

# 体外贴壁和微囊化生长睾丸支持细胞形态与其功能的相关性\*

张国境<sup>1</sup>, 赵佳<sup>2</sup>, 金洁<sup>1</sup>, 路欣<sup>2</sup>, 史小林<sup>2</sup>

## Correlation between the morphologies and physiological function of adherent and microencapsulated Sertoli cells

Zhang Guo-jing<sup>1</sup>, Zhao Jia<sup>2</sup>, Jin Jie<sup>1</sup>, Lu Xin<sup>2</sup>, Shi Xiao-lin<sup>2</sup>

### 文章亮点:

观察体外培养不同状态的小鼠睾丸支持细胞的形态与其生理功能间的相关性, 结果提示不同形态的睾丸支持细胞在蛋白质分泌数量和种类上都存在着差异, 细胞形态与其生理功能之间存在着明显的相关性。

### Abstract

**BACKGROUND:** *In vitro* culture has been a main method for studying the living cells. However, there is a big difference in the morphology of the cells and growth environment between *in vitro* and *in vivo*. So it is unclear whether the bioactivity of cells *in vitro* can reflect precisely the cell growth *in vivo*.

**OBJECTIVE:** To investigate the correlation between the morphologies of the cells cultured *in vitro* and their physiological function.

**METHODS:** Different morphologies of mouse Sertoli cells were cultured *in vitro*. One of morphologies was the growth of cell adherence, and the cells were flat; another cells grew in microcapsule, which showed sphere. Culture solution from the two kinds of morphologies of SCs was taken out, and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis was finished for obtaining the corresponding electrophoretic band. And then, the molecular weight of protein was calculated to ascertain which kind of protein secreted by Sertoli cells with different morphologies.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There were 14 electrophoretic bands from the growth of cell adherence with flat Sertoli cells, and the molecular weight of protein distributed from  $17 \times 10^3$  to  $158 \times 10^3$ . There were 10 electrophoretic bands from the cell growth in microcapsule with spherical Sertoli cells, and the molecular weight of protein distributed from  $17 \times 10^3$  to  $58 \times 10^3$ . These findings suggest that there are differences between the quantity and the kind of protein which is secreted by Sertoli cells with different morphologies. There are obvious correlations between the morphologies of the cells cultured *in vitro* and their physiological function.

Zhang GJ, Zhao J, Jin J, Lu X, Shi XL. Correlation between the morphologies and physiological function of adherent and microencapsulated Sertoli cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(33): 6189-6193.

[<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

### 摘要

**背景:** 细胞体外培养一直是研究活细胞的主要方法, 但体外培养细胞的形态和生长环境与体内环境有很大差异, 因此, 细胞的生物活性是否能准确反映体内该细胞的状态尚不清楚。

**目的:** 观察体外培养细胞的形态与其生理功能间的相关性。

**方法:** 体外培养不同生长状态的小鼠睾丸支持细胞, 一种为贴壁生长状态, 细胞呈扁平状; 另一种为微囊化生长状态, 细胞呈立体球状。分别取 2 种不同形态睾丸支持细胞的培养液, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 获取相应的蛋白质条带, 通过蛋白质相对分子质量的计算来确认睾丸支持细胞分泌蛋白质的种类。

**结果与结论:** 贴壁生长的扁平状的睾丸支持细胞培养液中可辨别出 14 个条带, 蛋白质相对分子质量分布在  $(17 \sim 158) \times 10^3$  之间; 微囊化生长的立体球状睾丸支持细胞培养液中可辨别出 10 个条带, 蛋白质相对分子质量分布在  $(17 \sim 58) \times 10^3$  之间。提示不同形态的睾丸支持细胞在蛋白质分泌数量和种类上都存在着差异, 细胞的形态与其生理功能之间存在着明显的相关性。

**关键词:** 睾丸支持细胞; 条件培养液; 体外培养; 贴壁; 微囊; 形态

**缩略语:** 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE; 睾丸支持细胞条件培养液: sertoli cell conditioned medium, SCCM

张国境, 赵佳, 金洁, 路欣, 史小林. 体外贴壁和微囊化生长睾丸支持细胞形态与其功能的相关性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(33):6189-6193. [<http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html>]

