

普通高等教育“十三五”规划教材



低温生物技术

张绍志 陈光明 编著



机械工业出版社
CHINA MACHINE PRESS

普通高等教育“十三五”规划教材

低温生物技术

张绍志 陈光明 编著



机械工业出版社

低温生物技术是低温工程、生物学及医学等学科交叉的产物,是现代生物医学技术的重要组成部分。本书详细论述了水溶液在低温下的性质和转变,生物材料低温保存的原理、应用和仪器设备,低温冷冻治疗的原理、应用和器械,药品和生物材料的冷冻干燥保存原理、应用和仪器设备,重点介绍了热物理科学和技术手段在低温保存、冷冻治疗以及冻干保存中的应用。

本书可作为高等院校能源与动力工程、生物医学工程等有关专业高年级学生或研究生的教学用书,也可供相关领域的科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

低温生物技术/张绍志,陈光明编著. —北京:机械工业出版社, 2019.3

普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-111-61536-1

I. ①低… II. ①张… ②陈… III. ①低温工程-生物医学工程-高等学校-教材 IV. ①R318.52

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第284581号

机械工业出版社(北京市百万庄大街22号 邮政编码100037)

策划编辑:蔡开颖 责任编辑:蔡开颖 张丹丹 陈洁

责任校对:郑婕 封面设计:张静

责任印制:李昂

北京机工印刷厂印刷

2019年4月第1版第1次印刷

184mm×260mm·13印张·320千字

标准书号:ISBN 978-7-111-61536-1

定价:34.80元

凡购本书,如有缺页、倒页、脱页,由本社发行部调换

电话服务

服务咨询热线:010-88379833

读者购书热线:010-68326294

网络服务

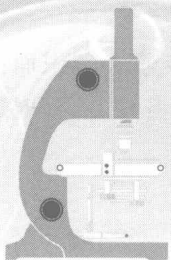
机工官网:www.cmpbook.com

机工官博:weibo.com/cmp1952

教育服务网:www.cmpedu.com

金书网:www.golden-book.com

封面无防伪标均为盗版



前言

近 20 年国内经济高速发展,制冷与低温技术应用的广度和深度都有很大的提高。相信随着“衣食住行”问题的解决,会有更多的资源投入到解决“生老病死”的问题上来,与“生老病死”问题有关的医学和生物技术将有长足的发展。不少高精尖的生物医学仪器设备都需要用到制冷和低温系统。作为一门工程类学科,低温能为这些仪器设备的研发提供技术基础,但更好的研发离不开学科知识的相互融合。低温生物技术就是这样一门交叉学科,研究生物医学中与低温有关的物理现象和技术问题,有用、有趣、有挑战性。

近年来,国内与低温生物技术有关的产业蓬勃发展,像低温冰箱,原来不少医院、血库和研究机构购置的都是国外品牌,但国产品牌现在也有了一定的市场份额。产业的持续发展离不开相关专业人才的培养。据作者不完全了解,目前国内从事低温生物技术方面研究的单位不少,如上海理工大学刘宝林老师课题组、中国科学院理化技术研究所刘静老师课题组、上海交通大学徐学敏老师课题组、中国科学技术大学赵刚老师课题组,但制冷或生物医学等专业开设有与低温生物技术有关的课程不多,作者以为原因之一是缺乏合适的教材。本书编写的主要目的是为制冷专业的学生提供了解最新低温生物技术的窗口,内容选择既强调基础性也注重时效性。第 1 章绪论作为开篇,简要介绍了自然界中的一些低温生物现象和低温生物技术的发展历史;第 2 章讲述了水和水溶液冷冻的基础知识;第 3~5 章分别就低温保存原理和应用、数学和物理建模及所用到的仪器设备展开讲解,在相应章节里列举了生物材料低温保存的具体方案;第 6 章重点介绍冷冻治疗的原理、应用和器械;第 7 章讲述药品和活性生物材料的冻干保存,重点介绍医药用冷冻干燥机系统组成以及干燥箱内传热传质分析。

作者所在课题组于 2000 年左右开始生物材料低温保存方面的研究,先后做了脐带血干细胞和关节软骨的相关研究。2004 年开始与浙江省血液中心合作进行人血小板的冷冻干燥保存研究,并一直持续至今。多年来,课题组在低温生物技术方向上的研究工作得到了国家自然科学基金委、教育部博士点基金、浙江省自然科学基金委、中国人民解放军第一一七医院、浙江省医疗器械研究所在经费上的资助,以及浙江省血液中心的通力协助,在此向这些单位表示感谢。

本书是在作者多年教学讲义的基础上编写的,编写中课题组的不少研究生都贡献了辛勤劳动,尤其是徐梦洁、虞效益等同学。浙江农林大学的胡军祥教授为本书提出了宝贵建议。

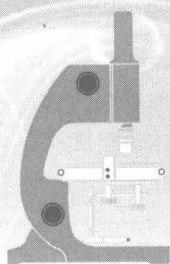


在此一并致谢。

低温生物技术是一门处在快速发展中的交叉学科，作者由于自身专业 and 知识面的局限，使得本书涵盖内容有限，书中某些表述可能存在不当或谬误之处，敬请各位专家和读者批评指正。

