

冷冻对兔(犬)脑组织影响的观察

附属第二医院脑外科 孙国华 朱 焱 吕学正 陶祥洛

冷冻外科是六十年代发展起来的一门新学科,我国近年来已开始应用于临床各科,但在脑外科领域中的应用尚少报道。本文通过对兔(犬)脑组织进行冷冻实验,探讨脑组织冷冻后的病理变化和生物学效应,并探索用国产冷冻探头治疗帕金森氏病所应选用的冷冻剂量,为临床提供冷冻技术治疗锥体外系疾病的参考数据。

实验设备与材料

实验设备:使用杭州制氧机研究所、杭州无线电八厂和本科协作研制的BY—Ⅱ型软管大型自控液氮治疗机。治疗温度可在 $0^{\circ}\text{C}\sim-196^{\circ}\text{C}$ 范围内随意选定和调节。冷冻探头为圆柱形,直径为2.4 mm。制冷剂为液态氮。

实验材料:兔32只,犬2只,雌雄不拘,兔体重1.5~2.5 kg,犬体重13 kg左右。

实验方法

一、操作方法 动物全麻后(氨基甲酸乙酯麻醉)在额后顶部中线旁0.5~1.0 cm处开颅。显露额顶区脑皮层,将探头垂直插入脑组织中,深约5~10 mm,启动冷冻喷液开关,使冷冻探头快速降温(平均约 $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$),达预定冷冻温度后开始计时。冷冻结束后自然复温解冻,移去冷冻探头,并按不同时间将动物处死,完整剖取脑组织,置于福马林液中固定3天,然后在冷冻部位作脑冠状切面,肉眼观察冷冻损伤灶大小,并将冷冻损伤区脑组织作石蜡包埋切片(苏木精—伊红液染色),在光镜下观察。

二、实验分组 实验分成以下6组。

第1组:兔8只,分别以 -30°C 、 -50°C (2只), -80°C (2只), -115°C 、 -140°C 及 -180°C 对兔脑进行冷冻。冷冻时间均为3分钟。冷冻结束后立即处死动物,剖取兔脑作病理检查。

第2组:兔10只,以 -50°C 冷冻兔脑3分钟,分别于冷冻后12小时、1、2、3、4、6、14、28、31及105天将动物处死,剖取兔脑作病理检查。

第3组:兔4只,以 -50°C 分别冷冻兔脑5、10、15及20分钟,冷冻结束后立即剖取兔脑作病理检查。

第4组:兔5只,以 -50°C 冷冻兔脑3分钟,分别于冷冻后10分钟和1、2、3、4天经颈动脉注射0.5%伊文思蓝2 ml,10分钟后剖取兔脑作病理检查。

第5组:兔2只,其中一只以 -50°C 重复冻融2次,每次均为3分钟,60小时后剖取兔脑;另一只以 -50°C 重复冻融3次,每次均为1分钟,60小时后剖取兔脑作病理检查。

第6组:兔3只,犬2只。兔分别以① -115°C 冷冻3分钟,56小时后剖取兔脑作病理检查;② -80°C 冷冻3分钟,24小时后剖取脑作病理检查;③ -20°C 冷冻1分钟,84小时后剖取脑作病理检查。犬分别以① -120°C 冷冻3分钟,72小时后剖取犬脑作病理检查;② -80°C 冷冻3分钟,9个月后剖取犬脑作病理检查。

实验结果

一、冷冻损伤灶大小

第1组：不同冷冻温度所致兔脑损伤灶大小见表1（冷冻时间均为3分钟）。

表1 冷冻温度与兔脑损伤灶大小比较

冷冻温度(℃)	30	-50	-80	-115	-140	-180
病灶直径(mm)	5.5	8	11	13	14	16.5

第2组：-50℃冷冻3分钟，12小时后冷冻损伤灶直径为7.5mm，1、2、3、4、6、14天均为7mm，28、31天为5mm，105天为4mm。

第3组：不同冷冻时间所致兔脑损伤灶的大小（温度均为-50℃）见表2。

表2 -50℃冷冻时间与兔脑损伤灶大小比较

冷冻时间(min)	病灶直径(mm)
5	9
10	10.5
15	11
20	11

第4组：-50℃冷冻3分钟，10分钟后经颈动脉注射0.5%伊文思蓝，冷冻损伤灶外围出现约1毫米染色；冷冻后1~4天注射者，冷冻灶周围未见有伊文思蓝染色。

第5组：重复冻融与单次冻融所致脑损伤灶大小见表3。

表3 -50℃冻融次数与脑损伤灶大小比较

冻融次数	1次	2次	3次
冻融时间(min)	1 3	1 3	1 3
病灶直径(mm)	5 8	11.5	9

第6组：兔脑-115℃冷冻3分钟，56小时后，脑损伤灶直径为12~13mm，-80℃冷冻3分钟，24小时后脑损伤灶直径为10mm。-20℃冷冻1分钟，84小时后脑损伤灶直径为2mm。犬脑-120℃冷冻3分钟，72小时后脑损伤灶直径为13mm；-80℃冷冻3分钟，

