

低温损伤细胞的机制研究进展

杨鹏飞¹综述,刘宝林²审校

(1. 国家食品药品监督管理局医疗器械审评中心,北京 100020;

2. 上海理工大学医疗器械与食品学院,上海 200093)

关键词:低温损伤; 细胞; 机制; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)13-1618-03

低温医疗即利用低温治疗疾病。早在公元前 2 500 年之前,埃及人就利用低温治疗头部的复杂骨折和胸部的炎性反应,也有记载曾利用冰治疗出血和浮肿^[1]。19 世纪中期,英国医生 Arnott^[2]首次利用温度为-24~-18℃的含有碎冰的盐水溶液治疗乳腺癌和宫颈癌,这是组织冷冻技术在治疗疾病方面的最早尝试。随着气体液化技术的建立,低温医疗器械逐渐得以应用。尤其是在 1961 年,美国神经外科医生 Cooper 设计了液氮医疗冷冻设备,标志低温医疗器械进入一个新时代。20 世纪 90 年代,多冷冻探针系统的研制成功以及图像监测的普及更使低温医疗技术有了一个突破。在许多情况下,低温医疗器械成为微创介入治疗肿瘤的最佳选择^[3]。总之,随着制冷低温技术的发展、低温医疗设备的更新和优化以及低温医疗的基础研究与临床研究的深入,低温医疗技术将进入一个崭新的时代。本文将对低温医疗器械对细胞及组织的损伤机制进行归纳总结。

1 低温生物医学

低温生物医学是研究温度降低对人类生命过程的影响,以及低温技术应用于疾病治疗的学科,包括人体冻伤、低温麻醉、低温脑复苏,人体重要细胞、组织、器官的低温保存、移植及临床应用,低体温医疗,利用低温手术器械杀伤异常组织(如肿瘤),低温标测(cryomapping),低温止痛等^[4-5]。就本质而言,低温生物医学研究的是温度变化对生物体的影响。生物体的主要成分是水,细胞也常被放置于溶液中进行降温保存。温度降低会导致细胞所处的溶液中形成冰晶和冰晶生长、溶液浓度升高等变化,可能引起细胞严重脱水或细胞内水结冰,都可能损伤细胞并使之死亡。

2 低温损伤细胞的机制

无论是对细胞的低温保存,还是对病变细胞的低温损伤,冷冻和复温过程均是造成细胞损伤的关键。因此,深入研究冷冻-复温过程中细胞受损的机制是低温生物医学的重要研究内容之一。了解了损伤机制,才能在低温保存过程中减少或尽量避免细胞损伤,也才能在低温外科手术中最大程度地杀死病变细胞而达到治疗的目的。

损伤机制一般分为两类:一类为直接效应,即低温环境直接影响细胞,使细胞产生损伤;另外一类为间接效应,即低温环境导致胞外成分或组织(如胞外基质、血管等)的变化或损伤,进而影响到细胞,最终导致细胞损伤(见图 1)。

2.1 直接效应 研究表明,细胞在降温过程中的死亡受多方面的影响,而细胞死亡的过程有可能持续数小时甚至数天。一般而言,低温环境直接导致细胞死亡的机制有以下 3 种:与冰晶相关的细胞破裂(ice-related cell rupture)、细胞坏死(necrosis)以及细胞凋亡(apoptosis)^[5]。

