

## 物理场辅助生物材料冷冻保存技术研究进展

马亚红, 李 静, 丁桂荣, 徐胜龙, 周 艳, 郭国祯

第四军医大学放射医学教研室, 陕西 西安 710032

**【摘要】:** 低温保存技术对于胚胎干细胞、血液、珍稀动植物物种资源的长期保存, 以及人体器官活体移植等具有重要意义, 是现代生命科学中一个重要的研究领域。目前制约低温保存效果最关键因素是冷冻保存过程对生物组织产生的低温损伤, 主要有胞内外形成的冰晶造成的机械应力损伤及由此引起细胞内外渗透压的改变造成的溶质损伤等。抑制冰晶形成与生长的方法, 除了传统的添加低温保护剂和提高降温速率外, 近年来很多学者致力于通过一些物理因子(包括高压强、超声波、微波、静态或低频电磁场)干扰生物材料在低温冷冻过程中晶核的形成与冰晶的生长, 目的是达到低损伤甚至无损伤低温保存效果。本文综述了不同物理场辅助低温冷冻保存技术在生物细胞、组织及食品保鲜等领域的应用进展。已有研究表明不同物理场均可影响生物材料低温冷冻过程中水分子的相变, 进而影响冰晶的结构和组成, 提高生物材料长期低温保存效率, 但是其作用机制不同。

**【关键词】** 物理场; 生物材料; 低温保存; 冰晶

**【中图分类号】** R318.52; Q68

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1005-202X(2015)06-0810-05

## Development of biomaterial cryopreservation technology assisted by physical field

MA Ya-hong, LI Jing, DING Gui-rong, XU Sheng-long, ZHOU Yan, GUO Guo-zhen

Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**Abstract:** Cryopreservation, one of the most important research fields in modern life science, is important for the long-term preservation of stem cells, blood, rare germplasm resources, and the viable transplantation of human organs. The main factor constraining cryopreservation effects is the low temperature damage to biological tissues during the cryopreservation, including the mechanical damage caused by intracellular or extracellular ice crystal, and the solute damage caused by changes of intracellular or extracellular osmotic pressure. Traditionally, the formation and growth of ice crystal is inhibited by adding cryoprotective agents and improving the cooling rate. Recently, many researchers try to interfere with the formation of crystal nucleus and growth of ice crystal during the biomaterial cryopreservation by some physical factors, such as high pressure, ultrasonic, microwave, static electromagnetic field and low-frequency electromagnetic field, to finally achieve the low damage, even no damage of cryopreservation. The applications of cryopreservation technologies assisted by different physical fields in biological cells, tissues and food preservation were reviewed in this paper. There were researches showed that all different physical fields could influence the phase transition of water molecules during biomaterial cryopreservation, affecting the structure and composition of ice crystal and improving the efficiency of long-term biomaterial cryopreservation, but their mechanisms were different.

**Key words:** physical field; biomaterial; cryopreservation; ice crystal

### 前 言

低温保存技术可以用来长期保存动植物物种资

**【收稿日期】** 2015-07-22

**【基金项目】** 国家自然科学基金(51407187); 中国博士后科学基金(2014M552631)

**【作者简介】** 马亚红(1982-), 女, 博士/博士后, 研究方向: 低温生物电磁学。E-mail: yahongma@sina.com。

源, 特别是医学上活体组织器官移植的发展, 使细胞、组织和器官的长期保存成为现代生命科学研究的一个重要领域。在低温保存状态下, 活细胞的所有新陈代谢几乎完全停止, 可防止老化及变异<sup>[1]</sup>。生物材料中所含的大量水分子是低温冷冻过程主要的作用对象, 在降温过程中, 水分子结晶致使生物体中的结合水从组织结构中被撕裂出来, 从而破坏了细