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China; <sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, Basic Medical Hospital of Capital Medical University, Beijing 101300, China

Zhang Guo-jing★, Master, Associate professor, Department of Histology and Embryology, Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 1000069, China zgj29@163.com

Corresponding author: Shi Xiao-lin, Professor, Doctoral supervisor, Department of Histology and Embryology, Basic Medical Hospital of Capital Medical University, Beijing 1000069, China shixl.good@163.com

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.33.022

Received: 2012-01-10  
Accepted: 2012-03-25

<sup>1</sup>首都医科大学燕京医学院组织胚胎学教研室, 北京市 101300; <sup>2</sup>首都医科大学基础医学院组织胚胎学教研室, 北京市 100069

张国境★, 女, 1967年生, 北京市人, 汉族, 2005年首都医科大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事生殖医学的研究。  
zgj29@163.com

通讯作者: 史小林, 教授, 博士生导师, 首都医科大学基础医学院组织胚胎学教研室, 北京市 100069  
shixl.good@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344  
(2012)33-06189-05

收稿日期: 2012-01-10  
修回日期: 2012-03-25  
(20111010009/WL-T)

## 0 引言

自1951年厄尔利开发了动物细胞的体外培养基以来, 生物学观察与研究活细胞的主要方法都是通过细胞体外培养的手段。但在培养瓶中生长的细胞, 其生物活性是否能准确反映体内该细胞的状态, 另外利用细胞体外培养法作为某些难以进行体内试验的替代方法, 以体外观察活细胞的生物学改变, 间接探测体内试验的细胞学反应等检测结果, 是否能准确地说明问题, 一直是进行生物学探索研究者的疑问。提出疑问的理由是组织和细胞离体后独立生存在人工的培养环境中, 虽然模拟体内环境, 但细胞的形态与生长环境仍与体内有很大差异。

为了探究体外培养细胞的形态与其生理功能间的相关性, 本实验将选择生理功能复杂的睾丸支持细胞, 利用细胞体外培养方法, 观察贴壁生长状态的睾丸支持细胞(细胞呈扁平状)和微囊化生长状态的睾丸支持细胞(细胞呈立体球状), 在相同的培养条件中, 其外分泌(即分泌的可溶性蛋白质)的功能状态是否能随之发生改变。目的是通过本实验探索影响细胞功能状态的形态因素。

## 1 材料和方法

**设计:** 对比观察。

**时间及地点:** 实验于2007-06/2010-12在首都医科大学完成。

**材料:**

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
标准胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶、褐藻酸钠、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)	Sigma 公司
人、大鼠、小鼠 Fas-L 免疫组 织化学染色试剂盒	武汉博士德生物工程 有限公司
考马斯亮蓝 R-250	AmreSCo 公司
IX70 倒置式系统显微镜	Olympus
MCO175 CO2 培养箱	Sanyo
DYY-8C 型电泳仪	北京六一仪器厂

**动物:** 健康SPF级10~15 d龄雄性ICR小鼠,

体质量8~10 g, 由中国协和医科大学实验动物研究所提供, 用于制备睾丸支持细胞悬液。

**实验方法:**

**睾丸支持细胞原代培养:** 取出并分离小鼠双侧睾丸。将生精小管剪成小段, 混合消化液消化, 制成单细胞悬液, 过滤、静置, 弃上清。重悬细胞, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于培养瓶中培养, 24 h换液, 以后约4 d换液1次。

**睾丸支持细胞传代培养:** 原代培养的细胞生长近汇合期时, 加入0.25%胰蛋白酶溶液, 37 °C条件下消化1.0~2.0 min。制成细胞悬液。以 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度分瓶接种, 标准环境培养, 约3 d换液1次。

