

自发性2型糖尿病模型db/db小鼠生物学特性研究

陆洁, 刘静, 裴天仙, 田兴美, 申秀萍*

天津药物研究院 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

摘要: 目的 对db/db小鼠进行生物学特性研究, 满足糖尿病研究的需要。方法 在试验周期内, 测定db/db小鼠的空腹血糖、体质量及摄食饮水量, 并测定21周龄模型动物的糖耐量、血中胰岛素、胰高血糖素、三酰甘油、总胆固醇等指标的水平, 进行胰腺的免疫组化双重染色及主要脏器的病理学检查, 并与db/m小鼠进行比较。结果 与对照组db/m小鼠比较, db/db小鼠过度肥胖, 伴有高血糖、胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱, 且肝脏和胰腺组织均出现明显病变, 胰腺免疫组化双重染色结果与血液学测定结果一致, 并可观察到胰岛中A细胞和B细胞的分布变化情况。结论 对自发性2型糖尿病模型db/db小鼠所做的相关生物学特性检测, 可供糖尿病研究参考。

关键词: db/db小鼠; 2型糖尿病; 生理学特性; 免疫组化双重染色; 胰岛素抵抗

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)05-0341-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.005

Study on biological characteristics of spontaneous type 2 diabetic model db/db mice

LU Jie, LIU Jing, PEI Tian-xian, TIAN Xing-mei, SHEN Xiu-ping

Tianjin Centre for Drug Safety Assessment, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To meet the need of study on diabetes mellitus, we investigated the biological characteristics of db/db mice. **Methods** In this experiment, fasting blood glucose, body weight, food intake, and water intake were measured. Fasting blood glucose levels in oral glucose tolerance test were observed on db/db mice of 21 weeks old. Meanwhile, the mice were sacrificed for the detection of insulin, glucagon, triglyceride (TG), and total cholesterol (TC) in serum, immunohistochemical double staining in pancreas, and morphological study. All the data of db/db mice were compared with those of db/m mice in statistics. **Results** Compared with db/m mice, obesity, hyperinsulinemia, hyperglycemia, and lipid metabolism disorder were serious on db/db mice, following obvious pathological deterioration of liver and pancreas. In accordance with the result of blood testing, change in distribution of A cells and B cells could be observed in immunohistochemical double staining on pancreas of db/db mice. **Conclusion** The db/db mice could be used as appropriate disease models of type 2 diabetes mellitus, providing the relevant biological information for further study in this field.

Key words: db/db mice; type 2 diabetes mellitus; biological characteristics; immunohistochemical double staining; insulin resistance

糖尿病是当前威胁人类健康的重要疾病, 近20年来我国糖尿病患病率呈快速增长, 目前为止患者人数已接近9 000万。合适的糖尿病动物模型在糖尿病的发病机制研究及其并发症的治疗、药物的开发过程中都发挥着极其重要的作用。db/db小鼠是目前应用于研究人类2型糖尿病最好的动物模型之一。小鼠的生物学特性及生理生化指标是多种实验中常见的重要参考值, 也是判断动物健康状态的标准, 同时也是选择实验动物的依据之一^[1-3]。本实验从体质量、空腹血糖水平、摄食量、饮水量、血清中主要指

标、胰腺免疫组化双重染色及主要脏器的病理学检查等方面, 对14~21周龄db/db小鼠进行生理学特性的检测, 为该小鼠在糖尿病研究中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级db/db小鼠和db/m小鼠, 均由南京鹏晟生物科技发展有限公司提供。许可证编号SCXK(苏)2009-0001, 合格证编号2022065。饲养于天津市新药安全评价研究中心实验动物屏障系

收稿日期: 2013-03-22

作者简介: 陆洁(1986—), 女, 研究实习生, 硕士, 研究方向为糖尿病、抗炎免疫、毒理。Tel: 15822926281 E-mail: luj@tjipr.com