2.1.1 与冰晶相关的细胞破裂 在对细胞或组织的冷冻过程

中,冰晶的形成、冰晶的增加、冰晶的相互接触和挤压以及冰晶的再结晶等,均会造成细胞膜或细胞器的损伤,从而导致细胞产生物理性破裂^[6],特别是对细胞或组织以较快的降温速率降至-20℃以下时。因此,冰晶的形成是导致细胞死亡的最主要因素。著名的低温生物学家 Meryman 在其发表于《科学》杂志的一篇文章中指出:组织内冰晶的形成是随后产生的所有生物解剖学和生理学后遗症的前提^[7]。在快速降温过程中,细胞内的水分还未离开细胞就已经到达相变温度而形成胞内冰。由于胞内冰可能破坏细胞器和细胞膜,并在复温过程中发生再结晶,所以胞内冰对细胞而言是致命的。在慢速降温过程中,当组织温度降低到相变温度时,细胞外的水分首先结晶,导致细胞外溶液中水分减少,浓度增加,使细胞处于高渗环境中,细胞内的水分逐渐渗出;随着冻结过程的继续,冰晶体积逐步增大,并通过相互接触、挤压等作用导致细胞膜损伤。多位学者通过对慢速冷冻的进一步研究,证实冰晶在生长过程中与细胞间产生的机械作用是造成冷冻损伤的又一因素^[8-11]。Ishiguro 和 Rubinsky^[12]深入研究了这种机械性损伤的机制,发现在生理盐水与红细胞构成的悬液慢速冻结的过程中,细胞所受的机械性损伤确实存在,且单纯机械性损伤即可导致细胞死亡。

因此,深入研究与冰晶破坏相关的物理性细胞损伤是低温医学生物学的重要工作。在低温保存过程中,低温保护剂(cryoprotective agent)可以阻止胞内冰的生成,因此被广泛应用于保存各种细胞和组织^[13-14]。有研究表明,通过应用低温保护剂(如甘油、二甲基亚砷或丙二醇等),结合细胞内自由水的作用,可以影响冰晶的形成或生长,从而控制或阻止胞内冰的形成^[13]。

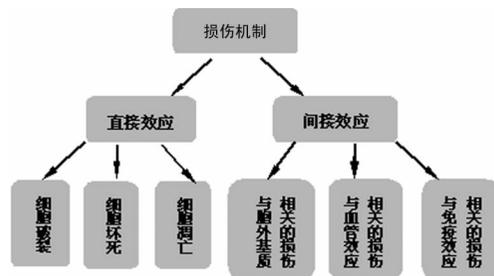


图 1 细胞损伤机制

2.1.2 细胞坏死 除了与冰晶相关的细胞破裂损伤外,细胞坏死也是导致细胞保存失败或病变细胞死亡的原因之一。细胞坏死的主要特征是细胞或细胞器的膨胀、细胞膜完整性的缺失、溶酶体的破裂以及由于核酸内切酶导致 DNA 随机降解使得细胞发生溶解^[15]。

细胞膜一旦失去完整性,细胞即开始溶解,释放细胞质,并激活一系列免疫及炎性反应。这种形式的细胞死亡与细胞受

到多种外界刺激因素有关,如局部缺血、渗透压冲击、热应力、离子解离及毒性物质等。而在低体温或低温保存过程中,上述刺激因素均可导致细胞死亡。因此,细胞坏死也被形象地比喻为“细胞谋杀”,也被认为是低温手术导致细胞死亡的原因之一^[16-17]。在细胞坏死过程中,酶(蛋白酶和核酸酶)的失控可导致蛋白质和基因裂解^[18]。此外,在复温过程中,随着冰晶的融化,细胞因水分的进入而膨胀,且渗透压的冲击很可能最终导致细胞坏死。

2.1.3 细胞凋亡 细胞凋亡的概念最初由 Kerr 等^[18]提出,是细胞死亡的另一种模式。细胞凋亡与细胞坏死在形态和分子机制上有较大差异。细胞凋亡具有主动性、内在性和可调控性,可在某些生理和病理条件下发生;而细胞坏死则通常是被动的,多因外来损伤因素所导致。二者具有明显的形态学区别:多数情况下,坏死常呈同一区域或一大片细胞破坏,而凋亡则通常局限在细胞范围内,且一般不会引起炎症反应。此外,凋亡细胞内的核酸内切酶被激活而导致染色体 DNA 在核小体间断裂,因此在 DNA 电泳图上出现分子大小为 180~200 bp 或其整数倍的 DNA 梯形带。