胞的组织结构,导致细胞死亡。因此生物材料相变过程中如何有效地抑制甚至完全避免水分子结晶对低温保存来说是相当重要的,可以直接影响低温保存效率。

常见的低温冷冻方法通过快速或超快速冷冻法和“两步法”等实现玻璃化<sup>[2-3]</sup>。玻璃化保存是将某种物质转变成玻璃样无定形体(玻璃态)的过程,在此形态中没有任何晶体结构存在。玻璃化转变主要取决于冷却速率和溶液浓度,通过优化上述两种因素,最终可能实现两种不同的玻璃化:部分结晶玻璃态或完全玻璃态。完全玻璃态是生物材料玻璃化低温保存的理想状态,避免了细胞内外水分子结晶以及引起的化学或机械应力损伤。实现玻璃化主要有两种方法:一种是通过快速或超快速冷冻降温,即将生物材料在低浓度低温保护剂下直接投入液氮以实现玻璃化,此方法仅适合含水量低、表面积与体积之比很大的生物材料。但由于热传导原因,体积较大的生物组织、器官等很难达到高的冷却速率。另一种是通过“两步法”保存,使细胞内外的水都不形成冰晶,细胞结构不会受到破坏从而使细胞得以存活。目前玻璃化保存是利用高浓度复合低温保护剂在25℃或0℃下对材料进行预处理,再投入液氮。低温保护剂主要通过增加细胞膜的通透性、促进细胞脱水、降低水分子冰点温度、保护蛋白质和酶类,从而提高低温保存效率。但高浓度低温保存剂在常温下仍会对生物材料产生化学毒性,因此也并非理想材料。

近年来研究人员发现外加物理场(如高压强、超声波、微波、静态电磁场、交变电磁场等)也可以影响生物材料冷冻过程中水分子的相变,通过不同的物理机理产生不同结构的冰晶、微晶冰甚至玻璃化,从而提高生物材料的低温保存效率。我们将从以下几个方面综述不同物理场在生物材料低温保存中的应用及最新进展。

## 1 物理场辅助低温保存方法

### 1.1 高压强

高压强通过改变样品的热力学平衡状态进而引起冰晶在瞬间产生<sup>[4]</sup>,其作用机理为:液体样品首先通过压缩达到一个目标压力值,该压力大小决定所期望的过冷度。通过在冷冻过程中施加高压强,将样品温度降至略高于冰点的一个温度值。最后将高压强撤掉导致过冷度增大,从而诱导晶核形成。例如对于含水量约为99%的琼脂凝胶来说,100 MPa压

力可以使过冷度变化10 K<sup>[5]</sup>。Frank等<sup>[6]</sup>研究了28 GPa压强对NaCl-H<sub>2</sub>O二元溶液结晶特性的影响,结果表明高压强可以减少冷冻过程中盐离子析出,增大含盐冰比例,可避免离子渗透压对细胞的破坏作用。

### 1.2 超声波

低频高能量超声场对结晶成核过程有显著影响,大大缩短晶核形成诱导期,输出功率越大,对晶核生成的强化作用越明显,主要作用机制是超声场的空化作用<sup>[7-9]</sup>。当在过饱和溶液凝固过程中施加超声场,溶液中会产生空化气泡,气泡的非线性振动及气泡破灭时产生的压力,可改变体系内各点的能量。体系内质点能量起伏,使分子间作用力减弱,溶液粘度下降,溶质分子之间的碰撞几率增大促进冰核形成,且气泡破灭时产生云雾状气泡有助于降低界面能,使新生表面的晶核质点变得更稳定,有利于晶核的稳定形成,但已形成的冰晶在声场的作用下也会破裂。

1992年,Acton等<sup>[10]</sup>给蔗糖溶液施加超声脉冲,脉宽3 s,每次30 s,每次间隔10 min,结果发现树枝状冰晶的前端明显地分裂成冰碎片进入未冻结溶液中,冰晶碎片导致晶粒尺寸减小。大于50 μm晶粒超声处理组仅占32%,而未处理组为77%。2009年,Delgado等<sup>[11]</sup>采用高功率超声辅助冷冻技术对苹果进行了冷冻保存,结果表明与未经超声处理组相比,超声处理冷冻保存组苹果中细胞结构更完好。

