

程竑主编

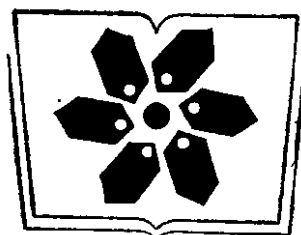
医德知识 百问

中国医药科

社

R318.52

H22

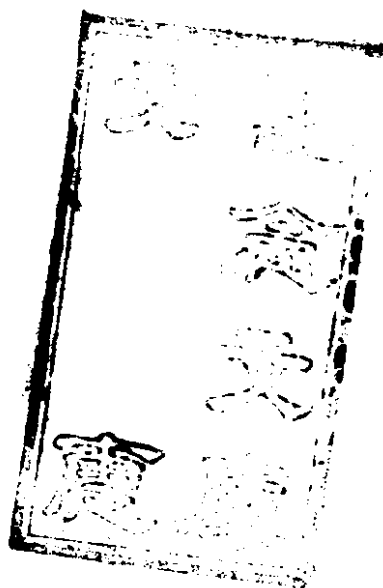
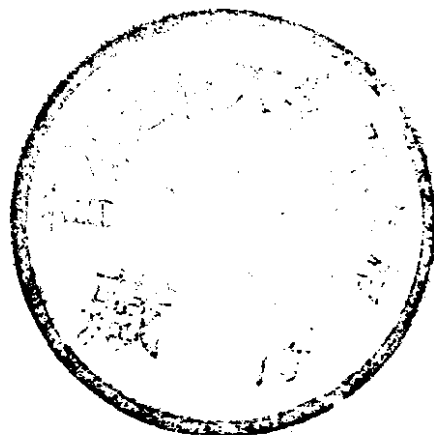


中国科学院科学出版基金资助出版

318.52

低温生物医学技术

华泽钊 任禾盛 著



科学出版社

1994



A0278182

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

低温生物医学技术是低温技术与生物学、医学相结合的新兴交叉学科。随着科学技术的发展,它将成为人们日益关注的热门学科。

本书是有关这一学科的专著,它较为全面地介绍了该学科的主要内容,包括动植物和人体的细胞、组织、器官的低温保存,电子显微镜生物样品的低温制备技术以及低温外科等问题,也包括溶液冷却时的晶态相变和非晶态固化、低温生物学的仪器设备等,同时还简要地介绍了抗冻蛋白和有关整个人体低温储存的活动及对其的批判。本书内容新、跨度大,并强调了低温制冷技术、工程热物理与生物学、医学的有机结合。它既总结了国内外学者及著者近年来的研究成果,又阐述了该学科的发展历史及未来的研究方向。书中附有大量的参考文献,以便读者博览。

本书可供对该学科感兴趣的生物界、医学界和工程界人士阅读,也可作为相应专业的本科生、研究生的教材或参考书。

低温生物医学技术

华泽钊 任禾盛 著

责任编辑 陈文芳

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1994 年 9 月第 一 版 开本:850×1168 1/32

1994 年 9 月第一次印刷 印张:13 1/4 插页:2

印数:1—1 300 字数:346 000

ISBN 7-03-004234-4/Q·522

定价:24.80 元

序*

当代科学技术的迅猛发展，使科学与技术的传统界限逐渐显得模糊不清，各相邻学科出现相互交叉与重新组合。低温生物医学技术正是借助进展中的特殊技术实现生物（包括人体器官和活体细胞组织与胚胎等）在低温下的存活，以利于生物学和医学上的培育、移植和治疗。自然，在低温外科中现已普遍使用“冷刀”等低温医疗工具。所有这些，在本质上，是研究生命现象受环境温度干扰的相互作用，在低温下压抑新陈代谢过程的生化反应速率，从而延长可保存的时间；但在降温和复温时，组织有耐变适应的问题，要防止冰晶化对活组织的破坏作用。这又是涉及细胞水平的溶液冻融热物理问题。

