

深低温保存生物材料快速复温方法的研究进展

张换成, 胥 义

上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093

【摘 要】生物材料的深低温保存已经越来越广泛地应用于生物学、医学等领域,其主要特点是通过低温保存生物材料,从而缓解供求之间的矛盾。同快速降温一样,快速复温在提高冷冻保存的生物组织的活性中也扮演了重要的角色。快速复温冷冻生物材料能够有效避免其在复温过程中的重结晶现象,减小热应力,降低细胞损伤,提高细胞的存活率。近年来许多国内外学者在快速复温低温保存的生物材料方面做了很多研究,探索出多种可行的复温方法。本文对传统以及新出现的复温方法逐一论述。通过查阅大量国内外相关文献,同时结合本单位的相关研究成果分析总结进行综述。目前所使用的快速复温的方法主要有传统的水浴法、Cryotop 法、微波法、激光法和磁热法等。通过对几种复温方法的综合分析,认识到它们的优势和不足,以及各种方法在应用上的局限性。所以有必要寻找一种新的可靠的复温方法来实现快速均匀的生物组织的加热,并提出了一种新的快速均匀复温生物材料的方法,该方法具有重要的研究意义和应用背景。

【关键词】快速复温; 低温保存; 重结晶; 细胞损伤

【DOI 编码】doi:10.3969/j.issn.1005-202X.2015.01.032

【中图分类号】R318.52

【文献标识码】A

【文章编号】1005-202X(2015)01-144-05

Study on Rapid Thawing Methods of Cryopreserved Biological Materials

ZHANG Huan-cheng, XU Yi

School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Abstract: Cryopreservation of bio-materials has been increasingly widely used in fields such as biology and medicine. Its main feature is to preserve bio-materials by cryopreservation technology so as to alleviate the contradiction between supply and demand. Rapid thawing plays an important role in improving the activity of cryopreserved biological tissue just like the way of rapid cooling. Rapidly thawing cryopreserved biological materials can effectively avoid the recrystallization phenomenon in the thawing process, minish the thermal stress, reduce the cell damage and improve the cell survival rate. In recent years, many scholars have done a lot of research of the rapid thawing methods and explored a variety of feasible thawing methods. In this paper, the traditional and emerging thawing methods will be discussed. Based on a large number of related literatures and the research results by our group. At present, the rapid thawing methods mainly include the traditional water bath, cryotop, microwave, laser and magneto-calorific etc. Based on the comprehensive analysis of several kinds of thawing methods, their advantages and disadvantages and limitations of various methods in the actual applications are discussed here. It is necessary to find a new reliable thawing method to achieve rapid uniform heating of biological tissue. So, a new kind of uniformly rapid thawing method should be put forward for deeply frozen materials, which will significantly affect the application of those materials.

Key words: rapid thawing; cryopreservation; recrystallization; cell damage

前 言

生物材料的低温保存已经越来越广泛地应用于生物学、医学等领域,其主要特点是通过低温保存生物材料,从而缓解供求之间的矛盾。大多数的生物材料在通过低温保存方法可以在较长的时间内保持活性。一些研究已经表明,降温 and 升温速率对低温保存的细胞的存活有重要的影响。目前,低温保存生物材料的复温方法主要是利用水浴、Cryotop、微波、激光

【收稿日期】2014-07-27

【基金项目】国家自然科学基金(50906056);上海市自然科学基金(13-ZR1428600)

【作者简介】张换成(1990-),男(汉族),硕士研究生,主要研究方向:生物系统热科学。E-mail:hc Zhang1006@163.com, Tel: 18818262787。

【通讯作者】胥义,男,副教授,主要研究方向:生物系统热科学技术, E-mail: xu_hongyi@263.net, Tel: 021-55270218。

等方法,通过对流、传导、辐射使热量分布到被加热的材料中,达到复温解冻的目的。由于不同方法的产热原理、传热方式不同,在复温方面各有自己的优势和缺点,以及应用的局限性。本文从产热原理、传热方式及应用领域等几个角度,论述了以上几种方法各自的优缺点和应用的局限性。