超声波在结晶过程中起着非常重要的作用,既可以使饱和溶液的固体溶质产生迅速而平缓地沉淀,又可加速晶体增长<sup>[12-14]</sup>。超声波作用下,溶液内会产生大量的结晶中心,且形成的晶粒尺寸受超声频率和强度控制,利用合适参数的超声作用可以加速冻结过程,提高热质传递使得冻结初始点到完全冻结之间的温度“停滞期”缩短,获得细小而均匀的晶体,因而冰晶对细胞的破坏作用也比较小。

### 1.3 微波

微波因其具有良好的穿透性,被广泛应用于很多领域。特定的温度下,水分子在微波场的作用下产生力矩,导致水溶液中形成更多的同质异构体,抑制了水分子簇的形成,从而降低了水分子加入晶格结构形成冰晶的可能性,相应地也降低了冰晶的生长速率,增强生物溶液的玻璃化能力。

Hanyu等<sup>[15]</sup>研究发现经2540 MHz微波处理后的生物样品,玻璃化程度与液氮冷却相当,认为微波处理使水分子簇聚集尺寸减小了,降低了成核数量并

抑制冰晶生长,有助于玻璃化。Jackson等<sup>[16]</sup>首次提出并验证了降温过程中微波与低温保护剂协同作用可抑制冰晶形成,为玻璃化保存开辟了一条新途径。但微波技术在低温保存领域的应用很大程度上受到微波本身性质的限制:一方面微波对生物体具有很强的杀伤作用,高强度的微波辐射可以直接将生物细胞杀死;另一方面,可能产生的微波泄漏将会对附近人群产生负面影响。

#### 1.4 电场

冰晶形成是水分子在低温状态下重定向结晶的过程,而水分子是一种强极性分子,电场使水分子产生重定向。分子动力学模拟研究结果认为当电场强度达到 $5.0 \times 10^9$  V/m时,电场作用能够引起水分子排列结构发生变化,在过冷水中能够诱发冰核的形成,表明电场可影响水的相变过程<sup>[17-18]</sup>。但是如此高的电场强度已经能够导致纯水击穿,实际上很难达到提高低温保存效率的目的。

早在1961年, Salt等<sup>[19]</sup>研究高压静电场对过冷水踞蝇、五倍蝇幼虫低温保存的影响,结果发现经过电场处理过的样品更容易结晶,但该实验现象在当时并未受到关注,之后关于电场对冰晶形成与生长影响的研究文献非常少。

Braslavsky等<sup>[20]</sup>通过实验研究脉冲电场对过冷水中冰晶形成的影响,脉冲电场强度为 $1 \times 10^9$  V/m,接近理论研究中的静电场强度值。结果显示,脉冲电场能够诱发冰核形成,水在过冷到 $-1.5$  °C时开始出现结冰现象。

2005年,陈程等<sup>[21]</sup>研究静电场对红细胞与冰晶间相互机械性作用的影响,结果表明:静电场在一定程度上改变了冰晶的形成与生长特性,在较强静电场的影响下,冰晶明显变粗,成为块状,细胞完全融入粗大的冰晶之中,在冻结末期,细胞不再受到冰晶挤压,从而减少了机械应力对细胞的损伤。

2006年, Petersen等<sup>[22]</sup>将脉冲电场引入生物材料低温保存过程,脉冲电场作用诱发过冷溶液中冰核形成,控制溶液中冰晶形成温度。极性水分子在电场作用下产生一个力矩,破坏了水分子簇的平衡状态,在冷冻初期,电场可以诱发冰核形成,而在冰晶生长过程中电场对冰晶生长具有抑制作用。

2008年,孙伟等<sup>[23-24]</sup>提出了用玻尔兹曼统计分布研究水分子在电场中按能量的分布函数。在没有外电场作用时,水分子的偶极矩方向是任意的,水分子对外呈现的宏观偶极矩等于零。当水分子受到外电

