

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.29.011

[http://www.crter.org]

张绍敏, 毋中明, 于德民. 载  $\beta$ -TC3 细胞新型葡萄糖敏感微囊的生物学性能[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(29):5331-5336.

## 载 $\beta$ -TC3细胞新型葡萄糖敏感微囊的生物学性能\*\*◆

张绍敏, 毋中明, 于德民(天津医科大学代谢病医院, 卫生部激素与发育重点实验室, 天津市 300070)

### 文章亮点:

1 实验创新性地具有生物相容和可生物降解性的天然材料制备成一种新型葡萄糖敏感微囊, 并对其表征, 以响应外界葡萄糖浓度变化而释放胰岛素。

2 应用制备的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊包裹  $\beta$ -TC3 细胞, 初步观察并评价其生物相容性。

3 实验结果初步证明了葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊作为细胞移植载体的可行性。希望能为治疗糖尿病提供一种新途径。

### 关键词:

生物材料; 材料生物相容性; 糖尿病; 葡萄糖敏感; 微囊; 海藻酸钠; 壳聚糖; 表征; 生物相容性; 国家自然科学基金

### 摘要

**背景:** 构建一种能够感应外界葡萄糖浓度变化而控制胰岛素释放的系统对有效地控制糖尿病的发生与发展具有重要意义。

**目的:** 研究负载  $\beta$ -TC3 细胞的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的性能。

**方法:** 通过层层自组方法制备葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊, 观察并评价其性能; 进一步应用制备的葡萄糖敏感微囊包裹  $\beta$ -TC3 细胞, 观察微囊内细胞的增殖情况。

**结果与结论:** 实验制备的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊温水浴振荡 48 h 后完整微囊仍达到 95%, 且微囊硬度变小、弹性增大; 通透性测试结果显示实验制备的微囊可将大分子物质牛血清白蛋白、免疫球蛋白 G 截留在微囊外; 体外释放实验显示, 随着周围环境葡萄糖缓冲液浓度的增加, 微囊内胰岛素释药量增大。说明实验制备的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊具有良好的机械强度、葡萄糖敏感特性与免疫隔离功能。进一步将  $\beta$ -TC3 细胞微囊化, 发现  $\beta$ -TC3 细胞在微囊中生长良好, 增殖高峰滞后于未微囊化的细胞。可见该生物微囊具有良好的细胞相容性。

## Biological characteristics of glucose-responsive microcapsules carrying beta-TC3 cells

Zhang Shao-min, Wu Zhong-ming, Yu De-min (Metabolic Hospital of Tianjin Medical University, Key Laboratory of Hormones and Development, Ministry of Health, Tianjin 300070, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** To prepare glucose-responsive microcapsules which can control insulin release as changing the glucose concentration in the medium is of great significance to control the occurrence and development of diabetes mellitus.

**OBJECTIVE:** To study the performance of glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules carrying  $\beta$ -TC3 cells.

**METHODS:** Glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules were prepared by layer-by-layer self-assembly method to evaluate the performance. And the glucose-responsive microcapsules carrying  $\beta$ -TC3 cells were prepared to observe the cell proliferation within the microcapsules.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The integrity rate of glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules could be 95% after 48 hours oscillation, and the hardness of microcapsules lowered, but the elasticity increased. The permeability test showed that microcapsules intercepted macromolecular substances such as bovine serum albumin and immuno-globulin G. The microcapsules could release more insulin with the increase of glucose concentration. As described above, the glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules had good mechanical strength, immunisolation effect and glucose sensitivity. The  $\beta$ -TC3 cells entrapped in the glucose-responsive microcapsules could grow well and the peak of cell proliferation lagged behind as compared with non-microencapsulated cells, indicating the glucose-responsive microcapsules had good biocompatibility.