华泽钊教授 60 年代初毕业于清华大学工程热物理六年制本科和完成了三年制正规研究生学习，有深厚的热物理基础。他长期从事低温工程的教学与科研工作，1981 至 1983 年作为访问学者在美国麻省理工学院开始进行低温生物医学技术的研究；此后在上海机械学院（现改名为华东工业大学）创建了独具特色的低温生物工程研究室，研制并完善了生物样品大型低温显微镜等成套研究装备，并完成了多种细胞的低温保存的研究项目；连续培养了多届研究生并授予了博士学位。1991 至 1992 年他应邀赴美在纽约州立大学低温生物研究中心工作，并兼任美国低温医学科学公司顾问，回国后和合作者任禾盛副教授一起，将所积 10 多年的研究成果和对国际同行研究动态的心得，用系统的笔触，汇集成本书书稿，由科学出版社出版，以介绍低温生物医学技术的新进

* 本文作者王补宣系中国科学院院士、清华大学教授。

展、尚存问题及其展望。这是在我国首次撰写的专著,内容丰富,有独到的见解,有利于推动我国在此新兴技术领域作出更多的贡献。值全稿即将付印之际,谨为之作序,推荐介绍,以飨读者。

王 补 宣

1994年2月

于北京清华园

前 言

近 40 年来,人体的一些重要细胞组织低温保存和移植的逐步成功,低温技术在治疗肿瘤等方面的应用,动植物细胞、胚胎组织低温保存的发展,已经给医学、生物、农业、畜牧业等带来了巨大的效益,并使低温生物学、低温医学成为颇受人们关注的新兴交叉学科。

在此过程中,工程学的参与与结合对低温生物医学的发展起着极重要的作用。从 70 年代起,工程学者开始介入此领域,他们着重研究温度降低造成溶液固化的过程;探索在冷却固化和复温融化过程中的各种物理化学过程对细胞可能产生的损伤;探索使细胞组织能实现低温保存的途径和热控制的方法;发展了相应的理论、技术和仪器设备。人们将这种研究低温生物医学的方法、技术和成果称为低温生物医学技术。但是迄今为止,国内外还未见到系统、全面地论述有关低温生物医学技术的较为理想的书籍。

我们是从 1982 年开始从事低温生物医学技术研究的。虽然发表了一些论文,也曾编写过一些材料,但总觉得若能有一本较全面介绍这一学科的书籍,对于研究和教学是颇有益处的。编著此书的愿望得以实现,应当十分感谢科学出版社陈文芳副编审,经她推荐,我们向中国科学院科学出版基金专家委员会提出申请,并于 1992 年获得科学出版基金的资助。

本书的宗旨是用工程学和生物、医学相结合的观点,论述低温生物医学技术这门新生的交叉分支学科的方法、特点、成果及发展方向。本书的第一章在介绍低温生物学、低温医学的重要意义和研究热点后,论述了低温生物医学技术的兴起和特点。第二、三章是关于溶液降温固化过程(包括晶态和非晶态固化的各种形式)的理论。第二章主要研究低浓度溶液慢速冷却时发生晶态固化的过

程及其对细胞可能产生的损伤及防止方法；晶态冻结过程的数理模型；三元相图的应用等。第三章则研究高浓度溶液快速冷却时发生的非晶态固化(玻璃化)过程；在冷却时产生玻璃化和复温时防止反玻璃化(非晶态向晶态的转变)的趋势；生物材料玻璃化低温保存的方法。第四章既介绍了生物材料低温保存的一般技术，又较具体地讨论了一些细胞组织的保存技术。其中有人体的，也有动植物的一些细胞组织。这章把重点放在关键技术的讨论上，而不求全求详。第五章介绍低温技术在电子显微镜生物样品制备中的应用。在现代的生物样品制备方法中，低温固定是第一也是最关键的步骤，其目的是让样品以接近玻璃态的形式固化。此章研究了生物样品被高速弹射进入低温液体的传热过程及其对低温固定效果的影响，并介绍了相应技术和设备。第六章介绍了低温生物医学技术研究中的应用中的一些重要的仪器设备，包括程序控制降温仪、低温生物显微镜和差示扫描量热仪。本章不但介绍了它们的发展、特点和主要技术关键，而且讨论了它们在低温生物学中的应用。第七章是低温外科手术中的工程问题，既介绍液氮低温器械，又研究了低温外科手术中遇到的若干问题。包括新型低温手术器械的设计、制造、检测的关键问题，也包括生物传热方程和在低温外科中如何保护正常组织的问题。本书还有两个附录。抗冻蛋白最初是在耐寒的昆虫、极地鱼类中发现的，是一种具有以非依数性方式迟滞水溶液冰点、而不影响其熔点这一特殊功能的蛋白，它能抑制冰晶的生长。附录1介绍了抗冻蛋白的特性、分类及发展现状。长期以来，时而有关于整个人体经长期低温后仍存活的传闻。附录2介绍了在美国等地确有人贸然将整个人体置于液氮中冷冻，但无一成功的一些活动情况。指出这些活动非但不可能成功，而且被许多著名学者认为是反科学的。本书各章和附录的后面均附有大量的参考文献，既包括国内外的主要成果，也包括我们自己的研究工作。这样做的目的，一则是为了做到有据可查；另一则也是为有兴趣钻研的读者提供方便。

