

不同冷冻技术对同种异体血管移植排斥反应的影响

龙俊东, 史业弘, 王成, 陈世玖

<https://doi.org/10.12307/2024.241>

投稿日期: 2023-02-09

采用日期: 2023-03-29

修回日期: 2023-04-13

在线日期: 2023-04-20

中图分类号:

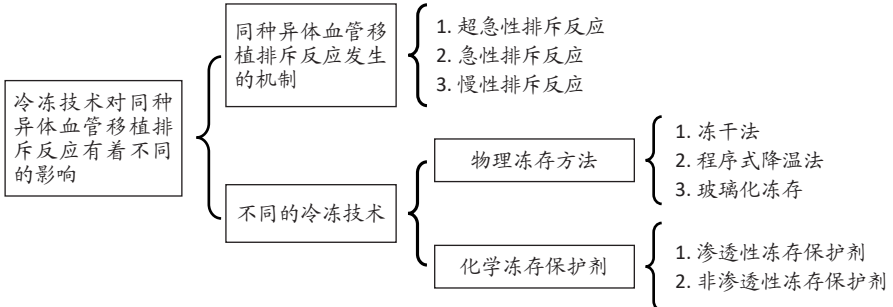
R459.9; R318.52; R654.3

文章编号:

2095-4344(2024)03-00433-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 不同冷冻技术降低同种异体血管移植排斥反应



文题释义:

补体系统: 由一系列的蛋白质组成, 属先天免疫系统的一部分。它能够参与清除与抗体结合的抗原。补体成分能被抗原抗体复合物或者抗体激活, 通过溶胞、调理、吞噬以及介导炎症反应来清除免疫复合物, 在移植排斥反应中起着重要的免疫作用。

水合作用: 水与离子之间的静电作用, 当水中有离子存在时, 这种静电作用会使水分子向离子为中心聚拢, 使得水分子分解成氧原子、氢原子或者羟基, 这是一个放热的过程, 能够减少水分子的运动, 抑制冻存过程中冰晶形成的速度。

摘要

背景: 冻存能够较好地保证血管结构的完整性, 如何改善移植后排斥反应的问题受到越来越多的关注。

目的: 综述不同冷冻技术降低同种异体血管移植排斥反应的研究进展, 以期为临床研究提供参考。

方法: 系统检索中英文数据库CNKI、万方和PubMed以及在线网站Baidu和Google Scholar自建库以来发表的降低同种异体血管移植排斥反应的相关文献。中文检索关键词: 心血管疾病、内皮细胞、低温冻存、血管移植、免疫原性、排斥反应, 同种异体移植和冷冻保护剂; 英文检索关键词: cardiovascular disease、endothelial cells、cryopreservation、blood vessel transplantation or vascular graft、Immunogenicity、immune rejection、allograft or allogeneic transplantation or allograft transplantation and cryoprotectant。按照纳入排除标准共选取68篇文献进行综述。

结果与结论: ①综述发现通过改进现有冷冻技术能够降低同种异体血管移植排斥反应, 其中主要涉及冻融方式和冻存保护剂的选择。②现有研究提示冻干法优于低温冻存, 但限于条件未能广泛开展, 现仍以低温冻存为主, 其中玻璃化冻存、缓慢复温和使用不锈钢乃至含银材料效果优于程序式冻存及快速复温。③渗透性和非渗透性冻存保护剂的联合选择, 可以在降低其毒性的同时, 进一步减少排斥反应的发生。

关键词: 低温冻存; 玻璃化冻存; 程序式降温; 冻存保护剂; 血管移植; 同种异体移植; 排斥反应; 综述

Effects of different freezing techniques on the rejection of allogeneic vascular transplantation

Long Jundong, Shi Yehong, Wang Cheng, Chen Shijiu

Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519100, Guangdong Province, China

Long Jundong, Masher, Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519100, Guangdong Province, China

Corresponding author: Chen Shijiu, Chief physician, Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519100, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Cryopreservation can better ensure the integrity of the vascular structure. How to reduce its immunogenicity to improve rejection after transplantation has attracted more and more attention.

OBJECTIVE: To review the research progress of freezing treatment to reduce vascular immunogenicity after allogeneic vascular transplantation in order to provide a reference for clinical research.

METHODS: A systematic search of Chinese and English databases CNKI, WanFang and PubMed, as well as online websites Baidu and Google Scholar since the establishment of the database has published literature on reducing vascular immunogenicity after allogeneic vascular transplantation. Keywords were "cardiovascular disease, endothelial cells, cryopreservation, blood vessel transplantation or vascular graft, immunogenicity, immune rejection, allograft or allogeneic transplantation or allograft transplantation and cryoprotectant". A total of 68 articles were included according to the inclusion and exclusion criteria.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The review found that the rejection of allogeneic vascular transplantation can be reduced by improving the existing freezing

遵义医科大学第五附属(珠海)医院, 广东省珠海市 519100

第一作者: 龙俊东, 男, 1996年生, 重庆市人, 汉族, 硕士, 主要从事显微外科与创面修复研究。

通讯作者: 陈世玖, 主任医师, 遵义医科大学第五附属(珠海)医院, 广东省珠海市 519100

<https://orcid.org/0000-0002-8991-4751>(龙俊东)

基金资助: 国家自然科学基金(81960824), 项目负责人: 王成

引用本文: 龙俊东, 史业弘, 王成, 陈世玖. 不同冷冻技术对同种异体血管移植排斥反应的影响[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(3):433-438.



technology, which mainly involves the selection of freezing and thawing methods and cryoprotectants. (2) The existing research suggests that the freeze-drying method is superior to the low-temperature cryopreservation, but due to the limited conditions, it is still dominated by low-temperature cryopreservation. Among them, vitrification cryopreservation, slow rewarming and the use of stainless steel and even silver-containing materials are better than programmed cryopreservation and rapid rewarming. (3) The combined selection of permeable and non-permeable cryoprotectants can further reduce the occurrence of rejection while reducing their toxicity.

Key words: cryopreservation; vitrification cryopreservation; programmed cryopreservation; cryoprotectant; vascular graft; allogeneic transplantation; rejection; review

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81960824 (to WC)

How to cite this article: LONG JD, SHI YH, WANG C, CHEN SJ. Effects of different freezing techniques on the rejection of allogeneic vascular transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(3):433-438.

