

P I F U
J I B I N G
Y E D A N
L E N G D O N G
L I A O F A

郭玉德 王 斌 段传新 武汉生 薛 芹 主 编

皮肤疾病-液氮 冷冻疗法

——理论与实践

湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

皮肤疾病-液氮冷冻疗法:理论与实践/郭玉德等主
编. —武汉:湖北科学技术出版社,2012.8
ISBN 978-7-5352-5143-5

I. ①皮… II. ①郭… III. ①皮肤病—冷冻疗法
IV. ①R750.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 174982 号

责任编辑:陈兰平

封面设计:王 梅

出版发行:湖北科学技术出版社
地 址:武汉市雄楚大街 268 号
(湖北出版文化城 B 座 13—14 层)
网 址:<http://www.hbstp.com.cn>

电话:027—87679439
邮编:430070

印 刷:湖北新新城际出版印刷技术有限公司

邮编:430072

787×1092 1/16 7.375 印张 25 插页
2012 年 8 月第 1 版

280 千字
2012 年 8 月第 1 次印刷
定价:38.00 元

本书如有印装质量问题 可找本社市场部更换

皮肤疾病-液氮冷冻疗法

——理论与实践

主 编 郭玉德 王 斌 段传新
武汉生 薛 芹

湖北科学技术出版社

编委会

主 编	郭玉德	武汉大学人民医院			
	王 斌	武汉市五医院			
	段传新	湖北省妇女儿童医院			
	武汉生	武汉大学医学院			
	薛 芹	武汉科技大学天佑医院			
副主编	张万义	武汉市五医院			
	汪春娇	武汉大学医院			
	赵映珍	湖北省妇女儿童医院			
	谭 毅	湖北省妇女儿童医院			
	曾凡华	湖北省妇女儿童医院			
	李 栋	武汉市儿童医院			
	廖皓磊	武汉大学医院			
	邓家英	潜江市中心医院			
编著者	孔勇刚	肖伯奎	段 勇	汪春娇	李 栋
	赵映珍	张万义	段传新	李 栋	武汉生
	谭 毅	郭玉德	廖皓磊	王 斌	

主 编 自 述

郭玉德,1931年3月生,辽宁沈阳人。1948年12月入学,供给制,1954年毕业于大连医学院医疗系耳鼻喉科专业。1953—1954年曾在沈阳中国医大附属第一医院耳鼻喉科张立、金济霖教授处学习;1963—1965年曾在北京解放军总医院耳鼻喉科姜泗长教授处学习。国家统一分配,历任湖北医学院附属第一医院(现武汉大学人民医院)耳鼻咽喉科教研室主任、主任医师、教授,兼中华医学会湖北暨武汉耳鼻咽喉科分会副主任委员、常委等。中国制冷学会六专业委员会湖北暨武汉分会主任委员,常务理事;中华免疫学会湖北省变态反应学会副主任委员、常委;中华老年医学会湖北分会、湖北省声学学会会员;美国冷冻医学学会会员;国外医学文摘——耳鼻咽喉科分册校译员;临床耳鼻咽喉科杂志编委、常委、湖北医科大学校刊编委;兼武汉工业大学教授等。自参加工作半个多世纪以来,一直从事医疗、教学和临床科研工作。20世纪50—60年代着手耳鼻喉科感染病灶的专题研究;20世纪70—80年代进行对小儿听力问题的研究并研制出“喉超声、鼻超声药导治疗仪”;20世纪80—90年代研制出“新生儿测听器”、“HA陶瓷听骨链”且论文“生物陶瓷HA听骨链研究及其应用”被美国只读光盘(CD-ROOM)数据库BiologicalAbstract——(1993)摘录收藏。20世纪末研制出特别适用于小儿分泌性中耳炎治疗的“游戏自身吹鸣器”。科研成果“HMC84数字显示液氮冷疗装置”获“87——湖北省科技进步二等奖”、“HA陶瓷听骨链”获部级一等奖和中华人民共和国国家科委97三等奖、“新生儿测听器”及“双曝法武汉地区气传真菌分布调研”获省科委科技进步奖。两次参加中国援阿尔及利医疗队(1979—1981年及1984—1986年),在阿首先开展听力重建手术、冷冻外科以及无麻坐位扁桃体或腺样体快速切除术,被受援国人民誉为“郭教授是赛义达人民的光荣”。获湖北省95科技精英称号和95中华医学会“桃李满天下荣誉奖章”一枚。自1954年以来共发表了专业论文100余篇,优秀论文获奖数十次。翻译俄、英、日、德、法等医学文摘约280多篇,均刊载在各专业期刊上;编著参考书:如《小儿中耳炎》、《实用冷冻疗法》、《现代小儿耳鼻咽喉科学》(人民卫生出版社)、《耳鼻咽喉科急诊》、《现代耳鼻咽喉科变态反应与免疫》、《耳鼻咽喉科漏、误诊》、《新编小儿耳鼻咽喉科学》、《小儿慢性扁桃体炎与心脏病》、《耳鼻咽喉科简明手术图解》(湖北科学技术出版社)、《临床听力学纲要》(武汉大学出版社)、《日本耳鼻咽喉科医师国家资格考试答疑》(香港金陵出版社)、《小儿耳鼻咽喉科疾病临床释疑》(黑龙江科学技术出版社)、《现代耳鼻咽喉科护理学》(北京台海出版社)、《现代医院英语会话》以及《耳鼻咽喉科、头、颈疾病诊断彩色图谱》、《现代小儿耳鼻咽喉、头颈外科简明手术图解》、《耳鼻咽喉、头颈外科急诊》、《嗓音保健及现代喉内外科疗法》及《现代耳鼻咽喉实用手术图解》、《耳解剖学手册》(湖北科学技术出版社,2001)、再版《耳鸣》及《慢性化脓性中耳炎》(北京军事科学技术出版社及人民军医出版社)、再版《实用冷冻疗法》和《现代医院英语会话》等24部。以及参编巨著《中国医学百科全书耳鼻咽喉科分册》、《耳鼻咽喉全书》(上海科学技术出版社)、《实用耳鼻咽喉科学》(山东科学技术出版社)、《性传播疾病》部分章节(辽宁科学技术出版社),尚有拟出版的《医用德语自学入门》。如今虽年逾八旬,身为首批共和国培育出来的人民耳鼻咽喉科医生,立志当年,学犹未尽,鞠躬奉献,携手共勉。

