

临床医学中若干低温热物理问题的研究*

华泽钊 王奇凤

上海理工大学低温生物医学技术研究所, 上海 200093

摘要 综述了临床医学中若干低温热物理新问题的研究进展。其中包括溶液冻结过程的显微研究; 小样品淬入过冷液氮中的沸腾传热和超快速冷却技术; 低温冷冻外科手术治疗的过程控制; 血管冻结过程中微裂纹的产生及其防止; 脂质体靶向性药物的低温冷冻干燥; 用于异种移植免疫隔离的微胶囊化胰岛及其低温保存等。

关键词 低温热物理 低温保存 低温外科 冷冻干燥 微胶囊化

低温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在医学中应用的学科。它包括人的冻伤、低温麻醉、低温脑复苏等; 人体重要细胞、组织和器官的低温保存、移植及临床应用; 低温医疗; 利用低温手术器械杀伤异常组织如肿瘤以及生物制品和药剂学中的冷冻干燥技术等。

低温能抑制生物体的生化活动。生化反应的速率随着温度的降低而急剧减弱, 因此一般细胞和组织在 -196°C 下可望保存几十年或更长。生物体虽能在低温下长期保存, 但却极容易在降温和复温过程中受到损伤而死亡。因为生物体的主要成分是水, 在降温和复温过程中, 细胞和组织会由于溶液冻结、融化以及溶液渗透压力变化等因素的作用而受到损伤。这种低温损伤主要发生在 $0\sim-60^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内, 我们称这个温度范围为“危险温度区”。

从本质上来说, 低温生物学是研究由于温度这个物理量的变化而对生物体造成的影响。从20世纪70年代起, 一批物理学家、工程学家、特别是工程热物理学家投入了低温生物医学的研究, 作出了很大贡献, 并使此学科发展到一个新的阶段。这阶段的特点就是运用热科学、工程学的理论与新技术, 对低温保存和损伤的机理和对低温生物学各方面问题进行全面深入的研究, 形成了新的交叉学科, 即生物学、医学和热科学、工程技术的交叉学科, 可

将其称为“低温生物医学技术”^[1]。

当前临床医学上的重要低温热物理问题有: 一些重要细胞和组织的低温保存; 玻璃化保存和超快速冷却技术; 热敏性药物、脂质体药物的冷冻干燥; 能抗排异、适用于异种移植的细胞和组织微胶囊化技术; 低温冷冻杀伤肿瘤组织的冻融程序的确定; 组织在冻结和融化过程中热应力和微裂纹的防止等^[2~6]。

近年来我们承担了国家自然科学基金重点项目“临床医学中若干热物理问题的研究”, 本文综述了此项目在临床医学中若干低温热物理新问题方面的研究进展。其中包括溶液冻结过程的显微研究; 小样品淬入过冷液氮中的沸腾传热和超快速冷却技术; 低温冷冻外科手术治疗的过程控制; 血管冻结过程中微裂纹的产生及其防止; 脂质体靶向性药物的低温冷冻干燥; 用于异种移植免疫隔离的微胶囊化胰岛及其低温保存等。

1 溶液冻结过程的显微研究

对溶液冻结现象的显微研究是分析细胞和组织在冻结过程中被损伤的机理以及探索低温保存最佳程序的有力手段。为此我们研制了低温显微实验系统(图1)。该系统由3部分组成: 实验段、低温显微系统、摄录像及计算机数据采集系统; 并加有强电场系统。氮气瓶中的高压氮气经减压阀减压

2002-01-28 收稿, 2002-03-07 收修改稿

* 国家自然科学基金重点项目(批准号: 59836240)资助

E-mail: tchua@public1.sta.net.cn

后, 经置于液氮中的换热器冷却; 当冷却的氮气拂过样品表面时, 使样品降温冻结. 通过调节氮气的流量可以获得不同的冷却速率, 由低温显微镜和摄

录像机得到样品在不同冷却速率下的结晶过程图像, 同时利用贴在上层载玻片面上的热电偶, 可以获得相应的冷却速率.

