

大鼠胰岛分离纯化新方法 “两步过筛法”的建立及评估

陆忠 沈水仙 支涤静 罗飞宏

(复旦大学附属儿科医院内分泌遗传代谢病科,上海 201102)

[摘要] 目的 建立胆管内灌注胶原酶分离胰岛与适宜孔径滤网过筛相结合的快速纯化胰岛细胞的方法并评估这种方法的效果。方法 清洁级 8~12 周龄 Sprague-Dawley 大鼠胆管内灌注胶原酶消化、分离胰岛,分别采用 Ficoll 不连续密度梯度离心法和两次经不同孔径滤网过滤的两步过筛法纯化胰岛细胞,行双硫腙(dithizone, DTZ)染色、吖啶橙/碘丙啶(acridine orange / propidium iodide, AO/PI)双色荧光染色法分析分离胰岛的纯度与活率;行葡萄糖刺激—胰岛素释放试验检测细胞活性;采用免疫组化荧光染色法观察胰岛细胞胰岛素的合成功能。结果 大鼠两步过筛法和胰岛密度梯度离心法胰岛细胞收获量分别 782 ± 115 胰岛当量(IEQ)和 598 ± 135 IEQ,差异有统计学意义($P < 0.01$);纯度分别为 90%~100%和 65%~85%,活率分别为 $>95\%$ 和 85%~95%。两步过筛法分离的胰岛葡萄糖刺激—胰岛素释放试验显示培养 24 h 后,高糖实验组胰岛素浓度($76.9 \pm 6.1 \mu\text{g/L}$)显著高于刚分离纯化后即加入高糖刺激时的浓度($49.4 \pm 3.9 \mu\text{g/L}$),差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 两步过筛法分离纯化大鼠胰岛可获得纯度高、活率高且活性好的大鼠胰岛细胞。[中国当代儿科杂志,2013,15(7):572-576]

[关键词] 胰岛;分离;纯化;滤网;大鼠

The establishment of “two-step sequential filtration method” on the yield rate of purified islets in rats

LU Zhong, SHEN Shui-Xian, ZHI Di-Jing, LUO Fei-Hong. Department of Endocrinology and Inborn Metabolic Diseases, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China (Luo F-H, Email: luofh@fudan.edu.cn)

Abstract: Objective To develop a simple, rapid and reliable method of purifying Sprague-Dawley (SD) rat islets by sequential filtration through two cell strainers of different sizes and to evaluate the efficacy of the method. **Methods** Islets were isolated from 8 to 12-week-old clean grade Sprague-Dawley rat pancreases using the standard collagenase digestion procedure and purified with either the generally used Ficoll density gradient method or the innovative two-step sequential filtration method. The purity and vitality of the isolated islets were visualized and assessed with DTZ and AO/PI staining. Glucose stimulating tests were performed to assay cell activity, and immunohistochemical staining was used to evaluate the synthesis function of islet cells. **Results** The yield of islets in the two-step filtration method group was 782 ± 115 IEQ per rat, which was significantly higher than in the conventional Ficoll density gradient method group (598 ± 135 IEQ per rat, $P < 0.01$). Purity of the isolated islets in the two-step filtration method group was 90%-100% and vitality was over 95%. In the conventional Ficoll density gradient method group, islet purity was 65%-85% and vitality was 85%-95%. With regard to the high-sugar stimulation test in the two-step filtration method group, insulin concentrations in islets cultured for 24 hours were significantly higher than in those that were freshly purified ($76.9 \pm 6.1 \mu\text{g/L}$ vs $49.4 \pm 3.9 \mu\text{g/L}$; $P < 0.01$). **Conclusions** A two-step sequential filtration method for rat islet purification was developed and the method was simple and reliable, with high islet vitality, purity and yield. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(7):572-576]

