9.1 低温生物保存

 >当生物温度降低时,生物组织的<u>生化反应速度会变低</u>, 在充分的低温下,生物的活性时间会延长。所以,利用这 一特性可以保存生物体。冻存温度:液氮-196℃,称为 深低温保存,是长期保存生物体的方法
 >低温保存是指将体外培养物悬浮在加有冷冻保护剂的溶 液中,以一定冷冻速率降至零下某一温度(一般低于-70
 ℃),并在此温度下对其长期保存的过程

▶Arrhenius 关系式表明了温度对化学反应速率的影响
$$k = A \exp(-\frac{E_a}{RT})$$
k. 化学反应速率.
A. 频度因子, Arrhenius constant, R. 普适气体常数 (J/kmolk)
∆E. 活化能量 (J/mol)
例: 某一生物体4度时能存活两小时的话, 在液氮温度-196度时能存活几个世纪

冷冻保护剂的作用

生物组织中包含很多水,以电解质水溶液形式存在。 水溶液的冻结对生物体是致命的,所以要事先加入 冷冻保护剂(cryoprotective eagent, CPA) 作用:

◆降低冰点,提高细胞膜对水的通透性,延缓冻结 过程

◆使细胞水分在冻结之前透出细胞外,减少胞内冰 晶,从而减少冰晶对胞内冻伤

◆减少胞外冰晶形态

◆减少细胞脱水程度,通过胞内玻璃化过程减少冰 晶形成

细胞体积变化率:

$$\frac{dV}{dt} = -L_p S(\pi_e - \pi_i) = -L_p SRT(O_e - O_i)$$

L_p m/Pa.s 细胞膜的水透过率(hydraulic conductivity)

- S: m² 细胞膜的表面积
- π 渗透压
- R 通用气体常数, 8.314J/mol.k
- T 液体温度K
- O 水的浓度 e. 细胞外侧 i. 细胞内侧 mol/m³



缓慢冷却和急速冷却对细胞的影响

.

冷却速度不同,细胞内的反应也不同。
>急速冷却时,细胞体积变化较小,但细胞内容易形成冰核,对细胞是致命的。
>缓慢冷却时,细胞脱水使得细胞体积变小。
>缓慢冷却时对细胞产生的影响:
1.由电解质浓缩引起的化学应力
2.体积变化引起的机械应力
3.细胞的收缩引起的细胞膜异常接近

解冻后不同种类细胞的生存率



生存率が極大を示す冷却速度が存在し,その最適冷却速度は 細胞の種類によって異なる。

図2.24 凍結解凍後の細胞の生存率に及ぼす冷却速度の影響42)

深低温保存方法: 慢速冻存法和玻璃化法 低温保存的三个物理化学过程 液体溶液的固化过程 固化溶液的熔化过程 水分通过细胞膜的渗透过程

低温保存领域的两个热点研究 ▶冷冻保护剂 ▶热应力与断裂

冷冻保护剂(cryoprotective agent, CPA)种类 ▶渗透型保护剂: ▶甘油,二甲亚砜(DMSO, Me2SO),丙二醇,乙二醇

作用:

 >低分子中性物质,在溶液中易结合水分子发生水和作用, 增加水的粘性,弱化水的结晶过程
 >冲淡溶液浓度,减少细胞摄入盐量,由保护剂替代
 >冷冻保护剂进入细胞,改变了细胞内过冷状态,使细胞内 压接近外压,降低了细胞脱水引起的皱缩和速度
 >保护剂进出细胞,缓解了复温度时渗透性肿胀引起的损伤 非渗透型保护剂:

聚乙烯吡咯烷酮, 蔗糖, 葡萄糖, 羟乙基淀粉等 作用:

- ▶大分子物质,溶于水,但不能进入细胞
- ▶降低冰点,减少冰晶形成

▶通过改变渗透压引起细胞脱水从而起到保护作用
 ▶通常与渗透性保护剂联合使用,促使细胞完成脱水;解冻时,提供一个高渗环境,防止水分进入细胞太快而引起细胞膨胀破坏。

在低温保存中,低温断裂主要由温度变化产生的热应 力引起

产生热应力的原因:

▶冷却过程中,样品温度分布不均,产生了温度梯度

▶慢速冷冻时,水不断结为冰晶,体积增加了9%

▶冷冻容器的热膨胀系数远小于保护剂溶液的热膨胀 系数

热应力大小

与冻结速度,样品尺寸,冻结溶液的力学性质等有关

慢速冻存法(程序降温法)步骤:

▶将细胞放在含有抗冻剂的溶液中预处理

▶用程序降温仪或低温冰箱将上述细胞连同溶液以较 慢速率降温

▶细胞外溶液中的水分结冰使溶液浓度升高,胞内水 分通过细胞膜向外渗透,细胞体积收缩,胞内溶液浓度 提高

▶到一定温度时,再快速降温至液氮温度,并在此温度 下长期保存

冷冻损伤的因素



玻璃化保存

液体转变为非晶态(玻璃态)的固化过程.玻璃化比冻结固 化方法引起的结果变化要小,因而是一种理想的低温保存 方式

玻璃态固体分子之间的关系和液态没有明显变化,而一般 晶体分子之间的关系和液态相差甚远.

使溶液玻璃化的途径: 极大地提高冷却速率 增加溶液浓度

例:若要使纯水玻璃化,降温速率要在10⁷ K/s,实现非常困难

玻璃化研究的重点:寻求容易实现玻璃化且 对细胞损害较小的溶液;提高冷却速率



图 3.1 两步降温装置的示意图

1-保温盖 2-杜瓦瓶 3-牵引绳 4-支撑板 5-热电偶 6-冻存管 7-玻璃化溶液 8-液氮 9-数据采集器 10-电脑

Fig. 3.1 The schematics of experimental setup for two-step cooling 1-lid 2-dewar flask 3-traction role 4-supporting board 5-thermal couple 6-cryotube 7-vitrification solution 8-liquid nitrogen 9-data collector 10-computer



弹性动脉冻结过程中冰晶形成和组织要素之间 的相互关系

石黒博、梶谷博、藤川清三

第45届日本传热研讨会 2008 研究目的
>大动脉是心脏外科移植手术中的材料之一.
>大动脉具有多层复杂组织,从血管壁内侧开始,由内膜,中膜和外膜三层构造组成,中膜。本研究以中膜为研究对象
>观察低温冷冻后的组织纤维形态

实验方法

- 1. 通过光学显微镜观察组织的冻结状态
- 2. 组织分别以冷却速度0.5 ℃/min 和 30℃/min速度进行 冷冻,并在-80度保存
- 3. 运用冷冻切片机制作切片。
- 4. 通过HE染色, E染色, VG染色, EVG染色对冷冻切 片进行染色
- 5. 通过光学显微镜观察切片组织
- 6. 通过电子显微镜观察冷冻组织: 由与第2步同样的冷却 速度获得冷冻组织,之后放到液氮中保存.对冷冻组织进 行真空干燥后,再用FE-SEM显微镜进行观察
- 7. 在流动的水中以100 ℃/min的速度对冷冻组织进行急速融解.同时对未冷冻组织进行固定,石蜡包埋.在光学显微镜下进行对比观察.

Tab.1 Staining method and colors

Method	Colors
HE stain	Cytoplasm, Connective tissue → Red or Pink, Cell nucleus → Blue or Indigo
E stain	Elastic fiber → Violet or Black, Cell nucleus → Dark red, Others → Light red
VG stain	Collagen fiber → Red, Elastic fiber, Cytoplasm → Yellow, Cell nucleus → Black
EVG stain	Elastic fiber \rightarrow Violet or Black, Collagen fiber \rightarrow Red, Cytoplasm \rightarrow Yellow, Cell nucleus \rightarrow Black

弹性板沿圆周方向均匀分布



Fig. 1. Tissues before freezing (Control)



Fig. 2. Tissues in freezing state at H=0.5°C/min a, b and d: sections of frozen sample (d: section along circumferential direction), c: FE-SEM image,



Fig. 4. Tissues after freezing and thawing (H=0.5°C/min)



Fig. 3. Tissues in freezing state at H=30.0°C/min (Section of frozen sample)

总结 ▶对猪大动脉的中膜在冷冻前后和冷冻中进行 了显微观察. ▶冷冻中由于冰晶的成长使纤维成分受到挤压, 形成纤维束 融解后,由于纤维成分的还原性,纤维束又基本 恢复成原状.组织在构造和形态上都基本恢复.