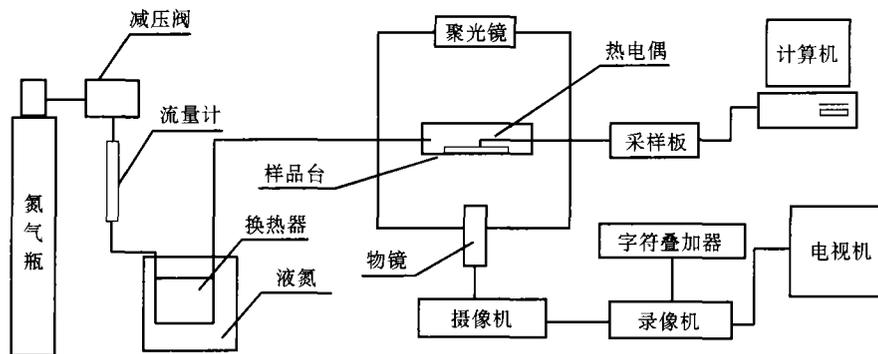


图1 低温显微实验系统

利用此低温显微镜系统对纯水、二甲亚砷、蔗糖、氯化钠溶液在不同的冷却速率下的结晶情况进行了系统的显微观察. 主要进行了水结晶时的气泡现象及其分布规律; 不同的低温保护剂溶液在不同降温速率及不同成核条件下冰晶的形成和生长过程及其对冰晶结构的影响; 电场对溶液冻结和对生物体冻结和解冻的影响. 实验中发现了以下一些规律^[7,8]:

(1) 在水冻结时, 随着冰晶的生长, 原先溶于水中的空气将被排出, 并在冰锋前聚集; 当聚集的空气超过其在水中的饱和溶解度一定值时, 聚集的空气将会形成可见的气泡而被排出. 气泡的排出会引起该处溶解度的降低, 使气泡排出过程停止; 若结晶过程继续进行, 会引起新的空气聚集, 并再次排出气泡, 因此气泡的形成是周期性的. 排出气泡的直径与冰峰前进的速度, 或者说与冷却速率有关. 冰峰前进的速度大, 气泡的直径小; 反之则直径大. 在开放的空间内, 空气将会由于扩散而从水中逸出.

(2) 在均相成核的结晶过程中, 冷却速率的快慢直接影响了最后形成的冰晶的颗粒大小. 高冷却速率使样品能达到较大的过冷度, 从而形成的冰晶将更细小. 从均相成核的冰晶的融化图形可以看出, 均相成核形成的冰晶中包含有大量的晶种. 异相成核时, 当晶种生长至超过临界半径时, 将发生枝晶生长. 球形的晶种先呈现六角形, 而后将是主干开始生长; 同时在水晶主干上会有更高级的分枝产生. 冷却速率将对分枝的形状产生影响: 在较低冷却速率下, 分枝较粗大; 而在高冷却速率下, 主干

将受到强烈而频繁的干扰, 形成细而密的分枝. 在高浓度的溶液中, 由于生长驱动力的降低, 冰晶的生长速率也会降低. 晶种的结构和数量会直接影响冰晶最后的形状. 同时生长的冰晶会产生互相影响, 并导致其形状发生变化. 溶液的性质是影响冰晶结构的因素之一, 在离子型溶液中可能会发生的离子聚集, 使各种成分的离子在溶液中产生不均匀分布, 从而改变冰晶结构.

(3) 强电场将使介质发生极化现象, 对于强极性分子(如水), 强电场会造成分子的定向排列, 从而影响其结晶过程. 二甲亚砷水溶液在电场中冻结时将会发生生长不对称的现象, 各个主干的生长速率会有不同. 离子型溶液氯化钠在电场的作用下表现出了更强烈的不对称性, 说明溶液中的离子在电场作用下会产生分离现象, 而使得生长的不均匀性加剧.