郭玉德

2012年3月于武汉

目 录

第一章 冷冻疗法及历史发展概况	(1)
第一节 有关冷冻医疗的简史	(1)
第二节 20 世纪前半期的冷冻外科	(2)
第三节 近代冷冻外科的发展	(2)
第四节 我国冷冻外科简述	(3)
第二章 超低温和机体	(5)
第一节 机体为什么可以结冻	(5)
第二节 冷冻的两极作用——破坏作用和保存作用	(5)
第三节 冷冻方法	(6)
第四节 冷冻破坏机制	(6)
第五节 冷冻后细胞损害的机理	(8)
第六节 冷冻保护剂作用	(8)
第七节 有关冷冻疗法的几个问题	(8)
一、物质或制冷物质	(8)
二、冷冻灶的产生	(9)
三、冷冻灶的温度测量	(10)
四、冻-融循环的重要性与实验观察结果	(12)
五、实验证明完全融解的重要性	(13)
六、制冷或降温效果	(14)
七、冷冻坏死及其修复经过	(16)
第三章 冷冻疗法的基础	(18)
第一节 冷冻引起的组织反应及其应用	(18)
第二节 冷冻坏死机制	(20)
第三节 冷冻坏死表现	(21)
第四节 冷冻坏死范围	(22)
第五节 冷冻坏死的修复经过	(22)
第六节 冷冻坏死的特征	(23)
第七节 冷冻后组织反应经过	(25)
第八节 影响冷冻坏死的因素	(25)
第四章 冷冻免疫现状概述	(27)
第一节 冷冻疗法与免疫现象	(27)
第二节 实验材料和方法	(28)
第三节 细胞冷冻致死的生物学特点	(28)
第四节 肿瘤的接触冷冻头	(29)
一、冷冻坏死所需温度	(30)
二、冷冻治疗中贫血化的效果	(30)

第五节 冷冻免疫问题的探究	(31)
第六节 自身免疫的概念	(32)
一、产生自身免疫的诸因素	(32)
二、非冷冻性组织破坏的抗体产生过程	(32)
三、有关冷冻免疫的文献复习	(33)
四、自身抗体增强	(33)
五、冷冻免疫反应中的各脏器的抗原性	(34)
六、冷冻自身抗体产生机制的实验研究	(34)
七、关于冷疗后自身免疫反应的一些问题	(34)
八、有关癌肿冷冻的免疫作用	(35)
九、冷冻癌细胞之抗原性实验研究和临床冷冻癌方法的选择	(35)
十、冷冻治癌的临床应用问题	(37)
十一、对冷冻免疫的当前认识	(38)
第五章 冷冻治疗器械	(39)
第一节 低温发生机制	(39)
一、制冷原理	(39)
二、制冷物质	(41)
第二节 各种变相制冷物质	(42)
一、液氮	(42)
二、二氧化碳	(44)
三、一氧化二氮	(44)
四、氟利昂(氯烷类)	(45)
第三节 冷冻治疗器	(45)
一、冷冻治疗器的种类	(45)
二、喷洒式冷疗器	(46)
三、配有冷冻头型的冷疗器	(53)
四、JT 效应冷疗器	(58)
第四节 附件及其他	(60)
一、公用可换冷冻头	(60)
二、保护器具	(61)
三、冷疗器性能试验	(61)
四、合理选择制冷物质	(62)
五、其他有关问题	(63)
第六章 冷疗操作方法	(65)
第一节 高压泵(瓶)和制冷容器的使用方法	(65)
第二节 冷冻器械的保管和消毒	(65)
一、器械的保管	(65)
二、器械的消毒	(65)
第三节 治疗前处理及麻醉	(66)
一、治疗前处理	(66)
二、麻醉	(66)