Key words: Islets; Isolation; Purification; Filter; Rats

研究表明,儿童 1 型糖尿病 (Type 1 diabetes mellitus, T1DM) 仍以每 15 年增加 1 倍的速度在增长,而且低龄化的倾向明显^[1]。尽管基因工程胰岛素、胰岛素泵等新技术现已广泛应用,儿童 T1DM 的慢性并发症发病率仍超过预期的增长速度。因此,不断探索儿童 T1DM 的新型治疗方法成为目前国内外研究的热点。胰岛移植是迄今为止国内外能治愈儿童 T1DM 的唯一方法,而胰岛细胞分离是胰岛移

[收稿日期]2013-01-07;[修回日期]2013-02-07
[项目基金]国家自然科学基金项目(30470808)。
[作者简介]陆忠,男,博士,主治医师。
[通信作者]罗飞宏,主任医师。

植技术的关键基础^[2],但是由于胰岛细胞分离纯化技术要求高,影响胰岛分离的因素很多,使分离的胰岛细胞数量、活性及功能差异较大,即使采用相同的胰岛分离纯化方法,胰岛分离纯化的稳定性和一致性也难以令人满意^[3-8]。因此,不断改进胰岛分离、纯化的方法^[9],仍然是改善胰岛移植成功率的关键所在。本研究在经典的胆管内灌注胶原酶分离胰岛的基础上,采用两种纯化方法分别获得大鼠胰岛细胞,比较分析其纯度、活率及活性,以探索一种省时、经济的胰岛纯化方法,为获得大量高纯度、高活性的胰岛奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 8~12 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 20 只,体重 250~300 g,雌雄不限,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司(实验动物合格证号:SCXK(沪)2003-0002)。

1.2 主要试剂与仪器

胶原酶 P (Roche 公司);DNase (Sigma 公司);HEPES (Farco Chemical Supplies);新生牛血清 (杭州四季青公司);Ficoll 400 (Pharmacia 公司);双硫脲 (dithizone DTZ) (Sigma 公司);吖啶橙 (acridine orange, AO, Sigma 公司);碘丙啶 (propidium iodide, PI, Sigma 公司);RPMI 1640 (GIBCO 公司);多聚甲醛 (Sigma-Aldrich Biosciences);豚鼠抗胰岛素抗体 (DAKO Biosciences 公司);偶联 Texas-Red 的羊抗豚鼠抗体 IgG (Santa Cruz Biotechnology 公司);大鼠超敏胰岛素 ELISA 试剂盒 (Mercodia 公司);24 孔培养板 (Corning 公司);0.22 μm 孔径滤膜 (Millipore 公司);600 μm 不锈钢丝滤网 (上海实生公司);70 μm 尼龙滤网 (BD 公司);倒置显微镜 (Olympus 公司);荧光显微镜 (Olympus 公司);CO₂ 培养箱 (Thermo Forma 公司);酶标仪 (Bio-RAD 550 型)。

1.3 大鼠胰岛分离

SD 大鼠随机平分于两组(密度梯度离心法组和两步过筛法组,每组各 10 只),10% 戊巴比妥钠 30~40 mg/kg 后肢肌注射麻醉,取仰卧位、固定四肢、常规消毒,沿腹中线及两侧肋缘下作“个”型切口,显露胰管及胆总管,4 号丝线于胰管靠近肠壁处结扎,在胆总管内插入直径 0.55 mm 的静脉穿刺针并结扎固定,切开胸腔,破心放血处死,经胆总管内穿刺针注入浓度为 0.75 mg/mL 的胶原酶 P 溶液 8~10 mL,使胰腺充分膨胀,破坏腺泡组织,迅速摘取整个胰腺,置入

含 6~8 mL Hank's 液的消化瓶中,38℃ 水浴中消化 13 min,取出置于冰浴中用眼科镊撕碎胰腺,弃去未消化的脂肪组织,移入消化瓶中振荡 15 s 使其呈细砂状,加入预冷 4℃ 新生牛血清 10 mL 与 4℃ Hank's 液 30 mL 终止消化,完成胰岛分离。