*通信作者 申秀萍, 研究员, 研究方向为糖尿病、抗炎免疫、毒理。Tel: 13820574481 E-mail: shenxp@tjipr.com

统[实验动物使用许可证号:SYXK(津)2011-0005]。饲料为SPF大鼠料,由北京科澳协力饲料有限公司生产[生产合格证号:SCXK(京)2009-0012]。动物饮用水为北京凯弗隆北方水处理设备有限公司生产的KFRO-400GPD型纯水机制备的纯净水。设施环境温度、湿度、换气次数由中央系统自动控制,温度维持在20~26℃,相对湿度维持在40%~70%,通风次数为10~15次/h全新风,光照为12h明、12h暗。动物的日常饲养管理由动物保障部负责,每日为动物提供足够的块料和新鲜的饮用水。饮水瓶每周灭菌处理一次。

1.1.2 试剂与仪器 葡萄糖,天津市化学试剂一厂,批号20100325。Insulin(Mouse)Ultrasensitive ELISA试剂盒(批号02423)、Glucagon(Human, Mouse, Rat) ELISA试剂盒(批号110913)均由ALPCO生产。Anti-Glucagon antibody [K79bB10](ab10988)(批号GR22269-1)、Anti-Insulin antibody (ab63820)(批号GR58531-1)、EXPOSE Mouse Specific AP (red) Detection IHC Kit (ab94740)(批号GR47563-1)、EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC Kit (ab80437)(批号GR54603-1)均由Abcam生产。总胆固醇(TC)测定试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司生产,批号110821。三酰甘油(TG)测定试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司生产,批号110551。Varioskan Flash型酶标仪,美国Thermo公司。Columbus型洗板机,奥地利日升。日立7080全自动生化仪,日本日立株式会社。G&G T2000电子天平,美国双杰兄弟(集团)有限公司常熟双杰测试仪器厂。PL203型电子天平,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司。卓越型(ACCU-CHEK)罗氏血糖仪及检测试纸条, Roche Diagnostics Gmbh。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 实验选用12周龄基因缺陷型2型糖尿病模型动物db/db小鼠,雌雄各半、预适应1周后尾静脉针刺采血测定3次血糖值(禁食4h,间隔1d),选择平均血糖值>13.0 mmol/L的db/db小鼠雌雄各5只(共10只)为模型组。选用与模型组同周龄的健康db/m小鼠雌雄各5只(共10只)作为对照组。小鼠雌雄分笼饲养,即每组2笼,每笼各5只。

1.2.2 体质量、糖代谢及摄食饮水量的变化 于14周龄开始,每日定时用电子天平称量每笼小鼠饮水

瓶质量和食料质量,计算每只动物每日饮水量、摄食量。饮水量=(前一天饮水瓶质量-当天饮水瓶质量)/5。食量=(前一天料质量-当天料质量)/5。每周测定模型组和对照组动物体质量。对14、16、18、21周龄db/db小鼠使用血糖仪测定禁食4h(不禁水)空腹血糖水平,对21周龄db/db小鼠进行糖耐量测试,各组ig给予1g/kg的葡萄糖(10%葡萄糖溶液,10 μL/g),分别测定药前和负荷葡萄糖后30、60和120 min各组小鼠血糖水平,血糖直接采用血糖仪测定尾静脉血。比较统计对照组和模型组不同周龄体质量、摄食饮水量及糖代谢的变化。

1.2.3 胰岛素、胰高血糖素、TG和TC含量的测定 于21周龄,眼眶静脉丛取血,分离血清。胰岛素水平使用Insulin(Mouse)Ultrasensitive ELISA试剂盒测定,胰高血糖素水平使用Glucagon(Human, Mouse, Rat) ELISA试剂盒测定,按照试剂盒说明书进行操作。日立7080全自动生化仪测定TG、TC含量。

1.2.4 组织病理学变化 于21周龄,糖耐量测试结束后,动物脱椎处死,剖杀,取动物肝脏、胰腺置于12%福尔马林中固定,组织经修块,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片厚度3 μm,HE染色,光镜下检查,并进行结果分析^[4]。

1.2.5 胰岛免疫组化双重染色 取石蜡包埋胰腺,切片厚度3 μm,按照免疫组织化学SP法显示胰岛中胰高血糖素免疫反应阳性细胞(A细胞)和胰岛素免疫反应阳性细胞(B细胞)。稀释度为:Anti-Glucagon antibody 1:2 000, Anti-Insulin antibody 1:1 000。Expose Mouse Specific AP (red) Detection IHC Kit和Expose Rabbit specific HRP/DAB detection IHC Kit显色。显微镜下观察,每组取5个样品,每张切片计数3个胰岛中胰岛素和胰高血糖素阳性细胞的数量,并计算比值进行统计学处理。