编 者

于浙大求是园

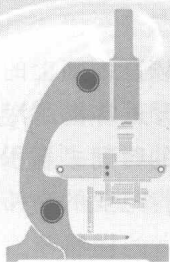


目录

前言

第1章 绪论	1	3.2.1 低温保护剂的毒性	36
1.1 自然界中的低温生物现象	1	3.2.2 降温过程中的损伤机理	37
1.2 低温技术在生物学中的应用	3	3.2.3 复温过程中的损伤机理	40
1.3 低温生物学技术发展简史	4	3.3 组织冷冻时的结冰现象	41
1.3.1 低温保存技术发展简史	4	3.4 人体器官冷冻保存问题	43
1.3.2 冷冻干燥技术发展简史	5	3.5 玻璃化保存	44
1.3.3 低温治疗技术发展简史	6	3.5.1 玻璃化溶液	45
习题	6	3.5.2 冻结线跟踪法	47
第2章 水和水溶液的冷冻	7	3.5.3 热应力问题	48
2.1 水溶液的性质	7	3.5.4 电磁复温技术	50
2.1.1 溶液组成的表示方法	7	3.5.5 快速降温方法	51
2.1.2 稀溶液的性质	8	3.6 低温保存应用	53
2.1.3 水溶液的渗透压	9	3.6.1 人血液细胞的低温保存	53
2.2 水的过冷及结冰	10	3.6.2 人类生殖细胞的低温保存	54
2.2.1 水-冰相图	10	3.6.3 人体其他细胞的低温保存	56
2.2.2 水的过冷现象	11	3.6.4 人体组织的低温保存	57
2.2.3 冰晶的生长	12	3.6.5 动物生殖细胞的低温保存	59
2.3 水溶液的相图	14	3.6.6 其他动物细胞的低温保存	60
2.3.1 二元溶液的相图	14	3.6.7 动物组织的低温保存	60
2.3.2 三元溶液的相图	15	3.6.8 植物种质资源的低温保存	61
2.4 水溶液的玻璃化及补充相图	18	3.6.9 微生物的低温保存	63
2.5 水溶液的热物理性质	22	3.7 低温保存中的污染问题	64
习题	33	3.8 低温保存操作实例	66
第3章 生物材料的低温保存	34	3.8.1 人类生殖细胞和生殖组织的保存方案	66
3.1 低温保存原理	34	3.8.2 哺乳动物卵细胞和胚胎的保存方案	69
3.2 悬浮细胞冷冻保存的损伤机理	35	3.8.3 植物细胞和组织的保存方案	73

3.8.4 藻类细胞的保存方案	79	6.3 冷冻治疗器械	131
3.8.5 苔藓的保存方案	81	6.3.1 半导体型冷冻治疗仪	133
习题	82	6.3.2 蒸汽压缩型冷冻治疗仪	134
第4章 低温保存过程的建模及分析 ...	83	6.3.3 气体节流型冷冻治疗仪	136
4.1 细胞的渗透性及测量	83	6.3.4 液氮型冷冻治疗仪	139
4.1.1 细胞的渗透性及物理模型	83	6.4 冷冻治疗过程分析	145
4.1.2 细胞渗透性的测量方法	86	6.4.1 冷冻治疗过程一维简化分析	145
4.2 悬浮细胞低温保护剂处理过程分析	89	6.4.2 冷冻治疗过程数值模拟	148
4.3 组织低温保护剂处理过程分析	91	6.5 冷冻治疗应用	148
4.3.1 胰岛组织	91	习题	152
4.3.2 人工组织	93	第7章 冷冻干燥保存	153
4.3.3 软骨组织	96	7.1 冷冻干燥保存原理	153
4.4 悬浮细胞冷冻过程分析	99	7.2 冷冻干燥保护剂	156
4.4.1 基于理想溶液假设的物理模型	99	7.3 冷冻干燥设备	158
4.4.2 基于非理想溶液假设的物理模型	101	7.3.1 干燥箱	159
4.5 胞内冰晶形成的物理模型	103	7.3.2 冷阱	161
4.6 组织冷冻过程分析	105	7.3.3 制冷系统	162
4.6.1 肝组织冷冻的物理模型	105	7.3.4 真空系统	164
4.6.2 血管组织冷冻的物理模型	107	7.3.5 加热系统	168
习题	108	7.3.6 在位清洗和在位消毒系统	168
第5章 低温保存的仪器设备	109	7.3.7 监控系统	170
5.1 差示扫描量热仪	109	7.3.8 两种冻干机的比较	172
5.2 低温显微镜	113	7.4 冻干过程传热传质分析	173
5.2.1 低温显微镜发展历史	113	7.4.1 真空下的气体导热和扩散	174
5.2.2 低温显微镜原理和类型	114	7.4.2 干燥箱内传热传质分析	175
5.2.3 低温显微图像处理	115	7.5 冻干显微镜	185
5.3 程控降温设备	117	7.6 冻干保存技术应用	187
5.4 低温冰箱	118	7.6.1 动植物标本冻干保存	187
5.5 液氮容器	121	7.6.2 微生物冻干保存	188
习题	122	7.6.3 蛋白质冻干保存	190
第6章 低温医疗	123	7.6.4 哺乳动物细胞冻干保存	191
6.1 冰帽和冰毯	123	7.7 冻干制品稳定性问题	193
6.2 冷冻治疗	125	7.7.1 水分活度、玻璃化温度与储存稳定性	194
6.2.1 冷冻治疗的作用机理	125	7.7.2 残余水分测量方法	196
6.2.2 冷冻治疗的实施方法	127	习题	197
6.2.3 冷冻治疗的过程监测	128	参考文献	198
6.2.4 冷冻治疗的辅助措施	130		