1.4 大鼠胰岛细胞纯化

1.4.1 密度梯度离心法 将消化后的胰岛混悬液经 600 μm 不锈钢网过滤,滤液置于 50 mL 离心管 1200 rpm 4℃ 离心 2 min,弃去上清液,沉淀物加入 4℃ Hank's 液洗涤,同样方法离心洗涤共 3 次。沉淀物平分于 2 根 15 mL 离心管内,分别加入 25% Ficoll 4 mL 混匀,其上依次分别沿管壁缓慢加入 23%、20%、11% Ficoll 溶液和 Hank's 液各 2 mL,3000 rpm,4℃ 离心 20 min,吸出 23%~20% 及 20%~11% 界面的胰岛,用 4℃ Hank's 液于 50 mL 离心管内离心洗涤 2 次,获得胰岛细胞。

1.4.2 两步过筛法 将消化后的胰岛混悬液首先经 600 μm 不锈钢网过滤,滤液置于 50 mL 离心管 930 rpm 4℃ 1 min 离心洗涤 2 次,弃上清液,沉淀物再次经过直径 70 μm 的尼龙滤网,用 Hank's 液充分洗涤,翻转滤网,将沉淀物冲洗于无菌培养皿,同向轻轻旋转培养皿,仔细吸去漂浮细胞团,即可获得胰岛细胞。

1.5 胰岛细胞 DTZ 染色、计数及纯度分析

1.5.1 DTZ 染色 DTZ 10 mg 溶于 3 mL 无水乙醇 (含 50 μL 浓 NH₃·H₂O),加 Hank's 液 (pH = 7.8) 12 mL,配制成储存液。取储存液并用 Hank's 液稀释 100 倍,0.22 μm 孔径滤膜过滤,取少许滤液与胰岛细胞混合,室温 10 min 后镜检,猩红色染色者为胰岛细胞。

1.5.2 胰岛细胞计数 将胰岛细胞悬液充分混匀后,用 50 μL 定量加样器在胰岛悬液中重复取样 5 次,分别计数 DTZ 阳性的细胞团数,并用标尺测量细胞团直径,根据直径换算表换算为相当于直径 150 μm 的胰岛当量 (IEQ)^[10],再按以下公式计算:胰岛细胞当量总数 = 5 次样品中 DTZ 阳性细胞团当量数 $\div 5 \times 20 \times$ 样本总容量 (mL)。

1.5.3 胰岛纯度 取胰岛细胞悬液镜检,每个视野的细胞团 (包括胰岛和外分泌组织) 中 DTZ 阳性细胞团所占的百分比即胰岛纯度。

1.5.4 胰岛细胞活性鉴定 采用吖啶橙 (AO)/碘丙啶 (PI) 双色荧光染色法。用 Dulbeccos 液分别配制成储存液,AO 670 μM , PI 750 μM , 4℃ 避光保存。临用前取 0.01 mL AO 与 1 mL PI 混合,用 Dulbeccos 液稀释 10 倍,经 0.22 μm 孔径滤膜过滤,与

胰岛制备物混和 10 min,在荧光显微镜下用 490 nm 激发光滤光片,510 nm 光栅滤片可同时见到绿色 (AO)和红色 (PI) 荧光。绿色荧光表示活细胞,红色荧光表示死细胞或凋亡的细胞。每个视野中绿色荧光细胞团所占的比例为活率,反映胰岛活性。

1.5.5 葡萄糖刺激—胰岛素释放试验 将分离纯化后的胰岛细胞重悬于 RPMI1640 培养液,调整细胞数,培养于 2 块 24 孔培养板中,每孔 1 mL,每孔 200 个胰岛细胞,其中的一块在胰岛分离后立即加低糖(2.8 mM)无血清培养液 37℃ 孵育半小时,再分别依次加入低糖(2.8 mM)和高糖(28.0 mM)的无血清培养液,37℃、5% CO₂ 培养箱内各孵育 2 h,分别收集各孔培养液上清,离心后上清置于 -80℃ 保存待测。另一培养板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,吸尽培养液用 Hank's 液洗涤三次,再先后分别依次加入低糖和高糖的无血清培养液,37℃、5% CO₂ 培养箱内各孵育 2 h,分别收集各孔培养液上清,离心后上清置于 -80℃ 保存待测。收齐标本后统一用超敏大鼠胰岛素 ELISA 检测试剂盒检测胰岛素浓度。刺激指数 (SI) 为高糖刺激与低糖刺激的胰岛培养液上清中胰岛素浓度的比值。