场E的作用时,水分子在电场作用下产生再定向,此时水分子对外呈现的宏观偶极矩不为零,在电场方向出现剩余偶极矩。水分子沿电场方向所具有的稳定状态和最大分布为在过冷水中诱发冰核形成提供了有利条件,从这个观点也可以说明,电场具有在过冷水中诱发冰核形成的作用。

2011年, Stan等<sup>[25]</sup>设计了微流控芯片并研究了非均匀电场对过冷水均质成核过程的影响,结果表明电场频率在3 kHz~100 kHz, 电场强度为 $(1.6 \pm 0.4) \times 10^5$  V/m的交变电场对过冷水溶液均质成核没有影响。并且根据热力学模型估算,当电场强度为 $10^7$  V/m~ $10^8$  V/m时可能会提高过冷水溶液中冰晶成核率。

2013年, Xanthakis等<sup>[26]</sup>又将静电场引入猪肉冷冻保鲜过程中,结果表明随着电场强度的增加,猪肉过冷度从对照组 $3.93$  °C $\pm 1.3$  °C降低至静电场冷冻组 $1.92$  °C $\pm 1.45$  °C(最大场强 $2 \times 10^6$  V/m),同时静电场冷冻组猪肉内冰晶尺寸明显减小,对照组冰晶尺寸为 $32.79$   $\mu\text{m} \pm 4.04$   $\mu\text{m}$ ,静电场处理组冰晶尺寸为 $14.55$   $\mu\text{m} \pm 8.20$   $\mu\text{m}$ (最大场强 $2 \times 10^6$  V/m)。因此静电场可以作为一种新型的具有发展前景的食品冷冻保存辅助技术。

2012年,本文作者设计制作了冰晶微电极实时显微观测系统,研究交变电场(电场强度0 kV/m~100 kV/m, 电场频率为0.5 MHz~10 MHz)对水溶液结晶过程的影响,初步建立了水合离子双层极化模型解释交变电场使晶粒细化的微观机理<sup>[27-28]</sup>。根据0.9 wt.% NaCl-H<sub>2</sub>O二元水溶液的冻结特性,溶液在降温过程中首先在一些区域内形成冰核,而后冰核逐渐长大形成冰晶。在溶液完成从液相转变为固相的过程中,溶液中水分子和盐离子可能以下面的方式存在于所形成的晶体之中,即随着水分子形成晶核并不断长大成纯水冰晶,绝大部分盐离子逐渐析出存在于晶界上,如图1c所示。当NaCl溶液冷冻过程中施加一定的交变电场时,水合离子双层极化产生的诱导偶极矩将随交变电场的变化而产生转动定向,冰晶生长界面上的水分子由于受到水合离子双层结构极化产生的局部电场作用,如图1a、1b所示,使得其进入纯水冰晶格结构变得困难,冰晶无法继续生长成为大体积的纯水冰晶,抑制了纯水冰晶粒生长,水合盐离子在晶界上以非晶态存在。