第 1 章

绪 论

1.1 自然界中的低温生物现象

何谓低温？在不同学科专业领域人员的眼中，其定义是大不相同的。在制冷与低温工程专业，120K 以下谓之低温；在物理学家眼里，低温通常指接近绝对零度的温度；农业生产上所说的低温，可能指比 0℃ 稍低的温度；食品保鲜领域内的低温，通常指 -20℃ 左右的温度；临床上的体温过低，则泛指比人体正常温度低的温度。

虽然低温难以准确定义，但低温是任何生物圈里的生物体都会面临的环境约束。因为任何生物体都有其适合生存的温度区间，当温度下降至该区间的下限甚至还要低时，生物体将面临舒适或生存问题。自然界中的寒冷可能会持续作用一段时间，对生物体造成的影响与其他环境因素、生物体近期的经历有关。当温度降到生物体液冻结点以下时，极有可能出现结冰现象，冰晶的形成将给生物体带来很大挑战。低温生物学专门研究低温对生物的影响，作为一门正规的科学，该学科起始于 18 世纪，当时科学家们对寒冷造成的生物体影响展开研究，被研究对象多为植物，具体的研究内容则包括冷冻的伤害作用、产生冻害的原因、冰侵入植物的机制、冷冻抵抗力强的植物和抵抗力弱的植物的差异、耐冻的原因及冷冻伤害的防范等方面。关于寒冷对动物影响的研究，人们更感兴趣的是昆虫和水生动物是怎样忍受冬季的寒冷及自体水的冻结。通过观察，研究者们发现线虫类的小动物即使在寒冷干燥的状态下也能够长期生存。进入 19 世纪，随着人工制冷技术的发展，低温生物学的实验研究变得相对容易，该领域的研究因此得以快速发展。

随着低温生物学知识的不断积累，人们已经了解到在漫长的进化过程中，大自然中的一些生物，尤其是处于极地生物圈中的生物，已经发展出了很好的应对低温的方法。下面将选取一些有趣的低温生物现象予以介绍。

1. 成核细菌

一些细菌如假单胞菌，在其外膜上拥有高效的冰晶成核剂。当环境气温低于 0℃ 时，它们用这些冰晶成核剂在各种水果和植物表面制造冰核，从而使表面出现局部冻结现象。冻结将引起上皮细胞的损伤，使得在下层植物组织中的营养物质外泄，被细菌所利用。

2. 高山热带植物的自我保护

在热带高山地区，如非洲的乞力马扎罗山，全年每天白天的温度都较高而晚上的气温则会降至 0°C 以下。由于温度始终在急剧地变动，有机体必须同时具备白天正常代谢活动和晚上抗冻的能力，它们没有机会像极地和温带的有机体那样，有长达数月的时间去累积显著的生理和生物化学变化，它们发展出了一些特殊的自我保护机制。例如，肯尼亚的高纬度山区存在一种特殊的高山植物，它长有很多玫瑰花状分布的长叶子和2m多高的柱状花。花是中空的，里面含有大量的水状黏性流体，该流体每天晚上都会冻结，冻结温度在 0°C 左右。即使环境温度降到 $-5\sim-10^{\circ}\text{C}$ ，花的温度也只降到 -1°C 左右。很显然，这种植物利用了黏性流体冻结所释放的潜热作为保护热源，使得植物体温度不至于降得过低。黏性流体的渗透压很低，使得其存在对植物细胞本身没有不利影响。通过对流体成分进行分析，科学家们发现了有意思的共生现象：流体中含有细菌，它们提供高效的成核剂，使得流体在刚低于 0°C 就可以结晶，植物与细菌相互合作，植物给细菌提供营养和庇护，而细菌通过冻结水使植物体在夜晚保持在尽可能高的零下温度位。还有一些非洲高山植物的花中没有任何流体，但这些植物能够将雨水捕获在玫瑰型叶子间。这些水每晚都会冻结，给植物提供类似的热保护。

3. 植物的耐寒性

水结成冰会导致多种有害的物理和化学改变。一方面，当冰在过冷的有机体中传播时，针状冰晶可能会刺破细胞膜，引起损伤。另一方面，因为只有水分子能参与冰的形成，溶质仍然留在冰晶周围的溶液中，溶质浓度最终可能达到有毒的水平。植物体内封闭的小室（如细胞）通常含有导致冰晶形成的组分，使得这些小室的水在较高的零下温度就冻结，产生的膨胀现象可能导致小室破裂。

植物的耐寒性是基于避免冻结，也就是让有机体在零下温度时保持过冷。例如，很多温带木本植物（如苹果树、枫树）耐寒，它们的某些器官或组织甚至能过冷到 $-15\sim-40^{\circ}\text{C}$ 。在温带的沿海地区，一些滩涂海藻在海水低潮时暴露于空气中，空气温度在冬天可能低于 -10°C ，这些海藻都进化出了耐冻能力。有学者研究了海藻的耐冻性与它们在潮汐带中的位置之间的关系，发现随着与低潮时最低水位线距离的增加，海藻细胞耐受的过冷温度逐渐降低。