**Key Words:** biomaterials; material biocompatibility; diabetes mellitus; glucose sensitivity; microcapsules; alginate; chitosan; characterization; biocompatibility; National Natural Science Foundation of China

张绍敏★, 女, 1982年生, 河南省郑州市人, 汉族; 2009年天津医科大学毕业, 硕士, 主要从事糖尿病相关研究。

zhangshaomin1234@126.com

通讯作者: 于德民, 博士, 博士生导师, 天津医科大学代谢病医院, 卫生部激素与发育重点实验室, 天津市 300070

yudem@hotmai.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)29-05331-06

收稿日期: 2013-04-16

修回日期: 2013-05-07

(201303250/WLM·W)

Zhang Shao-min★, Master, Metabolic Hospital of Tianjin Medical University, Key Laboratory of Hormones and Development, Ministry of Health, Tianjin 300070, China zhangshaomin1234@126.com

Corresponding author: Yu De-min, M.D., Doctoral supervisor, Metabolic Hospital of Tianjin Medical University, Key Laboratory of Hormones and Development, Ministry of Health, Tianjin 300070, China yudem@hotmai.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81000683\*

Received: 2013-04-16

Accepted: 2013-05-07

Zhang SM, Wu ZM, Yu DM. Biological characteristics of glucose-responsive microcapsules carrying beta-TC3 cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(29):5331-5336.

## 0 引言

目前胰岛素治疗糖尿病的方法在于通过频繁监测血糖, 且根据其结果进行皮下注射, 给患者的生活带来诸多不便; 且该治疗方法不能模拟生理胰岛素的分泌模式, 不能有效阻止一系列并发症如心脑血管疾病、肾病、眼底病变、神经病变以及不同程度的生殖能力下降等的发生。因此, 人们需要开发一种能够感应体内血糖浓度改变, 在适当时间提供准确剂量胰岛素来确保血糖浓度正常的给药系统<sup>[1]</sup>。

生物微囊通过一种半通透性膜材料包裹胰岛素分泌细胞调控血糖, 该装置可使患者避免长期使用免疫抑制剂, 并且允许使用动物胰岛、干细胞诱导或基因工程化胰岛素分泌细胞, 以此解决供者短缺问题<sup>[2-4]</sup>。近年来国内外研究了不同形式的葡萄糖敏感材料包裹胰岛素分泌细胞, 主要有装载葡萄糖氧化酶的pH值敏感材料<sup>[5]</sup>, 以刀豆球蛋白A为基础的溶胶-凝胶可逆互变材料<sup>[6]</sup>, 胰岛素绑定材料等<sup>[7]</sup>, 其中使用的天然蛋白质如葡萄糖氧化酶和伴刀豆球蛋白A<sup>[8-9]</sup>, 在体内的暴露会引起免疫反应。

基于改性壳聚糖对葡萄糖具有特异敏感性<sup>[10]</sup>, 可作为调节胰岛素释放的载体, 而海藻酸钠是一种存在于褐藻中的天然聚阴离子化合物, 具有良好的生物相容性<sup>[11-15]</sup>。实验将上述材料制备出一种新型的葡萄糖敏感微囊, 并对其表征, 以响应外界葡萄糖浓度变化而释放胰岛素; 同时包裹 $\beta$ -TC3细胞构建葡萄糖敏感生物微囊, 初步观察并评价这种生物微囊的性能, 以期治疗糖尿病提供一条有效的新途径。

## 1 材料和方法

**设计:** 体外对比观察实验。

**时间及地点:** 于2011年1月至2012年12月在天津医科大学代谢病医院卫生部激素与发育重点实验室完成。

**材料:**

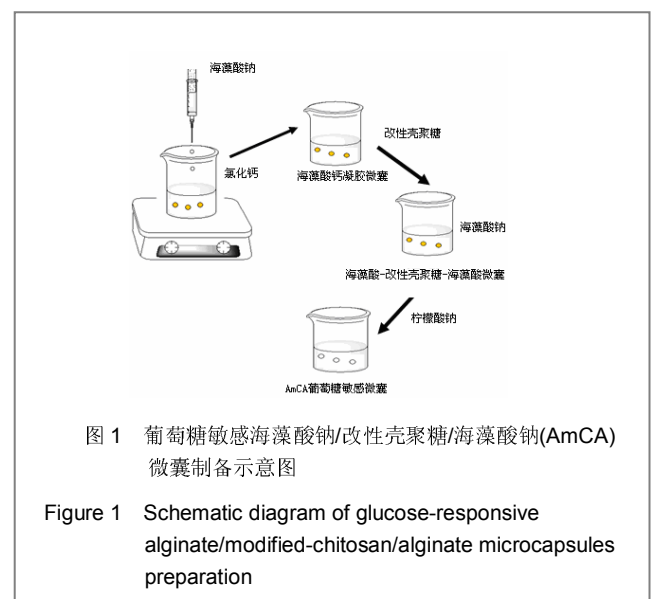
**细胞:**  $\beta$ -TC3细胞为天津医科大学代谢病医院卫生部激素与发育重点实验室保存。

