



低温技术在医学中的 应用

陈鸿书 编著

中国科学技术出版社

低温技术在医学中的应用

陈鸿书 编著

中国科学技术出版社

内 容 提 要

本书系统、扼要地介绍了低温技术的发展历史、作用原理及其在医学、生物学领域的应用。其中又以主要篇幅较详细地叙述了冷冻医疗和低温保存的理论、方法和应用,包括有关的最新进展情况,并对这一领域目前存在的问题和前景提出了意见和建议,作了展望。本书可作为从事低温技术、低温医学、生物学科工作者和医务人员的参考用书。

2015/12

低温技术在医学中的应用

陈鸿书 编著

责任编辑: 李春德 张 日

中国科学技术出版社出版 (北京海淀区魏公村白石桥路 32 号)

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

军事医学科学院情报研究所印刷厂印刷

开本: 787×1092 毫米 1/32 印张: 4.25 字数: 9.55 千字

1991 年 3 月第 1 版 1991 年 3 月第 1 次印刷

印数: 1-1000 册 定价: 2.50 元

ISBN 7-5046-0255-8 / R · 63

序

陈鸿书同志编写的《低温技术在医学中的应用》一书，即将与读者见面了，我愿意为它写几句话，以示介绍和推荐之意。鸿书同志50年代初即在军委沈阳中心血库工作，后又到军事医学科学院从事人血浆的冰冻干燥、生物制剂和生物化学研究。30多年来，和同事一起取得不少科研成果，论文著述亦多。《低温技术在医学中的应用》是他近年结合工作需要完成的力作之一。

低温技术是一门新兴的技术，它在医学、生物学中的应用范围非常广泛。其中又以冷冻医疗和低温保存最为重要。有鉴于此，作者将两者集中在一起，从理论到应用作了系统的阐述，并介绍了该领域最新成就。对普及、推动低温技术知识及其应用，做了一件很有意义的工作。

当前，低温技术的研究、开发和利用方兴未艾，还有许多理论问题和实际问题，如低温生物学中的热力学问题，生物物理、生物化学、病理生理问题和有关的低温工程物理、仪器设备等，都有待深入地探讨研究。我们期待有关学者、广大科技人员和医务工作者共同努力，进一步研究、开发、应用这一技术，为促进低温医学生物学的发展作出贡献！

钱信忠

1990年6月

前 言

近年来，随着低温技术和相关学科技术的发展，低温技术的应用越来越广泛。它在医学中的应用，涉及医学领域的各个学科部门，形成了低温医疗（冷冻外科）、低温保存、低温免疫等学科分支，有力地促进了治疗学，细胞、组织器官的保存与移植，计划生育与生殖工程，医学生物工程以及医疗机械的发展。低温技术的研究与开发利用，日益受到人们的重视。

为此，作者将近几年来收集的文献资料，结合我们工作实际，编写成书。希望对低温医学工作者，在了解这一领域的基本情况、发展动向或开展这方面的研究有所帮助。

低温医学是一门正在发展中的学科分支，在理论和实际工作上，某些方面还存在不同的观点和做法，加上作者水平有限，定有不少漏误，望各专家批评指正。

在本书编写过程中，得到全军低温中心和军事医学科学院情报所领导的热情支持和帮助；前全军低温中心主任刘遼教授和张中兴教授对初稿作了审阅、修改；老领导卫生部前部长、中顾委委员钱信忠同志为本书写了序言，在此一并致谢。

陈鸿书

1990年6月

目 录

引 言	(1)
低温技术	(4)
低温冷冻对组织细胞的作用	(9)
细胞、组织和器官的低温保存技术	(21)
血细胞的低温保存	(29)
一、红细胞的保存	(29)
二、白细胞的保存	(37)
三、血小板的保存	(40)
四、骨髓的保存	(43)
五、循环血干细胞和胎肝干细胞的低温保存	(46)
单细胞的低温保存	(52)
一、精子的低温保存	(52)
二、卵细胞和胚胎的低温保存	(55)
三、肿瘤细胞的低温保存	(60)
四、生物工程细胞的低温保存	(62)
五、脑神经细胞的低温保存	(64)
组织的低温保存	(66)
一、皮肤的低温保存	(66)
二、骨骼和关节软骨细胞的低温保存	(70)
三、血管的低温保存	(73)
四、角膜的低温保存	(75)
器官的低温保存	(78)