0 引言 Introduction

随着全球老龄化人口的增加及人们生活方式的改变, 心血管疾病的发生率在不断攀升, 在 2019 年, 根据全球疾病负担课题组 (global burden disease, GBD) 公布的数据显示, 心血管疾病是造成 204 个国家和地区人民死亡及致残的主要原因^[1]。根据预防学专家预估, 在 2030 年中国人民心血管疾病的死亡例数将达到 612.44 万例^[2]。其中, 冠心病、动脉硬化、周围动脉疾病等会造成血管狭窄、闭塞等致残性结果, 同种异体血管移植是其常用的治疗方法之一, 当疾病发展至主动脉瘤或动脉瘤破裂时, 血管移植甚至是其唯一的治疗方式。通过以上数据不难看出, 于当今、未来, 在临床上对血管移植有着巨大的需求。

同种异体血管移植可以明显缓解疾病症状, 有效提高患者的生活质量, 但其预后除了受到手术技术影响, 同时也受到血管移植物的影响。尽管在大、中口径血管移植中, 血管移植可由人工血管代替, 但普遍缺乏市售的小口径人工血管^[3], 因此在小口径血管移植中, 血管移植主要来源于脑死亡的器官捐献者^[4]。在临床中, 由于大多数受者与捐献者组织相容性不符, 小口径血管在移植后常见排斥反应, 造成血管堵塞, 导致治疗效果差甚至治疗失败。

既往有研究提示通过血管覆膜技术能显著降低同种异体血管移植排斥反应^[5], 但因其技术难度大、经济成本高, 未在临床中广泛开展。近年来, 现代冷冻处理技术不断完善使得同种异体血管能够长时间储存, 并在保证血管结构完整的前提下, 还可以通过特殊处理来有效降低移植排斥反应, 改善临床移植后结局, 越来越多的研究倾向于冷冻技术处理同种异体血管。作者结合前期研究发现和临床经验, 从简述同种异体移植排斥反应发生机制入手, 系统综述分析了不同的冷冻处理方案的优缺点, 以期降低同种异体血管移植排斥反应的发展提供参考。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者于 2022 年 9 月至 2023 年 3 月进行文献检索。

1.1.2 检索文献时限 1963 年 11 月至 2022 年 8 月。

1.1.3 检索数据库 中英文数据库 CNKI、万方和 PubMed 以及在线网站 Baidu 和 Google Scholar。

1.1.4 检索词 中文检索词为“心血管疾病、内皮细胞、低温冻存、血管移植、免疫原性、排斥反应, 同种异体移植和冷冻保护剂”; 英文检索词为“cardiovascular disease、endothelial cells、cryopreservation、blood vessel transplantation or vascular graft、Immunogenicity、immune rejection、allograft or allogeneic transplantation or allograft transplantation and cryoprotectant”。

1.1.5 检索文献类型 研究原著、综述、期刊论文、学位论文、会议论文、专利。

1.1.6 检索策略 中文数据库检索策略: SU=(内皮细胞或血管移植或免疫原性或同种异体移植) and FT=(低温冻存或冷冻保护剂或排斥反应) and FT=(心血管疾病或内皮) and FT=(深低温冻存)=(检测方法)。英文数据库检索策略: ((“cardiovascular disease” [Title/Abstract] OR “endothelial cells” [Title/Abstract]) AND ((“cryopreservation” [All Fields] OR “freeze” [All Fields] OR “blood vessel transplantation” [All Fields] OR “Freezing” [All Fields])) AND (“allogeneic graft” [Mesh Terms] OR (“vascular graft” [All Fields] or (“Immunogenicity” [All Fields]) OR (“immune rejection” [All Fields]) AND (“allograft or allogeneic transplantation” [Mesh Terms] OR (“allograft transplantation” [All Fields] or (“graft rejection” [All Fields]

OR (“Rejection” [All Fields] or (“Immune rejection” [All Fields])) AND (“cryoprotectant” [Mesh Terms] OR or (“CPA” [All Fields]))。

1.1.7 检索文献量 原始检索到论文 306 篇, 包括英文 264 篇、中文 42 篇, 其中, CNKI 检索到 35 篇, 万方检索到 7 篇, PubMed 检索到 252 篇, Baidu 检索到 4 篇, Google Scholar 检索到 8 篇。

1.2 入选标准

1.2.1 纳入标准 ①血管移植排斥反应的相关文献; ②冻存的相关文献; ③冻存保护剂的相关文献。

1.2.2 排除标准 ①与综述主题无关的文献; ②内容重复、老旧的文献; ③论据不可靠的文献。

1.3 数据提取 初筛 218 篇相关文献, 其中排除 171 篇, 实际纳入 68 篇, 包括中文 2 篇、英文 66 篇, 文献筛选流程, 见图 1。

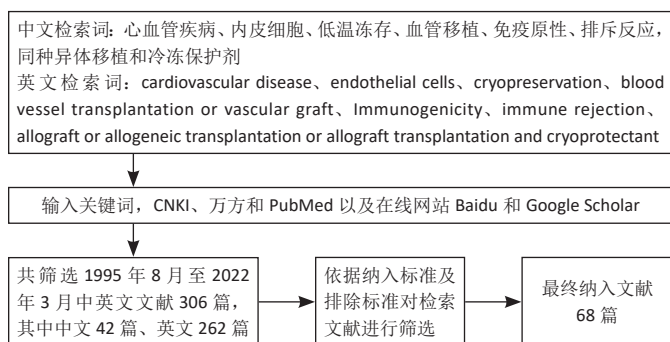
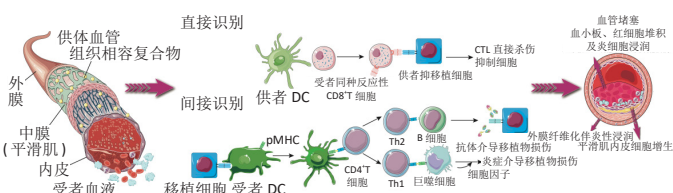