1.6 胰岛素免疫组织化学荧光染色观察胰岛活性 采用 0.01 mmol/L PBS 洗涤胰岛细胞,4% 多聚甲醛/PBS 室温固定 15 min,PBS 洗涤 2 次;加 0.1% Triton X-100/柠檬酸钠室温穿透 5 min,PBS 洗涤 2 次;3%

BSA 封闭 37℃,1 h;加一抗(豚鼠抗胰岛素抗体 IgG,1:200)4℃ 过夜,PBS 洗涤 3 次;加二抗(羊抗豚鼠抗体 IgG 偶联 Texas-Red,1:200)避光 37℃,1 h;PBS 洗涤 3 次;Hoechst33258 染核,PBS 洗涤 1 次;镜检。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析,所有实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间均数比较采用两样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠胰岛分离胰岛细胞的收获量、纯度及活率 经 10 次重复后,两步过筛法胰岛收获量为 782 ± 115 IEQ/大鼠,胰岛纯度 (93.7 ± 2.4)% (90% ~ 100%),活率 (97.2 ± 1.3)% (大于 95%);密度梯度离心法胰岛收获量为 598 ± 135 IEQ/大鼠,胰岛纯度 (77.1 ± 5.7)% (65% ~ 85%),活率 (90.5 ± 3.7)% (85% ~ 95%)。两步过筛法胰岛收获量显著高于密度梯度离心法胰岛收获量,差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。DTZ 染色法观察胰岛细胞的纯度显示两步过筛法收获的胰岛纯度较高,用 AO/PI 染色后观察胰岛活性发现,Ficoll 密度梯度离心法所得胰岛存在少许死亡胰岛细胞(图 1)。

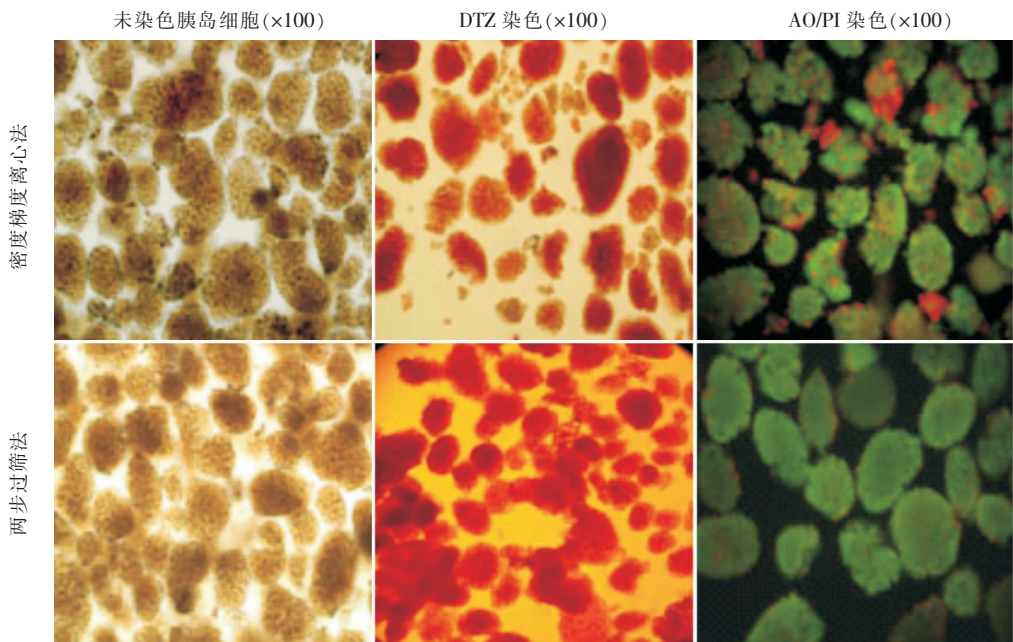


图1 两种纯化方法分离胰岛细胞结果的比较 DTZ 染色法观察胰岛细胞的纯度显示两步过筛法收获的胰岛纯度较高;用 AO/PI 染色后观察胰岛活性发现,密度梯度离心法所得胰岛存在少许死亡胰岛细胞。DTZ 染成猩红色者为胰岛细胞;AO/PI 染色中活细胞呈绿色,死细胞呈红色。

