

循环温差法测定生物组织活性的实验研究

于丽娜 刘静 周一欣

摘要 如何测定低温损伤后的生物材料活性是低温保存和低温医疗领域中的重要课题。本文提出了循环温差法测定生物组织活性的新方法, 并进行了初步的实验研究, 给出了定量评价生物组织活性的数学关联式。实验证明, 该方法所采用的测试装置简单, 易于操作, 结果稳定可靠, 重复性较好。本文最后指出了进一步的改进方法。

关键词 生物组织 活性检测 循环温差 低温保存 低温损伤

中图分类号 R138.03

文献标识码 A

文章编号 1002-3208 (2006) 02-0151-05

Experimental Study on the Method of Using Cyclic Temperature Difference to Detect the Viability of Biological Materials

YU Lina, LIU Jing, ZHOU Yixin. Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080

【Abstract】 Detection of the viability of biological materials due to freeze injury is very important in the fields of cryo-preservation and cryo-medicine. In this paper, a new method of using cyclic temperature difference for the viability evaluation was proposed, and preliminary experiments were performed to demonstrate the new approach. Mathematical relations were suggested and proved to be useful to quantitatively characterize the viability of biological tissues as well. It was shown that the device constructed was simple in structure and easy to control, and the obtained results are reliable and repeatable. Finally, strategies for improving the method and the device were also suggested.

【Key words】 biological tissue viability detection cyclic temperature difference cryopreservation freeze injury

在低温保存和低温医疗领域中, 生物材料按照不同的方法实施相应的降温过程, 来达到保护或破坏生物材料的目的。在冷冻过程中, 生物材料容易受到低温损伤, 从而导致活性降低。如何快速评价低温损伤, 测定生物组织冷冻后的活性是低温保存和低温医疗中亟待解决的重要课题。迄今为止, 已经有多种方法用于测定生物组织活性, 包括^[1~5]形态和生理学观察法、生化检测法、荧光法、组分分析法、核磁共振法等。其中, 形态和生理学观察方法简便易行, 但受人为因素影响较大, 不容易定量分析; 生化方法、荧光法、核磁共振法及组分分析的方法定量化程度高, 但均须借助较昂贵的仪器设备, 实验复杂, 成本较高。最近, 作者提出基于降温动力学曲线评价生物组织活性的方法^[6], 有可能成为一种快速有效的简捷方法, 但还需在消除系统内部干扰, 提高结果的稳定性和重复性上继续改

进。此外, 电阻抗测量法也是测定生物组织活性的有效方法^[7], 但在定量描述生物组织活性上也存在一定困难, 需要进一步探索电阻抗变化与生物组织损伤的关系。本文提出了一种快速有效检测生物组织活性的方法——循环温差法, 设计制造了相应的实验装置并进行了初步测试。结果表明, 该装置简单, 方法易行, 重复性和定量化程度较高, 有望发展成为一种微分析器件。

1 实验装置

如图 1 所示, 整个实验装置主要包括三部分: 样品系统、制冷器系统和温度信号监测系统。具体分为如下 8 个部分, 即: 铜片 1、3, 样品 2, 半导体制冷片 4, 肋状散热片 5, 温度传感器 6, 数据采集仪 7, 计算机 8。其中铜片 1 用于固定热电偶, 并保护样品表面减少外界影响, 铜片 3 也用于固定下表面的热电偶, 另外由于其良好的导热性还能够起到均温的作用, 减小由于半导体制冷片表面温度不均匀引起的样品下表面温度不均。热电偶固定于铜片中央, 样品夹在两铜片之间。铜片 3 与半导体

基金项目: 国家自然科学基金 (50325622) 资助

作者单位: 中国科学院理化技术研究所 (北京 100080)