2 过冷液氮中的沸腾传热和超快速冷却技术

细胞和组织的低温保存主要有2种途径: 一种是稀溶液慢速冷却; 一种是浓溶液超快速冷却. 近年来, 人们已逐渐地认识到, 凡是成功的低温保存, 细胞内的溶液均以玻璃态的形式被固化, 即在胞内不出现晶态的冰. 对于不同的体系, 要实现液体的玻璃化转化所需要的冷却速率相差极大. 如对 SiO_2 , 只要 10^{-3} K/s 的冷却速率, 就可使200 cm厚的材料实现玻璃化; 欲实现厚3.5 cm的 GeO_2 材料的玻璃化, 只需要 0.35 K/s 的冷却速率; 但对于纯水, 即使高达 10^7 K/s 的冷却速率也很难实现 $1 \mu\text{m}$ 的玻璃化固体^[1].

生物体都是含水量很高的体系,要实现玻璃化的难度极大.只有采用极高的冷却速率,使生物样品超快速地降温到玻璃化转变温度 T_g 以下,而冰晶还来不及形成.对于质量分数 w 20%的水溶液,要实现全部玻璃化所需的临界冷却速率极高,一般在 $10^2 \sim 10^3$ K/s^[2,4,9].

为此,我们研究了一种新型的超快速冷却的方法和技术.其基本原理是利用液氮导热系数低和液氮中温度分层的特性,先对低温容器中的液氮进行减压降温,然后突然让其升压,液氮的主体部分可在相当长的时间内保持过冷状态.用弹射或喷射的方法,将样品快速淬入过冷液氮,可达到极高的降温速率^[10,11].

在我们研究的参数范围内(过冷度 0~13 K;淬入速度 0.5 和 6 m/s;淬入深度为 5 和 50 cm)得到以下结果^[11,12]:

(1) 由淬入法得到的小样品在饱和液氮中的沸腾传热曲线,呈“M”形状.这种沸腾传热曲线较完整地呈现了沸腾的各个阶段:膜态沸腾的启动段、膜态沸腾的定态段、过渡沸腾段、和核态沸腾段.它比以往用加热法得到的沸腾传热曲线更完整、更全面.当液氮由饱和态逐渐过渡到过冷态(其过冷度由 0 K 逐渐过渡到 13 K)时,小样品在液氮中的沸腾传热曲线由呈“M”形状,逐步过渡到呈“ Δ ”形状,而且其热流密度剧增.

(2) 对于同样的过冷度,当直径小于 2 mm 时,小尺寸效应逐渐明显;尺寸越小,尺寸效应越剧烈.对过冷 12 K 的情况,当样品直径由 2 mm 减小到 0.3 mm 时,其临界热流密度由 5×10^5 W/m² 增大到 13.5×10^5 W/m²;当过冷度由 0 K 过渡到 13 K 时,对 0.3 mm 的小样品的临界热流密度由 4.4×10^5 W/m² 增大到 16×10^5 W/m².

(3) 对 0.3 mm 的小样品,当过冷度由 0 K 过渡到 11.9 K 时,其最高的冷却速率由 2×10^3 K/s 增大到 8.2×10^3 K/s,已达到能使处于低浓度溶液的细胞实现玻璃化的要求.

(4) 研究了淬入速度、淬入深度等对临界热流密度和冷却速率的影响;发现并非淬入速度越快越好,它是和淬入深度相制约的.

(5) 研究了平板在过冷液氮中的淬冷传热的诸影响因素,包括过冷度、方位角;并与关于过冷对圆管沸腾传热影响的研究进行比较和关联.此实验结果及相应的公式可供组织和器官低温保存时使

用.