第四节 冷冻方法	(66)
一、接触法	(66)
二、刺入法	(67)
三、灌注法	(68)
四、喷洒法	(68)
五、喷灌法	(69)
第五节 冷冻时组织测温问题	(69)
第六节 恶性肿瘤冷冻时的注意事项	(70)
一、对液氮疗法的看法	(70)
二、对于良性肿瘤的治疗问题	(70)
第七节 反复冷冻和再治疗问题	(70)
一、反复冷冻	(70)
二、再治疗	(70)
第八节 其他问题	(70)
一、冷冻并发症	(70)
二、应用解体式液氮冷疗器的某些体会	(71)
三、正确估价冷疗地位	(74)
四、冷冻疗法的优点	(74)
第七章 皮肤科应用	(75)
第一节 历史的回顾	(75)
第二节 冷冻疗法的种类及其适应证	(75)
一、二氧化碳雪疗法	(75)
二、液氮疗法	(76)
三、液氮疗法的适应证	(77)
第三节 液氮疗法治疗皮肤癌	(78)
一、概述	(78)
二、治疗方法	(79)
三、典型病例	(80)
四、并发症	(82)
五、注意事项	(83)
六、小结	(83)
第四节 良性和恶性前期皮肤肿瘤的冷冻疗法	(84)
一、原位癌及癌前病变的冷冻疗法	(84)
二、病毒性疣赘	(85)
三、血管瘤	(87)
四、色素痣	(90)
五、其他	(92)
六、液氮冷冻疗法	(94)
附录	(109)
参考文献	(159)

第一章 冷冻疗法及历史发展概况

冷冻外科或冷冻疗法(Cryosurgery, Cryotherapy)是指利用 0℃ 以下的低温冷冻机体某部,并借冷冻破坏组织的作用,以达到治病目的的一种治疗方法。Cryo 一词,是引自希腊语,原为降冻冰的意思,自 1930 年以来大家都沿用 Cryosurgery 或 Cryotherapy (俄文 криотерапия 德文 kryochirurgie、法文 Frigothérapie、日文谏结手术)二词。

远在公元前,当医学尚未形成体系的时代已有低温和冷冻病的记载,但那时所谓的低温仍然较高,低温程度并不低,远不是 19 世纪末期所发现和应用的低温。由于受工业革命时期的影响,开始生产能降至 -180℃ 温度的液体空气(liquid air),从此才进入到冷冻疗法的初期阶段。真正利用超低温技术治疗各种疾病,并在治疗中取得一定成效的是始于 20 世纪前半期。由于 Cooper 及 Lee(1961 年)可控型液氮冷冻器的研制成功,为后来的冷冻医疗飞跃发展奠定了物质基础。自 1899 年起按冷冻的发展情况可略分三个不同阶段,特别是近十多年来发展之快、成绩之大、研究之广都是非常惊人的。

第一节 有关冷冻医疗的简史

在自然条件 0℃ 以下的低温可产生结冰的现象,但从 19 世纪末期人工制成液体空气以来,由于液空熔点低、降温快、使用方便、容易掌握,在临床治疗过程中,很容易使组织结冰,这是一大优点。

从前,关于冷冻医疗的记载,早在 Hippocrates(公元前 377 年)在 Aphorism(格言)中对此已有简单描述,并对组织受冻的过程作了些观察,认为冷冻有止血和镇痛两大作用。

嗣后,冷冻疗法形成体系是从 19 世纪末期开始的,当时用制冷方法使局部麻醉。

法国有位医师名叫 Larrey J D 的,他在战场上曾为伤病员做手术,他把受伤的肢体放在冰雪中作冷冻麻醉,待局部知觉失去后便行截肢术,术中伤员自感良好,几乎没有任何疼痛感觉,因而获得了用自然降温方法进行冷冻麻醉作截肢手术成功的经验。这也就是冷冻麻醉的开始。

1845 年 Arnot T J. 创制了冷盐冰水灌注器,刚冷盐冰水冷冻病灶,尔后 Oppenichowski 又改用乙醚治疗子宫颈癌,从而扩大了冷冻疗法的治病范围并在临床上得到广泛应用。

在人类社会发史中,应认为 19 世纪是自然科学全面发展的全盛时期,在其各个领域均取得了惊人的成就,如近代医学创始人 Pasteur L, Koch R 等,他们在研究微生物病原中首先发现了结核病原体——结核杆菌,他们的光辉业绩是举世周知的。与医学科学迅速发展的同时,物理学、工业的发展也是非常突出的并同医学的发展起到了相辅相成的作用。

著名物理学家 Joule. Thomson 关于物态特性的论文发表,明确了物质气态和液态相互转化的可变关系,从而创立了 Joule-Thomson 说。这为 1890 年以后液空投产以及冷冻医疗的发展奠定了物质基础,为临床应用 -100℃ 疗法(超低温疗法)开辟了新途径。特别到了 1890 年,由于 Von Linde K. 创制的液体空气商品化以来,为后来开展冷冻疗法提供了取之方便的冷源物质。

1899 年美国纽约市有名临床医师 White 是利用液体空气治疗的首创人,他以原始的棉签蘸洁法利喷洒法(Swab method and spray method)治疗各种疾病。White 试用液体空气进行局部麻醉的过程中,发现液空不仅有明显的止痛作用而且被切开的创面未见出血。接着他又用液体空气治疗了下腿溃疡,治疗的创面未见痂皮形成,且肉芽再生非常良好,因而他提出了治疗难治的溃疡的新疗法。后来他又以同法治疗了大量的其他各种疾病。这为冷冻外科揭开了序幕。