作者简介: 于丽娜 (1980—), 女, 主要从事生物材料低温保存技术中的基础与应用研究。

制冷片 4 之间用硅油粘结，以减小界面上的导热热阻。散热片置于恒温水浴中，并保持在室温 22.5 。

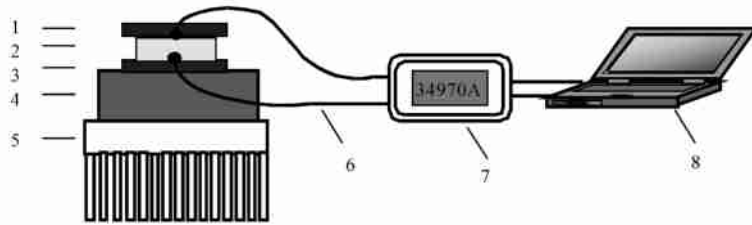


图 1 实验装置示意图

Fig 1 Schematic diagram of the device for experimental study

2 典型实验过程及结果

2.1 实验过程

以鸡肉为例，先将其切成 20mm × 20mm × 2.5mm 的薄片并在室温中保持温度稳定，注意组织表面应尽量平整，以保证与铜片接触良好。按照图 1 所示，安置好样品。打开数据采集仪，开始采集温度。1min 后开启半导体制冷片的电源，电源采用稳定性好的恒流源，使电流恒定保持 1.5A，4min 后关闭电源，使样品在空气中自然复温。

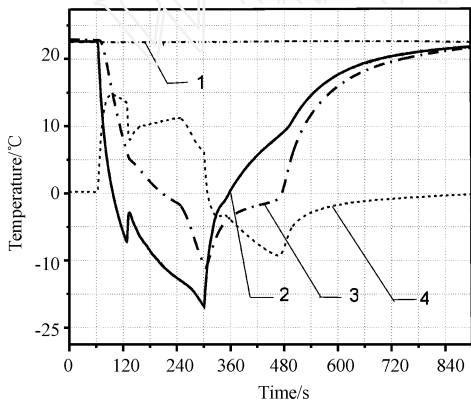


图 2 试样冷冻-复温过程的典型温度曲线

Fig 2 The typical temperature curve of the sample during the freezing-thawing cycle

整个试样冷冻复温过程的典型温度曲线如图 2 所示。曲线 1 为室温，基本保持 22.5 不变，曲线 2、3 分别为试样的下表面和上表面的温度曲线。曲线 4 为计算出的试样的上下表面的温度差。从中可以看出，在 60s 时，半导体制冷片开始制冷，下表面温度随之迅速下降，由于样品的热导率较小，热容较大，上表面的温度下降存在延迟，在 30s 左右的时间里，上下表面的温度差由 0 迅速上升到 14.8 ，并在降温过程中一直保持 5 以上的温

差。在 120s 时，下表面出现最大过冷点 - 7.5 ，然后由于样品发生相变释热，下表面温度突然回升 4 左右后，之后又逐步下降，而上表面由于热传导的延迟作用，其温度未有较大波动。反映在上下表面的温度差曲线 4 上，则出现一个下降的峰，体现了过冷后相变这一过程。在自然复温过程中，组织下表面由于与半导体制冷片及其散热器直接接触，而制冷器有一定余热，故升温较快。上表面与空气自然对流，升温较慢。至 900s 时样品基本恢复室温，停止数据采集。从整个过程的分析可以看出，试样上下表面的温差不仅与样品经历的环境温度有关，而且受到样品的热导率、比热、相变潜热等特性的影响。如果样品受到低温损伤，其内部细胞膜结构、细胞骨架或水分变化必然引起细胞特性的改变，从而反映在样品表面温差上。这说明在冷却复温过程中监测样品上下表面温差能够反映出生物材料的特性，从而以此作为一种崭新的评价低温损伤后生物材料活性的指标，是切实可行的。其定量标准通过下面的实验进一步予以阐述。

实验安排如下：将新鲜鸡肉按上述步骤准备好，并进行一次冷冻 - 复温实验，采集温度信号。待样品上下表面温度均恢复室温，停止数据采集。再置于室温 3min，消除样品内部温度不均一性的影响。然后按照与第一次冷冻相同的条件进行再次冷冻 - 复温循环，采集温度信号，注意保持两次循环过程中室温及恒温水浴温度基本不变，并固定半导体制冷片的输入功率，而热电偶及整个实验装置中各个部件相对位置不变，尽量减少人为因素对系统的影响。待第二个温度循环结束后，按照上述要求进行第三次冷冻 - 复温循环，直至温度再度恢复室温为止，停止数据采集。