3 低温冷冻外科手术治疗的过程控制

利用低温杀伤肿瘤组织的外科手术疗效取决于低温探针(冷刀)的降温复温程序和组织的冻融情况.目前最常用的是液氮低温探针,为此我们建立了过冷液氮低温探针实验台(图 2).它主要由高压过冷液氮系统、水浴加热系统、低温探针系统、液氮输送及控制系统、温度压力测量及采集系统等部分组成.实验台通过先抽真空再加压的方式获得高压冷液氮;可以通过控制低温电磁阀来调节液氮流量;可以在生物组织或模拟生物材料中进行冷冻实验;能够测量到冰球体积和质量;采集并记录相关液氮压力、探针表面与被冻组织内部的温度数据,为低温冷冻实验和进行组织内相变过程的分析提供必要的实验条件.

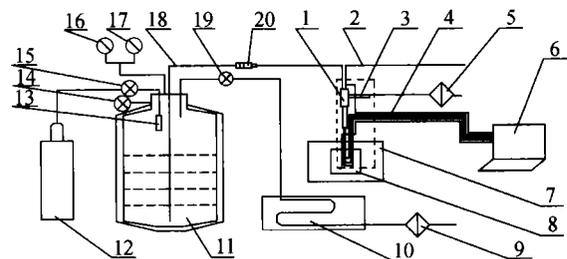


图 2 过冷液氮低温探针实验台整体系统图

1. 低温探针; 2. 低温探针排气管; 3. 低温探针抽真空管; 4. 热电偶; 5. 真空泵; 6. 计算机; 7. 实验用恒温水浴; 8. 实验用玻璃器皿; 9. 真空泵; 10. 恒温水浴; 11. 高压液氮杜瓦瓶; 12. 高压氮气瓶; 13. 扩散器; 14. 安全阀; 15. 进气阀; 16. 真空表; 17. 压力表; 18. 出液管; 19. 抽气阀; 20. 低温电磁阀

在此实验台上,分别研究了低温探针在空气、纯水、明胶和新鲜动物肝脏中降温和低温冻结和融化的情况;分别进行了液氮的不同输送压力、低温探针内进液管的不同位置等实验.通过时间继电器控制低温电磁阀的开闭时间分配,实现了探针壁面温度振荡的降温过程和复温过程.探针壁温的振荡,可能影响冰晶的结构和分布,进而影响组织的冷冻损伤效果.在纯水和明胶实验中,可以观察到冰球生长的过程;在新鲜动物肝脏的实验中,可以观察组织冻结的表观特点.实验可以获得冰球大小、质量、探针壁温和冰球内温度分布等重要数据,为定量分析组织相变过程提供实验依据^[13~15].

根据生物组织冻结过程的特点,采用能量平衡法和焓法分别建立一维和多维组织相变问题的模

型;利用有限差分方法和有限单元法,离散不同形状特征的求解区域,能够方便地求解生物组织相变问题.计算结果与实验测量值符合较好.对冷冻外科中可能遇到的多种因素进行了分析.这些因素包括:血流灌注率、代谢产热、组织热物性、探针直径和不同降温程序、复温程序等.

对氩-氮节流低温探针系统进行了分析.针对氩-氮节流低温探针的快速降-复温控制程序,研究了球形低温探针冻结生物组织的相变过程.

4 血管冻结过程中微裂纹的产生及其防止

关于血管组织低温保存的研究,是在20世纪70年代开始的.当时主要是针对静脉血管,因静脉血管是具有相对较为简单的薄层组织结构,溶液渗透损伤和热应力损伤都较小,保存后存活率较高,而且临床移植后的工作条件较温和,效果也较好,而动脉血管和气管的低温保存则要困难得多.上海新华医院、胸科医院和我们合作进行多年的研究,通过动物试验的探索,已成功地实现了气管和动脉的低温保存,并已用于临床^[16,17].

最近几年,开始发现个别移植后的大动脉,经数年运行后发生失效的现象.经临床解剖检查,发现是由于血管断裂所致.动脉血管在体内不断地经受压力的变化,不断地进行扩张、收缩的动作.如果动脉血管在冻结过程中出现微观的裂纹,此裂纹经数年运行后就会不断扩大,成为宏观裂缝,而使移植的动脉失效,此类并发症在临床上极其危险的^[5,17,18].为此我们分析了由于冷冻-相变-热应力造成的血管低温断裂的问题.血管中含有大量的水分,水冻结形成冰时,体积会膨胀.由于冷却是由外及内的,即血管周缘部分先结冰;而当其内部水分结冰时,体积膨胀受到限制,会产生很大的内应力;同时在冷却的过程中,血管内部的温度差别很大,也会产生很大的热应力,这些都是血管产生裂纹的原因.