1.2.6 数据处理及统计分析 采用SPSS11.5 One-Way ANOVA(单因素方差分析, LSD)进行统计分析,两组间均数差异性比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 体质量、糖代谢及摄食饮水量的变化

统计结果显示,自14周龄,与对照组相比,模型组db/db小鼠的体质量差异具有极显著性($P<0.001$),摄食量、饮水量及空腹血糖水平均显著增加($P<0.05$)(表1~3)。至21周龄,糖耐量测试

结果显示,与对照组相比,模型组动物葡萄糖负荷后血糖差异存在显著性($P<0.01$),耐糖功能低下,葡萄糖负荷前后血糖均处于高水平,2 h 不能下降到正常。见表 4。

表 1 db/db 小鼠体质量的变化 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Changes in body weight of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量/g							
	第 14 周	第 15 周	第 16 周	第 17 周	第 18 周	第 19 周	第 20 周	第 21 周
对照	25.1±3.3	26.6±2.4	25.7±3.3	28.2±2.3	29.2±4.9	27.1±2.8	27.9±2.5	26.9±2.6
模型	49.8±5.4 ^{△△△}	48.4±3.9 ^{△△△}	48.1±2.8 ^{△△△}	52.1±3.7 ^{△△△}	52.2±4.0 ^{△△△}	52.0±5.1 ^{△△△}	52.0±7.2 ^{△△△}	53.3±7.6 ^{△△△}

与对照组比较: [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$, ^{△△△} $P<0.001$; 下表同

[△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ ^{△△△} $P<0.001$ vs control group; same as below

表 2 db/db 小鼠饮水量的变化 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Changes in water intake of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	饮水量/(g·只 ⁻¹)			
	第 15 周	第 17 周	第 19 周	第 21 周
	($n=10$)	($n=14$)	($n=14$)	($n=14$)
对照	5.8±2.9	5.7±1.4	6.2±1.1	7.0±3.0
模型	11.8±3.5 ^{△△}	12.2±3.6 ^{△△△}	12.1±2.8 ^{△△△}	14.1±5.0 ^{△△△}

表 3 db/db 小鼠摄食量的变化 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Changes in food intake of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	摄食量/(g·只 ⁻¹)			
	第 15 周	第 17 周	第 19 周	第 21 周
	($n=10$)	($n=12$)	($n=12$)	($n=12$)
对照	4.1±1.0	4.3±1.0	3.8±0.6	4.3±1.2
模型	5.2±1.3 [△]	6.7±1.8 ^{△△}	6.0±0.8 ^{△△△}	5.9±0.8 ^{△△△}

表 4 db/db 小鼠糖耐量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Changes in fasting blood glucose levels of db/db mice in oral glucose tolerance test ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)				糖负荷后血糖值/(mmol·L ⁻¹)		
	第 14 周	第 16 周	第 18 周	第 21 周	30 min	60 min	120 min
对照	8.2±1.1	7.7±1.6	8.0±2.3	7.6±1.3	9.0±2.2	8.4±2.3	7.4±2.2
模型	17.7±3.2 ^{△△△}	18.5±8.2 ^{△△}	17.0±10.8 [△]	20.2±8.8 ^{△△}	29.2±4.7 ^{△△△}	21.7±8.4 ^{△△△}	18.7±8.7 ^{△△}

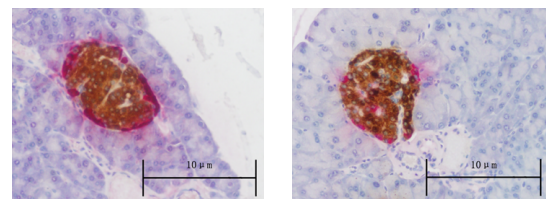
2.2 胰岛素、胰高血糖素、TG 和 TC 含量

与对照组相比,模型组动物血清中胰岛素、胰高血糖素、TG 和 TC 的量均显著升高($P<0.05$),见表 5。

2.3 免疫组织化学双重染色结果

21 周龄时,糖耐量测试结束后,对照组呈阳性反应的 A 细胞多分布于胰岛的周边部分,阳性反应产物胰高血糖素均位于胞质内,呈鲜红色;阳性反应 B 细胞分布于胰岛的中央部分,阳性反应产物胰岛素均位于胞质内,排列紧密,呈棕褐色。与对照组相比,随着糖尿病的进展,模型组动物 B 细胞排列疏松, A 细胞由位于胰岛周边逐渐向中央扩散,胰