2.2 结果

对所得数据进行处理，得出三次温度循环中样

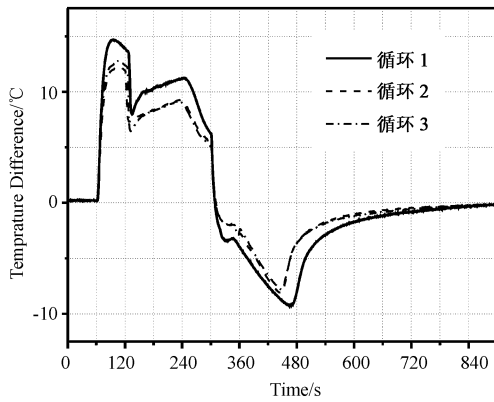


图 3 三次降温-复温循环中样品上下表面温差随时间变化曲线
(样品为鸡肉, 尺寸为 20mm ×20mm ×2.5mm)

Fig 3 Transient temperature difference curves of the sample surfaces during three freezing-thawing cycles

品上下表面温差随时间变化曲线, 如图 3 所示。比较三次循环的温差曲线, 可以看出, 其基本形状与图 2 中的曲线 4 大体相似。但差异也很明显。首先, 第一次温度循环中, 上下表面温差在 90s 左右达到最大值, 为 14.7 °C, 而第二次和第三次降温-复温循环中温差仅为 11.9 °C 和 12.1 °C; 在经历了相变过程后继续降温, 第一次降温循环中上下表面的温差也明显高于第二和第三次循环 (3 °C 左右)。在复温过程中, 第一个循环上下表面温差最低点出现在 467s 处, 滞后于第二和第三循环 23s 和 27s, 而温差最低点为 -9.27 °C, 分别低于第二和第三循环 1.13 °C 和 1.45 °C。从以上数据分析可以看出, 第一次温度循环在降温过程中样品上下表面温差明显高于第二第三次降温循环, 而第二、第三次温度循环的温差曲线差异很小。这说明在经过第一次的冷冻-复温过程之后, 生物材料活性受到损伤, 其特性发生了不可逆转变, 造成第二次循环温差曲线与第一次循环温差曲线的巨大差异, 这一差异直观而明确地反映了这一低温损伤造成的生物组织特性的改变, 从而可以作为评价生物材料活性的指征; 而第三次循环的温差曲线与第二次循环的温差曲线几乎重合, 也证明了生物材料内部发生不可逆转变, 完全失去生物活性后, 这种连续的降温循环温差曲线之间的差异必然很小。

3 评判标准及其影响因素

首先, 如上结果所述, 样品上下表面温度差的最大点 TD_{max} , 在几次降温循环中发生了较大变化,

可以作为活性评判的依据之一。进一步对降温过程 (图 3 中为 60s ~ 300s) 过程中的温差曲线对时间进行积分, 可以更明显地反映三个循环过程的区别, 即

$$P_N = \int_{t_1}^{t_2} TD dt \quad N = 1, 2, 3, \dots \quad (1)$$

其中 t_1 、 t_2 分别代表样品降温阶段的起始时间和终了时间, TD 为样品上下表面温度差, N 为温度循环的标记次数。 P_N 为样品降温阶段的上下表面温差曲线对时间的积分。计算得到第一、二、三次降温-复温循环的降温过程曲线积分分别为: 2521.3、2034.6 和 2003.3 (°C·s)。连续两个循环间曲线积分变化率按下式计算:

$$r_N = \frac{P_N - P_{N+1}}{P_N} \times 100\% \quad N = 1, 2, 3, \dots \quad (2)$$

按照上式计算图 3 的温度曲线, 得第一、二次循环的温差曲线积分变化率: $r_1 = 19.31\%$, 第二、三次循环的温差曲线积分变化率 $r_2 = 1.53\%$ 。可见, 温差曲线积分变化率 r_N 更加清楚的体现了与生物组织活性的正相关性, 即可以认为, 具有较大 r_N 的生物组织, 在第 N 次降温-复温循环之前具有较高的活性。相反, 则可认为其活性较低。

第 1 个至第 N 个循环总的温差曲线积分变化率 r_{1-N} 定义为:

$$r_{1-N} = \frac{P_1 - P_N}{P_1} \times 100\% \quad N = 1, 2, 3, \dots \quad (3)$$