**葡萄糖敏感微囊制备及生物性能研究所有主要试剂及仪器:** 氯化钙、柠檬酸钠、氯化钠、海藻酸钠购自上海试剂二厂; 胎牛血清、培养基、MTT、胰蛋白酶、牛血清白蛋白购自Sigma公司; 免疫球蛋白G购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 胰岛素购自江苏徐州万邦生化制

药有限公司; 气体压力微囊发生器、改性壳聚糖为天津医科大学代谢病医院卫生部激素与发育重点实验室制备; 一次性注射针头购自天津哈那好医材有限公司; THZ-82恒温震荡仪、恒流泵购自上海常思公司; UV-260型紫外可见分光光度计购自日本岛津公司。

### 实验方法:

**葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的制备:** 取15 g/L的海藻酸钠溶液20 mL, 用恒流泵匀速地通过一定孔径(0.7 mm $\times$ 32 mm)的针头向100 mmol/L的氯化钙100 mL中滴加形成海藻酸钙凝胶微囊, 固定20 min。在滴加过程中, 速度和距离是影响微囊形成的主要因素。实验中, 速度为30滴/min左右, 针头距液面10 cm左右, 微囊为完整的球形, 生理盐水洗涤3遍。将海藻酸钙凝胶微囊转移到5 g/L改性壳聚糖溶液(100 mmol/L乙酸溶解, pH 5.2)中, 轻轻摇动, 进行聚电解质复合反应, 得到海藻酸钙/改性壳聚糖微囊, 作用20 min, 生理盐水洗涤3遍。将海藻酸钙/改性壳聚糖微囊再悬浮于1.5 g/L的海藻酸钠溶液中, 中和其表面正电荷, 制得海藻酸钙/改性壳聚糖/海藻酸微囊; 作用10 min, 用生理盐水洗涤3次后, 用55 mmol/L柠檬酸钠浸泡海藻酸钙/改性壳聚糖/海藻酸微囊, 微囊内的海藻酸钙凝胶中的钙被钠置换, 使得海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠囊芯液化; 5 min后用生理盐水洗涤微囊表面多余的柠檬酸钠溶液, 制得葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊, 见图1。



**葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊机械强度的测定:** 将400个葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊放入内盛50 mL生理盐水的100 mL烧杯中,

用恒温水浴振荡仪于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$   $150\text{ r/min}$  振荡  $48\text{ h}$ , 分别在  $12, 24, 36, 48\text{ h}$  取样, 显微镜下统计完整微囊的剩余百分数, 计算公式为:

$$\text{微囊机械强度}(\%) = \frac{\text{处理后完整微囊数}}{\text{处理前微囊数}} \times 100\%$$

**葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊囊膜通透性能的测定:** 将葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠空微囊  $1\text{ mL}$  分别与  $0.5\text{ g/L}$  胰蛋白酶(相对分子质量  $23\ 400$ )、 $2.5\text{ g/L}$  牛血清白蛋白(相对分子量  $67\ 000$ )、 $0.4\text{ g/L}$  免疫球蛋白 G(相对分子质量  $150\ 000$ ) 溶液各  $1\text{ mL}$  混合, 分别在摇床上振荡孵育并于  $0, 15, 30, 60, 90, 120\text{ min}$  后, 吸取  $0.1\text{ mL}$  上清溶液作标本, 在紫外分光光度计  $279\text{ nm}$  处测量吸光度值  $A$ 。由于实验范围内蛋白质溶液的浓度与吸光度成正比, 因此可以用吸光度值  $A$  为纵坐标, 扩散时间为横坐标, 绘制微囊所在溶液中蛋白质浓度随时间变化的曲线<sup>[16]</sup>。

**葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊包裹胰岛素:** 将胰岛素与  $15\text{ g/L}$  海藻酸钠溶液混合均匀; 用恒流泵匀速的通过针头向  $100\text{ mmol/L}$  的氯化钙  $100\text{ mL}$  中滴加形成海藻酸钙凝胶微囊, 固定  $20\text{--}30\text{ min}$ ; 余步骤同葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的制备; 最后获得负载胰岛素的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊。

**葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊胰岛素体外释放行为:** 称取 3 份等质量的干燥后载胰岛素的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊, 置于一透析袋中, 两端扎紧, 分别将其浸入到  $0, 2, 3\text{ g/L}$  的葡萄糖磷酸缓冲溶液( $\text{pH } 7.4$ ) 中,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 使其达到充分溶胀, 每隔一定时间分别用紫外分光光度法在  $226.5\text{ nm}$  波长处测定吸光度值  $A$ , 按标准方程计算  $A = 0.021\ 42 + 0.015\ 76 \times c$  ( $c$  为胰岛素在  $\text{pH } 7.4$  磷酸缓冲溶液中的浓度,  $\text{mg/L}$ ,  $R = 0.999\ 37$ ),  $A = 0.001\ 17 + 0.036\ 97 \times c$  ( $c$  为胰岛素在  $\text{pH } 7.4$ ,  $2\text{ g/L}$  的葡萄糖水溶液中的浓度,  $\text{mg/L}$ ,  $R = 0.999\ 99$ ) 和  $A = 0.003\ 59 + 0.036\ 30 \times c$  ( $c$  为胰岛素在  $\text{pH } 7.4$ ,  $3\text{ g/L}$  的葡萄糖水溶液中的浓度,  $\text{mg/L}$ ,  $R = 0.999\ 98$ )。

**葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠生物微囊的制备:** 收集对数生长期的  $\beta$ -TC3 细胞与无菌的  $15\text{ g/L}$  海藻酸钠溶液混合均匀, 细胞浓度为  $3 \times 10^{10}\text{ L}^{-1}$ ; 用恒流泵匀速的通过针头向  $100\text{ mmol/L}$  的氯化钙  $100\text{ mL}$  中滴加形成海藻酸钙凝胶微囊, 固定  $20\text{--}30\text{ min}$ 。余步骤同葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的制备; 最后制得葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠生物微囊, 加入适量完全培养基后, 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 体积分数  $5\%\text{CO}_2$  细胞培养箱孵育。

**葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊内细胞活性评价:** 活细胞数量测定采用 MTT 分析法<sup>[17]</sup>, 它能间

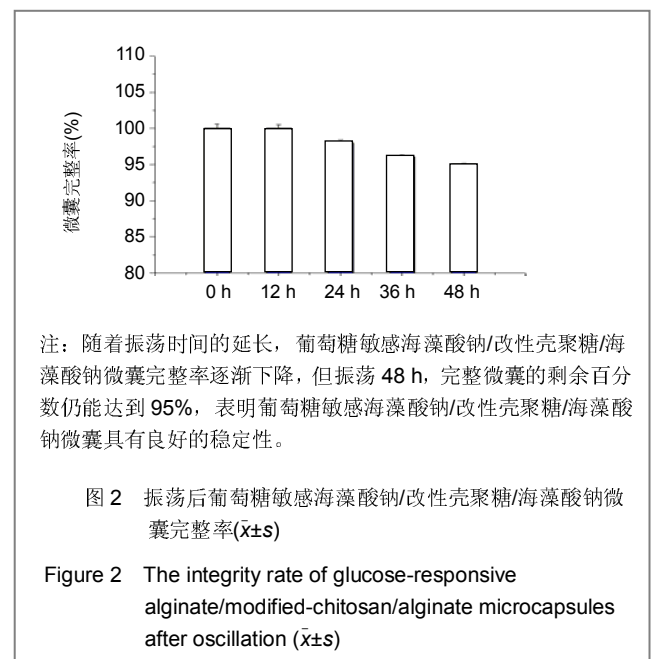
接反映活细胞的浓度, 以便观察细胞的生长情况。具体方法: 在  $24$  孔板的每孔中加入  $0.1\text{ mL}$  微囊化细胞, 每孔加  $100\text{ }\mu\text{L}$   $5\text{ g/L}$  MTT 溶液, 继续培养  $24\text{ h}$ , 待结晶完全后将微囊筛出, 用  $1\text{ mL}$  二甲基亚砜将细胞形成的结晶充分溶解, 吸取  $200\text{ }\mu\text{L}$  溶解液加入  $96$  孔板中, 用酶联免疫检测仪检测波长  $570\text{ nm}$  下的吸光度值  $A$ , 每组  $3$  个重复孔, 以正常培养的未微囊化  $\beta$ -TC3 细胞作对照。