9个月后脑损伤灶直径为3×4mm。

二、脑组织病理变化

1.肉眼所见：当冷冻探头插入脑组织较浅表（约5mm深时）且温度较低时（<-100℃），皮层下组织中便形成一坚硬冰球，随着时间增长，冰球渐向外扩展（3~5分钟后冰球扩展速度即不显著）。冷冻结束，自然复温过程中，冰球开始融化，并有血性水样液体渗出。

冷冻后10分钟至3天，冷冻损伤灶呈卵圆形暗红色斑块状，与周围脑组织分界清楚，外观类似脑出血性梗死灶。冷冻后6天，冷冻灶呈灰褐色；14天呈灰黄蜂窝状圆形坏死灶，边界清晰；30天呈一囊腔，腔内残留有淡黄色组织；105天所见同上，但病灶略有缩小；9个月后，冷冻损伤灶仍呈卵圆形，灰黄色，质地略硬，边界清楚。

2.镜检结果：脑组织冷冻10分钟后，冷冻区神经元呈程度不等的固缩性改变，细胞核浓缩，核染色加深，部份胶质细胞肿胀，呈空泡状，神经纤维增粗，冷冻区中心部有点状或片状出血点，血管明显扩张、淤血。血管内皮轻度肿胀，血管周围间隙扩大，偶见部份血管四周有蛋白样液体渗出，脑组织见有疏松空网带或蜂窝状结构。

冷冻后12小时至14天，冷冻区脑组织细胞及细胞核溶解，组织结构消失，呈液化坏死。坏死区内有中性白细胞浸润及少量吞噬细胞，随着时间推移，吞噬细胞逐渐增多，大多位于损伤区边缘，部份侵入损伤区中，并可见到冷冻区小血管内有血栓形成。

冷冻后30天至9个月，脑组织坏死灶局限化，呈向心性收缩。坏死灶边缘出现胶质纤维伴较多吞噬细胞浸润，及新生小血管，时间越长，增生之胶质纤维越多。

以-20℃1分钟冷冻的兔脑组织，84小时后镜检结果发现冷冻区有局限性坏死灶，中性白细胞浸润，小血管内有血栓形成。

讨 论

一、脑组织冷冻后病理变化特征 根据实验观察,脑组织冷冻后的病理变化可分为三期:①坏死前期:此期在冷冻后12小时内,其病理变化以脑组织细胞变性为特点;②坏死期:此期在冷冻后12小时至14天,其病理变化以脑组织液化性坏死为主;③修复期:此期在冷冻后14天以后,其病理改变主要是冷冻坏死灶逐渐收缩,有大量吞噬细胞浸润,胶质纤维增生。时间越长,纤维越多,逐渐形成疤痕。

以上病理变化过程与脑的缺血性软化病理过程相类似。

二、冷冻导致脑组织细胞死亡的机理 目前尚有争论,根据有关资料报道⁽¹⁾,冷冻导致生物细胞死亡的机理主要是:①细胞内外冰晶形成所致的机械性损伤;②细胞脱水和皱缩;③电解质浓缩和酸碱度改变;④细胞膜脂蛋白成分变性;⑤温度休克等。

根据本实验研究,作者认为值得强调的是冷冻所致活体脑组织微循环障碍在导致脑组织坏死过程中的地位。作者在实验中发现冷冻时脑组织小血管收缩,融化时小血管扩张,渗透性增加,以致血液浓缩,血流缓慢、淤积,最后发生小血管内血栓形成。此外,从病理切片中观察到冷冻后血管内皮细胞肿胀,变形甚至剥脱,以致血管腔变窄,进而促使血管内血栓的形成。如以 $-30^{\circ}\text{C}\sim-180^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻脑组织,10分钟后组织学检查未见脑组织坏死,但12~24小时后,脑组织细胞则由不全性坏死至坏死完全。最近有些学者通过实验证实⁽²⁾,冷冻灭活正常细胞和肿瘤细胞(均为体外试验)的临界致死温度为 -40°C 3分钟。但作者实验中以 -20°C 1分钟冷冻兔脑组织,结果于冷冻后84小时检查发现冷冻区及其附近小血管明显扩张,血液郁滞并有血栓形成,局部脑组织已呈缺血性坏死。

Soejima等⁽³⁾用冷冻方法研究脑水肿过程,通过脑荧光素血管造影发现,脑组织局部冷冻后可出现进行性微循环障碍。也有人证实⁽⁴⁾,在复温后立即从冷冻创面采取的细胞移植能存活,而24小时后所采取的几乎全无细胞存活。综合以上所述,作者认为冷冻所致脑组织的坏死很大程度上是由组织的微循环障碍致使组织缺血缺氧的结果。