腺组织胰高血糖素与胰岛素免疫阳性比值显著降低($P<0.001$)。空白对照组切片未见特异性着色。见表 5、图 1。



对照组

模型组

图 1 db/db 小鼠胰腺组织免疫组化双重染色观察结果

Fig. 1 Double immunohistochemical staining of pancreas of db/db mice

表 5 db/db 小鼠血清中胰岛素、胰高血糖素、胰高血糖素/胰岛素、A 细胞/B 细胞、TG 和 TC 的变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 5 Changes in insulin, glucagon, insulin/glucagon, and A cells/ B cells, TG, and TC of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	胰岛素/(ng·mL ⁻¹)	胰高血糖素/(pg·mL ⁻¹)	胰高血糖素/胰岛素	A 细胞/B 细胞	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照	0.42±0.22	220.03±57.38	0.65±0.43	0.28±0.06	2.06±0.47	0.79±0.11
模型	4.13±0.77 ^{△△△}	327.53±101.58 [△]	0.08±0.05 ^{△△}	0.13±0.04 ^{△△△}	3.57±0.92 ^{△△△}	1.60±0.60 ^{△△}

2.4 组织病理学检查结果

组织病理学镜下检查发现(图2),对照组小鼠肝脏细胞排列有序、形态清晰,胰岛细胞排列有序、形态清晰、胞浆丰富;与对照组相比,模型组动物绝大部分肝细胞空泡变性,同时,胰腺组织中胰岛细胞浆减少,血管轻度扩张。

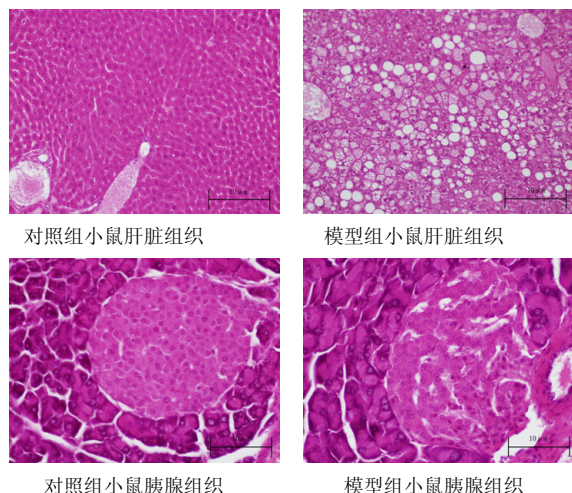


图2 db/db小鼠组织病理变化(HE染色)

Fig. 2 Histopathological changes of db/db mice (HE staining)

3 讨论

糖尿病(DM)是一种常见的代谢性疾病,是排位于肿瘤、心血管疾病和脑血管疾病后,对人类健康危害严重的慢性病,全球患者中约90%为2型。由于人口老龄化伴随肥胖增加与身体活动减少的趋势,这种流行性在当今社会显得尤为明显^[4]。除遗传因素外,2型糖尿病病因被认为多与患者过分肥胖致血中胰岛素相对不足有关。

胰岛素是调节葡萄糖、脂质和蛋白质代谢的重要激素,主要生理功能是促进糖代谢,促进葡萄糖氧化及糖原合成,抑制糖异生,从而维持血糖的稳定。只要胰岛B细胞能够代偿胰岛素抵抗,血糖浓度仍可维持正常。然而,这种稳态机制的破坏可导致外周组织的胰岛素抵抗,但当机体不能代偿由胰岛素抵抗造成的血糖升高时,血糖水平持续高出正常范围,最终导致2型糖尿病。胰岛素抵抗可以被定义为组织对胰岛素的反应不敏感,这种异常以胰岛素受体后信号传导障碍为主,这是2型糖尿病发生的一个重要特征^[5]。尽管2型糖尿病患者的胰岛素浓度高于正常,但肝脏产生的葡萄糖仍然过量。葡萄糖代谢障碍的程度在2型糖尿病患者中变异甚大,这种变异程度取决于胰岛素抵抗的程度。