#### 1.5 磁场

水分子不具有本征磁偶极矩。由氢键连接形成的水分子链或水分子环,在磁场可以通过质子传导形成分子电流,从而产生一个小磁场与外加磁场相



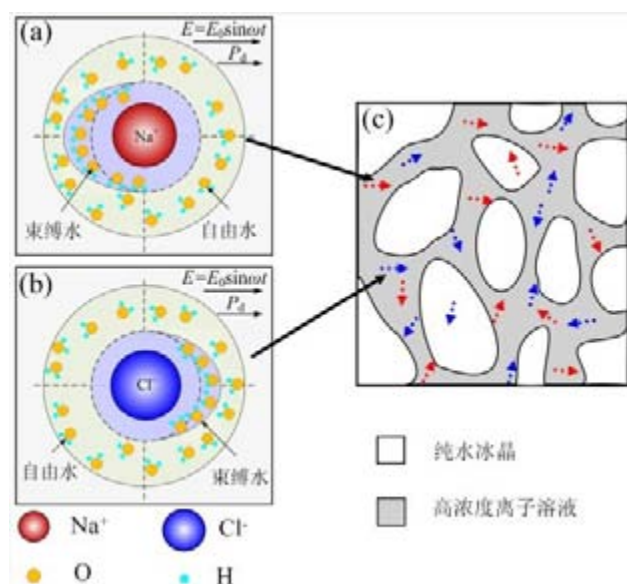


图1 水合离子双层极化与冰晶结构

Fig.1 Structure of ice crystal and double layer polarization of hydrated ions

Note: a: Double layer polarization model of hydrated  $\text{Na}^+$ ; b: Double layer polarization model of hydrated  $\text{Cl}^-$ ; c: Effects of double layer polarization of hydrated ions on the growth of ice crystals

互作用。水分子在磁场中所受的洛伦兹力使得小分子簇和单个水分子的形成概率增加。磁场作用使水分子间能量升高而分子内能降低,而能量的变化优势是氢键断裂与形成过程的重要体现。氢键同时存在于水分子簇内和水分子簇之间。磁场对两种氢键的作用并不相同,磁场减弱了分子簇内的氢键,将大尺寸的分子簇破碎形成小尺寸的分子簇,同时增强了分子簇之间的氢键连接。水分子所受的洛伦兹力与磁场强度的平方成正比,即较弱的磁场对水分子产生影响较弱,通常情况下,强磁场(>10 T)梯度才可以产生足够的磁场力以抵抗重力,这和水分子在电场中所受电场力是一致的。

1999年,Tagami等<sup>[29]</sup>报道18 T强磁场下直径小于6 mm小水珠凝固并漂浮,水滴的过冷度达到10℃,这对该尺寸水珠来说属于正常值,因此静磁场并不能明显地提高或抑制体积水的冷冻过程。2000年,Aleksandrov等<sup>[30]</sup>报道强静磁场可诱导0.5 mL蒸馏水中冰核的形成,0.5 BT静磁场产生的平衡冷冻温度为0℃。

根据麦克斯韦-法拉第方程:

$$\nabla \times E(r, t) = -\frac{\alpha B(r, t)}{\alpha t} \quad (1)$$

交变磁场可能影响冰晶形成。磁场可以增大水的过冷度,可能与水分子之间氢键的作用有关。根

据Cai等<sup>[31]</sup>解释,水分子由氢键连接成一系列的分子链,在外加磁场中具备了分子电流的特点,从而产生出一个小磁场与外加磁场相互作用,导致水分子内能发生变化,即有更多的水分子结合成氢键。而在形成氢键的过程中需要消耗大量的活化能,因此分子内能降低,水变得更加稳定。对于蒸馏水,外加磁场对过冷度有增加作用;对于低浓度NaCl溶液(0.9 wt.%),由于其中离子浓度增加,体现出一定的溶液特性,但是由于离子浓度较低而水分子数量大作用力仍然占主要优势,因此施加磁场后过冷度仍然稍有增加。对于高浓度NaCl溶液(5 wt.%)来说,离子已经发挥了主要作用,磁场对溶液作用与磁场对纯水作用的机理不同,其中大量离子所受洛伦兹力增强,溶液中溶质离子脱离水分子的束缚,以NaCl晶体形式析出导致溶液结晶速度加快。

2006年,朱腾骏<sup>[32]</sup>和徐军<sup>[33]</sup>研究发现低频旋转磁场对离子溶液结晶过程产生影响,且具有明显的“频率窗”效应,50 kHz交变磁场对溶液中冰晶的生长具有较为显著的抑制作用。当给溶液施加外部磁场时,溶液中分子或离子极化会随着磁场矢量变化而变化,这个过程需要一定的时间完成,即是一种弛豫过程。当磁场强度和频率变化时,溶液的介电特性发生变化,改变了溶液中离子活化能,从而影响冰晶的形成和形态。