综上所述，本书既包含了当前低温生物学、低温医学方面的主要

要内容,可供生物、医学界人士参考使用;又较详细地介绍了热物理、低温技术与生物医学相结合的方法及取得的成果,可供工程界人士,特别是制冷低温工程专业、热物理专业的教师、研究生和高年级学生使用。

本书的许多内容来自我们 10 年的研究成果。先后参加这些研究工作的有邬申义、陈儿同等 20 余人,他们的工作在本书正文和参考文献中均有反映。本书各部分的执笔者分别为华泽钊(第一、二、七章)、任禾盛(第三章)、韩润虎(第四章)、俞国新(第五章)、袁曙明(第六章)、唐伟(附录 1)、王奇凤(附录 2)。由华泽钊、任禾盛修改定稿。参加本书打印、绘图等工作的主要有王奇凤、韩润虎、刘宝林,还有鲍丽丽、夏建玲等。

这里需要特别指出的是,我们的研究工作从一开始就得到国家自然科学基金委员会的支持,材料与工程学部和生命科学部为我们的多项研究课题提供了经费。我们要感谢基金委对于低温生物医学技术这门交叉学科的重视和远见卓识。

本书承中国科学院院士、清华大学王补宣教授作序。本书的编写得到了国内许多同仁的支持,他们寄来了许多研究论文。我国旅美常兆华博士、唐伟博士以及 Baust 教授、McGrath 教授等均给予帮助,在此一并致谢。

由于低温生物医学技术是一门正在迅速发展的学科,书中某些内容的叙述和取材难免会有谬误或不当,我们真诚地欢迎各界人士批评指正。

华泽钊 任禾盛

1993 年 12 月

于华东工业大学(上海)

目 录

第一章 低温生物学、低温医学和低温生物医学技术	1
§ 1-1 低温生物学与低温医学的定义和范畴	1
§ 1-2 低温生物医学的重要意义	2
§ 1-3 低温生物医学的学术活动和当前的研究热点 ...	9
§ 1-4 低温生物医学技术的兴起和特点	15
参考文献.....	18
第二章 溶液的冻结特性与细胞的损伤	20
§ 2-1 纯水的冻结特性	20
§ 2-2 二元溶液的冻结特性	25
§ 2-3 被冻结组织融化过程的特点	31
§ 2-4 在冻结和融化过程中的渗透现象	32
§ 2-5 细胞低温损伤的机理分析	36
§ 2-6 溶液冻结过程的数理模型及其分析应用	43
§ 2-7 三元系统的相图及其应用	53
§ 2-8 关于“两步法”低温保存机理的探讨	63
参考文献.....	67
第三章 水溶液的结晶和玻璃化	70
§ 3-1 玻璃化方法的发展简史	71
§ 3-2 玻璃化转变的一般概念	73
§ 3-3 水和水溶液的结晶	79
§ 3-4 水和水溶液的非平衡性质	101
§ 3-5 生物材料的玻璃化低温保存	113
§ 3-6 玻璃形成的动力学研究	124
§ 3-7 反玻璃化问题	136
参考文献.....	145