第二节 20 世纪前半期的冷冻外科

自 20 世纪初开始生产液体空气以来,相继又制成了液氧、液氮等制冷物质,这给临床应用带来了极大方便。而这个时期对此等液化气体的生产技术、运输、贮藏等一系列问题尚未解决,在某种程度上或多或少影响冷疗工作的开展。直至 20 世纪中期,临床上大多还沿用于冰或二氧化碳,而不能广泛应用液化气体。正因为这样,临床多应用于干冰治疗各种皮肤病。到 1918 年有位眼科名医 Scholer 用干冰治疗了视网膜剥离以来,继有也以同法进行了追试,报告冷冻晶体(白内障)摘除术的成功经验,至 1940 年 Weitzner 应用二氧化碳雪治疗宫颈糜烂取得显著疗效,从此又扩大了冷冻疗法的应用范围,由在皮肤科应用转向在眼科、妇科应用。

早在 1936 年 Fay 曾用冷冻疗法治疗复发癌。他在采用 $-10\sim-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的制冷灌注装置治疗 4 例复发子宫癌和乳癌的过程中,发现癌体变小、疼痛减轻,起到使病情缓解的作用。然而他还有一个设想,即拟对全身进行冷冻疗法。第二次世界大战后,全身低温麻醉得到了很大发展,对促进心脏外科、脑外科的普及和发展起到了积极作用。

应用上述液化气体尽管可获得近 $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温,但限于器械等客观原因,使用方法仍然停留于棉签蘸洁法和喷洒法,这对准确地掌握降温、客观地判断疗效、扩大适应证、普及推广冷冻外科是个很大障碍。

临床上开展冷冻外科速度缓慢,直接与冷冻生物学研究不足有关,特别与人工获得超低温技术是由 20 世纪开始掌握有关,而超低温对细胞、组织保存和损害机制的研究还不够透彻,某些重大问题有待进一步阐明。

Rowbotham(1959)研制一种冷冻装置,用干冰丙酮做冷源物质,治疗时用它使受冷输出管道内的 95%乙醇迅速减少,其管头可降温达 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下。他用此法摘除了 3 例不能手术的胶质瘤,术中发现出血极少,其中 1 例是在肿瘤冻结冰状态下摘除的,这为研制冷疗器提供了新线索。

第三节 近代冷冻外科的发展

自 1961 年 Cooper 首先应用液氮冷疗器以来,为冻疗法开创了新分野,这种冷疗器是由液氮贮藏装置、控温调压、计时、复温、输出管道、冷冻头、测温排气管道等许多部件组成,机器体积大,操作复杂,造价昂贵,至今仍不能大力普及。液氮输出经过的管道,容器外的一段由夹层真空绝热的波纹管组成,液氮在一定压力下流至管的尖端,借气化降温作用,可使受冻局部温度下降达 $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右。他用此装置治疗了 100 例帕金森综合征,通过冷冻破坏丘脑部分,发现 90%的病例均获使震颤和强直症状明显改善,且未见有一例不良后遗症。

Cooper 冷疗器问世以后,对皮肤科、眼科等临床各科扩大冷疗适应证起到了积极推动

作用。

除此之外,还有一氧化二氮、二氧化碳、氟利昂(氯烷类-Freon)等之高压气体唧筒直接连以硅胶管,借 Joule-Thomson 反应原理,使喷出的管嘴接触组织局部达到降温,这样也可进行许多疾病的治疗,同样也受到临床各家的重视。

从古至今大家所关心的是恶性肿瘤的治疗问题,目前看来,综合疗法中除了手术切除、激光和放疗外,就算是超低温技术的应用了。它们之间各有特色,不能互相代替,尤其是冷冻疗法更具积极的治疗效果,是激光炭化和放疗杀癌作用所不及的。超低温冷冻对复发癌、不宜手术的癌肿病例的姑息疗效是令人满意的。

临床实践表明,冷冻不仅可以破坏患病组织且有由此而产生的自身免疫作用;有学者报道,冷冻治疗前列腺癌的同时治愈了肺部远处转移癌灶,因而提出了冷冻癌肿同时可形成特异抗体的说法。

第四节 我国冷冻外科简述

富有悠久文化历史的我们伟大的祖国,如今之所以像东方巨人一样能够健壮地生存在地球上,这主要有赖于我们的祖先在与自然的搏斗中,用自己的智慧战胜千变万化的恶劣环境的结果,并在与各种疾病作斗争中也积累了丰富的经验。我国古代即有冷腌法的原始记述。东汉张仲景著《伤寒杂病论》中文蛤散证治条,即以文蛤散治疗误用冷水喷淋烧酒而引起的变证……又如明朝李时珍所著《本草纲目》中“……伤寒阳毒,热感昏迷者,以冰一块置于中脘,亦解烧酒毒……”再如《溪外治方选》(卷下,痔门篇),取冷水治疗痔疮等,这些文献记述说明了我国的冷冻疗法开始的年代。

我国开展低温冷疗工作的时间还不太长,20 世纪 60 年代初已开始近代低温疗法的应用,1965 年上海新华医院首先报道冷冻摘除白内障;1972 年又报道了氧气节流冷冻疗法;1973 年江西医学院附一院制成笔式气冷式冷冻器应用于眼科临床。同年沪、杭等地研制成 S-107 型手持和 N-101 型软管式液氮电控密闭治疗机。1974 年广州市第二医院麦加秉研制成简便液氮低温治疗器。同期湖北医学院郭玉德教授也研制成功一种单手操作解体式液氮冷疗器,此器具十大优点,可供门诊及病房广泛应用。1975 年上海手术器械厂制成 YDZ-3 型液氮治疗机和安徽某厂制成 SDWQ75-2 型深低温治疗机,这对我国在开展超低温外科方面创造了极为有利的条件。