1 复温过程细胞损伤机制

玻璃化保存是目前保存细胞、微小型生物组织的最有效方法,可以大大提高细胞、组织的生物活性。实现玻璃化遵循两个原则,其一是细胞悬浮于有较高浓度的玻璃化溶液中;其二是溶液能够快速降温。在玻璃化过程中,会有大量的冰核生成,但由于玻璃化保存的生物材料溶液有较高的粘度,能够在温度低于熔点时抑制冰核的生长,从而避免冰晶的形成和生长。但在复温过程中,如果升温速率不足够快,在高于玻璃化温度以上某个温度区间,可能导致冰核将会迅速长成毁灭性的冰晶,对细胞造成致命损伤^[1],这就是所谓的反玻璃化。快速复温的方法能够使冰晶在没有时间形成和生长之前就达到熔点,避免再结晶。通过 Ruggera 和 Fahy 等^[2]的研究发现,3.3 °C/s~17 °C/s(即 180 °C/min~1000 °C/min)的复温速率,并且确保器官各部分之间的温度差不能大于 30 °C,可以避免反玻璃化的损伤。快速复温能够有效的提高低温保存的悬浮液细胞的存活率^[3],尤其对于排列紧密的细胞^[4]。但对于大多数体积较大的器官,由于很难实现均匀加热,所以快速复温的影响和效果还有待研究。

2 玻璃化保存生物材料的复温方法

目前低温保存的生物材料的复温方法主要有传统水浴、Cryotop、微波、激光和磁热等。由于不同方法的产热原理、传热方式不同,因此复温效果和应用范围都有较大的差异。

2.1 传统水浴方法

该方法的一般做法是将在液氮中冻存的生物材料快速取出,放置到恒温温水或蔗糖溶液中进行加热,并在加热的过程中充分振荡可以加快复温速率。目前水浴加热对单细胞悬液具有较好的效果,但无法使较大的组织和整个器官的内部达到较高的复温速率。由于是通过对流或传导来加热组织和器官将产生很大的温度梯度,产生较大的热应力所致的机械压力会使细胞损伤,还可能在材料内部融化之前就使外层过热^[5]。水浴加热示意图如图 1。

2.2 Cryotop 方法

Cryotop 是一个带有手柄的薄塑料长方形载片,其工作原理如图 2 所示。Cryotop 所占区域为 0.1 cm~2.1 cm,实物照片如图 3 所示。在使用时,将非常少量的分布有细胞的玻璃化溶液液滴放置在载片上,然后迅速将其投入液氮中实现深低温保存,需要复温时,直接将 Cryotop 区域浸入水浴或空气中。

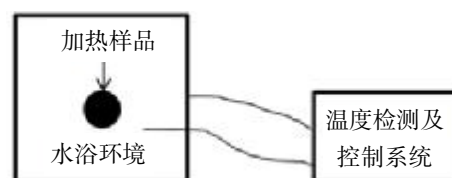


图 1 水浴加热示意图

Fig.1 Schematic of Water-bath Heating

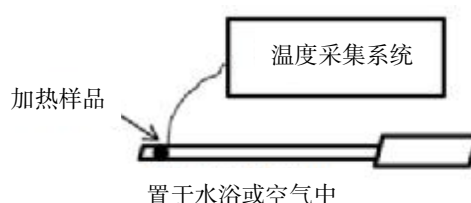


图 2 Cryotop 加热示意图

Fig.2 Schematic of Cryotop Heating

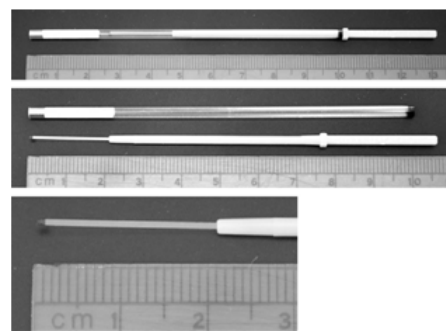


图 3 Cryotop 实物照片

Fig.3 Cryotop photos

该方法广泛用来实现快速降复温,由于使用的冷冻保护剂很少、细胞与液氮的直接接触面积大,细胞与冷源的整体热阻很小,其降温速率可以达到 60 000 °C/min~70 000 °C/min (温度变化范围 20 °C~-120 °C,冷源为液氮)^[6]。快速复温时,将 Cryotop 快速从液氮移入 23 °C~37 °C 的水或蔗糖溶液中进行水浴复温,其复温速率可高达 117 500 °C/min±10 630 °C/min (-120 °C~30 °C,热源为水或蔗糖溶液)。降复温速率可以通过改变包围在 Cryotop 载片的隔热材料进行控制。