图 1 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 同种异体血管移植发生排斥反应的机制 同种异体血管移植后的免疫排斥反应主要是由受者 T 细胞识别供者组织相容性复合 MHC- I 类抗原和 MHC- II 类抗原引发的一系列炎症, 最终导致血管堵塞的病理性过程。MHC- I 在哺乳动物新鲜血管的内皮细胞、平滑肌细胞中高度表达^[6], 其中内皮细胞被认为是血管移植中免疫刺激最强的成分, 在移植排斥过程中起着至关重要的作用^[7]。血管移植体内的树突状细胞、巨噬细胞等抗原提呈细胞传递、激活幼稚 CD8 细胞, 使其发生分裂和分化为成熟 CD8 细胞, 成熟 CD8 细胞到内皮细胞识别 MHC- I 变为效应 CD8 细胞, 同时召集炎症因子对其进行攻击, 导致内皮细胞脱落及血管各层细胞坏死, 形成累积血管全层的纤维素样坏死^[8-9], 受损后的血管移植进行修复、增生, 这个过程不断循环以及受者血小板、血细胞黏附于移植段血管等因素, 最终导致移植段血管管腔狭窄、堵塞, 过程如图 2。



图注: DC 为树突状细胞

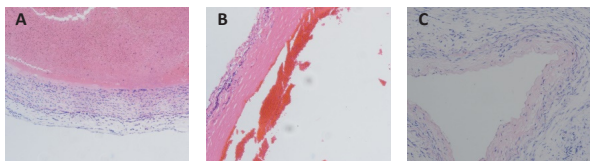
图 2 | 同种异体血管移植堵塞过程

2.1.1 超急性排斥反应 是在同种异体血管移植后 24 h 内出现的坏死性血管炎表现。主要由于受者体循环中存在的抗体识别移植段血管内膜上残存的 ABO 血型抗原, 发生抗体迅速攻击抗原的免疫效应而引起血

管内皮细胞受损释放凝血因子及血小板活化因子, 这激活了内源性凝血系统; 同时, 抗原-抗体复合物的形成也会激活补体系统^[10], 这两个系统的激活会导致大量的血小板、炎症递质如 C5a 聚集于移植段血管; 除此之外, 供、受者的主要组织相容复合物不符也会加剧这两个系统的激活, 例如, 活化的单核细胞及嗜酸性粒细胞可以释放促炎因子及促凝因子, 这最终导致血栓迅速生长在移植段血管腔^[11-12], 病理如图 3A。临床级的血管移植在移植前会经过特定溶液冲净及准确的供、受者配型, 故现代同种血管移植几乎不会出现此类反应。

2.1.2 急性排斥反应 包括 T 细胞介导的细胞免疫、抗体介导的体液免疫^[13]。前者首先通过受者 T 细胞识别血管移植细胞表面的特异性抗原启动排斥反应, 然后 T 细胞进入激活阶段, 自身活化增殖成效应性 T 细胞, 同时激活其他免疫细胞, 如嗜中性粒细胞、树突状细胞, 在这一过程中会释放大量的干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 α 导致血管移植管内皮细胞损伤及实质细胞损伤^[14]; 后者首先使促炎细胞如自然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞释放穿孔素、活性氧和肿瘤坏死因子 α 直接损伤内皮细胞导致血管内皮下层的基底膜裸露出来, 从而引起凝血反应形成微小血栓, 在血栓形成后, 使得补体系统激活产生具有炎症趋化作用的 C3a、C5a 及攻击内皮细胞的 C5b-9^[11, 15-16]。因此, 这两种免疫的级联反应会导致血管移植管内皮细胞丢失、平滑肌细胞丢失、基质增生及血栓形成, 如图 3B, 这是同种异体血管移植后最常见的一类排斥反应。

2.1.3 慢性排斥反应 虽对慢性排斥反应发生的原因众说纷纭, 如受者发生感染后导致 T 细胞的二次介导、自身免疫性疾病的发作、免疫抑制剂的使用不当或剂量不足等, 且目前尚无共识性机制, 但可以肯定的是炎症浸润贯穿于同种异体血管移植慢性排斥反应全程^[17]。在其发生早期的病理过程同急性排斥反应相似, 但不同的是其病程明显长于急性排斥反应, 病理学检查结果可见新生内膜形成、中层平滑肌结构明显紊乱及大量细胞外基质形成^[18]。随着病变的发展, 由于长时间的炎症浸润导致移植段血管管壁增厚、管腔狭窄甚至堵塞^[19], 在临床上, 组织病理学检查仍是其诊断的金标准, 如图 3C, 这是影响血管移植长期存活的主要原因。



图注: 图片来自于陈世玖课题组, 均采用苏木精-伊红染色 ($\times 200$)

图 3 | 超急性排斥反应 (A)、急性排斥反应 (B)、慢性排斥反应 (C) 的病理变化

2.2 冻存处理对血管移植排斥反应的影响 目前针对血管移植物的现代冻存处理主要包括物理方法和化学试剂。在此研究中, 物理方法包括冻干、程序式冻存及玻璃化冻存, 化学方法主要涉及冻存保护剂的种类。其中程序式冻存慢速降温、玻璃化冻存及非渗透性保护剂是重要部分, 将做重点阐述。

2.2.1 物理方法 冷冻能够长时间储存同种异体血管, 同时也能降低排斥反应的发生, 其机制有以下几点: ①供者的血管移植物会被受者免疫系统识别为外来异物引发排斥反应, 在冷冻过程中, 血管移植物的细胞膜或细胞质等结构会受到一定损伤, 导致其免疫原性下降, 从而减少被受者免疫系统识别的概率^[20]。②冻存会抑制血管移植物的新陈代谢, 减少了细胞膜脂质的流动性, 从而降低其细胞因子、炎症递质及活性氧等分子的释放^[21], 进一步减少了移植排斥反应的发生。③在同种异体血管移植中, 内皮细胞的损伤是导致排斥反应发生的原因之一, 而冻存在一定程度上保护了血管内皮细胞的完整性及功能^[22], 如冻存通过降低细胞钙离子内流来减少内皮细胞氧化应激的发生及代谢活性, 从而减轻其损伤程度^[23]。