1978 年,在杭州召开了首届全国冷冻医疗器械和临床经验学术交流会,会上收到有关这方面的论文 180 多篇,大会宣读交流的近百篇,内容丰富多彩,不仅展出了我国自制的各种类型液氮治疗器,而且也进行了实物应用表演,湖南医学院附属第一医院、山东淄博多家厂商相继制成多用途液氮治疗机。讨论的题目中不仅包括低温贮存和低温生物学特点以及低温治疗机研制等一系列问题,而且也涉及外科、肿瘤科、皮肤科、妇科、耳鼻咽喉科、眼科、口腔科等基础理论和临床应用方面的许多问题。与会者就上述各问题进行了广泛交流,这对于以后的冷冻外科科研和临床应用起到了很重要的推动作用。

继首次杭州召集的全国性国内冷冻医疗和器械研究专业会议后,又于 20 世纪 80 年代在北京、唐山、西安、深圳、青岛及武汉等地分别组织召开了国内四届和国际性经验交流大会,历届会议都充分展示了各家在从事冷冻医疗和低温生物学方面所取得的可喜成就,同时也显示出我国从业人员所做的贡献,从各家所报道的研究和观察结果来看,冷冻疗法或冷冻外科,已

成为广大病员所乐于接受并深受欢迎的一种新疗法、新技术,与激光、微波、射频和超声疗法相比具有安全、简便、经济、节约及疗效突出等一系列优点。

湖北省人民医院冷疗室自 20 世纪 70 年代中期创建以来,先后接待来院进修、参观学习的达 136 个单位或个人,遍及全国 26 个省市,因本人所研制的便携式液氮冷疗器小巧玲珑,易拆装,易掌握,多用途,可随身携带,它不仅在国内得到广泛应用,在 1979—1981 和 1984—1986 年随同笔者两次参加援阿尔及利亚医疗队在阿首先开展并推广冷冻疗法,4 年期间,每周 1 次的冷冻门诊共治疗了 4400 多例,深得受援国的重视和赞许,病例来源涉及地中海邻近许多国家,而在国内仅以曾来我院进修学习过的宜昌地区卫校五官科主任统计资料(25 年)表明,已治疗了 18 万多病例,为当地群众方便就医、少花钱、能治病做出了巨大贡献。为了推广这一新技术、新疗法,除在本省组织了 4 次学术交流和培训学习班外,同期在抚顺、本溪、青岛崂山、江苏如皋和近年在山西运城、北京协和以及儿童医院(2003 年)等也进行了专题讲座和演示。本书中所用的各种彩色照片,都是在此期间从国内外临床实践中所采集的实例照片,笔者认为通过这些典型照片将会对促进发展、深入探讨研究冷冻疗法方面起到积极作用。

第二章 超低温和机体

第一节 机体为什么可以结冻

这个问题的回答比较简单,不论植物或动物,其生物特征虽然各不相同,但正常的有机体组成成分大致接近,可以说大部分是水分,占其重量的70%~80%,可见含有这么多水的细胞或组织,当其受冷降温时,液态的水很快就变成固态的冰,这纯属物理现象。在结冻过程中,除水分之外,还有蛋白质、脂质、糖类等生命组成成分也随之改变。简单地说,这些变化就是提供冷冻外科治疗机制的理论基础。水成冰必须降温在0℃以下,为了维持冰晶继续形成和扩大,则必须持续降温并使之更低于0℃才行,这样才不至于使冰和水共存状态的局面得以存在。与此同时水中所含之溶质浓度对于冰点也有很大影响,对于组成复杂的机体组织和细胞成分,各自的敏感度殊非一致,出入悬殊,尚余许多问题有待详加研究。血管、结缔组织、神经、腺上皮、骨质等各类组织对冷冻敏感度各不相同。受冻组织开始结冰过程中呈冰和水混合状态,随着温度继续下降而冰晶固体成分逐渐增多,以致最后完全变成冰球,我们把这种由液态变成固态的临界温度叫做共融点(共晶点),掌握共融点对我们进行临床工作有其重要意义。盐水溶液的共融点是一21.3℃,而对含有其他多种成分的机体组织和细胞而言,尚需进一步了解他们各自的共融点。

无论溶液或机体,在冷冻过程中,所处外在条件极为重要,其与降温速度和降温深度直接相关,缓慢降温使水游离渐成冰块,快速降温则不等水分游离而自然形成冰块,可见结果不一,表现各异。快速冷冻时可见完整的六角冰晶乃至不全的六角冰晶形成。结冻到极点时则可显示冰晶化作用(vitrification),一般使受冻组织不容易达到这种冷冻程度。如果能冻透获得这种呈冰晶化(vitrify)状态的结果,才是最为理想的境地,也是技术上难以达到的。这种冷冻条件和冷冻状态间的密切关系,以后结合具体病例加以说明。