一、肾脏的低温保存	(78)
二、胰腺和胰岛的低温保存	(81)
三、甲状腺和甲状旁腺的低温保存	(87)
四、心脏、肝脏、肺脏的低温保存	(89)
五、小肠的低温保存	(92)
真菌、放线菌的低温保存	(94)
寄生虫的低温保存	(97)
一、丝虫的低温保存	(97)
二、锥虫的深低温保存	(101)
三、疟原虫的低温保存	(102)
低温技术在医学、生物学及其他方面的应用	(104)
一、血液成分、血液代用品和其它体液的 低温保存	(104)
二、农牧渔业用生物材料的低温保存	(105)
三、医用细胞系的低温保存	(107)
四、某些昆虫的低温保存	(107)
五、植物种子的低温保存	(108)
低温冷冻在临床医学中的应用	(110)
一、冷冻治疗作用	(110)
二、冷冻医疗的器械与设备	(112)
三、冷冻技术的临床应用	(112)
低温免疫问题	(115)
目前存在的问题与展望	(118)
一、目前存在的问题	(118)
二、对低温生物医学的展望	(119)
参考文献	(121)

引 言

早在 3 000 年前，我国周代的劳动人民就已知道利用天然冰块来进行冷藏。在冬季将天然冰块贮藏起来，到夏季用来冷藏食物和保存尸体。这些在春秋时代的《诗经》、《周礼》中已有明确的记述。如《诗经·豳风·七月》说：“二之日（十一月）凿冰冲冲，三之日（一月）纳于凌阴（冰窖）。”；《周礼·天官》云：“凌人，掌冰。正岁十有二月，令斩冰。……春始治鉴（青铜器，形似大盆），凡外内饔（烹调菜肴）之膳羞（精美食品），鉴焉。……大丧共（供）夷（放置）槃（盘）冰。”唐代以后，冰的应用就更为普遍了。在欧洲，200 多年前，1776 年意大利的生理学家 Spallanzani 报告了利用冬季寒冷抑制种马精子的活动，其后复温，又能恢复其活力。此后的 90 年，1866 年意大利病理学教授 Mantegazza 冷冻保存人的精液，19 世纪中期起，低温技术不断发展。

1834 年完成制冰方法；1849 年研制成功空气冷冻机；1877 年 I·凯利特研制液氧成功；1882~1884 年 S·V·费洛布列夫斯基及 R·S·斯拉捷夫斯基研制液氮、液氢（1884）成功；1890~1891 年 J·杜瓦研制镀银真空瓶胆及液氢成功；1892 年 H·K·奥尼斯研制液态空气成功；1895 年 C·冯林德制成商用液态空气；1904 年 C·冯林德制成商用液氮。

随着低温技术及低温设备的进展，低温生物学和低温医

学的研究应用也逐渐深入广泛。特别是自 1949 年以后，较多地开展对生殖细胞、哺乳动物及人体红细胞的低温保存研究。六七十年代又扩大到白细胞、血小板、肿瘤细胞和二倍体细胞以及某些组织和器官的保存和各种寄生虫、微生物的低温保存，从而形成了低温生物学的独立体系，成为专门研究在低温条件下，延长细胞、组织和器官寿命的科学。近几年来，随着低温生物工程技术的迅速发展如新型低温保存容器、低温降温仪以及低温显微镜等先进设备和检测仪器装置的研制成功，能较深入地研究各种细胞、组织和器官的结构和功能的关系，揭示了冰冻和复温全过程的物理、化学、生物化学、生物物理和病理生理等各方面的变化，从而进一步促进了低温生物学的发展。

当前，人们主要在两个方面大力进行研究和开发：一是利用低温冷冻对细胞的损伤破坏作用，以治疗疾病，着重研究如何使冷冻作用在局限的范围内对细胞达到最大的破坏，即冷冻治疗学；另一方面，也是目前主要的发展方向，着重研究如何最大限度地减少冷冻对组织细胞的损伤，以期用最佳的条件和方法，尽可能长时间贮存某些活的细胞、组织和器官，称为保藏冷冻生物学。现在低温保藏已广泛应用于其他领域，如医学（组织标本的制作、病毒、菌株、寄生虫的保存、医疗药品保存和冷冻手术等），家庭（各种蔬菜、水果和食品的低温保存）、农林牧渔业（农作物和禽、畜、鱼品种的保存与改良）和宇宙生物学等。更可喜的是用这一技术所保存的血细胞、骨髓、精子、卵、胚胎、肿瘤细胞、工程细胞、组织和部分器官已广泛地应用于实验室和临床实践。如血细胞（红细胞、白细胞、血小板和骨髓细胞）的临床输注，以及组织（角膜、骨骼和血管、皮肤）、器官