由于液体有不同的物理状态, 因此不同的冷冻方式对同种异体血管排斥反应的影响也不同, 结合临床, 各自优缺点如表 1。

冻干: 指冷冻干燥, 又称升华干燥, 是一种使细胞或组织脱水的物理过程。OLMOS-ZÚÑIGA 等^[25]在对冻干犬肺动脉移植和低温冻存犬肺动脉移植的对照研究中发现, 在术后 4 周冻干组肺动脉通畅率明显高于

表 1 | 物理冻存方式的优缺点

物理冻存方式的分类	特点	优点	不足
冻干	在真空条件下进行, 当水蒸汽直接升华出来, 组织细胞形成类似海绵状疏松多孔架构, 体积大小几乎不变	简化了无菌处理, 可使大部分 MHC 抗原决定簇封闭, 一定程度上预防了排斥反应发生	生产过程复杂, 设备极其昂贵, 对操作有严格要求
程序式冻存 (慢速降温)	最先被发现的冻存方法, 所需保护剂浓度较低, 是当前组织细胞冻存使用最广泛的方法	简便、可控, 在一定程度上降低排斥反应	易造成血管冷损伤及渗透压失衡, 导致其释放炎症因子引起受者血液免疫细胞的激活, 可能会影响远期管腔通畅率
玻璃化冻存 (快速降温) 态	组织冻存后呈玻璃样固态	可大幅度降低排斥反应	在复温时, 没有可控的热力传导控制系统, 易造成血管破裂

低温冻存组, 减少了炎症细胞从平滑肌迁移到血管内膜和中膜的数量, 降低了血管移植产生无序胶原蛋白和内膜增生、钙化的发生。MORATO 等^[26]在同种异体骨植入试验中印证了冻干具有移植降低移植排斥反的作用。但限于设备昂贵, 过程复杂, 尚未普遍开展, 临床中仍以低温冻存为主。

程序式冻存慢速降温: 水作为血管的主要成分, 在低温冻存中, 降温速率的控制尤为关键。程序降温是同种异体血管传统的冷冻保存方法。

在基础研究中, HRUBY 等^[27]报道经程序式冻存后的同种异体大鼠腹主动脉在移植后, 内皮及平滑肌所表达的 MHC 类分子表达受到抑制, CD4、CD8、IgG 等免疫效应分子的浸润量降低。HIDI 等^[28]在研究中发现程序冻存对血小板相关抗原 (GpIb/IIIA 受体) 的形成有抑制作用, 能减少血管壁纤维蛋白的沉积, 降低血管移植物的血栓的形成。程序降温使移植排斥反应下降的原因可能与冻存过程内皮细胞的丢失以及表面抗原被破坏、移植后平滑肌细胞的退化有关^[29-30]。

与上述研究不同, 一项 35 例接受冷冻保留异基因动脉搭桥术患者进行的前瞻性临床试验中发现, 所有被研究的患者在干预 1 个月后都表现出抗 MHC 抗体的增加^[30]。WEISS 等^[31]回顾了 2000-2015 年进行的同种异体髂动脉冷冻保存原位移植的长期结果, 其中 2 例患者在血管重建后 30 d 因排斥反应死亡, 余 31 例中的 13 例患者在 47 个月因移植相关并发症死亡, 4 例患者有移植血栓形成, 3 例患者出现髂动脉假性血管瘤。

最近的研究指出, 复温过程也是一个对血管移植排斥反应有着重要影响但未被重视的方面, 常规复温冻存血管移植物的方法是将其放入 37 °C 的水浴快速升温^[32], 但过快复温速率及较高的温度会对血管移植细胞在复温过程造成额外的损伤, 在移植后灌注恢复时将产生大量的氧自由基, 增强内皮细胞-白细胞的相互作用, 引起严重的炎症导致移植排斥反应加重^[33-34]。相反, HRUBY 等^[27]指出在解冻血管移植时, 先将其放入温度为 +4 °C 的冰箱中约 60 min, 然后在室温下保存约 30 min 后进行缓慢解冻, 血管移植物的 MHC 类分子表达量会显著下降, 从而减轻移植排斥反应。

不难发现, 基础实验与临床研究的结果尚有差异, 作者推断其中与基础实验样本量低, 术后追踪时间短及复温条件不同相关。

玻璃化冻存快速降温: 是将血管移植物直接投入液氮, 以极快的速度 (15 000-30 000 °C/min) 使胞内的水分子没有足够时间形成冰晶而直接转变为黏稠不结晶的玻璃化状态^[35]。大量研究采用了玻璃化冻存, 其主要原因在于可能有助于进一步保护血管结构, 降低排斥反应。

在基础研究中, 魏氏等^[36]进行了程序式冻存、玻璃化冻存兔股动脉的同种异体移植对照研究, 尽管术后股动脉内膜/中膜比值提示均发生排斥反应, 但玻璃化组的血管阻塞率及淋巴细胞浸润数量明显低于程序式冻存组, 这表示玻璃化冻存可以更进一步的降低血管移植排斥反应。SCHNEIDER 等^[37]表示玻璃化冻存也可减少血管移植代谢水平及促炎因子、趋化因子的释放水平从而降低排斥反应。但受限于没有合适的热力传导控制系统, 在复温时容易造成冻存组织破裂^[38], 故未能在临床广泛开展。在临床研究中, 玻璃化冻存降低免疫原性的作用在瓣膜、肌腱、精子等组织细胞中同样得到证实^[39]。

用于玻璃化冻存的容器对排斥反应的改善也有一定作用。尽管塑料

低温冻存管最常用，但它对排斥反应没有改善。GALBINSKI 等^[40]发现用不锈钢制成的封闭容器能激活热休克蛋白(HSP70)，HSP70可升高抗炎因子白细胞介素10的表达水平及通过Toll样受体对Treg细胞进行正性调节来预防移植排斥反应^[41-42]。XIAO等^[43]对比了不锈钢和银封闭玻璃化容器，后者热传导速率比前者高，可使玻璃化过程更快，能够降低移植细胞的冷损伤及细胞凋亡，从而减少排斥反应的发生。因此，在玻璃化冻存中通过改进冻存容器可以进一步降低排斥反应，但是目前体内研究相对不足，以上结果以基础研究和体外实验为主，尚不能为实际临床应用提供指导。