第二节 冷冻的两极作用——破坏作用和保存作用

生物体制冷冻后,虽然外观状态相同,但由此引起的内在变化却完全相反,既有破坏作用,又有保存作用。医学生物界,就是利用这种截然分明的两极作用来治疗疾病和贮藏生物。某些组织经细胞冷冻后由于其自身特有的耐受性,一部分遭制冷破坏,而另一部分却可以保留着活力而幸存。如果继续降温以致达到完全破坏的程度,不言而喻,这种冷冻坏死的机制,就成了冷冻疗法的基础理论之一。

为了防止冷冻破坏作用,科学家们进行了大量研究工作,发现甘油等物质可作为保护剂而被广泛应用。相对地说,受冻组织在保护剂作用下,可使其生物活性得以长期维持,机体代谢等生命基本活动过程虽可保持,而其变化速度大大减慢,机能减退而生化反应中间产物聚积,能量代谢过程几乎停滞,这样才能使得处于低温状态下的生命组织和细胞获得长期存在。这种冷冻死活两极分明的作用,一方面使受冻组织细胞遭到坏死覆灭,另一方面又可使耐寒性强

的组织细胞可在低度消耗能量代谢状态下得以保存生命,这种结果不同,目的各异,显然给各自带来了一系列问题,必须进行深入研究。

冷冻疗法的目的一方面是破坏患病的组织和细胞,必须使之冻成冰晶,进而导致理化反应障碍;另一方面是减少冷冻破坏作用,使之成为冰晶化相近状态,只受冻一次即达到生物贮存的目的。至于生物贮藏的低温温度到底多少为宜,目前还没有完整的资料报道。

第三节 冷冻方法

降温速度和冷冻温度是制冷过程中两项基本条件,降温速度与受冻组织的形状、大小、性质、制冷物质的种类、温度以及操作等一系列因素直接相关,降温速度可通过控制调节快慢,一般以单位时间来计量其降温速度,即以每分钟或每秒钟所降低的温度计量之。为了使降温速度保持不变,必须有一种特殊装置。通常是利用增加冷源质量的方法以达到迅速降温,而急速降温是件不容易掌握的技术,设计时必须考虑到制冷物质安全无害、燃点低、易得、不传热、用量少等特点。目前供临床使用可达超低温速度的制冷物质或冷源物质有 Freon 12、Freon 22、液空和液氮(liquid nitrogen)等,可保持 -150°C 以下,这些制冷物质是符合上面所提出的要求的。尤其是液氮与受冻组织直接接触时,立即沸腾蒸发并且传热差,很容易达到快速降温的要求。用于一般疾病治疗的冷源物质,达到 -20°C ~ -80°C 已足够。如像 CO_2 雪或干冰和氧化氮(N_2O)等。而我们所谈论的课题不是牵涉到大面积的冷冻贮存问题,其重点是小面积病损部位的局部治疗问题,围绕这个中心来研究冷冻器的改进、适应证的选择、制冷物质的筛选、快速降温的调控、冷冻范围和深度的正确应用以及疗效高而操作简便的方法。

第四节 冷冻破坏机制

为了了解机体细胞对冷冻融解前后的复杂变化过程,日本龟谷等曾用红细胞悬浮液做实验,借以观察红细胞冷冻后的变化情况,特别是观察细胞内有无冰晶形成,而没有像其他细胞内组成成分干扰那样,得以观察变化经过的详情,并且通过形态和功能变化的对比来判断其功能损害的程度,一般从溶血现象可容易辨出。龟谷用人的全血生理盐水悬浮液,根据细胞对制冷条件的敏感度各异,将此液置于 0°C 以下低温冰箱中保存,同时进行振荡,以便于观察出现在溶液中的周围冰晶,冰晶的形成使溶液浓缩,在此溶液中幸存的细胞与冰晶密集相嵌,也就是在这种状态下细胞内外之间渗透压发生了明显的变化。为了迅速调整压差的继续发展,细胞内的水分势必向外大量透出,结果红细胞产生皱缩现象。

随着温度继续下降,细胞更加皱缩,一般在 -20°C 时已达极限,几乎全部细胞内水分已完全结冻,在此温度以下再也不会引起其他改变。

缓慢降温冷冻时引起的细胞形态变化,与快速降温所致之开始于细胞内结冰现象相反,是先在细胞外形成冰晶(ice crystal),这冰晶与降温速度有直接比例关系。这种体小、单独存在的小冰晶颗粒,随着继续降温冷冻的同时,可见细胞内外冰晶形成。然而如向标本加入保护剂甘油时,则可使形成的冰晶颗粒变小,且有 $20\%\sim 30\%$ 细胞内不见冰晶形成。结成的冰晶形状不规则,称不定形冰(amorphous ice)或冰晶化状态,而定形的冰晶可使细胞固体化,以致停止活动能力。

形态改变与功能是息息相关的,降温快破坏重,添加保护剂虽起部分缓解作用,但不能根

本解决问题。实际上细胞也好,组织也罢,由于构造各异,故对低温的耐受性或敏感性也很不相同。欲求冰晶化或透明化,必须分别深究其理,这是一件相当不容易的事。

以上通过冷冻对红细胞形态的全面观察,可以得出以下结论:缓慢降温所致之细胞外结冰,使之脱水皱缩,反之,快速降温可引起细胞内冰晶形成。然而对其他细胞影响如何,并不能由此得出一致结论。本组实验结果只供说明参考,还不能全面反映出活体内冷冻后的复杂变化过程。冻后融解的细胞活性如何?有待后述。