**微囊化睾丸支持细胞的制作及培养:** 消化传代生长至近汇合期的睾丸支持细胞, 调整细胞悬液的浓度至 $4 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ; 取0.5 mL细胞悬液与等体积1.5%海藻酸钠混合, 吸入1 mL注射器中; 向6孔培养板的一个孔中加入3 mL 1.1%CaCl<sub>2</sub>, 将注射器内的细胞悬液滴入该孔, 制成凝胶珠; 加入2 mL 0.05%多聚左旋赖氨酸氢溴酸盐, 作用6 min; 加入0.15%海藻酸钠3 mL, 作用5 min, 加入3 mL 1.5%柠檬酸钠作用6 min; 将孔中较整齐的微囊放入另一孔中, 加3 mL完全培养液, 标准环境培养, 约3 d换液1次。每毫升细胞悬液约可制作120个微囊, 以60个/瓶的密度于35 mL培养瓶中, 完全培养基、标准环境培养。

**睾丸支持细胞的鉴定:** 免疫细胞化学方法标记培养细胞中的Fas-L, 以确认培养细胞为睾丸支持细胞。40 g/L多聚甲醛4 °C固定15 min, 0.1%Triton-X-100 孵育15 min; 体积分数3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡标本5 min, 置PBS中5 min; 滴加电荷封闭液, 湿盒内10 min; 滴加工作浓度的Fas-L一抗, 4 °C湿盒内过夜; PBS清洗; 滴加二抗, 37 °C湿盒内20 min; PBS清洗; 滴加三抗, 37 °C湿盒内20 min, PBS清洗; DAB显色。

**睾丸支持细胞培养液的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE):**

**收集样品:** 睾丸支持细胞进入指数生长期(P3~5)和微囊化睾丸支持细胞培养3 d后, 将各组细胞培养液更换为含体积分数5%胎牛血清的DF-12培养液, 培养1周后用预温的PBS轻柔漂洗3~5次, 洗去残余血清。弃PBS后加入无血

清培养液, 标准环境培养24 h。收集上清, 4 °C 500×g 离心5 min, 取上清收集于离心管中, 于-80 °C冻存。其冻存液为睾丸支持细胞条件培养液(SCCM), 将贴壁生长睾丸支持细胞的SCCM标记为SCCM-T, 微囊化生长睾丸支持细胞的SCCM标记为SCCM-W。

**浓缩样品:** 将冻存的SCCM样品置于4 °C冰箱融化后混匀。依次经离心浓缩过滤装置UFC9, 4 °C 2 500×g 离心35 min和离心浓缩过滤装置UYM3, 4 °C 3 000×g 离心4 h。收集样品于200 μL EP管中, -80 °C冻存。

**样品的蛋白质浓度测定:** 采用考马斯亮蓝蛋白质定量法, 又称Bradford法。

**(1)溶液配制:** ①标准蛋白质溶液: 用超纯水将标准牛血清白蛋白(4 g/L)稀释为3 000, 2 000, 1 000, 500, 200, 100, 50 mg/L。②工作染色液: 使用前用超纯水将5×考马斯亮蓝浓缩染色液稀释为工作染色液。稀释后的工作染色液可在4 °C避光保存3个月。4 °C保存的工作染色液温度应升到室温后才可使用, 否则将降低吸光度。

**(2)测定方法:** 取数支0.5 mL EP管, 分别加入空白对照(超纯水)、各稀释度的标准蛋白质溶液和待测蛋白质样品各4 μL, 再加入100倍体积的工作染色液, 充分混匀, 放置2 min。设置酶标仪程序并打印, 按顺序将各溶液分别加入96孔培养板中, 加样体积为200 μL。在595 nm处测定各待测样品的蛋白质浓度。

用电泳缓冲液调节经浓缩的两组样品的蛋白质浓度至5 g/L。分别取10 μL加入电泳缓冲液和上样缓冲液, 热变性后进行电泳。使用高相对分子质量范围蛋白质Marker(130 000, 75 000, 58 000, 38 000, 25 000, 18 000)。

**SDS-PAGE:** ①变性蛋白质样本制备: 取50 μL蛋白样本加入等量2×蛋白样本缓冲液, 混合均匀, 于95 °C水中变性5 min, 立即放入冰水浴中, 冷却后放入-20 °C冰箱中。②聚丙烯酰胺凝胶制备: 将分离胶缓慢灌入玻璃槽中, 高度占模具高度的70%, 上层覆以适量蒸馏水隔离胶体与空气。配制4%浓缩胶, 将剩余空间灌满浓缩胶后插入样品梳, 待到浓缩胶聚合后, 将样品梳拔出。