综上所述，在基础研究中已经证实玻璃化冻存较程序式冻存能进一步降低血管移植排斥反应，尽管前者现在在临床中的使用受限于复温条件，但这仍是未来血管冻存的优选方式之一。

2.2.2 化学冻存保护剂 从血管移植物的冻存到移植，其细胞会受到冷冻解冻的双重打击，容易造成细胞膜破裂甚至死亡，为了降低在冷冻处理对细胞的损伤，冻存保护剂在低温冻存中被广泛应用^[44]。当前常用的冻存保护剂主要分为两大类：即渗透性保护剂与非渗透性保护剂^[45]。冻存保护剂主要通过减少细胞在冻融过程中死亡、维持细胞内外水平衡、减少血栓形成及炎症反应、修饰细胞膜表面分子等方面减轻排斥反应，对其研究结果和优缺点论述如表2。

表2 | 冻存保护剂的优缺点

冻存保护剂的分类	特点	优势	不足
渗透性保护剂	与水分子发生水合作用，是对血管进行冷冻处理的最基本、应用最广泛的试剂	降低水分子结晶形成，减少胞内冰晶损伤，能够有效抑制炎症因子的表达	毒性高，易造成细胞死亡，破坏血管骨架，可能增加移植远期并发症的发生概率
非渗透性保护剂	降低溶液电解质浓度，增加溶液黏稠度，中和毒性	毒性低，能够稳定细胞膜，降低胞外冰晶损伤	降低排斥反应的能力较弱

渗透性冻存保护剂：因其分子质量小，能够自由渗透到细胞内，又称为细胞内液保护剂，比如甘油、二甲亚砜(DMSO)。它们可与水分子发生水合作用，具有减少胞内冰晶的形成、防止细胞内水分外渗、避免细胞在冷冻处理时过度皱缩而死亡的作用。

FAHNER等^[46]用甘油作为保护剂冻存山羊颈动脉后进行同种异体移植，在术后3个月的随访中发现甘油组的血管外膜炎症反应弱于自体移植组，且两组管腔通畅率相近。GAO等^[47]发现甘油缩水化后聚合而成的超支化聚甘油可以减少血管移植中性粒细胞的浸润，延长移植物的存活时间。

VAN DOORMAAL等^[48]展开了用生理盐水、甘油及DMSO作为保护剂储存兔主动脉的对比研究，结果显示DMSO组的主动脉壁厚/直径比明显优于其他组。由高浓度的DMSO所配成冻存保护剂被称为“VS83”，HÖGERLE等^[49]用VS83对心血管移植进行冷冻处理后，发现心血管移植白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 的释放及促炎M1型巨噬细胞的增殖均被抑制，显著降低移植术后的炎症反应。同时，LIN等^[50]首次证实DMSO有通过STAT5的表观遗传效应诱导幼稚T细胞向Treg细胞分化的作用，降低了移植白细胞介素17 α 、白细胞介素23、干扰素 γ 等致炎因子的表达水平，这有助于减少炎症与坏死的发生。

非渗透性冻存保护剂：其作为大分子团，能溶于水但不能自由出入细胞膜，故又称为细胞外液保护剂，比如羟乙基淀粉、聚乙二醇、海藻糖、中药等物质，其具有低毒性的优点；同时也有增加细胞外液黏度、提高渗透压、使细胞内水分迅速向外析出、减少胞内水分从而降低冻存过程中胞内冰晶形成而导致细胞损伤的作用。

羟乙基淀粉能够吸收膜外水分子，增加胞外液体黏度来动态抑制冰晶形成^[51]；同时，羟乙基淀粉还可黏附在血管内膜上，在移植后通过降低血小板糖蛋白I b、II b及III a的表达，阻断纤维蛋白原与活化血小板的结合来抑制凝血和血小板的聚集从而减少血栓的形成^[52]。聚乙二醇能稳定血管内皮细胞的血栓调节蛋白(TM)，在低温环境下可以避免血栓调节蛋白4/5/6类结构域失活^[53]，减少凝血酶与炎蛋白的结合位点，从而降低血管移植炎症及血栓的发生^[54]。

海藻糖可以激活细胞自噬、减轻细胞氧化应激、降低组织中白细胞介素6、COX-2、肿瘤坏死因子 α 、单核细胞趋化因子1等炎症因子的释放水平^[55]，减少炎症因子对树突状细胞抗原提呈作用的激活^[56]。有研究者将纳米颗粒封装的海藻糖与VS83技术相结合对大鼠心脏瓣膜进行保存后发现，白细胞介素10分泌增多，肿瘤坏死因子 α 释放减少^[56]。WANG等^[57]通过加入NaOH调节pH值及环氧氯丙烷等化学修饰合成的海藻糖共聚物，既保留了海藻糖的优点又具有良好的抑冰性，减少冰损伤引发细胞坏死进一步减轻移植后的炎症，达到预防排斥反应发生的作用。

最近的研究表明中药提取物可以有效预防同种异体移植排斥反应。如雷公藤内酯在低温冻存时能够降低移植血管MHC-I类分子及共刺激分子的表达水平，削弱了受体树突状细胞的抗原提呈作用及效应T细胞的激活^[58]；山茱萸通过降低白细胞介素12、干扰素 γ 的表达来减轻排斥反应^[59]；丹参酮和龟板可以提高移植Treg细胞数的量来抑制T细胞的毒性作用^[60]；大黄素可诱导FoxP3、CD122等调节性T细胞来抑制同种异体移植排斥反应^[61]。