Kleinhans 等^[7]提供了快速变化温度的测量系统解决方案。该测量系统可以跟踪 1 000 000 °C/min 的温度变化速率。温度传感器方面采用的是 50 μm 线宽的 T 型热电偶,热电偶的输出电压通过可 USB 存储的数字示波器记录,最后将采集到的电压数据转移到个人电脑中,利用 Office Excel 软件对原始数据进行处理。由于仪器尺寸、传热方式的限制,此方法主要适用于少量卵母细胞或胚胎细胞等溶液的降复温操作,在研究降复温速率对细胞存活率影响的领域有广泛应用。显然,对于实现较大体积的组织、器官等生物材料的快速均匀复温该方法并不适用。同时,该装置

的复温速率主要通过改变载片周围的绝热材料进行控制,温度变化范围小,不利于数字化控制。

2.3 微波方法

(1) 微波方法的工作原理

微波是频率为 300 MHz~300 000 MHz 的一种高频电磁波。能使处在微波电磁场中的极性分子以每秒 24.5 亿次的频率做往返振动,分子碰撞机会增加,从而产生热能^[8]。其基本原理是:组织细胞中的液态水吸收微波后引起水分子随外加电磁场而变化,使带有氢键的水分子的状态和构象随交变微波而变化,使水分子的氢键断裂,变成单个的水分子,并使每一个水分子的内能增加。这部分能量转化为水分子无规则运动的动能,这时它们之间的相互碰撞也增加,从而使液态水的温度增高。因此,液态水分子在吸收了微波的能量后,不是将这部分能量传送给其他生物分子,而是用来断裂水分子的氢键,转化为无规则运动的热能,使液态水的温度上升^[9-10]。微波加热装置结构如图 4。

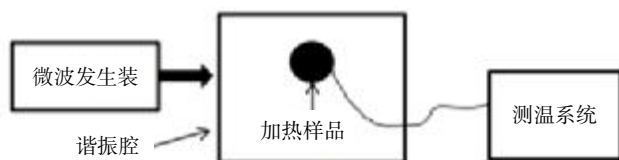


图 4 微波加热装置结构示意图

Fig.4 Schematic of Microwave Heating Device

(2) 微波技术在解冻中的应用

目前针对微波加热生物材料的实验装置大多是家用微波炉,或是将家用微波炉进行改进,使其能够适用于加热生物材料。要实现均匀加热几毫米厚度的生物材料的唯一简单可行的方法就是利用电磁吸收的原理。Guttman 等^[11]报道利用 2450 MHz 频率的微波实现了犬肾脏的复温,并将其成功移植,但是当 Guttman 或其他人^[12]在重复该实验时却不能得到之前的结果。Burdette 等^[13]利用 2450 MHz 频率的微波实现了兔肾脏的均匀加热。Ruggera 和 Fahy^[14]通过共振线圈产生 20 MHz~30 MHz 频率的微波,并实现了冷冻的玻璃化溶液的快速均匀复温。Lin^[15]建议使用 10 MHz~1000 MHz 频率的微波加热典型的低温保存的组织。Marsland 等^[16]指出 434 MHz 是实现场的均匀分布和热稳定性的最佳频率。Bai 等^[17]分析了直径为 36 mm 的球在不同微波频率下的热场分布,并预示了 434 MHz 下具有良好的场的均匀性。Evans 和 Penfold^[18]推导了决定热稳定的因素,包括与温度变化相关的冷冻材料的介电常数和电导率,并发现 434 MHz 在微波复温技术中能够产生适宜的热稳定性。

(3) 微波方法的优缺点

微波复温相对于常规的复温方法有很大的优势。通过合适的设计,微波的能量可以以很高的速率分布到生物材料内。尽管这些优势很早就被人们意识到,利用微波复温来避免反玻璃化并没有得到广泛应用。主要是因为微波的使用还存在很大的不足之处,加热

过程需要非常仔细的设计以便得到预期的结果和避免不希望发生的影响,比如在微波加热过程中形成过热点。造成这种结果的原因之一电磁场与生物材料之间复杂的相互作用。在加热过程中空腔中的电磁场会受到生物材料的干扰,材料内部的电磁场分布依赖于多种因素,如材料的大小、尺寸、场的频率以及材料的本构参数^[19]。一些非球面组织(如角膜、血管等)的复温均匀性也会受到影响。像肾脏这样大的器官,低温保护剂主要沿血管分布。如果血管变窄或损坏,就会导致分布不均匀;低温保护剂本身的渗透性、介电常数及其随温度变化也会影响低温保护剂的分布和微波加入时热量的吸收、传导。虽然低频率的微波更适合均匀加热给定尺寸的组织。但是,低频微波的加热功率比较低,升温速率比较慢。所以,在微波谐振腔内同时实现高效的快速、均匀加热仍比较困难。