4%浓缩胶(2.5 mL)配方:

配方	含量
超纯水	1.58 mL
40% Acr/Bic	0.25 mL
0.5 mol/L Tris(pH8.8)	0.63 mL
10% SDS	25 μL
10% AP	12.5 μL
TEMED	2.5 μL

③电泳: 在电泳槽内加入电泳缓冲液, 在加样孔内分别加入蛋白Marker和蛋白样品。先以80 V的恒压电泳30 min, 当溴酚蓝指示剂进入分离胶之后, 再以120 V的恒压电泳, 约60 min, 直到溴酚蓝染料抵达分离胶底部, 结束电泳。④观察: 将凝胶浸泡在考马斯亮蓝染色液中, 置水平摇台上轻摇4.0~5.0 h后, 凝胶浸泡在7%乙酸溶液内, 置于水平摇台上轻摇数小时脱色, 直至凝胶的背景与蛋白质条带的对比度明显、蛋白质条带清晰可见、背景显色很浅为止。使用凝胶成像系统照相存档。

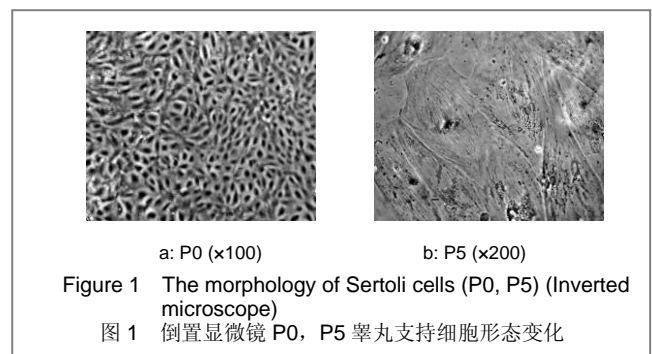
**蛋白质相对分子质量的计算:** ①标准曲线的绘制: 测量由凝胶顶端至溴酚蓝移动带前沿的距离, 再准确量出由凝胶顶端至各蛋白质Marker条带前沿的距离, 按公式: 相对迁移率(Rm)=蛋白条带迁移距离/溴酚蓝指示剂迁移距离, 求出Rm。然后在单对数坐标纸上做图。以蛋白质Marker相对分子质量的对数为纵坐标, 用其对应的Rm值为横坐标, 可得一直线, 即为标准曲线。②样品中未知蛋白质相对分子质量的测定: 测得同步电泳样品中目的条带的Rm值, 在标准曲线上查得其对应的相对分子质量的对数, 再计算出其相对分子质量。