**主要观察指标:** 葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的机械强度、通透性能、葡萄糖敏感性能及生物相容性。

**统计学分析:** 采用 Origin 8.5 软件进行处理, 实验中统计数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 未微囊化细胞与微囊化细胞两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

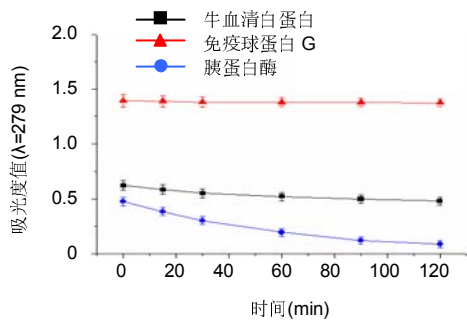
## 2 结果

**2.1 葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的机械强度** 分别将  $400$  个葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊放入内盛  $50\text{ mL}$  生理盐水的  $100\text{ mL}$  烧杯中, 用恒温水浴振荡仪于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$   $150\text{ r/min}$  振荡  $48\text{ h}$ , 并分别于  $12, 24, 36, 48\text{ h}$  取样, 在显微镜下统计完整微囊的剩余百分数。结果显示葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊在振荡  $48\text{ h}$  后完整微囊的剩余百分数仍能达到  $95\%$ , 见图 2。表明葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊经过液化后, 其硬度变小、弹性增大, 使微囊具有良好的机械强度与稳定性。



**2.2 葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的通透性能** 胰蛋白酶、牛血清白蛋白、免疫球蛋白 G

3 种蛋白质分别与葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠空微囊孵育后, 浓度变化曲线见图 3。其中孵育后, 海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊外溶液中胰蛋白酶浓度随孵育时间增加而明显降低, 牛血清白蛋白浓度略呈下降趋势; 而微囊外溶液中免疫球蛋白 G 的浓度随孵育时间延长几乎不变, 表明免疫球蛋白 G 不能通过这种微囊囊膜。

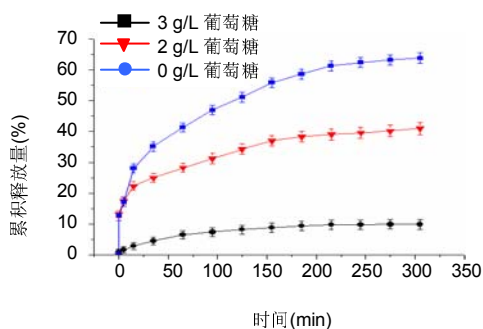


注: 随着孵育时间的延长, 海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊外溶液中胰蛋白酶浓度明显降低, 牛血清白蛋白浓度略呈下降趋势; 而微囊外溶液中免疫球蛋白 G 的浓度几乎不变, 表明免疫球蛋白 G 不能通过这种微囊囊膜。

图 3 不同蛋白质溶液与葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊孵育后的浓度变化( $\bar{x} \pm s$ )

Figure 3 The concentration change of glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules and proteins after incubation ( $\bar{x} \pm s$ )

2.3 海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊中胰岛素的体外释放情况 海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊在不同浓度葡萄糖缓冲液中对胰岛素的释放曲线见图 4。



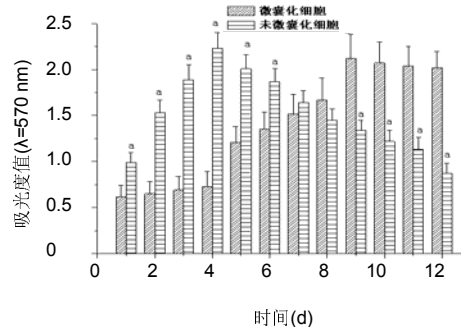
注: 随着时间的延长, 胰岛素释放量增加, 且随着周围环境葡萄糖缓冲液浓度的增加, 胰岛素释放量亦显著增加。说明海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊具有良好的葡萄糖敏感性。