另外,微波加热装置的加热效率比较低,功率主要浪费在输入端口的反射上以及腔体外壁和绝热材料的吸收。反射损耗目前还无法避免^[20],而吸收损耗则更大。减小吸收损耗可以通过在腔体内壁镀银的方法实现,但是价格比较昂贵。微波加热的另一个弊端在于大多数生物材料的介电常数 σ 正比于温度 T ,这将导致热失衡,同时浅的穿透深度也会导致加热的不均匀性,在加热体积较大、组成复杂的组织器官时,以上两个因素的影响更为明显。在提高复温速率方面,如果简单的通过使用大功率的放大器,必须要考虑到射频干扰以及空气放电,静电场下,空气的击穿电压为 3000 kV/m,在射频频率下,击穿电压将会小很多^[21],增加了使用的不安全性。

2.4 激光方法

激光与生物产生相互作用表现为生物材料的光热作用、光化学效应、光机械效应等。组织对光的吸收主要依赖于光的波长:蛋白质主要吸收紫外光;血色素、黑色素和其他色素主要吸收可见光,700 nm~900 nm 波段的光被组织吸收的很少;而水主要吸收红外光^[22]。由于生物材料中大部分的成分是水,并且激光具有很高的功率密度,所以可以通过水分子对红外激光的吸收来达到激光加热的目的。

使用 Cryotop 可以达到 $\sim 100000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的复温速率,并且得到很高的细胞存活率。由此推测更快的复温速率可以产生更高的存活率。Kleinhans 等^[23]利用 IR 激光脉冲实现了是 Cryotop 方法 3.5 倍~100 倍的复温速率。

光钳研究表明,大部分类型的细胞可以忍受高强度 1064 nm 波长的 IR 激光,这种激光可以通过 Nd:YAG 产生,所以选择该类型的激光进行加热。大多数的低温保护液对于红外光是相对透明的,并不能对激光的能量进行有效的吸收,可以通过添加少量的印度墨水来提高对红外的吸收率。印度墨水(India Ink)主要是由直径为 0.1 μm ~1 μm 的碳颗粒组成,并且使用的浓度为 0.25% (V/V),对要加热的卵母细胞也是无

害的。通过选择适当的浓度,可以使大部分 IR 激光的能量穿过样品,在样品的前后产生相对均匀的热量。通过估计,样品可以吸收的 IR 激光的能量大概为 30% 左右,测得的复温速率为 $(3.5 \times 10^5)^\circ\text{C}/\text{min} \sim (2 \times 10^7)^\circ\text{C}/\text{min}$ 。但是,模大于 $(1 \times 10^7)^\circ\text{C}/\text{min}$ 的复温速率会导致直径 $70\ \mu\text{m}$ 的卵母细胞产生较大的温度梯度,所以不宜使用。激光加热装置结构示意图如图 5。

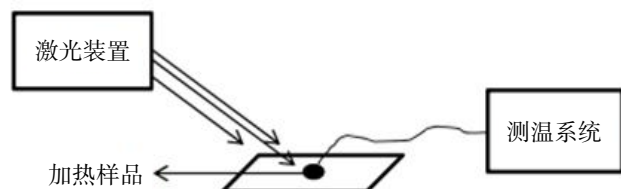


图 5 激光加热装置结构示意图

Fig.5 Schematic of Laser Heating Device

激光具有亮度高、方向性好、功率密度大的特点,被加热生物材料能够瞬间达到很高的温度。但是受激光束直径及穿透性的限制,激光加热目前只是配合 Cryotop 应用于小体积的样品的快速复温的研究,而对于体积较大的生物组织、器官,激光方法复温并不适用。

2.5 磁热方法

美国明尼苏达大学 Bischof 教授团队于 2012 年提出的磁热解冻法^[24],是从目前应用广泛的肿瘤磁流体热疗得到启发,可以使用磁性颗粒配合交变磁场实现较大尺寸的组织、器官的快速均匀加热。一般,磁性微粒的粒度必须小到纳米级时才能处于超顺磁状态,具有较高的产热。目前 Michael 等^[25]的初步研究表明,在磁场强度为 $20\ \text{kA}/\text{m}$,频率为 $370\ \text{kHz}$ 的条件下,1 mL 纳米颗粒浓度为 $10\ \text{mg Fe}/\text{mL}$ 的水溶液或低温保护剂的升温速率可达 $200^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