4. 植物的耐冻性

所谓耐冻性，即允许有机体部分冻结，但限制冰晶生长的性质。植物的冻结一般是被存在于细胞外液体中的有效冰晶成核剂所诱发的，如在冷杉、李、冬黑麦、柑橘、海洋浆果和苔藓的细胞外溶液中都发现过有效的成核剂，这些成核剂的成分是蛋白质、碳水化合物、磷脂等的复合物，能在 $-5\sim-12^{\circ}\text{C}$ 的温度范围触发主动冻结。除成核剂外，抗冻蛋白在植物的耐冻能力中也发挥了重要作用，它能阻碍冰晶的再结晶和长大。例如，在冬黑麦细胞内部已经确认了几种不同的抗冻蛋白，即使冰晶偶然进入了细胞，抗冻蛋白也能阻止它们长大到能起危害作用的程度。

5. 极地海洋中的鱼类

在北冰洋或南极洲，有浮冰的海水温度约为 -1.9°C ，由于鱼类属于冷血生物，因此这也就是鱼的体温。硬骨鱼的体液冻结点为 -0.6°C ，这意味着其体液过冷度为 1.3°C 。虽然这个过冷度并不大，但依然会对鱼构成严重的威胁。鱼的体表是跟外部冰晶直接接触的，因此，冰晶可能通过接种方式传到鱼鳃和鱼体内其他器官，从而导致整条鱼冻结死亡。在这种条件下生存的鱼被证实其体液内含有蛋白质抗冻剂，这类蛋白质能让与过冷水接触的冰晶长



不大,其生化成分是蛋白质或糖蛋白,作用机理是蛋白质主动黏附在冰晶表面,限制周围新的水分子加入冰结构。硬骨鱼多个部位的体液中都发现了抗冻蛋白的存在,如血浆、肠液、胆汁和脑脊髓液,但在细胞内部和尿液中没有。抗冻蛋白在肝脏内合成,通过血液运输到胆汁管,然后排到肠内。还有一些极地海产鱼类依靠氯化物或有机溶质〔如葡萄糖、甘油(Glycerol)〕的积聚,提高体液的溶质浓度,充分降低体液冻结点,避免体液过冷。

有意思的是,鱼的尿液相对于海水来说是低渗的,冻结点比海水温度高,鱼在分泌尿液时怎样避免泌尿系统结晶的问题尚不清楚。

6. 陆地冷血生物

与极地海洋鱼类相比,陆地冷血生物体可能会充分暴露于更低的温度环境中,它们为此发展出了相应的高效抗寒机制,其中比较典型的是昆虫和两栖动物。

昆虫的耐寒类型有两种:具备强过冷能力和耐冻。这两种昆虫都根据季节变化积聚含多个羟基的化合物,如某种昆虫在夏天的时候体液中含多个羟基的化合物渗透压约为 500mOsm/L ,在秋末或早冬昆虫遭受强冷,其体液中含多个羟基的化合物渗透压便高于 3000mOsm/L 。最常见的含多个羟基的化合物是甘油,从昆虫储存的糖原中产生,此外,也有昆虫积聚乙二醇、山梨(糖)醇、甘露醇和苏糖醇等多羟基化合物。

具备强过冷能力的昆虫需要利用体内的碳水化合物资源并脱水,以达到多羟基化合物的高浓度,如某些强过冷昆虫体内含水量能降至30%以下。由于过冷状态是物理意义上的亚稳态,昆虫个体也可能偶然地冻结,因此,稳定过冷状态对它们来说就非常重要。许多昆虫的血淋巴具有高热滞后的活性蛋白,比鱼的抗冻蛋白更加有效,能够阻止外部冰晶通过体表接种,有助于稳定体液的过冷状态。

耐冻昆虫的血淋巴具有冰晶成核物质,由蛋白或脂蛋白组成,这些物质的存在使得细胞外体液先结冰,从而能避免在细胞内部等封闭空间内出现冰晶。此外,一些耐冻昆虫的细胞内还有抗冻蛋白的存在。热带温和山区的昆虫喜欢耐冻的存活策略,因为这些昆虫不经受季节性的寒冷,机体没有足够时间来调整状态。

一些节肢动物,如蚯蚓茧的外表皮具有很高的水渗透性。在低温环境中,由于空气中的水蒸气分压相应地也很低,这类生物体会迅速通过外表皮的水分蒸发脱水,从而降低体液的冻结点,阻止体液过冷与冰晶形成。

低等的陆地脊椎动物的冬眠地通常在被冰雪覆盖的地方,虽然这些动物不直接暴露于低温空气,但仍需要具备一定的耐寒耐冻能力。某些物种的耐冻能力已被实验所证实,如青蛙、龟、蛇和蜥蜴。

大自然是人类最好的老师,很多发明创造是在她的启发下产生的。对于自然界中低温生物现象的研究,让一些有广泛影响的新技术应运而生。例如,抗冻蛋白是不少动植物抵抗低温的有效武器,通过将合成抗冻蛋白的基因转移至非抗冻农作物,人们能得到具有更好气候适应能力的小麦、柑橘、马铃薯新品种。

1.2 低温技术在生物医学中的应用

现代科学技术发展的一个重要特点是多学科交叉。低温技术不仅提供低温环境,而且提供冷却或降温手段,该技术在国民经济和科学研究的很多方面都得到了广泛应用,其中就包



括生物学和医学领域。低温生物医学技术是在制冷与低温工程、生物工程、临床医学等学科间发展起来的一门交叉学科，它的研究重点之一是制冷与低温技术在生物和医学上的应用，这些应用概述如下：