图 4 海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊在不同浓度葡萄糖溶液中的胰岛素释放曲线( $\bar{x} \pm s$ )

Figure 4 The insulin release curves of glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules in different concentrations of glucose solution ( $\bar{x} \pm s$ )

结果显示, 在不含葡萄糖的缓冲液中, 药物释放较少, 不足 10%; 在经 2 g/L 葡萄糖溶液处理后, 胰岛素释放增加; 当葡萄糖浓度为 3 g/L 时胰岛素释放显著提高, 达 65%。同时, 海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊在初始 20 min 内, 药物释放量随时间的延长而增加, 且随着周围环境葡萄糖缓冲液浓度的增加, 释药量亦显著增加。说明海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊具有良好的葡萄糖敏感性。

2.4 葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠生物微囊内细胞的生长情况 采用 MTT 法分别检测经微囊包裹和未经微囊包裹的细胞增殖情况。以培养时间为横坐标,  $A_{570}$  为纵坐标绘制生长曲线, 见图 5。



与未微囊化细胞比较,  $^a P < 0.05$ 。

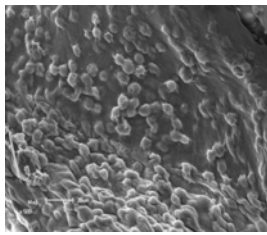
注:  $t$  检验结果显示, 培养前 6 d, 未微囊化细胞的生长速度明显高于微囊化细胞; 而培养第 7-12 天, 未微囊化细胞数目明显减少, 而微囊化细胞逐渐增多。且未微囊化细胞和微囊化细胞活性最大值间差异无显著性意义, 可见  $\beta$ -TC3 细胞能够在葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊内增殖, 只是在细胞增殖的起始阶段出现滞后, 在达到增殖高峰的时间上滞后于未微囊化的细胞。

图 5 葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊化细胞与未微囊化  $\beta$ -TC3 细胞的生长情况( $\bar{x} \pm s$ )

Figure 5 The growth condition of  $\beta$ -TC3 cells entrapped with or without glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules ( $\bar{x} \pm s$ )

结果显示, 未微囊化  $\beta$ -TC3 细胞在培养的第 1 天就开始增殖, 到第 4 天达到高峰, 随后细胞活性快速下降; 而微囊化  $\beta$ -TC3 细胞的增殖相对较慢, 从第 5 天开始增殖, 到第 9 天达到高峰, 随后细胞活性开始下降。上述结果表明  $\beta$ -TC3 细胞能够在葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊内增殖, 只是在细胞增殖的起始阶段出现滞后, 在达到增殖高峰的时间上滞后于未微囊化的细胞。

2.5 葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠生物微囊的形态特征 将葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠生物微囊固定后, 冷干, 表面喷金, 行微囊断面扫描电镜观察, 发现  $\beta$ -TC3 细胞呈球形分散于微囊内, 立体层次感强, 见图 6。



注: 扫描电镜下见  $\beta$ -TC3 细胞呈球形分散于微囊内, 立体层次感强。

图 6 包裹  $\beta$ -TC3 细胞的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的超微结构(标尺: 20  $\mu\text{m}$ )

Figure 6 Microstructure of glucose-responsive alginate/modified-chitosan/alginate microcapsules carrying  $\beta$ -TC3 cells (Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ )

### 3 讨论

现有微囊机械强度的评价方法是将微囊置于各种作用力场中, 考察微囊在作用力下破碎时所需力大小或者保持完整性的比率。实验应用剪切力场<sup>[18]</sup>, 将微囊置于一定流速下的流体中, 统计在剪切力作用下破碎的微囊完整率。研究表明, 经过液化的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的机械强度较好, 这可能因为微囊的硬度变小、弹性增大等, 使海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的机械强度增加。而微囊的通透性是囊内细胞存活和微囊免疫隔离效果的关键<sup>[19]</sup>。生长因子、激素等生物活性物质的相对分子质量多在 20 000 以下, 参与免疫排斥反应的免疫球蛋白中分子量最小的免疫球蛋白 G 为 150 000, 大多数补体成分的相对分子质量也在 85 000–400 000 之间。实验通过测定微囊膜截留分子量, 即不能透过膜的物质所具有的最低分子量, 来评价微囊膜的通透性能。此方法是评价微囊膜通透性能的主要方法, 采用的模型物质多为蛋白质和葡聚糖<sup>[20]</sup>。实验中制备的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊可截留相对分子质量大于 110 000 的物质, 从而阻隔相对分子质量在 160 000 左右的抗体及免疫活性细胞, 起到免疫保护作用<sup>[21–22]</sup>; 准许细胞生存所需营养物质, 如血清蛋白(相对分子质量小于 60 000)、电解质、氧等快速进入微囊<sup>[23]</sup>, 同时准许细胞分泌的生物活性物质如胰岛素等(相对分子质量小于 10 000)快速扩散出微囊。因此, 该微囊的通透性在满足囊内细胞存活的营养需要和细胞分泌物释放的前提下, 可将大分子物质牛血清白蛋白、免疫球蛋白 G 截留在微囊外, 为实现葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊的免疫隔离功能奠定了良好的基础。

同时实验采用体外细胞培养来评价微囊的生物相容性, 由于微囊材料的毒性越小, 它对细胞的抑制就越小。实验中与未微囊化细胞比较,  $\beta$ -TC3 细胞能够在葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊内进行一定的增殖, 只是在增殖的起始阶段出现滞后, 表明海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠葡萄糖敏感微囊具有良好的生物相容性, 有望作为细胞移植的载体。

1992 年, Kitano 等<sup>[24]</sup>发展了带有苯硼酸基团的葡萄糖敏感体系, 原理在于苯基硼酸基团能够与含有二羟基基团的分子(如葡萄糖)形成可逆的共价复合物, 随着周围环境葡萄糖浓度的增加, 凝胶交联密度降低, 变为溶胶态, 即凝胶的网格增大, 胰岛素的释放增加。实验采用苯硼酸改性的壳聚糖, 制备的海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊尺寸随着周围环境葡萄糖浓度的增加而增大, 便于胰岛素扩散, 提高胰岛素释放, 同时微囊对周围糖浓度的响应时间缩短到 3 h, 与以往报道的聚合物对周围糖浓度的响应时间 15 h 相比<sup>[25]</sup>, 缩小到原来的 27%。

实验成功制备出葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊, 同时构建负载分泌胰岛素的  $\beta$ -TC3 细胞的海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠葡萄糖敏感生物微囊。研究表明, 制备的葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊具有良好的机械强度和免疫隔离性能; 同时微囊对  $\beta$ -TC3 细胞无毒副作用, 在微囊内细胞呈现一定的生长趋势, 表明微囊具有良好的生物相容性。因此, 实验结果提示, 该微囊能够初步实现分泌胰岛素细胞生存环境的高度仿真化; 且该微囊具有较好的葡萄糖敏感性, 为胰岛素的源源不断供给提供有力的保障。实验初步证明了葡萄糖敏感海藻酸钠/改性壳聚糖/海藻酸钠微囊作为细胞移植载体的可行性, 为治疗糖尿病提供一条新途径。

**基金资助:** 国家自然科学基金项目(81000683)。

**作者贡献:** 实验设计为第二、三作者, 实验实施为第一、第二作者, 实验评估为第二、三作者, 资料收集为第一、二作者。第一作者成文, 第二、三作者审校, 第一、二作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**学术术语:** 层层自组装—是 20 世纪 90 年代发展起来的一种简易、多功能的表面修饰方法。层层自组装最初利用带电基板在带相反电荷介质中的交替沉积制备聚电解质自组装多层膜; 随着技术的发展, 层层自组装适用的原料已由最初的聚电解质扩展到聚合物刷、无机带电纳米粒子等, 其适用介质由水扩展到有机溶剂以及离子液体, 其驱动力由静电力扩展到氢键、卤原子, 配位键, 甚至化学键。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密,