但是,我们应该知道,组成机体的各组织和细胞并非单独游离存在,而是密切相关,对于实际降温速度快慢的反应,显然是不能单纯以离体标本实验结果来解释的。大块组织受冻时,首先可见冻区周围温度下降。然后继续向中心内部传递,以致内外温度相平衡,先在外边出现冰晶,然后逐渐向内移,降温慢,可见内外两处出现同样大小冰块,稍增大降温速度,则可引起内部结冰大和外部结冰小的不同现象。

许多学者通过离体的动物肉类(如鱼肉)进行冷冻实验观察,这样要比在活体身上进行实验观察容易得多。如像 Whittaker OK 用 1.5 mm 直径的冷冻头以 -70°C 直接冷冻仓鼠(Hamster)舌部黏膜,冻后连同周围健康组织一起切下进行普通光镜和电镜检查。组织标本用冷冻干燥法(使之处于 -60°C 冷冻干燥状态)、冷冻交换法[向戊二醛(glutaraldehyde)里加入饿酸(osmic acid)、乙二醇(ethylene glycol)、或者丙酮(acetone)、乙醇(ethanol)以及甲基赛璐珞(methylcelor)等置换剂,以使之保持 -70°C 12 天]以及冷冻破裂法(将切取之实验标本用液氮冷冻,然后在冷冻状态下切割碎片,并行干燥处理进行电镜观察)等三种方法处理。用前二法进行切片,用后一种方法进行标本切面观察,结果发现冻成冰球的组织块内有冰晶形成,其位于周围部冰晶体大而有空隙出现,似如网状结构。一般而言,细胞核内形成之冰晶较胞浆里所见之冰晶粒大,然而未能查出细胞核和胞浆中所含之水分数量。

为了查明细胞冻后引起的一系列障碍或破坏,通过细胞标本特制方法,用电镜进行较详细的观察,而在冷冻状态下引起的细胞功能障碍变化,似不能以任何方式加以观察,而只有依靠冻后融解状态观察其一部分变化。如像游离之红细胞悬浮液,冻后是否可引起溶血现象(hemolysis),向来就是临床各家争论的焦点,冻后之红细胞镜下检查时可见呈条纹状结晶化表现。另在冷冻状态下测定血红蛋白量是很难办到的,只有待其融解后取其标本液进行离心,借以测知上清液中所含血红蛋白量,由此再推测溶血,一般的红细胞和其他一些细胞的机能损害,也只有通过融解后对标本进行的测定办法来了解。

在观察降温速度与融解后溶血之间关系的实验中得知,不论降温速度快慢与否,其所致溶血现象均达 100%。当向标本添加甘油保护剂时,在开始降温时表现有保护作用。随着降温加大,末后则完全失去保护作用,此与保护剂浓度有一定关系。浓度为 80% 的甘油有阻止溶血现象发生的作用,因而起到一定的保护作用。

类似游离状态的红细胞一样,其他细胞对保护剂也有同样反应,降温速度对其影响不大,主要是冻融前后损害极大,即融解后细胞生存率显出山形曲线,冻后最高生存率因细胞种类不同而异,其产生差异的基本原因直接与细胞膜构造特点(特别是水的通透性各不相同)有关。

通过对肝、肾细胞形态的电镜观察指出,冻融后的两种细胞胞浆中的线粒体均显膨胀肿大,胞浆基质含量减少,颗粒消失,细胞基质消失,胞膜变形。在细胞机能观察方面,通过测定细胞各种呼吸酶含量得知,该酶类活性减低和活性物质大量游离。

在进行冷冻治疗过程中,冷冻受损部分仅限于机体的病灶部分。冻后所出现的变化过程,是末梢血管先收缩继而扩张麻痹,最后导致血液成分渗出血管外。在这方面已有较详细的观

察研究。

第五节 冷冻后细胞损害的机理

从上面所做的关于红细胞冷冻时和溶解后一系列的变化中,可以得到某些启示。Levelock 曾提出盐类受损学说(Salt injury theory),指出在 -15°C 已产生结冻,融解后红细胞的溶血程度几乎与降温 and 溶液含盐浓度是一致的,由于盐类浓缩作用而使红细胞放出大量磷脂物质,冷冻的结果致使组成细胞膜成分的脂蛋白分解,这就是细胞冷冻破坏的主要原因。然而由盐类浓缩引起的红细胞溶血现象,很可能是因糖类紊乱作用的结果,Meryman 特别提出最小容积学说(Minimum volume theory)以说明该现象。他称:处于高渗液中的细胞皱缩是有其一定限度的,如果超出它,就会引起细胞膜破坏。相反,也有不同意这种说法的,指出在冻融后所游离出来的磷脂含量,并不与盐类浓度呈平行关系,完全用盐类平衡障碍来说明冷冻破坏机制是不能完全被人们接受的,尤其在缓慢降温条件下,受冻变形的红细胞聚积相依而非被困在盐类浓缩的环境中,应该看成是一种机械的损害。

另一方面,当急速降温时在细胞内、外两侧均同时出现冰晶颗粒,两细胞内冰晶可直接起机械性破坏作用,从细胞内组成成分的超微结构来看,与冰晶形成的同时还有该成分受其影响所致之一系列变化,是理所当然的事实。