1) 利用低温对生化反应的抑制，进行生物材料的长期保存。这里的低温通常指 -80°C 以下或液氮温度位。根据描述生化反应速率 K 与温度关系的 Arrhenius (阿伦尼乌斯) 方程 [$K=A\exp(-E_a/RT)$]， A 为与具体反应有关的常数， E_a 为反应的活化能] 随着温度的降低反应速率将显著变慢。在液氮温度位，由于分子动能太低以致无法做空间上的移动，生化反应可以认为是停止的，生物材料因而可保持原状。生物材料与人们的需求有关，既可以来源于动植物，如大熊猫的精子、野生水稻的愈伤组织，也可以来源于人体，如血液成分、皮肤、胰腺组织，还可以是微生物，如病毒、细菌、真菌。同普通冰箱能延长食物的储存期一样，在低温下保存生物材料能够显著延长其储存期限至数月或数年，在液氮温度位储存甚至能达到数十年，从而为日后利用创造条件。

2) 利用 0°C 以上、低于正常温度对新陈代谢的延缓作用，减少代谢毒副产物的产生，减轻其对人体重要器官的伤害，为临床手术争取准备时间。此外，利用低温和人工模拟的体内环境，还能够将待移植的人体器官在体外保存数小时至数十小时，为器官运输、移植手术准备提供时间窗口。

3) 利用 0°C 以下低温对人体细胞和组织的冷冻破坏作用，进行病变组织的临床治疗，如去痣、摘除白内障、切除肿瘤。低温治疗已经和热疗、化疗、放疗、激光治疗一样，成为医院各个科室的常规治疗手段。

4) 利用低温对生化反应的抑制和对水的冻结效应，在低温下进行生物材料的水分去除，也称干燥。冷冻干燥的生物材料具有室温长期保存、方便储存运输、易于使用等诸多优点。冷冻干燥技术已经在生物制药行业得到广泛应用，很多微生物也可以用该方法保存。将该方法应用于哺乳动物血液细胞和其他体细胞的保存是当前研究的热点。

5) 利用低温对生物材料微结构的固定作用，进行生物样本的制备。生物材料的大部分成分是水，在足够快的冷却速度下，所有的水分子及构成生物材料的其他成分都将被固定在原地，从而使观察完好的超微结构成为可能。

除了以上应用外，在不少生物和医学仪器中也有不少地方要用到低温技术，如核磁共振仪中为超导线圈提供低温环境。作为一门工程技术，制冷与低温技术在这些应用里发挥用途的主要方式是提供设备，如生物材料保存用液氮容器、低温冰箱、程控降温仪、低温治疗器、低温显微镜、低温型差式扫描量热仪、冷冻干燥机、低温取代仪、低温制冷机等。这些设备的研制和开发与对低温生物的内在机理的认识紧密关联，性能更好的应用和研究设备的开发依赖于多学科科研人员间的合作。

1.3 低温生物医学技术发展简史

如前所述，低温生物医学技术涵盖的范围比较宽广，由于篇幅有限，本书将重点介绍低温保存技术、冷冻干燥技术及低温治疗技术。下面将简单回顾这些技术的发展历史。

1.3.1 低温保存技术发展简史

现代意义上的低温保存技术始自 1949 年，当时 Polge 等偶然发现添加甘油能让动物精



子成功地低温保存。自那以后,二甲基亚砜(DMSO)、乙二醇等多种低温保护剂被发现。多种生物材料的低温保存相继获得了成功,如与人的身体健康紧密相关的血液、骨髓等。作为学科标志,国际低温生物医学杂志 *Cryobiology* 于 1964 年创刊。20 世纪 60 年代,不少人进行了动物器官(如心脏、肝脏)冷冻保存的探索,但都没有获得成功(有少数研究者宣称获得了成功,但实验结果没有得到其他人的证实)。虽然如此,同期进行的采用机器连续低温灌流法保存人的肾脏取得了成功,并投入了临床应用。1971 年,美国麻省理工学院的 Diller 和 Cravalho 研制了第一台采用自动控温和温度图像数据同步采集技术的低温显微镜,使得细胞冷冻的实验研究手段上了一个台阶。研究人员可以更自由地对细胞的冷冻/复温条件进行精确控制,对细胞进行实时显微观察。多个研究者的实验结果表明,细胞种类、低温保护剂配方、升降温速率等因素都会影响细胞的存活率。为此, Mazur 提出了导致细胞死亡的“两因素”假说,从理论角度解释了最优冷却速率的存在。自 Mazur 以后,对冷冻造成细胞损伤的原因的研究一直深入,其中不少研究自物理化学角度展开。细胞膜对水和低温保护剂的渗透性是细胞自身与低温保存有关的重要性质,在众多实验成果的支持下,新的物理模型被提出。很多研究者尝试建立处于悬浮状态的细胞及与其他细胞邻接的细胞内部冰晶形成和生长的数学物理模型,并将此类模型应用于低温保存实践。

20 世纪 30 年代, Luyet 曾提出玻璃化保存生物细胞的想法,但直到 20 世纪 80 年代初, Fahy 等真正实践了该想法,他们采用高浓度的低温保护剂溶液(又称玻璃化溶液),在高压辅助下低温保存兔子的肾脏切片,获得了初步成功。自那以后,作为与传统的冷冻方法不一样的技术,玻璃化保存取得了快速发展。人们开发出了玻璃化技术的多个变种,如包埋-脱水-玻璃化法。玻璃化保护剂配方设计、加入和去除方法都在不断完善,并趋于标准化。目前,该方法除成功应用于悬浮细胞、薄片组织的低温保存外,还在植物种质资源的保存方面发挥着重要作用。2004 年, Fahy 等在玻璃化溶液配方研究上取得了新的进展,使得该技术保存器官向临床应用又迈进了一步。