无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Ludwig B, Rotem A, Schmid J, et al. Improvement of islet function in a bioartificial pancreas by enhanced oxygen supply and growth hormone releasing hormone agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(13):5022-5027.
- [2] Teramura Y, Iwata H. Bioartificial pancreas microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliver Rev*. 2010;62(7-8):827-840.
- [3] De Vos P, Van Straaten JF, Nieuwenhuizen AG, et al. Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? *Diabetes*. 1999;48(7):1381-1388.
- [4] Chang TM. Artificial Cells for cell and organ replacements. *Artif Organs*. 2004;28(3):265-270.
- [5] Luo R, Li H, Lam KY. Modeling the effect of environmental solution pH on the mechanical characteristics of glucose-sensitive hydrogels. *Biomaterials*. 2009;30(4):690-700.
- [6] Lee SJ, Park K. Synthesis and characterization of sol-gel phase-reversible hydrogels sensitive to glucose. *J Mol Recognit*. 1996;9(5-6):549-557.
- [7] Makino K, Mack EJ, Okano T, et al. Self-regulated delivery of insulin from microcapsules. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*. 1991;19(1):219-228.
- [8] Tanna S, Joan Taylor M, Sahota TS, et al. Glucose-responsive UV polymerised dextran-concanavalin A acrylic derivatised mixtures for closed-loop insulin delivery. *Biomaterials*. 2006;27(8):1586-1597.
- [9] Cheng SY, Constantinidis I, Sambanis A. Use of glucose-responsive material to regulate insulin release from constitutively secreting cells. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93(6):1079-1088.
- [10] Wu Z, Zhang S, Zhang X, et al. Phenylboronic acid grafted chitosan as a glucose-sensitive vehicle for controlled insulin release. *J Pharm Sci*. 2011;100(6):2278-2286.
- [11] Huguet ML, Dellacherie E. Calcium alginate beads coated with chitosan: Effect of the structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochem*. 1996;31(8):745-751.
- [12] Hari PR, Chandy T, Sharma CP. Chitosan/calcium-alginate beads for intestinal delivery of nitrofurantoin. *J Microencapsul*. 1996;13(3):319-329.
- [13] Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo IV, et al. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *Int J Pharm*. 2006;311(1-2):1-10.
- [14] Mi FL, Sung HW, Shyu SS. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydr Polym*. 2002;48(1):61-72.
- [15] Pan XP, Li LJ. Advances in cell sources of hepatocytes for bioartificial liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012;11(6):594-605.
- [16] 刘映薇, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠(ACA)微胶囊的蛋白质通透性研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2006, 25(3):370-373.
- [17] 周晶, 张英, 王为, 等. 谷氨酰胺对微囊化重组CHO细胞生长代谢及内皮抑素表达的影响[J]. *生物工程学报*, 2006, 22(1):162-166.
- [18] Lee CS, Chu IM. Characterization of modified alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Artif Organs*. 1997; 21(9):1002-1006.
- [19] Dove A. Cell-based therapies go live. *Nat Biotechnol*. 2002; 20(4):339-343.
- [20] Kang J, Erdodi G, Kennedy JP, et al. Toward a bioartificial pancreas: diffusion of insulin and IgG across immunoprotective membranes with controlled hydrophilic channel diameters. *Macromol biosci*. 2010;10(4):369-377.
- [21] de Vos P, Spasojevic M, de Haan BJ, et al. The association between in vivo physicochemical changes and inflammatory responses against alginate based microcapsules. *Biomaterials*. 2012;33(22):5552-5559.
- [22] de Vos P, Faas MM, Strand B, et al. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials*. 2006;27(32):5503-5617.
- [23] Veriter S, Aouassar N, Adnet PY, et al. The impact of hyperglycemia and the presence of encapsulated islets on oxygenation within a bioartificial pancreas in the presence of mesenchymal stem cells in a diabetic Wistar rat model. *Biomaterials*. 2011;32(26):5945-5956.
- [24] Kitano S, Koyama Y, Kataoka K, et al. A novel drug delivery system utilizing a glucose responsive polymer complex between poly (vinyl alcohol) and poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) with a phenylboronic acid moiety. *J Control Release*. 1992; 19(1-3):161-170.
- [25] Voigt A, Zintl F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *J Biotechnol*. 1999;68(2-3):213-226.