第四章 生物体低温保存技术及其应用	149
§ 4-1 生物体低温保存的一般技术	149
§ 4-2 血细胞的低温保存	156
§ 4-3 人体精子的低温保存	162
§ 4-4 卵子和胚胎的低温保存	166
§ 4-5 角膜的低温保存	175
§ 4-6 皮肤的低温保存	180
§ 4-7 胰岛和胰腺组织的低温保存	190
§ 4-8 肾脏的降温保存	194
§ 4-9 果蝇胚胎的低温保存	201
§ 4-10 作物种质资源的冷库保存与低温保存	211
参考文献.....	224
第五章 低温技术在电子显微镜生物样品制备中的应用	231
§ 5-1 低温电子显微术概述	231
§ 5-2 低温固定的技术要求、方法及设备	241
§ 5-3 样品在预冷过程中的传热分析与实验研究	252
§ 5-4 样品在冷却剂中的传热研究	260
参考文献.....	272
第六章 低温生物医学技术的仪器和设备	276
§ 6-1 降温仪及其应用	276
§ 6-2 低温生物显微镜	291
§ 6-3 低温生物显微镜的发展和应用	304
§ 6-4 热分析技术	306
§ 6-5 热分析技术在低温生物学中的应用	317
参考文献.....	320
第七章 低温外科中的一些工程问题	325
§ 7-1 低温外科及其器械	325
§ 7-2 低温外科的医学机理	330
§ 7-3 液氮和低温工程材料的性质	335
§ 7-4 液氮容器中的非平衡现象	345

§ 7-5	形成高压过冷液氮流的几种方法	352
§ 7-6	水、冰和人体组织的热物性	357
§ 7-7	生物传热方程和组织冻结过程的传热方程	363
§ 7-8	低温手术器械性能的检测方法——在水槽中低 温探头性能的研究	371
§ 7-9	低温冷刀中的两相流阻力与阻塞流	379
§ 7-10	正常组织的保护问题	384
	参考文献	391
附录 1	关于抗冻蛋白的研究	394
附录 2	关于尸体冻存的活动及对其的批判	405
索引	410

第一章 低温生物学、低温医学 和低温生物医学技术

§1-1 低温生物学与低温医学的定义和范畴

低温生物学和低温医学的英文名称分别是 Cryobiology 和 Cryomedicine。它们的前缀 Cryo-来源于希腊字 Kryos, 是“冷或霜”的意思。在工程上,低温 (Cryo) 通常是指比 -120°C 更低的温度范围。而在生物和医学中,低温所指的范围却要宽得多,可以从稍低于正常体温(37°C)直至低于 -196°C 。例如,低体温医疗的温度是略低于 37°C ; 动植物耐寒性研究温度范围是 0°C 上下; 而生物体低温保存、肿瘤低温割除术中使用的低温探头温度可低至 -196°C 。

我们可以在一些资料上见到关于低温生物学的某些定义或说明。1988年美国 Simon & Schuster, Inc. 出版的《韦氏新世界词典》(“Webster's New World Dictionary”)把低温生物学定义为: 研究在低温下生物体(特别是热血动物)的科学。1983年由上海辞书出版社出版,冯德培、谈家桢、王鸣岐主编的《简明生物学辞典》对低温生物学作了如下的说明: 低温生物学 (Cryobiology, Low temperature biology) 是生物科学的一门分科。它与在常温下进行的研究不同,是研究在 0°C 以下或接近 0°C 的低温下生命现象的科学。过去,低温生物主要研究植物的冻害以及细菌和昆虫的耐性。20世纪以来,进入细胞水平的研究,开始对生物和作为食品原料的生物材料进行低温处理,并广泛运用于家畜精子的储存和血细胞的处理等方面。目前,低温生物学在两方面发展最快,一是对自然状态下的生物耐寒性的理论研究,另一是通过冷冻保存以维持包括高等动物在内的动物组织、细胞、器官以及个体