2.2 胰岛细胞对葡萄糖刺激的反应

刚分离的胰岛细胞,在低糖和高糖刺激下,体外培养液中胰岛素浓度分别为 $22.2 \pm 1.8 \mu\text{g/L}$ 和 $49.4 \pm 3.9 \mu\text{g/L}$, SI 为 2.23 ± 0.05 。培养 24 h,在低糖和高糖刺激下,体外培养液中胰岛素浓度分别为 $26.1 \pm 4.2 \mu\text{g/L}$ 和 $76.9 \pm 6.1 \mu\text{g/L}$, SI 为 2.99 ± 0.37 。对低糖刺激的胰岛素分泌能力,刚分离的胰岛与培养 24 h 的胰岛差别不显著,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但对高糖刺激的反应,培养 24 h 的胰岛要显著高于刚分离的胰岛细胞,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 2)。

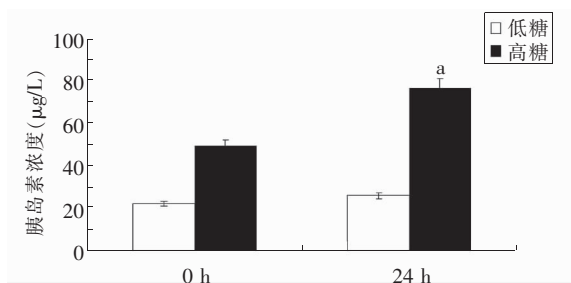


图2 分离的胰岛对葡萄糖刺激的反应 ($n = 5$) a: 与刚分离的胰岛比较, $P < 0.01$ 。

2.3 不同培养时间对胰岛素合成的影响

免疫组织化学荧光染色结果中红色荧光的强弱反映了胰岛素合成能力的高低,实验结果(图3)示,胰岛培养 48 h 时胰岛素染色荧光强度较强,培养 96 h、144 h、192 h 时胰岛素染色荧光强度逐渐减弱。

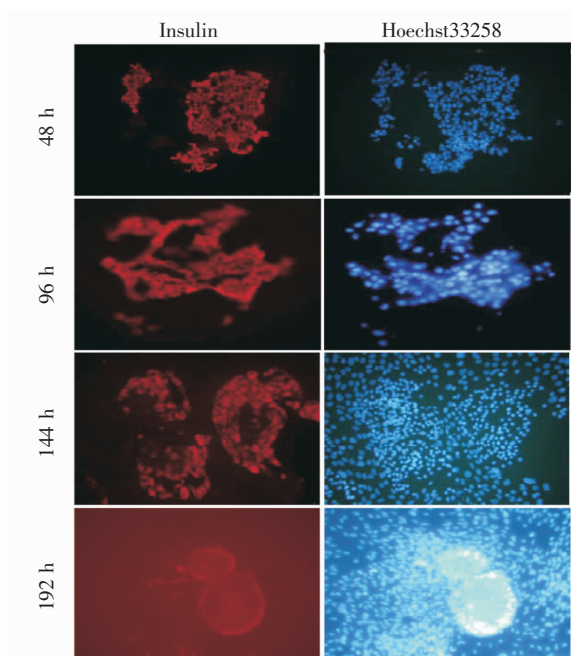


图3 胰岛素免疫组化荧光染色结果 ($\times 20$) 胰岛素阳性染色为红色,Hoechst33258 染核,呈蓝色。培养的胰岛细胞其红色荧光强度随着培养时间的延长而逐渐降低。