Mochimaru等<sup>[34]</sup>报道交变磁场可提高猪卵巢组织的低温冷冻保存效率,但是对于蒸馏水或含1.5 mol/L二甲基亚砷(DMSO)PBS溶液的结晶温度均没有显著影响。结果表明60 Hz交变磁场、0.1 mT交变磁场产生的诱导电场可通过电磁场非热效应抑制冰晶形成,物理机制是磁场能够使水分子簇在平衡位置附近振动从而阻止冰晶生长,有助于细胞和组织长期低温保存。近年来,已经有商用的磁控冷冻装置用于食物保鲜。

2011年,Abedini等<sup>[35]</sup>采用程序控制磁场发生冷冻装置(Cells Alive System, CAS)研究磁场对牙周膜细胞和牙髓组织低温保存的影响,结果表明对牙周膜细胞进行长期冷冻保存,对其生长率和特性没有影响。与对照组相比,牙髓组织中血管内皮因子(VEGF)表达以及VEGF与神经生长因子(NGF)蛋白浓度均没有显著差异。磁场控制方法冷冻保存的牙周膜细胞已经被临床验证。

2013年,Lin等<sup>[36]</sup>研究表明慢速冷冻过程中0.4 T或0.8 T静磁场(Static Magnetic Fields, SMF)可以明

显提高人体红细胞低温保存效率,与对照组相比,分别提高10%和20% ( $P < 0.001$ )。而且静磁场冷冻对红细胞形态和代谢水平没有影响,而0.8 T静磁场冷冻组疏水区细胞膜流动性和溶血程度明显降低 ( $P < 0.05$ )。结果表明0.8 T静磁场可降低红细胞膜流动性、提高红细胞膜稳定性,从而减少慢速冷冻过程中细胞严重脱水带来的损伤。

## 2 总结与展望

冷冻过程中形成的冰晶对细胞膜产生机械或生物化学应力损伤导致了不可逆的组织损伤。从本质上来说,生物材料低温冷冻保存或治疗过程中主要是由于物理因子温度的变化而引起对生物体的影响。生物体中主要成分是水溶液,被保存的细胞或者组织通常也是放置于一定浓度溶液中进行低温保存的。因此温度直接作用对象是存在于生物细胞、组织内外大量水溶液,温度降低会引起胞外溶液结晶,从而引起胞内溶液浓度的升高、细胞膜内外渗透压发生变化等,若这些因素控制不当,低温环境反而会损伤细胞甚至会使之死亡。因此如何减少生物材料在冷冻保存过程中低温带来的冷冻损伤仍然是一个具有挑战性的研究课题。