以前糖尿病研究多采用人造动物模型,1966年美国 Jackson 实验室于 C57BL/Ks (db/db) 品系小鼠发现糖尿病突变基因(db)^[6],它是位于小鼠4号染色体的瘦素受体(Leptin receptor)基因发生突变所致。db/db小鼠主要表现为下丘脑缺陷,它不能产生饱感,即对饱感物质(瘦素)缺乏反应,从而合成代谢大于分解代谢,引起脂肪的堆积而肥胖,逐渐发展为严重的糖尿病伴有明显的高糖血症^[7]。该小鼠具有和人类2型糖尿病相似的临床症状,多饮、多食、多尿、肥胖、高血糖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、脂代谢异常等综合征^[8]。高血糖是由于对胰岛素作用的抵抗以及胰岛素分泌代偿不足造成的,其特征为碳水化合物、蛋白质和脂质代谢紊乱。本实验研究对象为db/db自发性2型糖尿病小鼠,试验观察期间,模型组动物的体质量、摄食饮水量及空腹血糖始终保持较高水平,糖尿病模型组动物TG和TC的含量均显著升高。可能的机制为2型糖尿病患者存在胰岛素作用不足,说明其脂肪组织摄取葡萄糖及从血浆清除三酰甘油的能力下降,脂肪合成代谢减弱,血浆中游离脂肪酸和三酰甘油浓度增高,存在脂质代谢紊乱。多余的脂肪组织导致的代谢紊乱,进一步加剧了胰岛素抵抗。为了防止糖耐量受损,需要更多的胰岛B细胞来“适应”胰岛素抵抗。胰岛素抵抗意味着需要更多的胰岛素^[9]。

Unger提出“双激素”学说,2型糖尿病的发生有胰岛素和胰高血糖素作用紊乱的参与,认为胰高血糖素的绝对或相对过多,是造成糖尿病高血糖症的重要因素之一,但确切的原因不明。有学者称^[10],2型糖尿病患者存在胰岛素分泌后延,表明其早期分泌减弱,而后期胰岛素分泌增高(高血糖刺激所致)。胰高血糖素同胰岛素水平呈现正相关,国内也有报道称胰高血糖素参与了胰岛素抵抗^[11]。

高胰岛素和胰岛素抵抗是 C57BL/KsJ (db/db) 小鼠的主要特点之一,胰岛素抵抗即是胰岛素的血中含量并未减少,但其功能作用却下降^[8]。本文观点与此一致,本实验于21周龄检测糖尿病模型小鼠耐糖功能低下,葡萄糖负荷前后血糖均处于高水平,并检测出血中胰岛素和胰高血糖素水平均有所升高。

正常生理状况下小鼠的胰岛呈圆型、椭圆形,轮廓鲜明,较均匀的散在于胰腺组织中。2型糖尿病胰腺组织中主要有二种病理形态学改变,一是胰岛纤维化,增生的纤维组织常呈灶性出现在胰腺外分泌部的小叶周围,腺泡之间及动脉周围,且纤维

束沿着毛细血管走行向胰岛内穿插,累及胰岛,而致胰岛纤维化。二是在某些胰岛周围胰腺腺泡明显萎缩,胰腺外分泌组织面积缩小^[12]。本实验病理学观察发现,与对照组相比,21周龄糖尿病模型动物绝大部分肝细胞空泡变性,胰腺组织中胰岛细胞胞浆减少,血管轻度扩张,但并未见胰岛纤维化,提示21周龄db/db小鼠的胰腺并未产生严重的病理变化,可延长实验周期进行进一步的观察研究。

内分泌细胞之间可通过紧密连接和缝隙连接来调节相邻细胞的功能代谢。胰腺的内分泌功能是通过胰腺腺泡之间散在的胰岛实现的。胰岛(pancreatic islet)是实质性的细胞团块,主要包括A细胞、B细胞、D细胞及PP细胞(或称F细胞)。B细胞最多,占胰岛细胞总数的60%~70%,分泌胰岛素(insulin);A细胞约占20%,分泌胰高血糖素(glucagon)。胰岛素和胰高血糖素的分泌及两者之间的相互关系,对于维持机体各种物质正常的新陈代谢尤为重要。血液中的葡萄糖水平是反馈调节胰岛素分泌的最重要的因素,长时间的高血糖刺激可刺激B细胞增殖,胰岛素分泌将进一步增加。胰岛素虽然可通过降低血糖间接刺激胰高血糖素分泌,但B细胞分泌的胰岛素和D细胞分泌的生长抑素则可通过旁分泌直接作用于相邻的A细胞,抑制胰高血糖素的分泌。摄食或葡萄糖负荷后,胰岛素的作用占优势。