的生活状态的应用研究。

从目前实际研究内容和范畴出发，我们认为可以定义低温生物学为研究低温对生物体所产生的影响及其应用的学科。它包括动植物对寒冷环境的耐性、冻伤及其防治、低温酶学、极地生物学、动物冬眠等；动植物细胞组织的低温保存和移植；低体温医疗、用低温杀伤异常组织；食品、药品的冷藏保存和冷冻干燥；还包括电镜生物样品的低温制备技术等等^[1,2]。

而低温医学可以被定义为研究温度降低对人类生命过程的影响，以及低温技术在人类同疾病作斗争中的应用的学科。它包括人的冻伤和防冻、低温麻醉、低温脑复苏等；人体重要细胞、组织、器官的低温保存、移植及临床应用；利用低温手术器械杀伤异常组织如肿瘤等。

由上述可见，低温生物学和低温医学所研究的内容有很多是共同的，因为人类本身也是一种生物体。当然，低温生物学除了研究人以外，还研究其他生物体，特别是有重要意义的动植物；而低温医学则更侧重于临床效果。两者互相依赖、互相补充。国际期刊《低温生物学报》（“Cryobiology”）的全名就是《低温生物学——低温生物学和低温医学的国际学报》（“Cryobiology—International Journal of Low Temperature Biology and Medicine”），可见两者的密切关系。故许多人将它们统一称为低温生物医学。

§ 1-2 低温生物医学的重要意义

从定义来看，低温生物学只是研究温度对生物体的影响。对于生物体来说，温度降低可以看作是一种外界因素的变化。然而外界因素变化还可以有其它多种，如温度升高、压力升高、压力降低等等；相应地也可以有研究这些因素对生物体影响的学科，如高温生物学、高压生物学、低压生物学等。但是低温生物学却因其有广泛的应用背景而受到特别重视。现以下列诸方面为例，说明其重要意义。

§ 1-2-1 低温保存和低温损伤

很久以前，人们就有了将生物材料放在低温下长期保存的想法。从上世纪起，一些科学幻想小说作家就编写了生物体以至整个人体在低温下长期保存的故事。但是真正在科学意义上开始实现低温保存还只是在1949年。当时，英国生物学家 C. Polge 和 A.U. Smith 在一次实验中，偶然发现加了甘油的精子可以经历低温而不死亡^[3]。当他们在英国《自然》杂志上发表了简短的论文后，引起极大的重视。此后一大批科学家被吸引到“低温保存”这个课题上来了。

生物体为什么能在低温下长期保存呢？这是因为低温能抑制生物体的生化活动。生物体内一切新陈代谢过程中的化学变化，虽大多数由酶所催化而表现出多种特殊形式，但仍然都服从于某些共同的物理化学规律。著名的瑞典物理化学家 S.A. Arrhenius (1859—1927，曾因提出电解质在水溶液中会部分离解成自由离子的理论而荣获1903年诺贝尔化学奖)研究了温度对化学反应速度的影响，得到了如下的 Arrhenius 关系：

$$k = A \exp(-E_a/RT) \quad (1-1)$$

这里， k 是反应速率， R 是气体常数， T 是绝对温度， E_a 是活化能 (Activation energy)， A 则称为 Arrhenius 因子。对于给定的反应， A 是个常数。

式(1-1)可以改写为下列形式：

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E_a}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (1-2)$$

对于给定的反应，若以 $\ln k$ 和 $1/T$ 分别作纵、横坐标，上述关系应为向右方下斜的直线。许多酶反应速率、心搏速率、呼吸速率、神经冲动传播速率、变质反应速率等试验都已证实了上述关系^[4]。

根据一般推荐的活化能 E_a 的数值，就可以算出反应速率 k 随温度降低而衰减的情况。按此也可以推算出生物变质速率与温

度的关系。举例来说,若一生物体在 4℃ 环境下能存活 2 小时,那么按理论,它在 -40℃ 下能保存数日,在 -80℃ 下可保存数月,而在 -196℃ (液氮温度)下可望保存几个世纪^[1]。