我们和新华医院、上海儿童医学中心合作,对冻结过程中出现的微裂纹问题进行了理论和实验研究.以母羊的主动脉为例,其内径为4.2 mm,外径为5.3 mm.模拟计算时选择了5种不同的外部降温速率,即:0.1, 0.5, 1, 2和5 K/min.当降温速率较慢时,周向应力开始逐渐增大;在相变温区达到极大值;随着相变的完成,周向应力逐渐减小;最后,随着内部温差的减小,周向应力也趋于

零.当降温速率较快(如5 K/min)时,表面的周应力出现了负极大值.

从计算结果可以看出,不论是径向应力、周向应力还是轴向应力,都随着外界环境降温速率的增大而增大;热应力的极大值都发生在相变温区内,这说明由相变引起的热应力大于由于内部温差引起的热应力;对于任何一种降温过程,径向应力的最大值远小于周向应力和轴向应力的最大值,如表1所示.

表1 不同降温过程的最大应力比较

降温速率 K/min	最大应力/MPa					
	周向力	方向	轴向力	方向	径向力	方向
0.1	0.187	拉应力	0.189	拉应力	0.0044	拉、压应力
0.5	0.557	拉应力	0.547	拉应力	0.0143	拉、压应力
1	0.721	拉应力	0.729	拉应力	0.0189	拉、压应力
2	0.831	拉应力	0.821	拉应力	0.0248	拉、压应力
5	1.375	压应力	1.369	压应力	0.0294	拉、压应力

Shi等^[19]通过实验研究认为,生物材料内的水分冻结时,产生裂纹的极限拉应力是与温度有关的;在0~-10℃范围内,极限拉应力为0.6~0.7 MPa.对于我们所研究的情况,当降温速率为1, 2和5 K/min时的最大轴向和周向应力均超过了0.6 MPa,这样就可能引起裂纹,破坏动脉组织.

同时,我们对所研究的母羊动脉组织进行了低温试验.光镜和电子显微镜试验都发现,以0.1 K/min的降温速率冷却的动脉,管壁上没有裂纹;而以5 K/min的降温速率冷却的动脉,在管壁上能够看到明显的裂纹;而且裂纹的方向是轴向的和周向的,是由于周向应力和轴向应力所致.这说明分析计算结果与实验得到的断裂情况相符^[20,21].

5 脂质体靶向性药物的低温冷冻干燥

近年来,脂质体作为一种新型药物载体在医药领域的研究和应用得到了迅速发展,在医药界得到了日益广泛的关注.脂质体既可以包封脂溶性药物,又可包封水溶性药物,是靶向给药系统的一种新剂型;在许多疾病,尤其是癌症的治疗中显示出明显的优越性.对脂质体进行低温冷冻干燥,可以减少脂质体悬浮液的聚集、融合;减少包封药物的氧化和泄漏等;而且使脂质体药品长期稳定地贮存.

由于冻干药品具有多孔疏松状、能长时间稳定贮存、并易重新复水而恢复活性等优点,冷冻干燥技术已被广泛应用于热敏性药品的制备,也已成为

制备脂质体药品的一种重要方法。但目前国内外一般都只把冷冻干燥技术作为一种获取冻干脂质体的手段,主要研究冻干药品在临床上的应用,如药物毒性、药效、靶向性、稳定性等,而对冷冻干燥过程的各阶段对冻干脂质体的质量影响,却很少研究。实际上冷冻干燥过程的差异,或过程工艺参数的不同,都会对冻干脂质体药品的质量产生很大的影响^[22]。

