同功能作用的因子的研究<sup>[6, 18, 28]</sup>，如生长因子、细胞凋亡抑制剂、抗氧化剂等。这些因子的特殊功能使得软骨在长时间的保存中，保证了软骨细胞的生长，同时又抑制了软骨细胞的凋亡、老化，起到了各种不同功能作用的因子协同提高软骨细胞成活率的作用。如 Teng 等<sup>[18]</sup>在 DMEM 液加不加入 ZVAD-fmk 做比较，在保存 21 d 后加入 ZVAD-fmk 组细胞存活率为 52.4%，显著高于对照组的 31.2%。这说明加入 ZVAD-fmk 这种细胞凋亡抑制剂能够在一定程度上提高细胞成活率，对提高保存效果起正向作用。作者认为 ZVAD-fmk 作为一种细胞凋亡抑制剂，能有效阻断 Caspase 信号传导通路，通过影响特定信号分子而抑制细胞凋亡。由此可见加入这种因子可能阻断传导通路，从而抑制了软骨细胞凋亡，对软骨组织保存效果起了正向作用。但是在微观层面添加这种因子是如何开启抑制凋亡程序，以及抑制软骨细胞走向凋亡的具体机制，值得今后研究探讨。Bae 等<sup>[2]</sup>发现 RPMI-1640 液 20 mL 加入 EGCE 1 mL 能够提高 4 °C 下保存 2 周以及进行动物移植 4 周后移植物的细胞存活率、软骨基质的含量以及移植后的功能效果。作者认为 EGCG 作为一种绿茶提取物，具有强抗氧化性功能。由此可见

加入这种因子后能有效防止软骨细胞软化,降低衰老速度,显著提高其成活率。由此可见,生长因子、细胞凋亡抑制剂、抗氧化剂等因子的特殊功能使得软骨在长时间的保存中,保证了软骨细胞的生长,同时又抑制了软骨细胞的凋亡、老化,起到了各种不同功能作用的因子协同提高软骨细胞成活率的作用。

对于软骨细胞活性的检测又主要集中在了软骨细胞成活率这一标准上,通过这一准确直观的标准来基本判断软骨保存的效果。在长时间的异体软骨体外液体保存中,添加不同因子的实验研究表明有提高软骨组织保存效果的功能,作者认为可能主要是软骨细胞不但从液体中获得了充足的营养物质,更重要的是给软骨细胞提供了新陈代谢的类似体内的液体环境。而在更长时间的保存中软骨细胞成活率显著下降,作者认为可能软骨细胞此时发生了一些不可逆的凋亡,基质中的有毒代谢物质增多,加速了软骨细胞的死亡。无论是Pallante等<sup>[4]</sup>研究不同温度对于保存效果的影响,还是Teng等<sup>[18]</sup>研究不同因子对于保存效果的影响,均采用软骨细胞成活率作为评判体外液体保存效果好坏的金标准,说明软骨细胞成活率这一标准的确能够评判移植保存效果,但是到底多少成活率适合移植并无统一论,因此接下来的探索方向便是进一步定量成活率对于移植效果的影响。

总之,异体骨软骨移植治疗全层软骨损伤因其取材容易、不用二次手术等特点成为一个非常有效的方法,但如何在长时间的软骨保存中保持软骨移植物的活性成为众学者争相研究的焦点。而体外软骨组织液体保存法能够一定程度上克服这一缺点,因此对于在体外保存的环境以及培养液成分进行了分门别类的探讨<sup>[29-41]</sup>,发现了一些能提高保存效果的各种不同功能的因子。软骨细胞存活率也成为广用的一种评判方法,对于移植效果起着金标准的作用。但目前针对这种保存方法仍有诸多疑惑,如软骨细胞成活率到底为多少才能适合移植,如何模拟关节软骨的力学环境,如何营造软骨细胞体内生长的微环境,如何对所添加不同因子的浓度进行探索,成为今后对异体软骨保存研究的方向。