60 年代,美国纽约血液中心主任 A. W. Rowe (现任国际低温生物学期刊主编)实现了人体红细胞的低温保存。1980 年他将在液氮温度下保存了 12 年的红细胞复温后进行检查,没有发现任何生化和功能上的变异。实际上,这证明了生物材料可以在低温下长期保存^[2]。

1981 年美国麻省理工学院低温生物实验室主任 E. G. Cravalho 等将红细胞的温度一直降至 -272.29℃,复温后未见任何变异,这说明低温保存并未发现有温度的下限^[3]。从 Arrhenius 关系来分析,温度越低,可保存的时间就越长久,但要达到液氮温度以下,耗费很大,所以从实用观点来说,-196℃ 已足够了。

生物体虽能在低温下长期保存,但却极容易在降温和复温过程中受溶液冻结、融化,以及溶液渗透压力变化等因素的作用而损害。这种低温损伤主要发生在 0℃ 到 -60℃ 这段温度范围内,我们称这个温度范围为“危险温度区”。

为了实现细胞的低温保存,一般均需在溶液中加入一定种类和浓度的低温保护剂 (Cryo-protective agents),如甘油、二甲亚砜等,并针对不同的细胞,设计特定的降温程序和复温程序等。没有上述特定的条件,细胞在降温、复温过程中必然会遭到低温损伤而死亡。

§ 1-2-2 人体细胞和组织的低温保存及其临床应用

到目前为止,能低温保存的人体细胞和组织主要有:血液及其某些组份、精子、胚胎、骨髓细胞、肝细胞、皮肤、角膜、胰腺组织、甲状腺旁体等。它们的移植成功已为临床医学带来了一些突破性的发展。

全血和各种血液成份的低温保存,既可解决供血、输血双方时间不同的矛盾,又可按不同患者的要求提供不同的血液成份。例

如,烧伤和出血性休克病人主要需要血浆,贫血病人需要红细胞,缺乏血小板的病人需要血小板,而血友病人则需要血液中的某些凝血因子等。1982年我们在美国麻省总医院血液中心(著名的C. E. Huggins 曾长期任主任,不久前病故)的低温血库中见到许多私人血袋。这些人将自己的血液抽出放在低温下长期保存,以备日后不时之需。用自己的血液进行自体移植,不会产生排异反应,也不必担心肝炎、艾滋病毒等的传染。若人在年迈时能输入年轻时保存的血液,更可有“返老还童”的作用。

骨髓细胞(Bone marrow cells, Stem cells)的低温保存为癌症治疗开创了一种新的途径。治疗实体恶性肿瘤和白血病的常用方法是进行化疗和放疗,这种方法能杀死癌细胞,但同时也杀死了大量的造血“祖先细胞”——骨髓细胞,使患者的造血功能减退。从80年代起,医生们利用低温生物学的研究成果,先将骨髓细胞由患