但是,也有持与细胞内冰晶机械性破坏作用相反论点者,他们以红细胞融后胞内微细结构变化观察结果为理由,红细胞内成分与其他细胞的不一致,则主张细胞膜受损学说。实际上通过观察各种条件下之细胞冷冻形态变化可知,细胞内冰晶形成所致细胞形态变化远远没有细胞膜形态变化显得突出,特别是由于胞膜变形、皱缩和变粗糙等所形成的空隙,均是在降温后细胞膜直接出现的反应,是引起红细胞溶血的根本原因。

第六节 冷冻保护剂作用

据 Levelock 解释,甘油所起的保护作用,是由于甘油在溶液中颇似防护墙,对于盐类浓缩起着缓冲作用。高浓度的甘油可阻止细胞内冰晶形成和细胞膜变性,借甘油自身的理化性质,它可作为血红蛋白和细胞膜组成成分的一种相互作用物质而缓解冷冻损害作用。另外,在急速降温过程中,由于添加糖类的高分子物质,可起到降低细胞膜透性作用,从而收到保护效果,甘油就好像细胞膜外一层保护胶一样起到防冻作用。

第七节 有关冷冻疗法的几个问题

一、物质或制冷物质

关于皮下零温度对机体作用的生物学,首先涉及的是冷源物质在产生结冻温度中同机体生物学系统的相互关系问题。这种冷源物质降温是由机体活组织或细胞完成的,而从周围组织中吸热降温是很重要的。这种温度变化首先取决于受冻组织的特点和其含水量多寡以及血管供血状态。另一方面与所用的冷冻装置种类和冷源物质关系同样也是很重要的因素。冷源物质的沸点越低,其冷冻的深度和广度也越大。例如氟利昂 12 的沸点为 -29.8°C ,则不能用

于治疗皮肤恶性肿瘤,但行冰冻向内障摘除术比较适用。而液氮的沸点为 -195°C ,它不仅适用于冷冻良性肿瘤,而且更可供口腔、皮肤、骨科等用于治疗恶性肿瘤。

二、冷冻灶的产生

现代所用的冷源物质可任意冷冻成大小各异的冷冻灶。然而,冷冻速度、冷冻容量、冷冻深度等以及皮肤、新生物所产生的零下温度,与选用的冷源物质及其沸点不同而表现各异。现代提倡用液态氮做冷源物质。

冷冻灶的产生直接与冷冻刀头利器大小有关(图 2-1)。如果所用的冷疗器是开放型的,最好选用可调换的塑料喷嘴进行冷冻喷洒。冷冻的时间、传热力、细胞成分、渗透压以及冷冻组织的血管供应状态都将决定着冷冻灶的大小(图 2-2)。冷冻速度与冷冻坏死的深度和降温程度有着极为密切的关系。冷冻速度越快,其受冻组织破坏的深度也越大。在制冷过程中所产生的吸热作用,即使水变成冰,是与融解涵热直接相关的。通过水变成冰的现象,可测出每克水产生 80cal 的等价热。

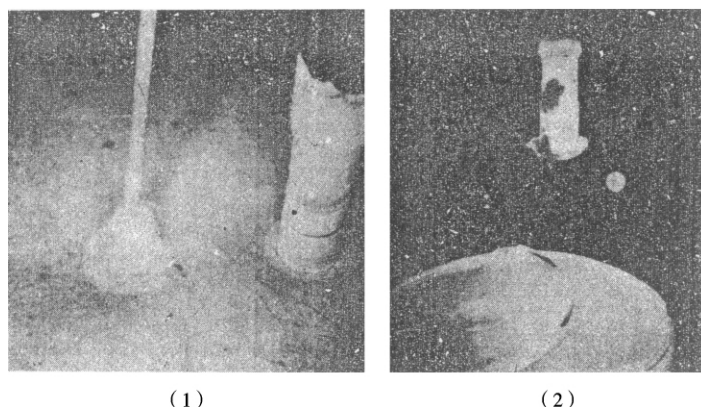


图 2-1 (1) 示冷冻灶深度和范围,其与制冷物质和冷冻头种类有关。

接触法用的冷冻头比棉签法的降温要好些

(2) 示冷冻明胶豚所形成的冰球外观

(仿 S. Zacarian, 1969)

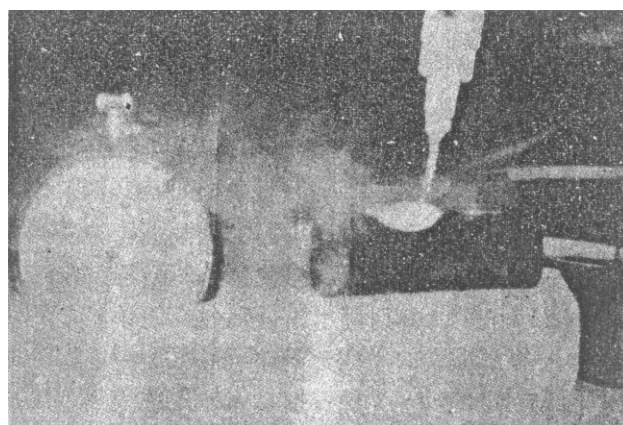


图 2-2 液氮喷洒 30 秒钟,明胶豚形成的冰球状态