为了更好地对脂质体的冷冻干燥过程进行研究,我们在已研制成的一台特殊的低温冷冻干燥系统上,进行了实验研究。该冻干装置具有以下特点:利用液氮可使冷阱温度低于 -100°C ,甚至可接近 -196°C ;内置有电子天平,通过电子天平可实时地观察和记录样品失水情况,并判断冻干过程是否结束;内置辐射加热板,并可控制其温度,以满足不同干燥阶段加热量的需求;装有真空调节阀,可调节干燥室内的真空度;温度测试系统可实时准确测量冻干过程中药品温度、冷阱温度、加热板温度。

我们利用这套液氮低温冷冻干燥实验装置,对脂质体药品低温冷冻干燥过程中的玻璃化、降温速率、低温保护剂、干燥阶段循环压力等对冻干脂质体药品质量的影响进行了研究。

脂质体药品冻干前后的粒径变化和对药物的包封率的变化,是衡量冻干过程优劣的两个重要指标。如果脂质体囊泡的粒径经冻干后增大了,说明在冻干过程中脂质体囊泡发生融合现象,以致包封药物发生了泄漏;如果脂质体囊泡的药物的包封率经冻干后减少了,也说明在冻干过程中脂质体囊泡发生破裂现象。我们和第二军医大学药学院合作,用脂质体分别包封水溶性药物喃氟啉和脂溶性药物维生素A,经研究所得到的冻干工艺,已明显地减小了脂质体囊泡的粒径;降低了冻干过程粒径的变化;提高了脂质体囊泡的药物的包封率^[23]。

6 用于异种移植免疫隔离的微胶囊化胰岛及其低温保存

用胰岛移植可治疗糖尿病,但人胰岛来源不足和免疫排斥反应是胰岛移植的两个难题^[6]。上海市第一人民医院和我们合作,采用海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(APA)生物膜对胰岛进行微囊化,希望能起到免疫隔离作用,可用于异体和异种移植。微囊化的胰岛移植成功与否,除与被移植胰岛的数量和

质量有关外,还与微囊本身因素及其免疫隔离的功能有关。只有牢固度高、生物相容性好的微囊才能在体内长期存在。胰岛移植还要求微囊具有特殊的通透性,即小分子的葡萄糖、胰岛素等能通过;而大分子的免疫细胞和免疫球蛋白不能通过。这样的微囊膜才具有良好的免疫隔离作用;同时又能让营养物质进入微囊内,使微囊内的胰岛能长期存活。

为此,我们研制了高压静电成囊系统。该系统由高压电发生器、推进器及注射器等组成;能够制备粒径小、尺寸一致,表面光滑的球形微胶囊;并和上海市第一人民医院合作,对制备的APA微囊的牢固度、生物相容性以及通透性进行了试验研究。结果表明:采用高压静电成囊装置制成的微囊尺寸均匀、表面光滑、大小可控;其牢固度及生物相容性比气流式制囊技术好。微囊化的胰岛,经低温保存后存活率较高。上海市第一人民医院已将由SD大鼠取出的胰岛,用高压静电成囊装置微囊化后,异种移植至BAL-C小鼠,具有较好的疗效。通过葡萄糖灌流试验、一定浓度的胰蛋白酶、牛血清白蛋白及IgG溶液等试验、空微囊孵育试验,以及将荧光标记的免疫球蛋白进行的试验、空微囊孵育后荧光显微镜下的观察,都证明葡萄糖、胰岛素能自由通过微囊膜,胰蛋白酶也能透过微囊膜;而牛血清白蛋白、IgG则不能通过。说明此法制得的APA微囊具有良好的免疫隔离作用,为具有免疫隔离作用的微囊化胰岛用于异种移植提供了技术手段^[24,25]。

7 结束语

目前临床医学中的低温热物理问题主要集中在两个方面:一是具有重要临床意义的复杂细胞和组织的低温保存,如造血干细胞、胚胎和卵子、气管和血管、组织工程中工程化细胞、组织及其可降解骨架的低温保存等;另一是高品质药物制备中的问题,如冷冻干燥等。