**作者贡献:** 第一作者和通讯作者构思并设计本综述,分析并解析数据,经通讯作者审校,第一作者对文章负责。

**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。

**伦理要求:** 无涉及伦理冲突的内容。

**学术术语:** 免疫原性一是指能够刺激机体形成特异抗体或致敏淋巴细胞的能力。即指抗原能刺激特定的免疫细胞,使免疫细胞活化、增殖、分化,最终产生免疫效应物质抗体和致敏淋巴细胞的特性。也指抗原刺激机体后,机

体免疫系统能形成抗体或致敏 T 淋巴细胞的特异性免疫反应。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 亓建洪,王伟,吴雅迪,等.人异体骨软骨移植保存方法研究[J].中国矫形外科杂志,2012,20(1):64-67.
- [2] Bae JY, Matsumura K, Wakitani S, et al. Beneficial storage effects of epigallocatechin-3-o-gallate on the articular cartilage of rabbit osteochondral allografts. Cell Transplant. 2009;18(5):505-512.
- [3] 张洪美,荆琳.自体软骨细胞移植治疗膝关节炎的临床研究与应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(8):1509-1511.
- [4] Pallante AL, Chen AC, Ball ST, et al. The in vivo performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity. Am J Sports Med. 2012;40(8):1814-1823.
- [5] Onuma K, Urabe K, Naruse K, et al. Allogenic serum improves cold preservation of osteochondral allografts. Clin Orthop Relat Res. 2012;470(10):2905-2914.
- [6] Garrity JT, Stoker AM, Sims HJ, et al. Improved osteochondral allograft preservation using serum-free media at body temperature. Am J Sports Med. 2012;40(11):2542-2548.
- [7] Revell CM, Athanasiou KA. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. Tissue Eng Part B Rev. 2009;15(1):1-15.
- [8] Malinin T, Temple HT, Buck BE. Transplantation of osteochondral allografts after cold storage. J Bone Joint Surg Am. 2006;88(4):762-770.
- [9] Pallante AL, Chen AC, Ball ST, et al. The in vivo performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity. Am J Sports Med. 2012;40(8):1814-1823.
- [10] Dontchos I, Robinson D, Cohen N, et al. Storing live embryonic and adult human cartilage grafts for transplantation using a joint simulating device. Biomaterials. 2000;21(21):2117-2123.
- [11] Pennock AT, Wagner F, Robertson CM, et al. Prolonged storage of osteochondral allografts: does the addition of fetal bovine serum improve chondrocyte viability. J Knee Surg. 2006;19(4):265-272.
- [12] 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.
- [13] Carl BM, Shadle CA, Jimenez SA, et al. Articular cartilage preservation and storage. I. Application of tissue culture techniques to the storage of viable articular cartilage. Arthritis Rheum. 1979;22(10):1093-1101.
- [14] Williams SK, Amiel D, Ball ST, et al. Prolonged storage effects on the articular cartilage of fresh human osteochondral allografts. J Bone Joint Surg Am. 2003;85-A(11):2111-2120.

- [15] Andrew NM, Law GK, McGann LE. Storage of porcine articular cartilage at high subzero temperatures. *Cell Tissue Bank*. 2006; 7(1):55-60.
- [16] Brain CT, Shadle CA, Jimenez SA, et al. Articular cartilage preservation and storage. I. Application of tissue culture techniques to the storage of viable articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 1979;22(10):1093-1101.
- [17] Muldrew K, Novak K, Yang H, et al. Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes. *Cryobiology*. 2000;40(2):102-109.
- [18] Teng MS, Yuen AS, Kim HT. Enhancing osteochondral allograft viability: effects of storage media composition. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466(8):1804-1809.
- [19] 刘刚, 马平, 韩一生. bFGF 对培养兔关节软骨细胞作用的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 1999, 6(6): 437-439.
- [20] Czitrom AA, Langer F, McKee N, et al. Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(208):141-145.
- [21] Pennock AT, Wagner F, Robertson CM, et al. Prolonged storage of osteochondral allografts: does the addition of fetal bovine serum improve chondrocyte viability. *J Knee Surg*. 2006;19(4):265-272.
- [22] Shimizu M, Deguchi A, Hara Y, et al. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(3):947-953.
- [23] 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.
- [24] Malinin T, Temple HT, Buck BE. Transplantation of osteochondral allografts after cold storage. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(4):762-770.
- [25] Cohen I, Robinson D, Cohen N, et al. Storing live embryonic and adult human cartilage grafts for transplantation using a joint simulating device. *Biomaterials*. 2000;21(21):2117-2123.
- [26] Aaron RK, Jolly G, Ciombor DM, et al. A histochemical method for the demonstration of calcifying cartilage. *Calcif Tissue Int*. 1988;43(4):244-249.
- [27] Muldrew K, Novak K, Yang H, et al. Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes. *Cryobiology*. 2000;40(2):102-109.
- [28] 张卫东, 杨柳, 唐康来, 等. 关节镜下微骨折术治疗膝关节软骨缺损临床疗效观察[J]. *重庆医学*, 2005, 34(7):980-981.
- [29] Kim HT, Teng MS, Dang AC. Chondrocyte apoptosis: implications for osteochondral allograft transplantation. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466(8):1819-1825.
- [30] Csöngö L, Bravo D, Newman-Gage H, et al. Banking of osteochondral allografts, Part II. Preservation of Chondrocyte Viability During Long-Term Storage. *Cell Tissue Bank*. 2002; 3(3):161-168.
- [31] McCulloch PC, Kang RW, Sobhy MH, et al. Prospective evaluation of prolonged fresh osteochondral allograft transplantation of the femoral condyle: minimum 2-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2007;35(3):411-420.
- [32] Ohlendorf C, Tomford WW, Mankin HJ. Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res*. 1996;14(3):413-416.
- [33] Brighton CT, Shadle CA, Jimenez SA, et al. Articular cartilage preservation and storage. I. Application of tissue culture techniques to the storage of viable articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 1979;22(10):1093-1101.
- [34] Kang HG, Jenabi JM, Liu XF, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor I receptor by epigallocatechin gallate blocks proliferation and induces the death of Ewing tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(5):1396-1407.
- [35] 张洪美, 荆琳. 自体软骨细胞移植治疗膝关节关节炎的临床研究与应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(8):1509-1511.
- [36] 元建洪, 赵建莉, 张延明, 等. 人骨软骨组织体外冷冻保存的效果[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(46):8579-8582.
- [37] 蓝旭, 刘王梅, 曹宝丰, 等. IGF- I 对培养兔关节软骨细胞作用的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2001, 14(6):341-342.
- [38] Revell CM, Athanasiou KA. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15(1):1-15.
- [39] Garrity JT, Stoker AM, Sims HJ, et al. Improved osteochondral allograft preservation using serum-free media at body temperature. *Am J Sports Med*. 2012;40(11):2542-2548.
- [40] Fahy GM, Saur J, Williams RJ. Physical problems with the vitrification of large biological systems. *Cryobiology*. 1990; 27(5):492-510.
- [41] Jomha NM, Anoop PC, Bagnall K, et al. Comparison of high cryoprotectant concentrations for cryopreservation of porcine articular cartilage. *Cell Pres Tech*. 2003;1(3): 201-206.