9.2 微循环中的氧输运

▶正常情况下,1ml血液中含有0.15g血红蛋白,1
mol血红蛋白可以附着4mol氧;
▶98%的氧附着在血红蛋白中(hemoglobin),剩
余的部分游离在血浆中
▶根据Henry**\$ Law**

 $[O_2] = \alpha P$

- [O₂] 游离氧的浓度
- **P** 氧分压
- α 溶解度系数:评价物质分离氧的能力

血红蛋白-氧饱和度SO2或S: 表示氧和血红蛋白的有效结合能力,由百分比 表示。

 $H_{h} + nO_{2} \xrightarrow{k} H_{h}(O_{2})_{n}$ $H_h + nO_2 \leftarrow H_h(O_2)_n$

k 分离率 k' 结合率 决定血红蛋白和氧的化学反应的因素:温度, 血浆酸碱度,二氧化碳分压,DPG浓度 (diphosphoglycerate:减少血红蛋白的氧亲 和性,使氧容易放出)

分析SO2的Hill方程
$$SO_2 = -\frac{(P/P_{50})^n}{1+(P/P_{50})^n}$$
$$P_{50} = -\frac{1}{K^n \alpha}$$
P₅₀ 血氧饱和度为50%时的氧分压
当n约为2.7, SO2在20-80%时, Hill方程很准确。

当处于相平衡状态时,可以运用Adair公式

$$SO_{2} = \frac{\alpha_{1}P + 2\alpha_{2}P^{2} + 3\alpha_{3}P^{3} + 4\alpha_{4}P^{4}}{4(1 + \alpha_{1}P + \alpha_{2}P^{2} + \alpha_{3}P^{3} + \alpha_{4}P^{4})}$$

 α_i Adair 参数 对于羊血,有

$$log_{10} \alpha_{1} = -0.4948 log_{10} P_{50} - 1.117$$

$$log_{10} \alpha_{2} = 0.7473 log_{10} P_{50} - 5.207$$

$$\alpha_{3} = 0$$

$$log_{10} \alpha_{4} = -3.955 log_{10} P_{50} + 0.0238$$

P50可以表示为二氧化碳分压和ph值的函数

$$\log_{10} P_{50} = (0.1902 \times 10^{-2} PCO_2 - 0.3916) pH$$
$$-0.0126PCO_2 + 4.4527$$

$$\alpha_1 = 1.22 \times 10^{-2}$$

 $\alpha_2 = 9.96 \times 10^{-5}$
 $\alpha_4 = 3.96 \times 10^{-7}$

微血管网中的氧输运 假定第i只血管,考察在流动方向x方向的微 元血管dx 根据质量平衡,有

$$m_{i,x} = m_{i,x+dx} + m_{diffusion}$$

 $m_{i,x}$
单位时间进入微元的氧质量

 $m_{i,x+dx}$
单位时间流出微元的氧质量

 $h_{i,diffusion}$
由扩散通过血管流出的氧通量

单位时间进入微元的氧质量 $m_i = Q_i F(H_{tc}, C) [S_{0,i} + n_i PO_{2,i}] m_t$ 血液的体积流量 Q_i $F(H_{tc},C)$ 血液输氧能力函数,由血细胞压积率 Hemotocrit和血红蛋白含氧量决定 $S_{0,i}$ i血管内氧分压为0时的氧饱和率 氧分离曲线的斜率 n_i $PO_{2,i}$ i段血管内的氧分压 \mathcal{M}_{t} 可分离氧的质量

扩散至组织中的氧浓度,可由定常扩散方程

$$D \nabla^2 c = g_0$$

D 氧扩散系数
 g_0 氧在壁面的消耗率
 $c(r) = \frac{g_0}{2D} - \frac{g_0}{D} \delta r + \alpha P O_{2,i}$
δ 氧浓度为零时的组织厚度
 $\delta = \sqrt{\frac{2D\alpha P O_2}{g_0}}$
 α 组织中的氧溶解度

血管和组织边界上的氧消耗梯度

$$\frac{dc}{dr}\Big|_{r=0} \sim -\sqrt{\frac{2g_0 \alpha P O_{2,i}}{D}}$$

$$c_{w} = D \frac{dc}{dr} \bigg|_{r=0}$$

根据质量平衡方程

$$m_{i,j} - m_{i,j+1} = m_{diffsusion} = \pi d_i \sqrt{2Dg_0 PO_{2,i}} dx$$
$$\frac{dm_i}{dx} = \pi d_i \sqrt{2Dg_0 PO_{2,i}}$$