(肾、肝、心、胰、肠等)的同种异体移植,使许多患者转危为安,有的甚至起死回生,恢复健康;精子、卵和胚胎的冻存和应用,为人工受精等生殖工程研究、计划生育和优生优育作出了重大贡献;肿瘤细胞和工程细胞的冻存和应用,则为肿瘤研究、细胞工程和遗传工程的研究与发展不可缺少的重要条件。

低温生物学的范围很广。张中兴(1986)根据国际低温生物学会历年年会和“低温生物学”杂志刊登的内容,将当前低温生物学内容归纳为以下几个方面:

- (1) 寒冷适应:包括动物和植物对于冷环境的适应。
- (2) 冬眠:体温调节或寒冷适应的一种特殊形式。
- (3) 低体温:由寒冷引起的体温降低。
- (4) 寒冷损伤:如冻伤与冷冻保存时的损伤。
- (5) 冷冻外科:以治疗为目的的人工性冷冻损伤。
- (6) 冷冻免疫:由冷冻引起的免疫变化。
- (7) 冷冻保存:利用低温保持生物样品活性。
- (8) 低温生物学研究和应用的有关仪器与设备。

可见低温生物学的范畴非常广泛,其中的寒冷适应、冬眠、低体温等低温生理问题和寒冷损伤问题在低温生物学中均有重要意义,冷冻免疫等其他问题,也受到人们的重视。但当前较活跃的领域,乃是冷冻保存和冷冻医疗(冷冻外科)方面。这方面的研究和应用较多,文献报告亦多。有必要对此作专门的研究,特别是在冷冻低温保存方面,是冷冻低温技术在生物医学中应用的重点所在,加深对这方面的了解,以期促进对这方面的研究与开发利用。

低 温 技 术

一般所说低温，是指干冰（ -80°C ）以下的温区。1954年第一届低温工程会议上规定，把低于 -150°C 的温度作为低温的界限。目前生物医学上较为常用的是液氮温度，即 -196°C 。

一、致冷剂

常用的致冷剂，大致可分为两类：一类是在常温下不能液化的，其液体的正常沸点（在标准大气压即 1.033 kg/cm^2 下的液体沸点）低于 -150°C ，如氩、氧及氮；另一类在常温下施加足够的压力能液化的，其液体的正常沸点高于 -150°C ，如二氧化碳与氟利昂（ F_{12} 及 F_{22} ）。常用致冷剂及其致冷温度如表 1。

表 1 致冷剂与致冷温度

致 冷 剂	致冷温度 ($^{\circ}\text{C}$)
盐和冰的混合物	- 20
氟利昂 12	- 29.8
氧化亚氮	- 40
氟利昂 22	- 40.8
固态二氧化碳 (干冰)	- 78.5
氟利昂 13	- 81.5
氧化氮	- 89
液氧	-183
液态空气	-195
液氮	-195.8
液氢	-268.9

其中最常用的为以下三种:

(一) 液氮

为无色无臭液体, 不易燃烧, 对生物体无毒无害。1 个大气压下的沸点为 -195.8°C , 冰点为 -204°C , 在 -195.8°C 时比重为 0.786 g/ml 。

因液氮正常沸点低, 故须贮存于有双层壁(壁间抽成真空)的称作杜瓦瓶的特殊容器内, 以防止液氮迅速蒸发。也可放在类似的小型容器内(如热水瓶、杯)便于临床应用。按容器的大小和质量, 液氮的蒸发率(消耗量)为每天 $1.5\sim 8\%$ 。

液氮使用时较安全, 但须注意防止溅到衣服上, 以免损坏衣物; 没有放气(减压)装置的容器不可密闭, 以防爆炸; 手指及其他暴露部位的皮肤勿接触已被液氮冷却的金属物品, 以免冻伤。