1.3.2 冷冻干燥技术发展简史

虽然早在 1 万年前就有人类利用天然条件冷冻干燥(冻干)食物的记录,但现代意义的冻干技术起始于 1890 年,由 Richard Altmann 教授首先应用于解剖标本的制备。最早的冻干装置使用化学吸湿剂(如浓硫酸、五氧化二磷)吸收升华出来的水汽,后来使用能直接抽除水汽的蒸汽喷射真空泵(多级串联),现在均使用冷却到低温的金属表面凝华水蒸气。

1909 年, Shackell 成功地冻干了抗血清、狂犬病毒。1911 年, Harris 等人用冻干法保存了细菌菌种。1921 年, Swift 用冻干法保存了病毒毒种。20 世纪 30 年代,疫苗、激素、维生素及一些医药产品开始了商业性的冻干法生产。在第二次世界大战期间,由于战争的需要,冻干血浆和抗生素被大量生产,冻干技术本身也得到了极大的发展。一个引证是,在青霉素发明后其冻干制剂被迅速大规模生产。

现在,冻干在食品和制药行业都是相对成熟的技术,微生物的冻干燥也十分常见,但将该技术应用于人和动物的细胞,很长时间以来都未获得成功。进入 21 世纪,在自然科学研究引导下,这些领域展现出了新的曙光。研究人员发现,一些糖类,尤其是海藻糖,在冷冻和干燥的过程中能保护蛋白质、核酸和膜等生物大分子和结构。通过各种方法将海藻糖引入哺乳动物细胞(如血小板、干细胞)后,这些细胞在冻干复水后都获得了较高的存活率。

该技术若能实用，带来的社会效益和经济效益将十分可观。

1.3.3 低温治疗技术发展简史

19 世纪中期，英国的 James Arnott 用低温盐水治疗胸部和子宫肿瘤，限于当时的技术手段，低温盐水是用碎冰和盐混合制得的。1899 年，美国的一位医生 Campbell White 报道了应用液化空气治疗皮肤病的方法。由于效果显著，他的方法很快得到了效仿。使用液化空气的方式有多种，如用棉签蘸涂、用瓶子喷洒、将充满液化空气的玻璃瓶或黄铜瓶在病灶上滚动等，当时可治疗如疣、腿部溃疡、疖、带状疱疹、皮肤癌、丹毒等疾病。1907 年，William Pusey 首先将固体二氧化碳应用于治疗疾病，干冰在其后的数十年成为冷冻治疗最主要的冷源，在皮肤科和妇科都得到了较广泛的应用。1942 年，一种基于氟利昂蒸气压缩式制冷的冷冻手术系统问世，但未获得推广，其原因可能是这种系统不能像干冰那样轻易地获得足够低的温度。1950 年，Allington 首先将液氮应用于冷冻治疗，他用棉签将液氮直接涂布于病灶，治疗疣、角化症等各种非肿瘤性皮肤病。

到了 20 世纪 60 年代，冷冻治疗技术取得了突破性发展。Irving Cooper 和 Arnold Lee 制作了一种冷冻治疗探针，能用来准确地冷冻脑组织内的病灶。这种探针就是后来各种液氮冷冻探针的原型，它由 3 根长同心管构成，内管输送液氮到探针顶端，内管和中间管之间的间隙为气氮从探针顶端回流的空间，而外管和中间管之间的间隙为真空绝热层。液氮冷冻探针问世后，冷冻治疗技术得到快速发展，先是被用于治疗帕金森病和其他神经系统疾病，后来又相继用于治疗其他多种疾病，如子宫炎症、骨关节疾病及皮肤疾病等。

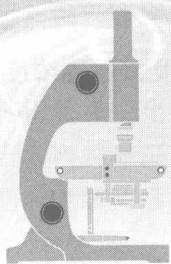
由于缺乏有效的监测手段及同时期激光治疗技术的快速发展，冷冻治疗的应用在 20 世纪七八十年代有所停滞。到了 20 世纪 80 年代末，超声、CT 技术日益普及，使得冷冻探针可以在实时影像的监测与引导下，被准确地插入病患部位，手术医生能精细控制冷冻范围，保证有效地杀死病变组织而不损伤或最大限度地减少正常组织的损伤。

20 世纪末，美国的 Endocare 公司和以色列的 Galileo 公司研制成功了氩氦低温治疗系统（又称氩氦刀），探针利用高压氩气节流获取 -160°C 低温，利用高压氦气节流复温，这两家公司生产的冷冻探针直径可小至 1.5mm，从而真正做到手术的微创化。在美国，目前氩氦刀大有取代液氮冷冻的趋势。

习 题

1-1 举出一个书中没讲过的低温生物现象，叙述不少于 200 字。

1-2 某生物化学反应的活化能为 60kJ/mol ，在 37°C 时的反应速度为 100%，温度下降至 -80°C 时反应速度为多少？



第 2 章

水和水溶液的冷冻

水是生物体最重要的组成成分，是很多生化反应得以进行的载体。生物体中的水溶有电解质、各种小分子（如氨基酸、葡萄糖、脂肪酸）和各种大分子（如多肽、蛋白质、DNA），水和它们一起形成了水溶液。纯水和水溶液在温度降到 0°C 以下时可能会结冰。要研究生物体在低温下会有哪些物理、化学反应，可以从最基本的水或水溶液的冷冻着手。