除了上述几种渗透性冻存保护剂，目前还研究出抗冻蛋白类、含血清类的冻存保护剂。抗冻蛋白是生物界自然选择进化产生的一种防止生物体结冰而导致死亡的功能性蛋白，如林蛙、南北极鱼类、昆虫等体内含有大量抗冻蛋白，其具有冰结合面和非冰结合面两种官能团，它通过非冰结合面上存在的带电荷侧链及疏水性侧链，使得非冰结合面上的界面水无，来抑制冰晶形成从而减少细胞在冻融过程中的死亡^[62]。含血清类的冻存保护剂，如含胎牛血清的冻存保护剂中有大量的生长因子、免疫球蛋白，可以通过给冻存的血管移植提供营养、调节细胞应激反应来维持细胞代谢，减少细胞死亡^[63]。从理论上说，这两种冻存保护剂均可通过减少冻融期间血管移植细胞死亡来降低移植后的排斥反应。但是，对于目前来说，本课题组不建议将这两种冻存保护剂纳入降低同种异体血管移植排斥反应冻存保护剂的范畴，具体原因如下：①由于当前冻存保护剂洗脱技术仍存在一定弊端，不能够及时、全面地洗脱血管移植上黏附的冻存保护剂；②这两种冻存保护剂是除了供、受者之外的第三类异物蛋白，容易引起受者免疫系统攻击引发炎症导致移植后排斥反应的加重。

无论是哪种类型的冻存保护剂都是为了减少血管移植在冻融中的损伤，KURO等^[64]开发了一种电压施加装置，即在冻存血管移植时，通过予冻存保护剂1000V的电压能够使内皮细胞的损伤进一步降低，改善移植后结果。冻存保护剂都具有一定的细胞毒性，为了解决这一问题，NAGAYA等^[65]报道了一种“中空纤维法”，可使冻存保护剂的有效体积达到最小值，通过减少冻存保护剂对细胞的毒性，能够降低移植后的炎症反应。以上方法仅分别在基础研究中的鼠股动脉移植及胰岛冻存中实现，在人类血管冻存中是否有同样效果有待进一步试验。

考虑以上因素，作者认为应联合使用渗透性及非渗透性冻存保护剂，但使用时应充分考量其物理、化学、生物特性及两者的混合比例，以期既能降低细胞毒性又可抑制排斥反应。

3 结论和展望 Conclusions and prospects

3.1 既往他人在该领域研究的贡献和存在的问题 人工血管有近似人类血管的机械力学性与生物特性，扩大了血管重建的可能，但存在术后感染率高、通畅性较差的缺点^[66]，尤其是小口径人工血管无法克服早期出现血栓造成移植功能障碍的问题，尽管在2010年全球进入了血管“仿生”时代，但至今仍未发现可以媲美人类小口径血管的人工血管^[67]。这使得冷冻冻存的同种异体血管在重建领域得到关注。自从20世纪初低温技术的问世，人体器官的保存跨越到一个新高度，MAZUR^[68]开拓了应用定量模型来描述细胞在冷冻过程中变化的先河，并为研究低温冻存的理论方法铺平了道路。此前的研究主要集中于优化冻存方案降低冻存对血管结构完整性和机械力学性的负面影响，缺乏冻存方案对血管移植免疫原性、移植排斥反应影响的研究。例如：①血管移植被受体识别、排斥的分子大量表达在内皮细胞，而内皮细胞在抗栓方面起重要作用，如何平衡这两者的关系尚无结论；②基础研究中动物模型观察时间较短，没有以“年”为时间单位对其追踪；③基础研究中未详细阐述冻存对不同排斥反应类型的影响。

3.2 作者综述区别于他人他篇的特点 此研究系统综述了冻存技术对同种异体血管移植排斥反应影响的相关文献,分析发现冻干法优于低温冻存,但限于条件未能广泛开展,现仍以低温冻存为主,其中玻璃化冻存、慢速复温和使用不锈钢乃至含银材料效果优于程序式冻存及快速复温。渗透性和非渗透性冻存保护剂的联合选择,可以在降低其毒性的同时,进一步减少排斥反应的发生。

3.3 综述的局限性 文章着重于介绍不同冷冻处理技术对移植后血管排斥反应强弱的影响,未区分冻存技术对不同类别排斥反应的影响,没有综述关于移植前是否需要 ABO 和 HLA 配对、移植后免疫抑制剂应用对结局的影响。原因在于不同作者发布的关于上述研究的结论相反、数据不够充足,存在较大争议,尚无法广泛采用。

3.4 综述的重要意义 从临床应用出发,以同种异体血管移植排斥反应机制为探讨起点,基于同种异体小口径血管移植相关的排斥反应,进行了临床需求的全面分析和综合。以期读者辩证思考,选取合适的冻存方案,为降低移植失败提供有益支持。

3.5 课题专家组对未来的建议 对于小口径血管的重建,自体血管移植是首选,但在临床中,自体血管数量往往达不到需求量,如患有大面积毁损性创面、血管疾病等患者。因此有必要建立同种异体小口径血管的冻存库,以应对各种需此耗材的情况,在此篇文章的基础上,有如下几点建议:

(1) 发展冻干技术,降低其经济成本推动其临床应用。

(2) 优化冻存技术: ①研制玻璃化复温时所需的热力传导控制系统;

②改进冻存容器及推广其临床应用。

(3) 推进冻存保护剂的研发: ①找出最适合于血管冻存的渗透性及非渗透性冻存保护剂的最佳浓度比; ②探索新型冻存保护剂,如中药、化学聚合物、抗冻蛋白等。

相信在多学科的交叉发展下,在不久的将来人们可以找到满意的冷冻处理方法,建立满足科研与临床需求的“血管银行”。

作者贡献: 王成负责该综述构思设计,龙俊东负责文章写作,龙俊东参与文献收集、分析总结,史业弘负责审校,陈世政负责项目指导。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 声明)。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the global burden of disease Study 2019. *Lancet*. 2020;96(10258):1204-1222.
- [2] 饶蓁蓁,傅晏红,李若瞳,等. 2030 年我国常见危险因素所致心脑血管疾病死亡和早死概率预测研究 [J]. *中华预防医学杂志*, 2022, 56(5):567-573.
- [3] JOUDA H, LARREA MURILLO L, WANG T. Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications. *Cells*. 2022;11(3):493.
- [4] L'HEUREUX N, DUSSERRE N, KONIG G, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med*. 2006;12(3):361-365.
- [5] LIU S, ZHI J, LI S, et al. Progress on Precise Regulation of Vascular Intimal Repair by a Surface Coating of Vascular Stent. *Curr Drug Deliv*. 2021;18(7):862-873.
- [6] WILCOX EC, EDELMAN ER. Substratum interactions determine immune response to allogeneic transplants of endothelial cells. *Front Immunol*. 2022;13:946794.