磁热解冻的方法需要引入将磁场能量转换为热能的磁性纳米颗粒以达到加热的目的。不同于肿瘤磁热可以忽略磁性纳米颗粒的毒性,对于生物材料的保存,磁性纳米颗粒的毒性问题仍需要进一步讨论。以上讨论全是以磁性纳米颗粒能够均匀分布于被保存

的生物材料为前提,实际上磁性纳米颗粒在生物材料中的分布受到诸多因素的影响,比如材料各部分密度不同、细胞对于纳米颗粒的吸收性的差异以及纳米颗粒的聚集效应等,都会影响纳米颗粒的均匀分布,进而影响热源分布。所以如何实现磁性纳米颗粒的均匀分布以及分布情况的检测手段也需要深入研究。

3 几种复温方法的比较

水浴和 Cryotop 方法是将待加热的生物材料置于温水或空气中,利用传导或对流方式实现加热。传导受生物材料的导热系数、不同位置之间温差以及生物材料与水或空气的接触面积有关。对于加热体积较大的组织、器官,由于较低的导热系数,将导致较大的温度梯度,水浴加热是不可取的。Cryotop 方法通过增大热传递面积来加快升温速率,但仅在复温细胞级别的生物材料有较好的效果。

微波加热是一个体积热效应,生物材料中的每个水分子都可以看做一个热源,可以忽略掉生物材料较低的导热系数。在热源分布均匀的前提下实现均匀加热。实际上由于生物材料各部分的含水量及其他介质介电系数的影响,这种热效应并不是均匀分布。加热速率并且会受到温度变化的影响,导致加热的不稳定性。在加热较大体积的组织器官时,要经过非常仔细的设计才可能达到预期的效果。

激光加热优点在于能够达到 Cryotop 方法复温速率的 3.5 倍 ~100 倍,为进一步研究快速复温速率对细胞存活率的影响创造条件。该方法主要是通过水分子及碳颗粒吸收红外激光的能量实现快速加热,但加热材料的尺寸受激光束直径的限制,大多在毫米级别,仅适用于较小的细胞悬液样品的加热。并且激光在穿透组织时,由于吸收作用会导致激光衰减,加热样品的前后位置的吸收能量不同,会导致很大的温度梯度。

4 总结

本文对几种玻璃化复温方法进行了简单的介绍,可知这几种复温方法各有自己的优势和不足,适用于

表 1 几种加热方法的比较

Tab.1 The Comparison of Several Warming Methods

加热方式	热源类型	复温速率	缺点	应用范围
水浴	外热源	$1^\circ\text{C}/\text{min} \sim 3^\circ\text{C}/\text{min}$	复温速率慢,且加热不均匀	细胞溶液、中小型组织、器官
Cryotop	外热源	$110\ 000^\circ\text{C}/\text{min}$	仅适用于少量细胞溶液,不便于控制	少量细胞溶液
微波	体积热源	$10^\circ\text{C}/\text{min}$	难于控制,容易形成过热	细胞溶液、中小型组织、器官
激光	外热源	$1 \times 10^7^\circ\text{C}/\text{min}$	不便于控制	少量细胞溶液
磁热	体积热源	$200^\circ\text{C}/\text{min}$	引入磁性纳米颗粒,毒性有待验证	细胞溶液、中小型组织、器官