2.1 水溶液的性质

溶液是指由两种或多种物质在分子尺度上构成的均匀混合物。溶液可以是液态的，也可以是气态的或固态的。本书讨论的是由水和一种或多种物质组成的液态溶液，且将水称为溶剂（Solvent），而将其他物质称为溶质（Solute）。

2.1.1 溶液组成的表示方法

在生物材料的低温保存实践中，人们常常需要配制含有多种溶质的溶液。由于历史的原因和个人习惯的不同，存在不同的成分表示法。因此，有必要参照国家标准了解不同表示法的确切含义以及相互之间的转换关系。

1. 摩尔分数

溶液中某一溶质 i 的摩尔分数被定义为

$$x_{s,i} = n_{s,i} / (n_w + \sum_i n_{s,i}) \quad (2-1)$$

式中， n_w 为溶液中水的物质的量； $n_{s,i}$ 为溶质 i 的物质的量。

2. 质量摩尔浓度

在 1kg 水（溶剂）中所含有的某种溶质 i 的物质的量称为质量摩尔浓度，单位是 mol/kg 。

$$m_{s,i} = n_{s,i} / W_w \quad (2-2)$$

式中， W_w 为溶液中水的质量。



3. 浓度

在单位体积溶液中所含有的某种溶质 i 的物质的量称为物质的量浓度, 简称浓度, 常用单位是 mol/L 。

$$c_{s,i} = n_{s,i} / V \quad (2-3)$$

式中, V 为溶液的总体积。

4. 质量分数

溶液中所含有的某种溶质 i 的质量与溶液总质量之比称为质量分数, 即

$$y_{s,i} = W_{s,i} / (W_w + \sum_i W_{s,i}) \quad (2-4)$$

式中, $W_{s,i}$ 为某种溶质 i 的质量。

若非特别说明, 本书以后章节出现的表示含量的百分数 (%) 均指质量分数, 溶液指水溶液。

2.1.2 稀溶液的性质

活的生物体含水量通常都很高, 而且其中的溶质不少是大分子, 溶质的总摩尔分数小, 因此如果整体视为溶液, 可以认为是稀溶液。稀溶液可以近似成理想溶液, 根据其组成推算其常见物理性质。

1. 水蒸气分压

稀溶液上方的水蒸气分压 p_w 等于溶液温度下纯水的蒸气压 p_w^0 乘以溶液中水的摩尔分数 x_w , 即

$$p_w = p_w^0 x_w \quad (2-5)$$

该关系被称为拉乌尔定律 (Raoult's Law)。

2. 沸点

在相同的外压下, 稀溶液的沸点 T_b 要高于纯水的沸点 T_b^0 , 其沸点升高部分正比于溶液的总质量摩尔浓度 m_s , 即

$$\Delta T_b = T_b - T_b^0 = K_b m_s \quad (2-6)$$

$$K_b = R M_w (T_b^0)^2 / r \quad (2-7)$$

式中, r 、 M_w 、 T_b^0 分别为溶剂水的摩尔汽化热 (J/mol)、摩尔质量 (g/mol) 和沸点 (K); R 为摩尔气体常数, $R = 8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$; K_b 为沸点升高常数, 其值为 $0.51 \text{ K}/(\text{mol/kg})$ 。

3. 凝固点

在相同的外压下, 稀溶液中水的凝固点或冻结点 T_f 要低于纯水的凝固点 T_f^0 , 降低部分正比于溶液的质量摩尔浓度 m_s , 即

$$\Delta T_f = T_f^0 - T_f = K_f m_s \quad (2-8)$$

$$K_f = R M_w (T_f^0)^2 / L_f \quad (2-9)$$

式中, L_f 为冰在 T_f^0 温度下的摩尔熔化热, $L_f = 6.003 \text{ kJ/mol}$; K_f 为凝固点降低常数, $K_f = 1.86 \text{ K}/(\text{mol/kg})$ 。

稀溶液的上述性质, 包括下面将要讨论的渗透压, 统称为稀溶液依数性。依数的含义是



指当溶质的种类和数量确定后, 这些性质只取决于所含溶质粒子的数目, 与溶质的化学性质无关。对于理想的 (即不发生任何离解的) 由非电解质 (如葡萄糖、蔗糖) 溶质构成的稀溶液, 其依数性变化正比于溶液的质量摩尔浓度 m_s 。若溶质是电解质 (如氯化钠), 则可能部分或全部离解成正、负离子团, 离解后正离子团、负离子团以及未离解的分子, 均能以相当于理想非电解质溶质分子那样的方式, 对溶液的依数性起作用。

2.1.3 水溶液的渗透压

高等生物体的基本构成单位为细胞, 细胞的一个重要特征体现在细胞膜是半透膜。所谓半透膜, 即在自发状态下只允许某些物质透过而不允许另一些物质透过的膜。图 2-1 给出了简单的渗透压现象的演示实验, 将等高度的蔗糖溶液与纯水放入 U 形管内的两侧, 用半透膜隔开, 不久即可见蔗糖溶液液面不断上升, 说明膜右边水分子不断透过半透膜进入蔗糖溶液中。当蔗糖溶液液面上升到一定高度时, 增加的液体压力就会抵消由于单位体积内溶剂分子数目不等而造成的渗透现象, 此时, 单位时间内从半透膜两侧透过的溶剂分子数目趋于相等, 溶液液面不再上升, 体系达到渗透平衡。如果要使渗透现象不发生, 必须在蔗糖溶液液面上施加一个额外压力, 该压力称为渗透压。渗透压是稀溶液的依数性之一, 根据以下公式计算, 即