三、国产冷冻探头行丘脑冷冻切除术治疗帕金森氏病应选用的冷冻剂量 根据 Cooper^(5,6)通过数千例丘脑冷冻切除术治疗帕金森氏病取得的经验,认为丘脑冷冻损伤灶的大小以6~9mm直径为恰当。Krayenbuhl等⁽⁷⁾认为最大直径以9mm为宜。作者实验中用直径2.4mm的冷冻探头,以 -50°C 持续3分钟所致冷冻损伤灶直径为7~8mm,恰在Cooper等人报道的安全而有效的范围内,是治疗帕金森氏病可选用的参考冷冻剂量。

四、影响脑组织冷冻生物学效应的一些因素

1.关于脑组织单次冷冻持续时间问题:从表2可以看出,脑组织在冷冻开始后的头3分钟内,冷冻损伤区扩展最快,以后扩散速度显著减慢,15分钟后扩展极微。这与Gill等⁽⁸⁾报道的结果相符(Gill等认为冷冻区体积与冷冻时间成对数关系)。因此,认为脑组织单次冷冻持续时间以3分钟为宜。

2.重复冻一融对脑组织的影响:脑组织经反复冻融后,冷冻损伤区的范围比单次冻融时增大,组织坏死程度也比单次冻融严重。因此,临床上可以通过反复冻一融的方法来增大组织的破坏范围。但James⁽⁴⁾指出,重复冻融5~7次后,冷冻效应已达极限,其冷冻损伤范围为同一冷冻探头和温度在单次冷冻(无时间限制)所产生的最大作用的两倍。

3.实验结果表明,在一定范围内,冷冻损伤灶的大小与冷冻温度,冷冻持续时间和

蛇粉、蛇酒治疗麻风病四例 的临床疗效观察

朱丰雪* 谢兴夫* 王治林** 李盼望[△] 赵根焱^{△△}

麻风病是一种严重危害人民健康的传染病，据麻风防治与科研出国考察组的汇报资料，全世界现有麻风病人约一千二百万。属于第一世界的美国，现有麻风病人三千多人；属于第二世界的日本（现有八千多病人）、加拿大、英国、瑞士只有少数病人，因此，不再单独成立麻风防治系统，和采取隔离政策（日本除外）。属于第三世界的印度和泰国情况就不同了，印度人口六亿多，现有麻风病人约三百五十万，泰国人口四千多万，现有麻风病人四万。这两个国家麻风患病率较高，是他们公共卫生工作中的重要问题。

麻风在我国至少已流行二千多年。解放三十年来，由于党和政府的重视，开展了大规模的防治工作，使全国麻风病总数从解放初的五十多万人，下降到目前的二十万以下。

在治疗方面，国外几年前已开始了多种药物联合化疗，取得较高的疗效。我们三十年来一直采用氨苯砒（DDS）单一疗法，并在治疗过程中，相继发现不少病例对砒类药物产生过敏现象或耐药性，给治疗带来一定的困难。为在本世纪末消灭麻风病，探索更有效的治疗途径，实属当务之急。为此，我们根据古文记载、民间验方和前人的工作，于1981年5月至6月间研制成蛇粉（代号“8105”）和蛇酒（代号“8106”）。自1981年7月至1982年5月（共10个月）分别在余杭、青山两所麻风病院各选2例患者进行临床疗效观察，其结果细菌指数下降较快，疗效令人满意，现报道如下：

一、材料和制备方法

“8105”、“8106”均选用浙江的蝮蛇和赤链蛇作药。蝮蛇是一种剧毒蛇，肉性温、味甘；胆性寒、味苦；具有驱风祛湿、清肝明目之功，常用于恶风、恶疮、瘰疬和

* 生物学教研室

** 杭州市中心皮肤病防治站

[△] 余杭县地方病医院

^{△△} 青山县凤山医院

重复冻融的次数成正比的。

（实验承本院病理科苏泳元医师，外科教研室叶子良、华照楼、任顺兮等同志协助，特此致谢）

参 考 文 献

1. Holden H B: Practical cryosurgery. 1975
2. 浙江人民卫生实验院肿瘤免疫组等：冷冻对体外单层细胞的研究。第一届全国冷冻医疗和器械学术会议论

文汇编 第17页，1979

3. Tohru Soejima, et al: J Neurosurg 52 (2): 188, 1979
4. James Fraser: Progress in Surgery 14: 136, 1975
5. Cooper I S: J Neurosurg 10: 853, 1962
6. Cooper I S: JAMA 181: 600, 1962
7. Krayenbühl H Zurich, et al: Progress in Neurological Surgery 5: 171, 1973
8. Gill W, et al: Am Surg 36: 437, 1970