不同的生物样品材料。特别是近几年来兴起的激光加热和磁场加热很可能是解决目前深低温保存生物材料快速解冻的有效方法,值得去深入研究和探索。

【参考文献】

- [1] Fahy G. Vitricification//in: Proceedings of NATO Advanced Study Institute on Biophysics of Organ Cryopreservation[M]. New York; Plenum, 1987: 133-147.
- [2] Ruggera PS, Fahy GM. Rapid and uniform electromagnetic heating of aqueous cryoprotectant solutions from cryogenic temperatures[J]. Cryobiology, 1990, 27(6): 465-478.
- [3] Akhter T, Pegg DE, Foreman J. The effect of cooling and warming rates on the survival of cryopreserved L-cells [J]. Cryobiology, 1979, 16(5): 424-429.
- [4] Pegg DE, Diaper MP, Skaer HL, et al. The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2M glycerol[J]. Cryobiology, 1984, 21(5): 491-502.
- [5] Guttman FM, Segal N, Borzone J. Cryopreservation of canine kidneys with dimethylsulphoxide: further studies, in organ preservation [J]. Cryobiology, 1979, 8: 185-199.
- [6] Peter M, Shinsuke S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95°C to $70000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed at 610°C to $118000^{\circ}\text{C}/\text{min}$: A new paradigm for cryopreservation by vit-rification [J]. Cryobiology, 2011, 62(1): 1-7.
- [7] Kleinhans FW, Shinsuke S, Peter M. Simple, inexpensive attainment and measurement of very high cooling and warming rates [J]. Cryobiology, 2010, 61(5): 231-233.
- [8] 黎相照, 李林, 徐小艳. 微波解冻法对冷冻组织细胞角蛋白免疫组化检测影响的实验研究 [J]. 中国医学物理学杂志, 2003, 20(2): 2941-2944.
Li XZ, Li L, Xu XY. Reserch of microwave thawing method impact on the frozen tissue cell keratin immunohistochemical detection [J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2003, 20(2): 2941-2944.
- [9] Banik S, Bandyopadhyay S, Ganguly S. Bioeffects of microwave-a brief review [J]. Bioresource Technology, 2003, 87(2): 155-159.
- [10] 庞小峰, 张安英. 微波的生物热效应的机理和特性研究[J]. 原子与分子物理学报, 2001, 18(4): 421-425.
Pang XF, Zhang AY. The research of biological thermal effect mechanism and characteristics of microwave [J]. Journal of Atomic and Molecular Physics, 2001, 18(4): 421-425.
- [11] Guttman FM, Lizin J, Robitaille P. Survival of canine kidneys after treatment with dimethylsulphoxid, freezing at -80°C , and thawing by microwave illumination [J]. Cryobiology, 1977, 16(5): 559-567.
- [12] Pegg DE, Green CJ, Walter CA. Attempted canine renal cryopreservation using dimethyl sulphoxide, helium perfusion and microwave thawin[J]. Cryobiology, 1978, 15(6): 618-626.
- [13] Burdette EC, Karow AM, Jeske AH. Design, development and performance of an electromagnetic illumination system for thawing cryopreserved kidneys of rabbits and dogs [J]. Cryobiology, 1978, 15(2): 152-167.
- [14] Ruggera PS, Fahy GM. Rapid and uniform electromagnetic heating of aqueous cryoprotectant solutions from cryogenic temperatures [J]. Cryobiology, 1990, 27(6): 465-478.
- [15] Lin JC. Electromagnetic heating techniques for organ rewarming//in: The Biophysics of Organ Cryopreservation [M]. New York: Plenum, 1987: 582-590.
- [16] Marsland TP, Evans S, Pegg DE. Dielectric measurements for the design of an electromagnetic rewarming system[J]. Cryobiology, 1987, 24(4): 311-323.
- [17] Bai X, Pegg DE, Evans S, et al. Analysis of electromagnetic heating patterns inside a cryopreserved organ[J]. Biomed, Eng, 1992, 14(6): 459-466.
- [18] Evans S, Penfold J. Thermal runaway in electromagnetic heating, with application to the reheating of cryopreserved biomaterials [J]. Microwave Power Electromag Energy, 1993, 28(4): 84-92.
- [19] Caicheng L, Huaizhi L. Analysis of rapid rewarming of cryopreserved tissues [J]. IEEE Transactions Biomed Eng, 2000, 48(5): 2185-2191.
- [20] Rachman MJ. Electromagnetic warming of cryopreserved organs [D]. Univ of Cambridge, UK, 1990.
- [21] Metaxas AC, Meredith RJ. Industrial microwave heating [M]. London, UK, 1983: 261.
- [22] Patterson MS, Jacques S. Laser-tissue interactions, Handbook of laser technology and applications [M]. Bristol: Institute of Physics Publishing, 2000.
- [23] Kleinhans FW, Jin B, Estefania P, et al. Ultra rapid warming of cryo samples using an IR laser pulse [J]. Cryobiology, 2013, 67(4): 398-442.
- [24] Etheridge ML, Bischof JC. Optimizing magnetic nanoparticle based thermal therapies within the physical limits of heating [J]. Biomedical Engineering Society, 2013, 41(1): 78-88.
- [25] Michael LE, Yi X. Radiofrequency heating of magnetic nanoparticle cryoprotectant solutions for improved cryopreservation protocols [J]. Cryobiology, 2013, 67(3): 398-442.