综上所述,不同物理场均有可能成为一种潜在的低温冷冻辅助技术,进一步提高低温保存效率,然而优化物理场参数以及阐明作用机理仍然需要进行深入细致的研究。

## 【参考文献】

- [1] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 20-67.
- [2] Hua ZZ, He HS. Technology of cryobiology & medical engineering [M]. Beijing: Science Press, 1994: 20-67.
- [3] Zhmakin AI. Physical aspects of cryobiology[J]. Physics-Uspekhi, 2008, 51(3): 231-252.
- [4] Zhmakin AI. Fundamentals of cryobiology[M]. Berlin: Springer, 2009.
- [5] Otero L, Sanz PD. High-pressure shift freezing: Amount of ice instantaneously formed in the process[J]. Biotechnol Prog, 2000, 16(6): 1030-1036.
- [6] Kalichevsky MT, Knorr D, Lillford PJ. Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions[J]. Trends Food Sci Tech, 1995, 6(8): 253-259.
- [7] Frank MR, Runge CE, Scott HP, et al. Experimental study of the NaCl-H<sub>2</sub>O system up to 28GPa: Implications for ice-rich planetary bodies[J]. Physics of the Earth and Planetary Interiors, 2006, 155(1-2): 152-162.
- [8] Chow R, Blindt R, Chivers R, et al. A study on the primary and secondary nucleation of ice by power ultrasound[J]. Ultrasonics, 2005, 43(4): 227-230.
- [9] 杜春华, 郑诗礼, 徐红彬, 等. 物理场强化溶液结晶研究进展[J]. 现代化工, 2006, 26: 88-91.
- [10] Du CH, Zheng SL, Xu HB. Advances in physical fields used to enhance solution crystallization[J]. Modern Chemical Industry, 2006, 26: 88-91.
- [11] Chow R, Blindt R, Kamp A, et al. The microscopic visualisation of the sonocrystallisation of ice using a novel ultrasonic cold stage[J]. Ultrason Sonochem, 2004, 11(3-4): 245-250.
- [12] Acton E, Morris GJ. Method and apparatus for the control of solidification in liquids[P]. WO/1992/020420. 1992-11-26.
- [13] Delgado AE, Zheng L, Sun DW. Influence of ultrasound on freezing rate of immersion-frozen apples[J]. Food Bioprocess Tech, 2009, 2(3): 263-270.
- [14] Inada T, Zhang X, Yabe A, et al. Active control of phase change from supercooled water to ice by ultrasonic vibration 1: Control of freezing temperature[J]. Int J Heat Mass Transfer, 2001, 44(23): 4523-4531.
- [15] Saclier M, Peczkalski R, Andrieu J. Effect of ultrasonically induced nucleation on ice crystals' size and shape during freezing in vials[J]. Chem Engin Sci, 2010, 65(10): 3064-3071.
- [16] Saclier M, Peczkalski R, Andrieu J. A theoretical model for ice primary nucleation induced by acoustic cavitation[J]. Ultrason Sonochem, 2009, 17(1): 98-105.
- [17] Hanyu Y, Ichikawa M, Matsumoto G. An improved cryofixation method: Cryoquenching of small tissue blocks during microwave irradiation[J]. J Micros, 1992, 165(2): 255-271.
- [18] Jackson TH, Ungan A, Critser JK, et al. Novel microwave technology for cryopreservation of biomaterials by suppression of apparent ice formation[J]. Cryobiology, 1997, 34(4): 363-372.
- [19] Svishchev IM, Kusalik PG. Crystallization of liquid water in a molecular dynamics simulation[J]. Phys Rev Lett, 1994, 73(7): 975-978.
- [20] Vegiri A, Schevkunov SV. A molecular dynamics study of structural transitions in small water clusters in the presence of an external electric field[J]. J Chem Phys, 2001, 115: 4175-4185.
- [21] Salt RW. Effect of electrostatic field on freezing of supercooled water and insects[J]. Science, 1961, 133(3451): 458-459.
- [22] Braslavsky I, Lipson SG. Electrofreezing effect and nucleation of ice crystals in free growth experiments[J]. Appl Phys Lett, 1998, 72(2): 264-266.
- [23] 陈程, 陶乐仁, 华泽钊. 静电场对红细胞与冰晶间相互机械性作用的影响[J]. 低温工程, 2005, 5: 45-50.
- [24] Chen C, Tao LR, Hua ZZ. The effect of external electric field on the mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during freezing[J]. Cryogenics, 2004, 5: 45-50.
- [25] Petersen A, Schneider H, Rau G, et al. A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature[J]. Cryobiology, 2006, 53: 248-257.
- [26] Sun W, Xu XB, Zhang H, et al. Effects of dipole polarization of water molecules on ice formation under an electrostatic field[J]. Cryobiology, 2008, 56(1): 93-99.
- [27] 孙伟. 交变电场对生物溶液相变特性的影响以及应用于低温生物保存的研究[D]. 西安: 西安交通大学, 2008.
- [28] Sun W. Effects of alternated electric field on the freezing process of biology solution and application in cryopreservation of biological materials[D]. Xi'an: Xi'an Jiaotong University, 2008.

(下转819页)