(二) 二氧化碳

为无色无臭、弱酸性、不燃的气体。在 1 个大气压下, 温度低于三相点时, 呈固体相; 在 -78.9°C 时, 压力低于三相点, 固体二氧化碳即升华, 压力增至 5.1 kg/cm^2 以上才获得液态二氧化碳; 在 21°C 时, 压力超过 57 kg/cm^2 亦可获得液态二氧化碳。 -78.9°C 压缩固体(冰)比重为 1.512 g/ml , 非压缩固体(雪)比重低于水 ($<1\text{ g/ml}$); 在 1 个大气压下, 其升华热约 $137\text{ cal/g}^{\circ}\text{C}$ 。由于二氧化碳临界温度超过常温, 故在常温与约 57 kg/cm^2 下, 可以液态贮藏于钢瓶内。使用时, 要注意安全, 勿让液态二氧化碳或干冰溅附在暴露的皮肤上, 也勿直接接触经液态二氧化碳冷却的金属物品, 以防冻伤。

(三) 氟利昂

为氟化碳氢化合物，常用的 F_{12} 和 F_{22} ，均为无色、不燃、稍有乙醚气味、相对无毒的液体。 F_{12} （二氯二氟甲烷）的正常沸点为 -29.8°C ，于 -158°C 结冰。液态比重在 30°C 时为 1.292 g/ml ，气化热为 $39.86\text{ cal/g}^{\circ}\text{C}$ 。 F_{22} （氯二氟甲烷），其正常沸点为 -40.8°C ，比重为 1.175 g/ml ，气化热为 $55.9\text{ cal/g}^{\circ}\text{C}$ 。均可以气态或高压下液态等形式贮存于钢瓶中备用。

二、产生低温的方法

现代技术中，产生低温的方法很多，除冷冻保存所需低温条件和简易方法外，目前在冷冻医疗(外科)中常用的方法如下。

(一) 相变致冷

指以液体的汽化及固体的融化或升华来致冷。典型的冷冻器械——冷冻头即采用此法冷却。将致冷剂液体减压喷射到冷冻探头内壁，液体蒸发而在局部产生低温。此种冷冻头探杆系由三个同心管组成，液态致冷剂经内管流至探杆尖端汽化，蒸气经内管与中间管之间的环形空隙逸出，中间管与外管之间环形空隙抽成真空以绝热。因此，仅有探杆尖端冷却，其温度可由装在尖端的微型热电偶测定，并以控制液体流量和加热的方法来调节操作杆的温度。

(二) 等焓膨胀致冷

即利用各种气体的节流冷却效应来致冷。气体在与周围介质不进行热交换，同时亦不对外做功的情况下，通过小孔扩散来降低压力的方法，称为节流。气体在节流时，可以改变自己的温度，此种现象于 1852 年为焦耳—汤姆生用实验

确定，故称焦耳-汤姆生效应（Joule-Thomson effect）。

应用气体节流冷却效应的原理，可制成各种“冷刀”，外形象一大号钢笔，内装一支焦耳-汤姆生效应的微型制冷器，它利用空压瓶内的气体，使空压气体分成两路；一路经过滤干燥器，将气体中的水分和杂质滤过后，通过软管进入“冷刀”。另一路进入压力表，以显示压力数据。进入“冷刀”内的高压气体通过喷管，在喷口进行喷射，使“冷刀”冷却，由“冷刀”和人体组织进行热交换，将热量带走，使组织冷冻凝固。

（三）半导体致冷

半导体致冷又称温差电致冷，也称电子冷冻。是利用直流电通过两个不同的导体或半导体的交接处，在此交接处即出现温度差，即所谓帕尔蒂效应（Peltier effect）来产生低温冷却。半导体致冷的优点是体积小、重量轻、携带方便、灵活性大、操作简便，不需要复杂的装置和设备，任何有电源和水源的地方都可使用。半导体致冷的重要问题是材料的选择。碲化铋（ Bi_2Te_2 ）是最好的材料之一，因为它的热导率低，温差势高。以硒化铋（ Bi_2Se_3 ）和碲化铋的合金作为N型材料与P型的碲化铋相联，形成温差电结，所得到的致冷最高值相当于温度降低 70°C ，串联后效果较好。当 $t=27^\circ\text{C}$ 时，第一级能冷却 59°C ，第二级小于 40°C ，第三级小于 29°C ，第四级小于 22°C ，而消耗的功率随着级数的增多而很快增加，故温差电致冷还不能达到象液氮那样深的低温冷度（ -196°C ）。由于低温的深度不够，能量较小，对处理或破坏体积较大，需要冷量较大的组织如肿瘤，应用上还有限制。故目前半导体冷冻多用于眼科疾患、皮肤疾患和病理冷冻切片等较小的组织处理。