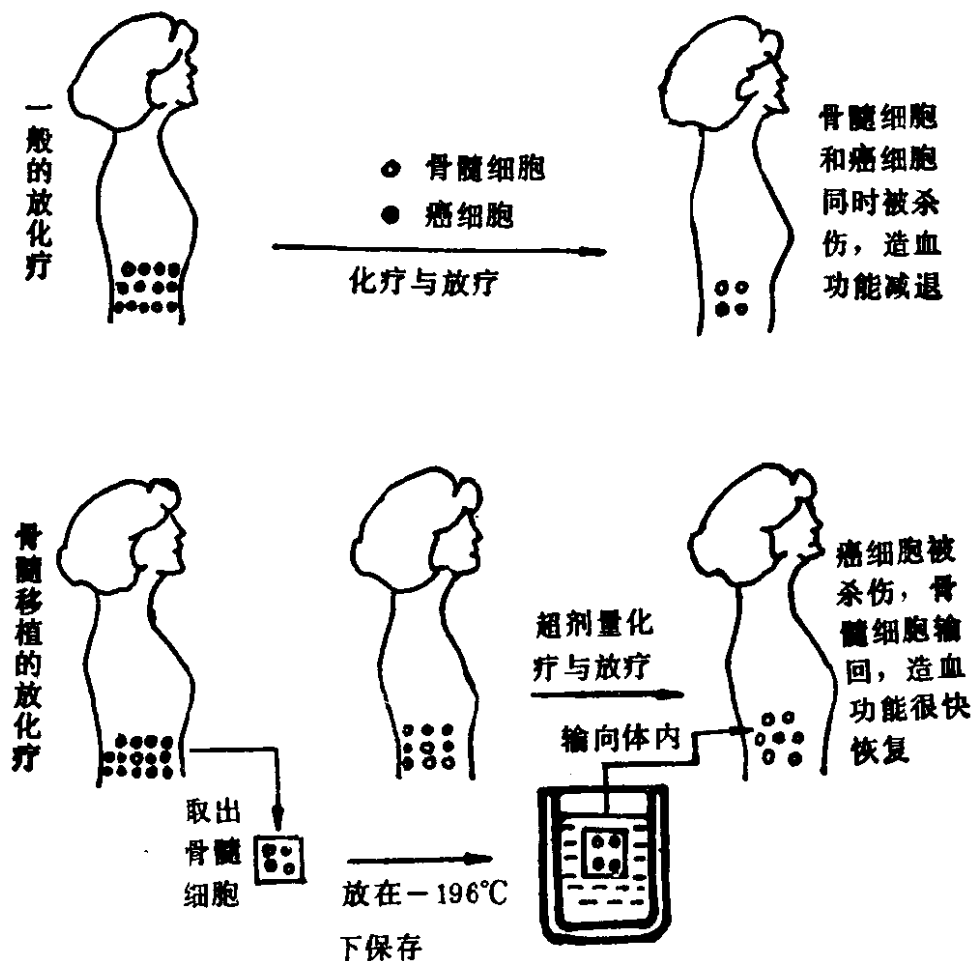


图 1-1 骨髓细胞的低温保存与移植——治疗癌症的一种新方法

者体内取出，加抗冻剂后以特定的程序在低温下保存。接着对患者进行大剂量的化疗和放疗，杀死体内的癌细胞。疗后再将低温保存的骨髓细胞复温，移植回患者体内，使其迅速恢复造血功能(见图 1-1)。这种方法已在临床上成功应用，成为治疗癌症的一种新途径。

人的精子和胚胎的低温保存，可使许多患不育症的夫妇喜得子女，也有利于计划生育。标志世界医学先进水平的冷冻试管婴儿，就是利用在液氮温度下保存的胚胎，复温后在体外培养而获得成功的。

胰岛细胞经胰腺组织的低温保存已成为糖尿病患者的福音。糖尿病是由于缺乏胰岛素引起的代谢性疾病。人工流产夭折胎儿的胰腺，可以通过低温保存，然后移植到患者体内，释放胰岛素，使糖代谢得到稳定的控制和调节，从而使糖尿病得到治疗。

§ 1-2-3 动植物细胞和组织的低温保存及其在农牧业中的应用

哺乳类动物精子和胚胎的低温保存，已给畜牧业带来了巨大的变革。以奶牛为例，若要得到大量优良奶牛，按常规的办法就要相应地饲养一大批良种公牛和良种母牛，而这需要耗费很大的财力和人力。若将良种牛的精子、胚胎实现低温保存，人们就可以只饲养很少量的良种公牛和良种母牛，而得到大量的优良奶牛崽。其方法是先收集良种公牛的大量精液，置于液氮中保存，并送到各地的良种母牛处；对良种母牛注射“超排卵剂”，使之一次能排卵数十个；将冷冻精液复温后注入母牛子宫，让其和超排卵子结合，形成数十只胚胎；用水将胚胎冲出并收集，以特殊的技术保存于 -196°C 低温下；需用时将这些良种胚胎逐一分别置入一般母牛子宫内，让其怀孕生崽。用这种方法，良种母牛只须排卵而不必怀孕生崽。一头良种母牛每年可以超排大量卵子，通过“借腹怀胎”的办法得到大量的良种牛崽(见图 1-2)^[4]。

对于濒危的珍稀动物，如大熊猫、东北虎等，有可能通过低温保存精子和胚胎的办法得到挽救。我国成功地实现了熊猫精子的