胰岛内分泌细胞数量、比例以及位置分布的变化,均可干扰细胞彼此间的旁分泌调节作用。采用免疫组织化学双重染色的方法,即在同一张切片上同时显示胰岛中得胰岛素和胰高血糖素两种抗原的不同颜色,有利于观察两种抗原的表达。可以一定程度上解决普通的HE染色切片无法辨别,而单一的免疫组织化学染色因切片的不一致而造成观察结果由一定的主观性等问题。采用免疫组化双重染色计数,在同一张切片上显示胰岛素和胰高血糖素免疫阳性细胞的表达情况,第一重染色选择胰高血糖素,以碱性磷酸酶(AP)标记显红色,第二重染色选择胰岛素,以辣根过氧化酶(HRP)标记,DAB显棕褐色。由于使用不同的酶进行标记,故第二重染色前不需要阻断,背景清晰,未发生交叉反应^[13]。统计结果与所测得血中胰高血糖素与胰岛素水平的比值相一致,显示21周龄db/db小鼠在糖耐量试验2h后胰岛中胰高血糖素与胰岛素免疫阳性细胞的

分布情况,随着糖尿病的进展,模型组动物胰岛素阳性反应细胞(B细胞)排列疏松,胰高血糖素阳性反应细胞(A细胞)由位于胰岛周边逐渐向中央扩散。

本实验对14~21周龄db/db小鼠进行持续观察及多项指标的监测,结果表明该动物是研究人类2型糖尿病良好的模型动物,为相关药品的研发及糖尿病发病机制的研究提供背景资料和参考依据。

参考文献

- [1] 杨 锋,王红星,何永亮,等.实验Beagle犬血液学及血液生物化学参考值的探讨[J].中国比较医学杂志,2004,14(6):355-358.
- [2] 许永华,宋燕玲,张东辉,等.年龄和性别因素对封闭群草原兔尾鼠正常血液生化指标的影响[J].中国实验动物学报,2002,10(4):237-242.
- [3] 施新猷.现代医学实验动物学[M].北京:人民军医出版社,2000:71-81.
- [4] 刘 静,陆 洁,裴天仙,等.基因缺陷型2型糖尿病模型动物db/db小鼠早期生物学特性研究[J].药物评价研究,2013,36(1):8-12.
- [5] 代 晶,姜 卫.内分泌疾病百科全书4——糖尿病[M].北京:科学出版社,2008:18-32.
- [6] Hummel K P, Dickie M M, Coleman D L. Diabetes, a new mutation in the mouse [J]. *Science*, 1966, 153: 1127-1128.
- [7] Molnar M, Wittmann I, Nagy J. Prevalence, course and riskfactors of diabetic nephropathy in type-2 diabetes mellitus [J]. *Med Sci Monit*, 2000, 6: 929.
- [8] 田小芸,恽时锋,周森妹,等. C57BL/KsJ 小鼠的繁殖性能及部分生化指标的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(11): 675-677.
- [9] 卡洛琳.肥胖在2型糖尿病发病机制中扮演的角色[J].糖尿病天地:临床刊,2011,5(9):426-431.
- [10] 杨 篷,韩玉麟,程晓芸,等.胰岛血糖素与2型糖尿病的相关性研究[J].同济大学学报:医学版,2005,26(6):50-53.
- [11] 谢乃强.胰高血糖素与2型糖尿病患者胰岛素抵抗关系研究[J].中国基层医药,2002,9(9):798-799.
- [12] 潘彦珞,惠 京,王 欣,等.非胰岛素依赖型糖尿病胰岛内分泌细胞的免疫细胞化学观察[J].天津医药,1994,22(9):550-551.
- [13] 柏青杨,兴桂华.免疫组织化学双重染色法在胰腺损伤研究中的应用[J].齐齐哈尔医学院学报,2001,22(1):96.