**主要观察指标:** 贴壁生长状态的睾丸支持细胞条件培养液(SCCM-T)和微囊化生长状态的睾丸支持细胞条件培养液(SCCM-W)中, 睾丸支持细胞分泌的可溶性蛋白质在数量和种类上的差异。

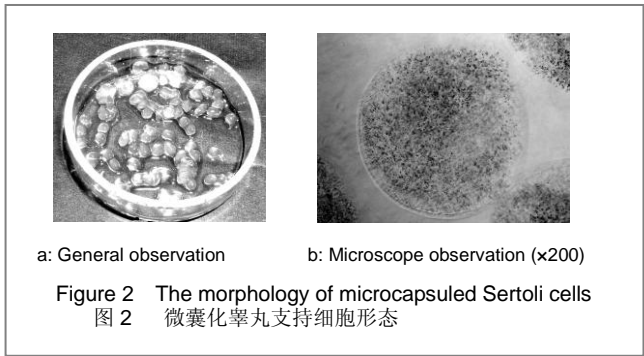
**统计学分析:** 由第一作者采用SPSS 10.0软件完成统计处理。

## 2 结果

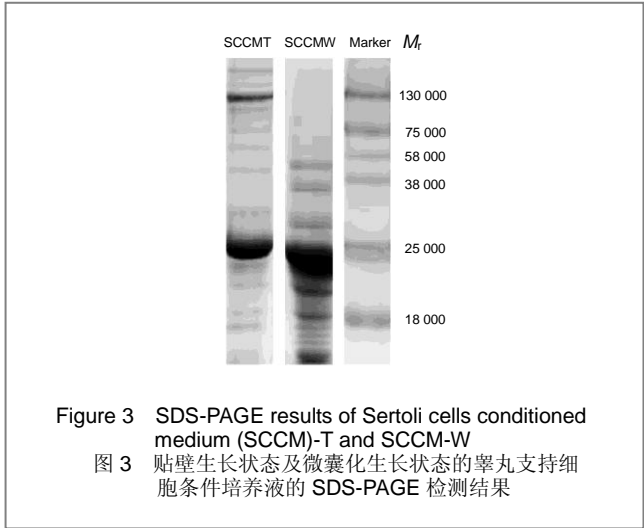
**2.1 贴壁生长的睾丸支持细胞形态** 倒置显微镜下可见刚分离的睾丸支持细胞为圆形, 24 h贴壁后可见其伸出多个突起, 细胞扁平, 细胞核较大, 见图1a; 细胞生长增殖三四天后汇合, 传至P4或P5代后, 细胞突起相嵌形成单细胞层铺于培养瓶底, 最突出的特征为细胞质内含有许多大小不等、分布不均的脂滴, 见图1b。



2.2 微囊化的睾丸支持细胞形态 实验用1 mL注射器缓慢推出制作微囊的方法, 每mL细胞悬液大约推出130个凝胶珠, 最终获得大约120个左右较整齐的微囊。大体观微囊呈透明圆球体, 直径约2 mm, 见图2a; 体视镜观察, 微囊呈圆球形, 大小均匀, 分散良好, 无粘连, 表面光滑, 微囊中细胞分布均匀, 每个细胞平均占有的空间为 $2.5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ , 相邻细胞的间距约为135.7  $\mu\text{m}$ 。平均每个微囊中约含有3 000个细胞, 见图2b。在整个培养过程中, 微囊内的细胞数量无大体可见的变化。

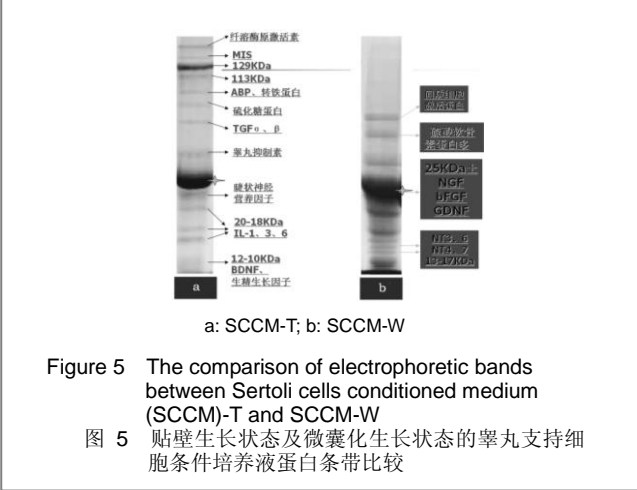
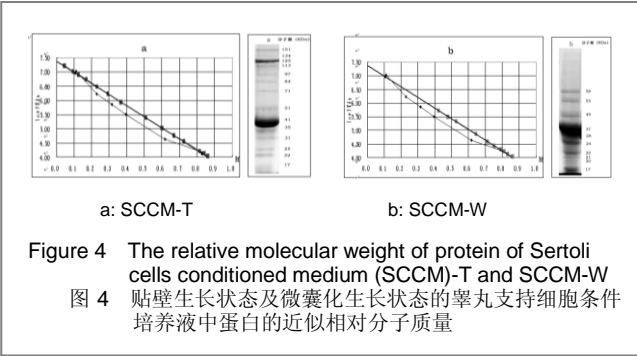