3 讨论

胰岛细胞在胰腺总细胞数中仅占 2%,目前啮齿类动物的胰岛纯化方法多采用 Ficoll 密度梯度离心法^[11],胰岛细胞分离纯化过程费时、费力、技术要求高^[12-13]。尽管如此,获得纯度约 85% 左右的胰岛细胞,在分离纯化过程中即约有 40% ~ 50% 的胰岛损失,而密度梯度离心法使用的 Ficoll 溶液对胰岛也有一定的细胞毒性作用^[14],因此,国外近年探索采用适宜的胶原酶消化配合滤网过滤代替 Ficoll 密度梯度离心过程^[3,9,15]。

滤网过滤分离胰岛细胞的效率和纯度取决于滤网孔径的选择,不同种类的哺乳动物其胰岛大小约为 100 ~ 200 μm ,且种间存在不同程度的差异,研究报道 BALB/c 小鼠胰岛直径 $< 300 \mu\text{m}$ ^[15], C57BL/6 小鼠的胰岛直径不超过 380 μm ^[16],新分离的大鼠胰岛直径介于 50 ~ 300 μm ^[17],考虑到胶原酶消化后血管等难以消化组织的残留,我们首先采用 600 μm 不锈钢过滤到未消化组织,随之再采用直径 70 μm 的尼龙滤网过滤,结果表明,滤网“两步过筛法”的胰岛纯化方法胰岛的收获量为 $782 \pm 115 \text{ IEQ/大鼠}$ 、纯度达 90% ~ 100%,显著高于 Ficoll 密度梯度离心法,与国外报道的相仿^[3,9,15]。同样在胆管内灌注胶原酶 P,使用密度梯度离心法纯化一个大鼠的胰岛需耗时 2 h 左右,而两步过筛法耗时减少至 30 min 内,纯化效率显著提高,与 Li 等^[6]报道的方法相仿。在胰腺消化过程中,胰腺基质在酶的作用下易形成一种黏稠的胶状物质,它可网罗大量的胰岛,使胰岛随之丢失,从而减少了胰岛的收获量。本研究在胶原酶 P 及随后的洗液中加入脱氧核糖核酸酶 (DNase),避免了胶状物质的形成,也有助于提高胰岛细胞的收获率。

胰岛制备物的质量鉴定采用 DTZ 染色法^[18],DTZ 为螯合指示剂,可和人类及动物胰岛细胞中含有的锌元素特异性螯合,从而使胰岛细胞呈现猩红色,而其他细胞不显色,故 DTZ 对胰岛细胞的特异性染色使胰岛细胞易于鉴别。DTZ 染色表明,两步过筛法获得胰岛的完整性优于 Ficoll 密度梯度离心法。胰岛细胞活性鉴定通常采用 AO/PI 双色荧光染色法^[19]。AO 为膜通透性染料,可进入活细胞内与核酸结合,在荧光显微镜下发出绿色荧光;PI 为非膜通透性核酸染料,不能进入活细胞,但易于通过死亡细胞的细胞膜,可与死亡或凋亡的细胞的 DNA 或 RNA 结合,在荧光显微镜下发出橙红色荧光,

AO/PI 双色荧光染色法可同时区分活的和已死亡的、或凋亡的胰岛细胞,对于胰岛制备物活性鉴别有重要价值。两步过筛法获得的胰岛普遍呈现绿色荧光,而 Ficoll 密度梯度离心法获得的胰岛存在少许死亡细胞。这可能与两步过筛法纯化胰岛操作简单,操作过程中机械损伤少,胰岛暴露时间短,不存在 Ficoll 的细胞毒性损伤等因素有关。进一步采用免疫组化荧光染色方法进行胰岛素染色,发现两步过筛法纯化获得的胰岛分离后可保持较长时间分泌胰岛素的能力;葡萄糖刺激-胰岛素释放试验作为体外测定胰岛细胞功能的方法,利用不同浓度的葡萄糖刺激-胰岛素释放试验,0 h 和培养 24 h 的胰岛在高糖刺激后上清液胰岛素浓度分别是低糖的 2.23 倍和 2.99 倍,说明两步过筛法纯化获得的胰岛细胞具有良好的胰岛素分泌能力,胰岛细胞功能不低于国内其他方法分离的胰岛^[6,20]。

总之,采用不同孔径两步过筛法分离纯化大鼠胰岛,可获得纯度高、活率高且活性好的胰岛细胞。

[参 考 文 献]

[1] Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20; a multicentre prospective registration study[J]. *Lancet*, 2009, 373(9680): 2027-2033.