::
$$m_i = Q_i F(H_{tc}, C) [S_{0,i} + n_i PO_{2,i}] m_i$$

$$\frac{dPO_{2,i}}{dx} = \frac{\pi d_i}{Q_i F(H_{tc}, c) n_i m_t} \sqrt{2Dg_0 PO_{2,i}}$$

在整段血管内积分可得

$$PO_{2}^{1/2} = PO_{2,i-1}^{1/2} - k_{i}$$
$$k_{i} = \frac{\pi d_{i}L_{i}}{Q_{i}F(H_{tc},c)n_{i}m_{t}}\sqrt{\frac{g_{0}\alpha D}{2}}$$

如果知道起始血管的PO2,那么第n级分支的氧 分压为

$$PO_{2,n}^{1/2} = PO_{2,0}^{1/2} - \sum_{1}^{n} k_{i}$$

$$\therefore Q_{i} = \frac{\pi d_{i}^{4} \Delta P_{i}}{128 \mu L_{i}}$$

$$\sum k_{i} = \frac{128 \mu}{F(H_{tc}, c)m_{t}} \sqrt{\frac{g_{0} \alpha D}{2}} \sum_{i=1}^{n} \frac{L_{i}^{2}}{n_{i} d_{i}^{3} \Delta P_{i}}$$

不同血管内血液和组织中的氧分压



Microvessel Order

Fig. 2. Measurement of the partial pressure of oxygen in blood and tissue in the hamster window preparation (mean \pm SEM). The blood vessels are grouped according to size and their position in the branching order in the microvascular network A1,2,3,4 are arterioles in descending size, Cap: capillaries, Vc: venous capillaries; Tis: tissue pO₂; and, Vl: large venules. A1 arterioles, which branch directly from small arteries, have a nominal diameter of 55 μ m. The large Vl venules have 80 μ m diameter. Measurements were made optically with the phosphorescence quenching technique and reported by Kerger *et al.*, 1996. The venules, which collect the blood from the tissue, have higher pO₂ than the capillaries because of the presence of flow shunts that bring arteriolar blood directly into the venules, and the diffusion of oxygen between arterioles and parallel running venules.

血管分支中氧分压的计算公式



microcirculation reacts by constricting the arterioles, causing hypertension.

脑组织中的氧传输 谷下一夫

制作切片并获取图片

◆运用甲基丙烯酸树脂(methacrylate resin) 作为铸型剂使微血管铸型。这种树脂在扫描电镜下微血管清晰可见
◆血管铸型后,运用专用的切片装置(rodent brain matrix) 将脑组织切成1毫米厚的切片,然后再将每一部分切片切成
0.3 mm厚的切片,运用激光共聚焦显微镜对切片进行观察
◆在Adobe Photoshop 下,对获得的切片图像进行图像处理,对不同区域的皮质中血管数量进行计算。考察不同皮质深度的血管密度。

◆运用微电极测量氧分压。

◆运用Fluent软件分析皮质中不同深度氧分压的分布

大脑皮质切片的位置和所获得的切片



组织部位:

somatosensory cortex

躯干

- HL: hind limb 后肢
- FL: fore limb 前肢
- BF: barrel field 臀部
- Tr: trunk

B Figure 25 Begma: 1:80 mm 1.mm

由大脑切片重构而成的表层和中层的微血管网



Fig. 2 Geometries of arteriole and capillaries for upper and middle layers.

大脑皮质臀部感觉区域中的血管密度







Fig.1 Tip of the oxygen microelectrode developed by Baumgartl and Lubbers.

不同体感区域氧分压在皮质不同深度的变化





刺激身体不同部位后,大脑皮质不同区域氧分压 随时间的变化

对大鼠不同部位进行刺激后, 大脑皮质体感区域氧分压的最高值



数值分析的边界条件 ◆在立方体边界区域氧分压梯度为零 ◆在表面至皮层的100微米的上层皮质区域,氧消 耗率为零 ◆壁面处的氧通量连续 ◆在上层区域 细动脉进口氧分压 100 mmHg 毛细血管进口氧分压 50mmHg 大脑血流量 153 cm³/100g/min ◆在中层区域 细动脉进口氧分压 85 mmHg 毛细血管进口氧分压 50 mmHg 大脑血流量 247 cm³/100g/min

不同皮质层氧分压的空间分布