- [7] PEELEN DM, HOOGDUIJN MJ, HESSELINK DA, et al. Advanced in vitro Research Models to Study the Role of Endothelial Cells in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2021;12:607953.
- [8] MORIS D, CENDALES LC. Sensitization and Desensitization in Vascularized Composite Allograft Transplantation. *Front Immunol*. 2021;12:682180.
- [9] MO F, WATANABE N, MCKENNA MK, et al. Engineered off-the-shelf therapeutic T cells resist host immune rejection. *Nat Biotechnol*. 2021; 39(1):56-63.
- [10] MINNELLI C, RIAZY M, OHASHI R, et al. Early Transplant Arteriopathy in Kidney Transplantation. *Transplant Proc*. 2021;53(5):1554-1561.
- [11] STITES E, RENNER B, LASKOWKI J, et al. Complement fragments are biomarkers of antibody-mediated endothelial injury. *Mol Immunol*. 2020;118:142-152.
- [12] BENTALL A, JEVAKANTHAN M, BRAITCH M, et al. Characterization of ABH-subtype donor-specific antibodies in ABO-A-incompatible kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2021;21(11):3649-3662.
- [13] BESTARD O, GRINÓY J. Refinement of humoral rejection effector mechanisms to identify specific pathogenic histological lesions with different graft outcomes. *Am J Transplant*. 2019;19(3):952-953.
- [14] KUMMER L, ZARADZKI M, VIJAYAN V, et al. Vascular Signaling in Allogeneic Solid Organ Transplantation- The Role of Endothelial Cells. *Front Physiol*. 2020;11:443.
- [15] VALLAKATI A, REDDY S, DUNLAP ME, et al. Impact of Statin Use After Heart Transplantation: A Meta-Analysis. *Circ Heart Fail*. 2016;9(10): e003265.
- [16] CUMPELIK A, HEEGER PS. Effects of the complement system on antibody formation and function: implications for transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2022;27(5):399-404.
- [17] ENNS W, VON ROSSUM A, CHOY J. Mouse model of alloimmune-induced vascular rejection and transplant arteriosclerosis. *J Vis Exp*. 2015;(99):e52800.
- [18] KAUFMAN CL, KANITAKIS J, WEISSENBACHER A, et al. Defining chronic rejection in vascularized composite allotransplantation-The American Society of Reconstructive Transplantation and International Society of Vascularized Composite Allotransplantation chronic rejection working group: 2018 American Society of Reconstructive Transplantation meeting report and white paper Research goals in defining chronic rejection in vascularized composite allotransplantation. *SAGE Open Med*. 2020;8:2050312120940421.
- [19] JUSTIZ VAILLANT AA, MOHSENI M. Chronic Transplantation Rejection// *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- [20] SONG G, WANG S, BARKESTANI MN, et al. Membrane attack complexes, endothelial cell activation, and direct allorecognition. *Front Immunol*. 2022;13:1020889.
- [21] LEN JS, KOH WSD, TAN SX. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci Rep*. 2019;39(8):BSR20191601.
- [22] PARIHAR A, KUMAR A, PANDA U, et al. Cryopreservation: A Comprehensive Overview, Challenges, and Future Perspectives. *Adv Biol (Weinh)*. 2023;e2200285. doi: 10.1002/adbi.202200285.
- [23] REN L, WANG MR, WANG QC. ROS-induced oxidative stress in plant cryopreservation: occurrence and alleviation. *Planta*. 2021;254(6):124.
- [24] MOORE TM, GENDLER E, GENDLER E. Viruses adsorbed on musculoskeletal allografts are inactivated by terminal ethylene oxide disinfection. *J Orthop Res*. 2004;22(6):1358-1361.
- [25] OLMOS-ZÚÑIGA JR, JASSO-VICTORIA R, DÍAZ-MARTÍNEZ NE, et al. Lyophilized allografts without pre-treatment with glutaraldehyde are more suitable than cryopreserved allografts for pulmonary artery reconstruction. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(2):e5001.
- [26] MORATO GO, ROCHA A G, CHUNG DG, et al. Lyophilized and gamma-sterilized allogeneic bone implant used as a spacer for advancement of a modified tibial tuberosity in the treatment of cranial cruciate ligament disease in dogs. *PLoS One*. 2019;14(8):e0220291.