过去的研究认为,细胞凋亡和坏死是细胞死亡的两种相互排斥的选择,即细胞或者选择凋亡,或者选择坏死,而最新的许多研究表明,二者间的区分并不绝对,常会表现出一些相互关联的现象^[19-20],如:体外实验中,某些刺激在低剂量时可引起凋亡,高剂量时则导致坏死;很多刺激,如热休克、缺氧、病毒、射线、氮氧化物等,均可导致凋亡和坏死;在组织水平,坏死区域往往被凋亡区域包围等等。此外,从生化水平上看,二者也有一定的联系,如细胞内 ATP 的衰竭,可使细胞从凋亡模式转向坏死模式^[20]。

最近的一些研究表明,当对前列腺癌细胞进行降温且温度并没有低至可以立即杀死所有细胞的时候,细胞凋亡成为一种细胞死亡的重要机制^[21]。在对结肠癌细胞的体外降温实验中也发现亚致死温度会导致细胞的凋亡^[22]。关于冷冻导致细胞凋亡的实验研究大多进行于体外,体内的研究很少。但是,Steinbach 等^[23]在研究中描述了冻结组织外周细胞的凋亡。Baust 等^[24]在研究中讨论了低温损伤分子学基础,并描述了细胞凋亡和坏死两种机制在低温损伤过程中发挥的作用。文献以前列腺癌细胞 PC-3 作为体内模型用于研究冷冻温度对细胞死亡过程中分子机制方面的影响。PC-3 细胞暴露在一 80~37 °C 这样的温度区间中,暴露在一 5 °C 以上的细胞由于 DNA 片段非随机排列而判断为凋亡,而在一 15 °C 以下的细胞 DNA 随机排列而判断为死亡。并且当温度为一 5 °C 以上时,一种凋亡抑制剂 IDN-1529 完全抑制了 PC-3 细胞的死亡,而当温度为-75~-10 °C 时,这种抑制剂同样抑制了细胞的死亡。

2.2 间接效应 间接效应是指与细胞外基质相关的细胞损伤、与血管效应相关的细胞损伤以及由于免疫效应导致的病变细胞组织的死亡等多种效应。由于细胞存在于组织当中,因此它与组织各部分都存在着一定的关联。如果在低温环境中,这种关联被破坏或者相应组织受破坏,细胞必然会受到一定的影响,如果破坏程度严重,则会导致细胞最终死亡。

2.2.1 与细胞外基质相关的细胞损伤 一些体内实验发现细胞的损伤与细胞外基质相关,细胞与细胞外基质是相互关联、相互依存的。细胞产生细胞外基质,而细胞外基质通过单个、多个分子与胞内纤维或细胞骨架相连,为细胞提供三维结构供其生长^[25]。当细胞与细胞外基质之间的连接受到温度的影响,或是受到冰晶的机械损伤时,细胞则会因为失去胞外基

质的支持而变得脆弱,很可能最终死亡^[26]。在 Yang 等^[27]的研究中发现在对胚胎干细胞的低温保存过程中,如果复温后的细胞失去胞外基质,则很难继续增殖并最终死亡。而如果复温后的细胞周围存在胞外基质,并且多个细胞通过胞外基质相互黏附在一起,这样的细胞群落则有可能存活、增殖。

2.2.2 与血管效应相关的细胞坏死 当进行体内低温损伤的研究时,血管效应是另一个导致细胞死亡的因素。血管效应是指经低温冷冻-复温后得病变组织因为微循环中的血栓形成而进一步坏死。在组织温度降低的过程中,血管首先收缩,血液流动速度降低。当组织被冻结时,血液循环停止。应用肝组织和胸部组织进行体外实验时,发现血管组织中有冰晶的形成,且冰晶在没有细胞膜形成障碍的区域会优先通过血管系统进行生长^[28]。