2.3 SCCM的SDS-PAGE检测结果 各组样品分别浓缩约300倍。调节各组样品的蛋白质浓度至5 g/L后进行电泳。结果见图3, 在SCCM-T中可辨别14个条带, 蛋白质相对分子质量分布在17 000~158 000之间; SCCM-W中可辨别出10个条带, 蛋白质相对分子质量分布在17 000~58 000之间。



依据蛋白质Marker绘制标准曲线, 在标准曲线上查得各条带对应的相对分子质量的对数, 计算得它们的近似相对分子质量分布在17 000~158 000之间, 见图4。

数据是3次实验的平均值, 各组数据间差距小于±10%。已分离出的14个条带中有10条找到了与其相对分子质量相对应的蛋白, 见图5。



### 3 讨论

既往的研究结果表明, 睾丸支持细胞是异体组织细胞移植的理想候选细胞, 它具有以下几个明显优势: ①睾丸支持细胞能够分泌多种蛋白质, 已知的有ABP、硫酸糖蛋白1和2、转铁蛋白、抗Müller管激素、转化生长因子等<sup>[1]</sup>。②睾丸支持细胞有局部免疫豁免功能。③睾丸支持细胞还可在局部分泌众多的生物基质材料, 这些生物基质不仅在维持组织的正常形态中起作用, 而且对细胞形态功能乃至生长分化均起重要的调节作用<sup>[2]</sup>。已有研究将睾丸支持细胞应用于异体肾细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞的共同移植等<sup>[3-7]</sup>, 均得到了满意结果。因此实验选择睾丸支持细胞为研究对象, 通过对不同生长状态睾丸支持细胞的条件培养液行SDS-PAGE分析, 探讨不同细胞形态与其功能间的相关性。

在制备蛋白质分析用条件培养液时, 实验中使用了无血清培养液对各组细胞进行24 h培养。Robert等<sup>[8]</sup>的实验已证实, 卵泡刺激素和睾丸激素只会影响睾丸支持细胞合成蛋白质的总量, 而不会引起分泌蛋白质的种类改变。故对贴壁生长的睾丸支持细胞和微囊化生长的睾丸支持细胞条件培养液进行SDS-PAGE, 可以定性反映睾丸支持细胞在正常培养(即有血清培养)状态下可溶性

蛋白质的分泌情况。

细胞微囊化技术的基本原理是利用微囊半透膜结构所具有的相对分子质量选择性通透特点, 将具有免疫活性的大分子物质阻隔在微囊外, 囊内细胞生存所需要的营养物质以及信号物质能快速、通畅的进入微囊。同时, 囊内细胞所分泌的具有活性的小分子物质也能快速扩散出去<sup>[9-12]</sup>。可见, 要应用此技术, 待包裹的细胞必备条件是: ①具有分泌生物活性物质的细胞。②此种生物活性物质的相对分子质量比免疫球蛋白(相对分子质量为150 000)小, 能通过半透膜。

SCCMT经SDS-PAGE可分辨出14个蛋白质条带,  $M_r$  17 000~158 000之间(由于采用浓缩离心装置对蛋白质样品进行浓缩时选用的是10 000截留相对分子质量的超滤膜, 10 000以下的分子有可能被滤出), 实验结果与Robert等<sup>[8]</sup>的实验相似。SCCMT已分离出的14个条带中有10条找到了与其相对分子质量相对应的蛋白。这些蛋白分别与雄激素结合蛋白、转铁蛋白、硫化糖蛋白、转化生长因子 $\alpha$ 、 $\beta$ 、睫状神经营养因子、白细胞介素1、3、6, 脑源性神经营养因子、碱性成纤维细胞生长因子、胶质细胞源性神经营养因子、神经生长因子等细胞因子的相对分子质量相对应。