- [27] HRUBY J, SPUNDA R, MERICKA P, et al. Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. *PLoS One*. 2020;15(3):e0230234.
- [28] HIDI L, KOMOROWICZ E, KOVÁCS GI, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One*. 2021;16(7):e0255114.
- [29] COTI I, WENDA S, ANDREEVA A, et al. Donor-specific HLA antibodies after fresh decellularized vs cryopreserved native allograft implantation. *HLA*. 2020;96(5):580-588.
- [30] GONZÁLEZ-GAY M, LÓPEZ-MARTÍNEZ R, BUSTO-SUÁREZ S, et al. Immunological Aspects Involved in the Degeneration of Cryopreserved Arterial Allografts. *Front Surg*. 2020;7:616654.
- [31] WEISS S, BACHOFEN B, WIDMER MK, et al. Long-term results of cryopreserved allografts in aortoiliac graft infections. *J Vasc Surg*. 2021;74(1):268-275.
- [32] ANTONOPOULOS CN, PAKAKONSTANTINOOU NA, HARDY D, et al. Editor's Choice- Cryopreserved Allografts for Arterial Reconstruction after Aorto-iliac Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019;58(1):120-128.
- [33] MINOR T, VON HORN C. Rewarming Injury after Cold Preservation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2059.
- [34] BOGERT NV, WERNER I, KORNBURGER A, et al. Effect of Rewarming on Leukocyte-Endothelial Interaction After Deep Hypothermic Preservation. *Ann Transplant*. 2020;25:e919540.
- [35] FINGER EB, BISCHOF JC. Cryopreservation by vitrification: a promising approach for transplant organ banking. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018;23(3):353-360.
- [36] 魏民, 张伯勋, 刘郑生, 等. 玻璃化法保存异体动脉的实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(4):251-254.
- [37] SCHNEIDER M, STAMM C, BROCKBANK KGM, et al. The choice of cryopreservation method affects immune compatibility of human cardiovascular matrices. *Sci Rep*. 2017;7(1):17027.
- [38] GANGWAR L, PHATAK SS, ETHERIDGE M, et al. A guide to successful mL to L scale vitrification and rewarming. *Cryo Letters*. 2022;43(6):316-321.
- [39] WANG M, TODOROV P, WANG W, et al. Cryoprotectants-Free Vitrification and Conventional Freezing of Human Spermatozoa: A Comparative Transcript Profiling. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3047.
- [40] GALBINSKI S, KOWALEWSKI LS, GRIGOLO GB, et al. Comparison between two cryopreservation techniques of human ovarian cortex: morphological aspects and the heat shock response (HSR). *Cell Stress Chaperones*. 2021;27(2):97-106.
- [41] BORGES TJ, LANG BJ, LOPES RL, et al. Modulation of Alloimmunity by Heat Shock Proteins. *Front Immunol*. 2016;7:303.
- [42] GUO P, ZHANG H, LI C, et al. Research progress on Toll-like receptors pathways regulating function of regulatory T cells. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2020;36(9):1701-1712.
- [43] XIAO Z, ZHANG Y, FAN W. Cryopreservation of human ovarian tissue using the silver closed vitrification system. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(11):1435-1444.
- [44] LIN M, CAO H, MENG Q, et al. Insights into the crystallization and vitrification of cryopreserved cells. *Cryobiology*. 2022;106:13-23.
- [45] YONG KW, LAOUAR L, ELLIOTT JAW, et al. Review of non-permeating cryoprotectants as supplements for vitrification of mammalian tissues. *Cryobiology*. 2020;96:1-11.
- [46] FAHNER PJ, IDU MM, VAN GULIK TM, et al. Glycerol-preserved arterial allografts evaluated in the infrarenal rat aorta. *Eur Surg Res*. 2009;42(2):78-86.
- [47] GAO S, GUAN Q, CHAFEEVA I, et al. Hyperbranched polyglycerol as a colloid in cold organ preservation solutions. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116595.
- [48] VAN DOORMAAL TPC, SLUIJS JH, VINK A, et al. Comparing five simple vascular storage protocols. *J Surg Res*. 2014;192(1):200-205.
- [49] HÖGERLE BA, SCHNEIDER M, SUDROW K, et al. Effects on human heart valve immunogenicity in vitro by high concentration cryoprotectant treatment. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(2):e1046-e1055.
- [50] LIN GJ, WU CH, YU CC, et al. Adoptive transfer of DMSO-induced regulatory T cells exhibits a similar preventive effect compared to an in vivo DMSO treatment for chemical-induced experimental encapsulating peritoneal sclerosis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;378:114641.
- [51] KÖRBER C, SCHEIWE MW. The cryoprotective properties of hydroxyethyl starch investigated by means of differential thermal analysis. *Cryobiology*. 1980;17(1):54-65.
- [52] XU L, LI L, ZU J, et al. Effects of Different Types of Early Restrictive Fluid Resuscitation on Immune Function and Multiorgan Damage on Hemorrhagic Shock Rat Model in a Hypothermic Environment. *Comput Math Methods Med*. 2022;2022:4982047.
- [53] LIU X, BORON M, ZHAO Y, et al. End-point modification of recombinant thrombomodulin with enhanced stability and anticoagulant activity. *Eur J Pharm Sci*. 2019;139:105066.
- [54] WATANABE-KUSUNOKI K, NAKAZAWA D, ISHIZU A, et al. Thrombomodulin as a Physiological Modulator of Intravascular Injury. *Front Immunol*. 2020;11:575890.
- [55] LIU S, YANG Y, GAO H, et al. Trehalose attenuates renal ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy and inhibiting oxidative stress and inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;318(4):F994-F1005.
- [56] AHMAD T, EAPEN MS, ISHAQ M, et al. Anti-Inflammatory Activity of Fucoidan Extracts In Vitro. *Mar Drugs*. 2021;19(12):702.
- [57] WANG J, SHI X, XIONG M, et al. Trehalose glycopolymers for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Cryobiology*. 2022;104:47-55.
- [58] WANG Y, ZHANG S, LI Z, et al. The effects of triptolide on the cellular activity of cryopreserved rat sciatic nerves and nerve regeneration after allotransplantation. *Int J Neurosci*. 2020;130(1):83-96.
- [59] LU C, ZENG Y Q, LIU H, et al. Tanshinol suppresses cardiac allograft rejection in a murine model. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36(2):227-236.
- [60] LIU X, ZENG YQ, LIANG YZ, et al. Medicinal herbs Fructus corni and Semen cuscutae suppress allograft rejection via distinct immune mechanisms. *Oncotarget*. 2016;7(24):35680-35691.
- [61] QIU F, LIU H, LIANG CL, et al. Corrigendum: A New Immunosuppressive Molecule Emodin Induces both CD4+FoxP3+ and CD8+CD122+ Regulatory T Cells and Suppresses Murine Allograft Rejection. *Front Immunol*. 2020;11:1381.
- [62] LIU K, WANG C, MA J, et al. Janus effect of antifreeze proteins on ice nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(51):14739-14744.
- [63] JAHANBAN-ESFAHLAN A, OSTADRAHIMI A, JAHANBAN-ESFAHLAN R, et al. Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *Int J Biol Macromol*. 2019;138:602-617.
- [64] KURO A, MORIMOTO N, HARA T, et al. Protection of rat artery grafts from tissue damage by voltage-applied supercooling. *Med Mol Morphol*. 2022;55(2):91-99.
- [65] NAGAYA M, MATSUNARI H, KANAI T, et al. An Effective New Cryopreservation Procedure for Pancreatic Islets Using Hollow Fiber Vitrification. *Horm Metab Res*. 2016;48(8):540-549.
- [66] IWAKI R, SHOJI T, MATSUZAKI Y, et al. Current status of developing tissue engineering vascular technologies. *Expert Opin Biol Ther*. 2022;22(3):433-440.
- [67] LEJAY A, VENTO V, KUNTZ S, et al. Current status on vascular substitutes. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2020;61(5):538-543.
- [68] MAZUR P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*. 1963;47(2):347-369.

(责任编辑: ZN, QY, YJ)