三、低温仪器

长期以来，人们均用人工控制（或半自动控制）降温速度的方法来冷冻生物样品，并用普通光学显微镜来观察冻存前后的组织、细胞的形态和结构的变化。但是由于在低温的特定条件下，这些方法不但不准确，并且也只能用于观察细胞在冰冻前或复温后的变化。对于不同生物样品特性，如何根据其特性细微调控其降温速度，观察其在冰冻过程中的组织结构形态变化，一直是人们研究探讨的热门课题。近年来，已由低温生物学家和工程物理学家共同研制成功不同型号的用电子计算机控制的程控降温仪，可根据实验需要，按照一定的速率降温，研究降温速率对细胞存活率的影响。此外，还研制出不同型号的用电子计算机控制，配备有录相系统的低温显微镜，可以连续观察和记录细胞在冰冻和复温过程中的整个变化。不仅为进一步研究细胞的低温冷冻损伤机制提供了手段，而且由于这种仪器可以自动摄影、记录，使其便于长期保存。

低温冷冻对组织细胞的作用

低温冷冻对组织细胞的作用，可产生物理、化学和生物组织形态学等方面一系列的影响。从生物学的观点而言，低温冷冻最基本的概念是冰晶形成和由此造成多方面的影响，其过程和变化是极其复杂的。

一、冷冻过程

冰冻是液体转化为固体的过程。纯溶剂（如水）的冰冻是全部物质一致转化，冰点即其液体与固体两种形态平衡共存的温度。过冷水与纯水不同之处是在冰点（ 0°C ）以下，温度越低，过冷水蒸气压力越较纯水为高，两者气压差越大；这说明溶液的蒸气压力高者不易结冰，即不易达到平衡。

溶液与水不同，其中含有溶质，其冰冻也与纯水不同。冷却至冰点以下，开始时与水相同，冰晶与冰核的形成率随温度降低而提高。但冷却至一定程度，溶液中水分因结冰而减少，溶质浓度越来越高，冰点温度便越降越低，于是出现冰核形成率和冰晶生长率下降。

含有细胞的溶液，由细胞膜分隔为细胞内与外两个不同的组成部分，其中只有水分容易通过细胞膜。在慢速冷却时，冰冻先见于细胞外，而细胞内呈过冷状态。此乃由于细胞内成分复杂，容积又小，即使有冰核形成但受细胞膜限制而无冰晶生长之故。此时，细胞内外蒸气压力出现不平衡，

如要恢复平衡,便要使细胞内溶质浓度升高。一种方式是细胞内脱水浓缩,因水分最易通透细胞膜逸出。第二种方式是细胞外溶质进入细胞内,在细胞受损伤破坏时可发生,如在冰冻后期。第三种方式是细胞内水分因结冰而减少,使溶质浓度升高;如在快速冷却时,冷却速度超过细胞内水分逸出的速度,细胞未脱水前,细胞内水分已冰冻。因此,各种细胞的细胞膜对水的通透性,便决定了各种细胞冰冻过程的差异。

当溶液降温冷冻时,由于水不断转化成冰,以致溶液内溶质浓度不断升高,然而实验证明,此时溶液浓度的升高不是匀速的。所以,生物材料在冰冻过程中,由于细胞内的水分形成冰,造成细胞内的电解质浓度升高,如若不采取相应的技术措施,则成为低温冻存失败的原因之一。

为使生物材料冻存成功,人们在组织细胞的保存液内,加入低温保护剂,以降低保存液开始结冰的温度,缩短相变时间,从而达到提高存活率的效果。

各种液体,只有经过过冷才能结冰。过冷温度随着许多因素而变。例如降温速率、溶液的化学成分,溶液内有无杂质、有否摇动溶液等,都可改变过冷温度。实验表明,过冷温度不宜太低,以免冷冻生物材料相变时,组织细胞由较低的温度骤然回复到较高温度,温差太大,而对活细胞造成某些损伤。

二、复温过程

通常冻存的生物材料复温时需要将样品加热,样品很快由零下温度上升到零度左右,冰开始融化,继续复温,此时样品温度升高缓慢,要使冰全部融化,需经历较长时间(在