当组织复温后,血液循环重新开始进行,组织在较短时间内会有充血现象。而内皮细胞的损伤会导致毛细血管渗透性增大、浮肿、血小板凝聚,最终使得血管在 30~60 min 内被阻塞。低温造成微循环血栓形成的机制,大致可从下列两方面来分析。首先,管壁内皮细胞受损引起促凝作用。血管管壁正常的内皮细胞具有抗凝和促凝的双重特征,也就是说内皮细胞既具有一系列的防止血液在血管内凝固的机能,又具有促凝的“潜能”,因为它能合成促凝的组织因子,在正常情况下,抗凝起主要作用,只有当内皮细胞受损时可触发内源性凝血过程,而且由于组织因子的释出,又触发外源性凝血途径。另外,血液流速降低引起的促凝作用。血小板破裂后的产物对于凝血过程有很强的促进作用。若血小板和血管管壁内皮接触并被激活,就会产生血小板黏附,随之就发生血小板聚集,形成血小板血栓。血管中血液各种成分在管内的分布是随流速变化的。在正常流速情况下,红细胞、白细胞是在血流的中轴流动,稍外层是血小板,而最外的边缘流是血浆。这个边缘血浆层阻止了血小板和血管内壁的接触。但当流速降低时,许多血小板进入了边缘流,增加了与管壁内皮接触的机会,被内皮激活而产生黏附、聚集,进而形成血栓,造成血管腔阻塞。许多事实已表明,血流减慢是血栓形成的重要因素。总之,在低温的作用下,尽管有的血管或细胞未在作用的中心区域被直接损伤致死,它们仍然会由于被周围环境所阻塞得不到充分的养分而最终“饿死”^[4]。

2.2.3 免疫效应 免疫(immunity)是人和动物机体识别“非己”异物,并中和分解或排除这些异物,从而保持机体内环境平衡的一种复杂的生理保护功能。凡能刺激机体产生免疫反应的“非己”物质,被称为抗原(antigen)或免疫原(immunogen)。抗原具有特异性,某一抗原进入机体时可刺激机体产生特异性抗体(antibody)。人和动物组织受到损伤后都可能形成抗原刺激,受损伤的机体也就产生相应的抗体。

当组织受到低温损伤后会形成特异性抗原,这种抗原物质同样能对机体产生免疫反应,称之为低温免疫反应(cryoimmuneresponse)。实验已表明,某些低温手术后,会产生 IgM、IgG 及其他相近的免疫球蛋白等抗体;一些临床也表明,经低温外科不仅能用冷冻方法杀伤肿瘤细胞,而且有时还可能产生抗体使转移病灶退化或消失。关于低温作用产生抗体,有一些说法。有的认为在组织被冷冻损伤后,释放了大量的在正常情况下受控制的抗原进入血液或淋巴系统;有的认为低温起了佐剂(cryoadjuvant)的作用,使抗原物质发生分子变化^[4]。