这一参数代表了待测样品在检测过程中的总的活性变化, 可以作为活性定量化的重要参数。

由此, 提出循环温差法进行生物组织活性测定的两个关键参数——样品两面最大温差 TD_{max} 和总的温差曲线积分变化率 r_{1-N} 。温差最大值虽是最直观的生物组织活性的评判标准, 但它是绝对数值, 实验过程中会因降温速率、测温点的变化而变化, 没有统一的评价标准, 可以作为一个辅助的参数进行活性评价。而 r_{1-N} 则是数个循环过程的比值, 从一定程度上消除了上述因素的影响, 其大小仅与样品的特性有关, 可以作为表征生物组织活性的定量参数。将新鲜生物组织的 r_{1-N}^0 与完全失去活性的生物组织 r_{1-N} ($r_{1-N} = 0$) 之间等分为 10 段, 可得出生物组织活性评价的 10 级标准。通过测定和计算待测样品的 r_{1-N} 可以定量得到其活性程度。

总结上述实验过程和实验结果，可设定循环温差法测定生物组织活性的关键步骤为：至少应该包含三个或三个以上的降温 - 复温循环。首先第一次降温 - 复温循环是必要的，它体现了被测样品本身的特性。经过第一次降温 - 复温循环后，生物样品受到低温损伤，活性变低；进行第二次和第三次降温 - 复温循环，如果其差异很小（可以用 r_2 作为定量标准，对于鸡肉来说，总结实验结果，认为 $r_2 < 2\%$ 为评判标准），则可认为第三次降温循环可以作为参比曲线，与第一次降温 - 复温循环的温差曲线比较，计算 r_{1-N} 的值（此处 $N=3$ ），作为生物组织活性评价的参数。如果第二次和第三次降温 - 复温循环，其差异较大（ $r_2 > 2\%$ ），则必须进行第四次降温循环，直至找到符合上述要求的参比曲线 N 为止。计算 r_{1-N} 的值，检验其所处于的活性标准的具体区域，就可定量得到其活性程度。

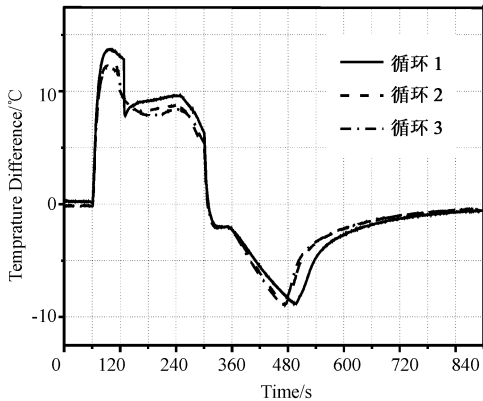


图 4 三次降温-复温循环中样品上下表面温差随时间变化曲线
(样品为鱼肉，尺寸为 20mm × 20mm × 2.5mm)

Fig 4 Transient temperature difference curves of the sample surfaces during three freezing-thawing cycles
(The sample was fish muscle and cut with geometry dimension of 20mm × 20mm × 2.5mm)

为了检验样品种类对两个重要参数——上下表面温差最大值 ID_{max} 和 r_{1-N} 的影响，取与图 2、3 实验中同样尺寸的新鲜鱼肉作为样品，在同样的降温程序下重复上述实验。结果如图 4 所示。在第一、二、三次降温 - 复温循环中，样品两面最大温差分别为：13.7，12.3 和 12.1，比相同尺寸下的鸡肉的最大温差低 1 左右，降温过程曲线积分分别为：2330.8、2067.2 和 2036.0 (s)。计算连续两个循环间曲线积分变化率，分别为 $r_1 = 11.31\%$ ，

$r_2 = 1.51\%$ 。由于第二、三个循环间曲线积分变化率已小于 2%，认为其经历第三个循环后已经基本失去活性，计算 r_{1-N} 的值 ($N=3$): $r_{1-3} = 12.65\%$ 。可以看出，对于新鲜的样品，不同种类的样品具有不同的 ID_{max} 和 r_{1-N} ，其大小仅与样品的种类有关。不同种类样品之间的 ID_{max} 和 r_{1-N} 的大小不具有可比性。而对于同一种样品来说，在几何尺寸、降温程序固定的情况下其新鲜样品的 r_{1-N}^0 是固定的，这样，新鲜生物组织的 r_{1-N}^0 与完全失去活性的生物组织 $r_{1-N} (r_{1-N} = 0)$ 之间等分为 10 段，得出的生物组织活性评价的 10 级标准也就是固定的。这一标准是检验待测样品活性等级的客观标准，仅与样品种类有关。不同种类的生物组织，都有不同的活性等级评价标准，应由实验精确测定。