SCCM-W经SDS-PAGE可分辨出10个蛋白质条带,  $M_r$  17 000~58 000之间。SCCM-W中未见58 000以上的蛋白质条带, 这可能是由于本实验制备的工艺不能通过相对分子质量在58 000以上的大分子蛋白所致, 有文献报道使用静电微囊发生器制作微囊, 获得微囊的直径在200~500  $\mu\text{m}$ 之间<sup>[13]</sup>。有研究者认为, 微囊越小, 相对每个微囊内细胞的数目也越少, 使得每个细胞与外界接触的面积增大, 更容易保持其活性和功能<sup>[14-15]</sup>。实验中使用1 mL注射器, 由于方法简便, 仅为实验所用, 故推出的微滴直径在2 mm左右, 有可能导致 $M_r$  58 000以上的蛋白不能从微囊内释放。但就 $M_r$  58 000以下的蛋白质而言, SCCM-W中的蛋白质条带明显高于SCCM-T。其中 $M_r$  20 000~30 000之间的条带较为明显, 而且较SCCM-T宽, 此外, 有2个条带在SCCM-T的低相对分子质量区域内没有显示。与这些相对分子质量可能对应的蛋白, 分别有神经生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胶质细胞源性神经营养因子、NT3、6和NT4、7。

综上所述。睾丸支持细胞的不同形态与其外分泌的生理功能之间呈现有明显相关性。两者间的相关性不仅表现在分泌量间的差异, 而且在分泌物的种类方面也存在着差异。因此实验结果支持应用体外细胞培养的方法

探测体内细胞的生理功能需慎重。

#### 4 参考文献

- [1] Shi XL. Beijing: Kexue Chubanshe. 2002:3-7.  
史小林. 人类生殖学[M]. 北京: 科学出版社, 2002:3-7.
- [2] Seino K, Kayagaki N, Fukao K, et al. Rejection of Fas ligand-expressing grafts. *Transplant Proc.* 1997;29(1-2):1092-1093.
- [3] Sun XQ, Zhao H, Wen RM, et al. Xibaoyu Fenzi Mianyixue Zazhi. 2001;17(4):350-352.  
孙晓青, 赵鸿, 温儒民, 等. 睾丸Sertoli细胞对共移植同种异体肾细胞的保护作用及受体性别的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(4):350-352.
- [4] Zhao H, Sun XQ, Ding Q, et al. *Zhonghua Waikexue Zazhi.* 2002;40(4):259-261.  
赵鸿, 孙晓青, 丁强, 等. 睾丸支持细胞与共刺激通路阻断剂对异体移植肾细胞的保护作用[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(4):259-261.
- [5] Shamekh R, Newcomb J, Mallery J, et al. Survival of rat or mouse ventral mesencephalon neurons after cotransplantation with rat sertoli cells in the mouse striatum. *Cell Transplant.* 2005;14(8):551-564.
- [6] Valdés-González RA, Dorantes LM, Garibay GN, et al. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(3):419-427.
- [7] Isaac JR, Skinner S, Elliot R, et al. Transplantation of neonatal porcine islets and sertoli cells into nonimmunosuppressed nonhuman primates. *Transplant Proc.* 2005;37(1):487-488.
- [8] Wilson RM, Griswold MD. Secreted proteins from rat Sertoli cells. *Exp Cell Res.* 1979;123(1):127-135.
- [9] Evangelista MB, Hsiang SX, Fernandes R, et al. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials.* 2007;28(25):3644-3655.
- [10] Yim EK, Wan AC, Le Visage C, et al. Proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell encapsulated in polyelectrolyte complexation fibrous scaffold. *Biomaterials.* 2006;27(36):6111-6122.
- [11] Chayosumrit M, Tuch B, Sidhu K. Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm. *Biomaterials.* 2010;31(3):505-514.
- [12] Murua A, Portero A, Orive G, et al. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J Control Release.* 2008;132(2):76-83.
- [13] Wang ZF, Xue YL, Gao JM, et al. *Zhongguo Linchuang Kangfu.* 2005;9(41):17-19.  
王振福, 薛毅珑, 高军茂, 等. 侧侧金森病样大鼠脑中微囊化牛嗜铬细胞移植实验[J]. 中国临床康复, 2005, 9(41):17-19.
- [14] Robitaille R, Dusseault J, Henley N, et al. Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology.* 2003;144(7):3037-3045.
- [15] Sugiura S, Oda T, Izumida Y, et al. Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array. *Biomaterials.* 2005;26(16):3327-3331.