参考文献

[1] Squazzi A, Bracco D. A historical account of the technical means

- used in cryotherapy[J]. Minn Med, 1974, 65(3): 3718-3722.
- [2] Arnott J. Practical illustrations of the remedial efficacy of a very low or anaesthetic temperature in cancer [J]. Lancet, 1850, 56(1409): 257-259.
- [3] Chang ZH, Finkelstein JJ, Ma HW, et al. Development of a high-performance multiple cryosurgical device [J]. Biomed Instrum Technol, 1994, 28(5): 383-390.
- [4] 华泽钊. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 1.
- [5] Baust JG, Baust JM. Advances in Biopreservation[M]. New York: CRC Press-Taylor and Francis Publishing, 2006: 1.
- [6] Gao DY, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells[J]. ILAR J, 2000, 41(4): 187-196.
- [7] Meryman HT. Mechanics of freezing in living cells and tissues[J]. Science, 1956, 124(3221): 515-521.
- [8] Nei T. Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures. I. Microscopic observation of hemolyzing erythrocytes during the freezing and thawing process[J]. Cryobiology, 1967, 4(3): 153-156.
- [9] Bronstein VL, Itkin YA, Ishkov GS. Rejection and capture of cells by ice crystals on freezing aqueous solutions[J]. J Cryst Growth, 1981, 52(2): 345-349.
- [10] Brower WE, Freund MJ, Baudino MD, et al. An hypothesis for survival of spermatozoa via encapsulation during planar front freezing[J]. Cryobiology, 1981, 18(3): 277-291.
- [11] Körber CH, Rau G, Cosman MD, et al. Interaction of particles and a moving ice-liquid interface[J]. J Cryst Growth, 1985, 72(3): 649-662.
- [12] Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification[J]. Cryobiology, 1994, 31(2): 483-500.
- [13] Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide[J]. Nature, 1959, 183(4672): 1394-1395.
- [14] Baust JM, Vogel MJ, Baust JG. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival[J]. Cell Transplant, 2001, 10(7): 561-571.
- [15] Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo[J]. J Cellular Biochem, 1995, 58(2): 181-190.
- [16] Baust JM, Van Buskirk, Baust JG. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000, 36(4): 262-270.
- [17] Gage AA, Baust JG. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery [J]. Cryobiology, 1998, 37(1): 171-186.
- [18] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013-2026.
- [19] Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, et al. The apoptosis-necrosis paradox: apoptogenic protease activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death[J]. Oncogene, 1997, 15(7): 1573-1581.
- [20] Leist M, Single B, Castoldi AF, et al. Intracellular adenosine triphosphate(ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis[J]. J Exp Med, 1997, 185(6): 1481-1486.
- [21] Bischof JC, Smith D, Pazhayannur PV, et al. Cryosurgery of Dunning AT-1 rat prostate tumor: thermal biophysical, and viability response at the cellular and tissue level[J]. Cryobiology, 1997, 34(1): 42.
- [22] Yang WI, Addona T, Nair DG, et al. Apoptosis induced by cryoinjury in human colorectal cancer cells is associated with mitochondrial dysfunction[J]. Int J Cancer, 2003, 103(2): 360-369.
- [23] Steinbach JP, Weissenberger J, Aguzzi A. Distinct phase of cryogenic tissue damage in the cerebral of wild-type and c-fos deficient mice[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1999, 25(3): 468-480.
- [24] Baust JG, Gage AA, Clarke DM, et al. Cryosurgery—a putative approach to molecular-based optimization[J]. Cryobiology, 2004, 48(2): 190-204.
- [25] Friel R, van der Sar S, Mee PJ. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(13): 1894-1903.
- [26] 刘静. 低温生物医学工程学原理[J]. 北京: 科学出版社, 2007: 1.
- [27] Yang PF, Hua TC, Wu J, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling[J]. Cryo Letters, 2006, 27(6): 361-368.
- [28] Rubinsky B, Lee CY, Bastacky J, et al. The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery[J]. Cryobiology, 1990, 27(1): 85-97.

(收稿日期: 2012-06-15)

• 综 述 •

内皮素在急性胆源性胰腺炎中发病机制的研究现状*

王丽兰¹综述, 赵永忠²审校

(桂林医学院附属医院: 1. 检验实验室; 2. 消化内科, 广西桂林 541001)

关键词: 急性胆源性胰腺炎; 发病机制; 微循环障碍

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 13. 036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1620-03

急性胆源性胰腺炎(ABP)占中国胰腺炎年发病率一半以上,有15%~30%发展成急性重型胰腺炎(SAP)^[1-3]。其发病机制一般认为系胆总管内结石、蛔虫、肿瘤及憩室等造成十二指肠壶腹部Oddi括约肌炎性反应、水肿、梗阻及狭窄等,使胆

汁反流入胰腺;或由于胆道感染、炎性渗出液经胆胰间淋巴管交通支蔓延至胰腺所致^[4]。有研究证明,胆汁反流和胰管内压力增高共同促进了ABP的发生^[5],因而导致胰腺微循环障碍、白细胞过度激活、细胞凋亡、肠道细菌移位,其中胆囊结石是

* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅计划课题项目(Z2010262)。