[2] McCall M, James Shapiro AM. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*[J/OL]. 2012, 2(7): a007823.

[3] Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ. A protocol for islet isolation from mouse pancreas[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(11): 1649-1652.

[4] de Groot M, de Haan BJ, Keizer PP, Schuurs TA, van Schilf-gaarde R, Leuvenink HG. Rat islet isolation yield and function are donor strain dependent[J]. *Lab Anim*, 2004, 38(2): 200-206.

[5] 李明,陈栋,李永海,张伟杰.小鼠胰岛的分离与纯化[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(2): 206-208.

[6] 董维平,彭永德,丁晓颖,王煜非,黄运鸿.不同胶原酶消化对大鼠胰岛的纯化和获得率的影响[J]. *中华器官移植杂志*,

2012, 33(1): 53-55.

[7] Shimoda M, Noguchi H, Fujita Y, Takita M, Ikemoto T, Chujo D, et al. Islet purification method using large bottles effectively achieves high islet yield from pig pancreas[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(2-3): 501-508.

[8] 孙煦勇,秦科,农江文,文宁,赖彦华,董建辉,等.人胰岛在分离、纯化过程中的细胞凋亡及氧化损伤[J]. *中华器官移植杂志*, 2011, 32(8): 502-505.

[9] Liao YT, Jiang JX, Ye J, Qi H, Li FR. A novel protocol for mouse islet isolation[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7): 1134-1135.

[10] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas[J]. *Science*, 1980, 21: 908-910.

[11] Carter JD, Dula SB, Corbin KL, Wu R, Nunemaker CS. A practical guide to rodent islet isolation and assessment[J/OL]. *Biol Proced Online*, 2009, 11: 3-31.

[12] Gürol AO, Yillar G, Kurşun AO, Küçük M, Deniz G, Aktas E, et al. A modified automated method for isolation of viable pancreatic islets in laboratory animals[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(5): 1526-1527.

[13] Morrison CP, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. Islet yield remains a problem in islet autotransplantation[J]. *Arch Surg*, 2002, 137(1): 80-83.

[14] Salvalaggio PR, Deng S, Ariyan CE, Millet I, Zawulich WS, Bas-adonna GP, et al. Islet filtration: a simple and rapid new purification procedure that avoids ficoll and improves islet mass and function[J]. *Transplantation*, 2002, 74(6): 877-879.

[15] Jo J, Choi MY, Koh DS. Size distribution of mouse Langerhans islets[J]. *Biophys J*, 2007, 93(8): 2655-2666.

[16] Stull ND, Breite A, McCarthy R, Tersey SA, Mirmira RG. Mouse islet of Langerhans isolation using a combination of purified collagenase and neutral protease[J/OL]. *J Vis Exp*, 2012. doi: 10.3791/4137.

[17] Cavallari G, Zuellig RA, Lehmann R, Weber M, Moritz W. Rat pancreatic islet size standardization by the "hanging drop" technique[J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(6): 2018-2020.

[18] Clark SA, Borland KM, Sherman SD, Rusack TC, Chick WL. Staining and in vitro toxicity of dithizone with canine, porcine, and bovine islets[J]. *Cell Transplant*, 1994, 3(4): 299-306.

[19] Bank HL. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988, 24(4): 266-273.

[20] 袁宇,丛聪,张静,魏玲玲,李胜富,金熙,等.大鼠胰岛的分离纯化方法改进与功能鉴定[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(1): 75-79.

(本文编辑:王晓莉)