这些问题的解决需要进行大量的应用基础研究。如用溶液理论、多元相图来分析和计算在慢速冷冻时溶液内冰晶形成的数量、溶液浓度的增加、未冻水份额的减少;分析水通过细胞膜的渗透过程,建立数理模型及控制方程;分析和建立溶液非晶态固化的动力方程;寻求新型的玻璃化溶液,研究其特性;研究生物体在降温过程中的传热及冷却规律,寻求达到最快冷却速率的方法。同时也需要

研制和完善低温生物医学中的仪器设备和技術,包括程序控制降温仪、低温扫描差示量热仪、低温显微镜、超快速冷却设备、冷冻干燥设备、电子显微镜样品制备的低温固定设备、先进的低温外科手术器械及正常组织的保护系统等。

参 考 文 献

- 1 华泽钊,等. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994
- 2 Mazur P, et al. Cryobiological preservation of drosophila embryos. *Science*, 1992, 258: 1932
- 3 Mukaida T. Successful vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reproduction*, 1998, 13: 2874
- 4 Fahy G M, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 1994, 21: 407
- 5 Hunt C J. Fractures in cryopreserved arteries. *Cryobiology*, 1994, 31: 506
- 6 Soong S P, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet*, 1994, 343: 950
- 7 陶乐仁,等. 低温保护剂溶液结晶过程的显微实验研究. *工程热物理学报*, 2001, 4: 481
- 8 Tao L R, et al. An experimental study of ice formation in high voltage electric field. *Heat Transfer Science and Technology*, Beijing: Higher Education Press, 2000. 169~174
- 9 Rall W H, et al. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 1985, 313: 573
- 10 Cao Q, et al. Effects on rapid cooling of small samples in quenching. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, 858: 262
- 11 Hua T C, et al. Quenching boiling in subcooled liquid nitrogen for solidification of aqueous materials. *Materials Science & Engineering A*, 2000, 292: 169
- 12 许建俊,等. 平板在过冷液氮中的淬冷沸腾传热的实验研究. *低温工程*, 1999, 4: 174
- 13 张 洁,等. 冷冻外科中组织冻结过程的实验与理论研究. *中国医学物理杂志*, 2000, 17(4): 251
- 14 张 洁,等. 模拟生物组织冻结过程实验与分析. *工程热物理学报*, 2000, 21 (3): 350
- 15 Zhang J, et al. Experimental measurement and theoretical analyses of the freezing-thawing processes around a probe. *Cryo-Letters*, 2000, 21: 245
- 16 王奇凤,等. 气管的低温保存和临床移植研究. *制冷学报*, 1999, 2: 50
- 17 徐红艳,等. 血管低温保存降温过程对裂缝产生影响的实验研究. *低温工程*, 2000, 1: 22
- 18 Pegg D E. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology*, 1997, 34: 183
- 19 Shi X, et al. Thermal fracture in a biomaterial during rapid freezing. *Journal of Thermal Stress*, 1999, 22: 275
- 20 华泽钊,等. 血管冷冻过程热应力和断裂的分析方法. *中国科学, E辑*, 2001, 31(2): 123
- 21 Hua T C, et al. Analyses of thermal stress and fracture during cryopreservation of blood vessel. *Science in China, Ser E*, 2001, 44 (2): 158
- 22 刘占杰,等. 药品冷冻干燥过程中的玻璃化作用. *中国医药工业杂志*, 2000, 8: 380
- 23 刘占杰,等. 脂质体冷冻干燥过程的实验研究. *化工进展*, 2000, 19(11): 69
- 24 李保国,等. 低温保存微胶囊化胰岛的实验研究. *低温工程*, 2000, 6: 30
- 25 李保国,等. 胰岛移植用免疫隔离微胶囊的牢固性、生物相容性和通透性研究. *中国免疫学杂志*, 2001, 17(2): 85