4 讨论

本文提出了一种新的利用降温 - 复温过程中监测生物样品的上下表面温差进行生物组织活性评定的方法——循环温差法。设计制作了简单的实验装置，以鸡肉、鱼肉为样品进行了初步实验。如果保持样品尺寸和降温升温程序固定，特定种类生物样品具有特定的活性评价标准，利用循环温差法测定和计算最大温差 ID_{max} 和总的温差曲线积分变化率 r_{1-N} ，就可确定其活性等级。与基于降温动力学曲线快速确定生物组织活性的方法^[6] (FCBM) 相比，循环温差法测定生物组织活性的不同之处在于，循环温差法更加直观的揭示了生物组织由于活性变化引起的传热过程的改变，其活性评价可以量化，其量化参数 r_{1-N} 在尺寸固定、降温复温程序固定的情况下仅与样品种类有关，量化程度高。在实验装置上也存在明显区别：本文装置中热电偶通过铜片固定，与样品表面接触紧密，测温点固定，受外界温度波动干扰小。克服了 FCBM 中由于样品表面易发生形变，仅依靠单一测温点获取温度信息，因而温度信号干扰较大的缺点，在稳定性和重复性方面有了很大提高。

本文中的实验作为原理性试验，采用了 1.5A 的恒定电流对生物样品进行冷却，时间为 4min。应当说明的是，不同的降温速率下，生物样品的损坏程度是不同的，从而物性变化程度也不同。为了

使该方法能够发挥最大的评价准确性，应该针对不同种类的生物样品，探索和选择最佳的冷却程序和复温程序。

应当说明的是，该方法不仅可以用于测定低温保存或低温医疗中，遭受低温损伤的生物组织活性评价，也可用于热疗等热损伤或者由机械损伤或其他因素引起的生物组织活性变化的检测。为确定其具体的评价标准，应开展进一步的实验。此外，本文中设计制作的实验装置是针对样品为固体的实验材料，对于液态的生物材料，如血液、蛋白质溶液等，可以根据上述原理作改进设计。此外，由于循环温差法可以反映生物材料内部的组织结构变化，其应用领域还可进一步拓宽，如生物材料内部结构及组分分析、力学特性检测等方面，都是值得探索的方向。特别是，本文设计的实验装置结构简单紧凑，易于微型化和集成化；整个过程仅需电流控制，可以实现系统的自动控制，故其在生物芯片和微分析系统方面具有很好的应用前景，这也是有待开展的工作方向。

5 结 论

(1) 在生物组织受到低温损伤后，在经历降温、复温循环时，其样品上下表面温差与新鲜样品存在差异，其差异大小与组织活性存在定量关系。

(2) 将新鲜生物组织的 r_{1-N}^0 与完全失去活性的生物组织 r_{1-N} ($r_{1-N} = 0$) 之间等分为 10 段，

可得出生物组织活性评价的 10 级标准。

(3) 利用循环温差法及其定量化参数 r_{1-N} 能够快速准确测定生物组织活性。

参考文献

- [1] McKinnon AO, Squires EL. Morphologic assessment of the equine embryo. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1988, 192: 401 - 406
- [2] Ulreich JB, Patel MR, Maveddat M, Boles JL. Dimethyl sulfoxide protects organs from loss of viability induced by warm ischemia. *Toxicology Letters*, 1998, 95 (1): 191
- [3] Ananta E, Heinz V and Knorr D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology*, 2004, 21 (5): 567 - 577
- [4] Bradbury DA, Simmons ID, Slater KJ. Measurement of the ADP: ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis *Journal of Immunological Methods*, 2000, 240: 79 - 92
- [5] John AA, James HB, et al. A low-volume platform for cell-respirometric screening based on quenched-luminescence oxygen sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19: 1529 - 1535
- [6] Liu J, Zhou YX. Freezing curve-based monitoring to quickly evaluate the viability of biological materials subject to freezing or thermal injury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377: 173 - 181
- [7] Yu TH, Liu J, Zhou YX. Using electrical impedance detection to evaluate the viability of biomaterials subject to freezing or thermal injury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378: 1793 - 1800

(2004-11-25 收稿, 2005-01-11 修回)