$$\Pi = RTx_s / V_{mw}^0 \quad (2-10)$$

式中, T 为溶液的热力学温度 (K); x_s 为溶质的摩尔分数; V_{mw}^0 为纯水的摩尔体积 (m^3/mol); R 为气体常数。

渗透压的大小反映出溶剂分子通过半透膜渗入该溶液的趋势。渗透压越大, 渗入的趋势越大。对于渗透压不等的两溶液, 把其中渗透压高的溶液称为高渗溶液, 渗透压低的溶液称为低渗溶液。渗透压相同而成分不一样的两溶液称为等渗溶液。哺乳动物细胞, 包括人体细胞, 在正常生理状态下可认为与 0.9% 的生理盐水等渗。

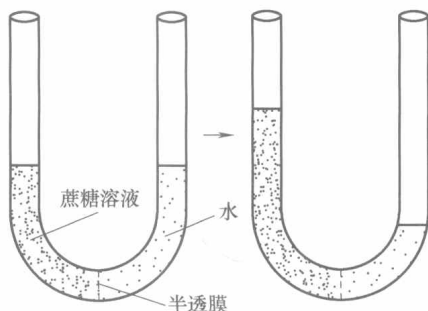


图 2-1 渗透压现象

例 2-1 计算室温 20°C 、1.8% 的 NaCl 的渗透压和冰点, 假设 NaCl 全部离解。

解 NaCl 的质量摩尔浓度 $m_{\text{NaCl}} = \frac{18/58.5}{0.982} \text{mol/kg} = 0.3133 \text{mol/kg}$

所以冰点 $= (273.15 - 1.86 \times 2 \times 0.3133) \text{K} = 271.98 \text{K} (-1.17^\circ\text{C})$

Na^+ 和 Cl^- 的摩尔分数 $x_s = \frac{2 \times 18/58.5}{2 \times 18/58.5 + 982/18} = 0.0112$

$$\begin{aligned} \Pi &= \frac{RTx_s}{V_{mw}^0} = \frac{8.314 \times 293.15 \times 0.0112}{1.8 \times 10^{-5}} \text{Pa} \\ &= 1.52 \times 10^6 \text{Pa} = 1.52 \text{MPa} \end{aligned}$$

2.2 水的过冷及结冰

2.2.1 水-冰相图

根据温度和压力的不同，冰可以存在八种稳定的形态，如图 2-2 所示，其中状态Ⅳ为状态Ⅴ的亚稳态。表 2-1 列出了水和冰八种形态之间相互转换的三相点的温度和压力，L 代表水。从相图可以看出，在压力为 2100bar（1bar=10⁵Pa）时温度降至-20℃也不会有结冰现象发生，如继续增加压力，则会形成冰Ⅲ，如图 2-3 所示。与常见的由水形成冰Ⅰ相比，由水变成冰Ⅲ不会有体积膨胀的现象发生，相应地由膨胀给生物材料带来的应力和应变损害可以被避免。曾有人据此提出基于高压的低温保存技术。

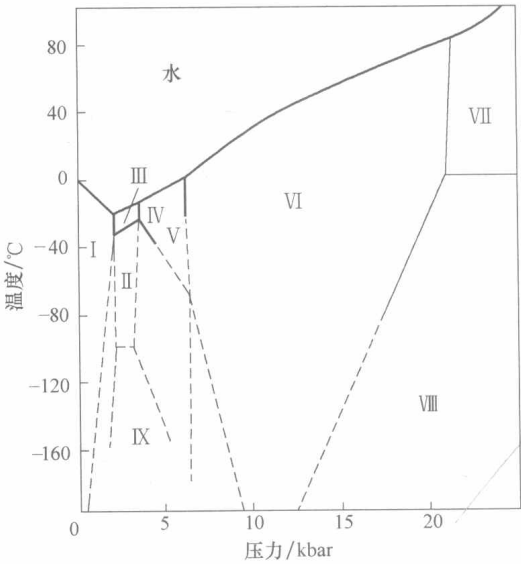


图 2-2 水-冰相图
——准确数据，-----近似数据

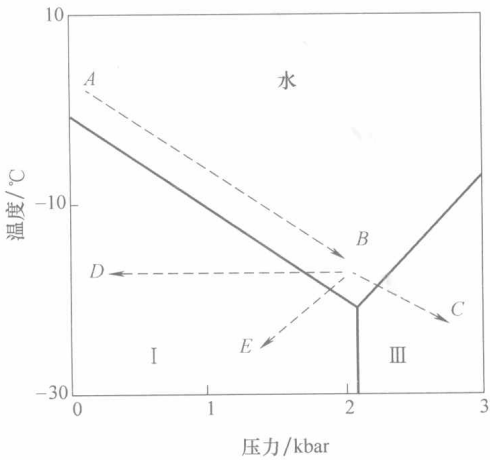


图 2-3 高压冷冻法原理

表 2-1 水-冰三相点

共存相	温度/K	压力/MPa
L- I -Ⅲ	251.2	207
I -Ⅱ -Ⅲ	238.5	213
Ⅱ -Ⅲ -Ⅴ	248.9	344
L-Ⅲ -Ⅴ	256.2	346
L-Ⅴ -Ⅵ	273.4	626
L-Ⅵ -Ⅶ	354.8	2200
Ⅵ -Ⅶ -Ⅷ	273	2100