

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.47.012

[http://www.crter.org]

田猛, 韩波, 游潮, 万昌秀. 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊是如何包裹肝细胞的? [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(47):8215-8221.

半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊是如何包裹肝细胞的? **☆○

田猛^{1,2,3}○, 韩波³○, 游潮¹, 万昌秀²(¹四川大学华西医院神经外科, 四川省成都市 610041; ²四川大学高分子科学与工程学院生物医学工程系, 四川省成都市 610065; ³南加州大学Keck医学院外科系, 美国加利福尼亚州洛杉矶市 90032)

文章亮点:

1 国内外关于半乳糖修饰材料用于肝细胞特异性吸附和功能表达改善的研究报道主要集中在膜和支架材料的研究中, 实验创新性地将半乳糖修饰和可以在生理 pH 值条件下制备的海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊结合起来, 用于肝细胞的包裹研究, 目前尚未见相关的研究报道。

2 通过深入研究半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的结构和性能, 为进一步将这种新型的微胶囊用于肝细胞包裹准备了条件; 实验证实半乳糖的引入在一定程度上削弱了海藻酸钠分子链上负电荷的密度, 影响了静电复合成膜的过程。将微胶囊包裹肝细胞后, 肝细胞在半乳糖化的微胶囊内自发形成了球形聚集体的结构, 并且其白蛋白分泌和尿素合成能力都有明显的改善。表明通过引入半乳糖的方法, 成功地制备了一种对肝细胞具有生物活性的新型。

关键词:

生物材料; 生物材料与药物控释; 药物控释材料; 半乳糖; 壳低聚糖; 海藻酸钠; 微胶囊; 肝细胞; 国家自然科学基金

主题词:

生物相容性材料; 胶囊; 药物调剂; 肝细胞

基金资助:

国家自然科学基金项目(30870614)*, 课题名称: 第三代生物材料的生物学界面反应及其生物相容性和功能性评价方法的研究; 成都市科技局&四川大学华西医院转化医学创新基金项目研究专项资助项目*

摘要

背景: 前期实验成功制备了一种新型半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊, 国内外尚未见以壳低聚糖和海藻酸钠制备的微胶囊用于肝细胞包裹的研究。

目的: 研究半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的结构和性能, 然后将这种微胶囊用于肝细胞包裹, 研究肝细胞的形态和功能表达。

方法: 激光共聚焦显微镜观察半乳糖化海藻酸钠含量分别为 50%, 30% 时, 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的膜结构和膜厚, 机械破碎百分率测定微胶囊的力学性能, 通过包裹 FITC 标记的白蛋白和球蛋白的释放来测定微胶囊通透性。倒置相差显微镜观察肝细胞在半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中的形态, 检测肝细胞白蛋白和尿素的合成。

结果与结论: 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的膜内层致密而外层疏松, 呈一种非对称膜的结构。随着半乳糖化海藻酸钠含量的增加, 微胶囊的膜也越来越疏松, 这些现象表明半乳糖的引入削弱了海藻酸钠分子链上负电荷的密度, 影响了静电复合反应。微胶囊的力学性能与胶囊膜的结构和厚度有关; 随着半乳糖化海藻酸钠含量的增加, 膜结构越来越疏松, 同时膜的厚度也减小, 因此其力学性能变差。微胶囊的通透性主要决定于皮层的孔径, 而疏松的亚层结构对通透性影响不大。制备的微胶囊具有选择性通过白蛋白, 截留球蛋白的能力, 表明胶囊膜的皮层孔径介于白蛋白和球蛋白尺寸之间。肝细胞在半乳糖化微胶囊中呈球形聚集形态, 并且肝细胞在半乳糖化微胶囊中的白蛋白分泌和尿素合成能力明显强于在海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中的效果。

Galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule: How to encapsulate hepatocytes?

Tian Meng^{1,2,3}, Han Bo³, You Chao¹, Wan Chang-xiu² (¹Department of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Department of Biomedical Engineering, College of Polymer Science & Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan Province, China; ³Department of Surgery, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles 90032, CA, USA)

Abstract

BACKGROUND: A novel galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule has been prepared successfully. There is no report on hepatocytes encapsulated into the microcapsule prepared with chitosan oligomer and alginate sodium.

OBJECTIVE: To study the structure and properties of the previous novel galactosylated alginate-chitosan

田猛☆, 男, 1980 年生, 四川省成都市人, 汉族, 博士, 讲师, 主要从事生物材料与组织工程方面的研究。
tianmong007@gmail.com

通讯作者: 田猛, 博士, 讲师, 四川大学华西医院神经外科, 四川省成都市 610041; 四川大学高分子科学与工程学院生物医学工程系, 四川省成都市 610065; 南加州大学 Keck 医学院外科系, 美国加利福尼亚州洛杉矶市 90032
tianmong007@gmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)47-08215-07

修回日期: 2013-08-11
(20121221009/GW · W)

Tian Meng☆, M.D., Lecturer,
Department of Neurosurgery,
West China Hospital, Sichuan
University, Chengdu 610041,
Sichuan Province, China;
Department of Biomedical
Engineering, College of
Polymer Science &
Engineering, Sichuan
University, Chengdu 610065,
Sichuan Province, China;
Department of Surgery, Keck
School of Medicine, University
of Southern California, Los
Angeles 90032, CA, USA
tianmong007@gmail.com

Corresponding author: Tian
Meng, Department of
Neurosurgery, West China
Hospital, Sichuan University,
Chengdu 610041, Sichuan
Province, China; Department of
Biomedical Engineering,
College of Polymer Science &
Engineering, Sichuan
University, Chengdu 610065,
Sichuan Province, China;
Department of Surgery, Keck
School of Medicine, University
of Southern California, Los
Angeles 90032, CA, USA
tianmong007@gmail.com

Accepted: 2013-08-11

oligomer microcapsule, and then explore the morphology and function expression of the hepatocytes encapsulated.

METHODS: The membrane structure and thickness of the microcapsule (containing 50% or 30% galactosylated alginate) were observed using a laser confocal microscopy. Mechanical property was determined by mechanical rupture rate. Permeability was evaluated by release profile of fluoresceine isothiocyanate-labeled human serum albumin and immunoglobulin G. The morphology of hepatocytes in the microcapsule was observed using an inverted phase contrast microscopy. Function expression of the hepatocytes included albumin secretion and urea synthesis.

RESULTS AND CONCLUSION: The microcapsule had an asymmetry structure, with dense inner and loosened outer surfaces. With the increase of the galactosylated alginate, the membrane became loose, which indicated the negative charge on the alginate molecular chains was weakened after introduction of galactose, and thus electrostatic complex was affected. Mechanical property was correlated with both membrane structure and thickness. With the increase of the galactosylated alginate, the membrane structure became loose and the thickness was decreased, resulting in poor mechanical properties. The permeability was dependent mainly on the pore size of the skin layer of the membrane other than the loose sublayer. The prepared microcapsule can selectively pass through the human serum albumin and cut off immunoglobulin G, indicating skin pore size between human serum albumin and immunoglobulin G. The hepatocytes can form sphere assemble in the galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule and exhibit improved albumin secretion and urea synthesis compared to the control in the alginate-chitosan oligomer microcapsule.

Subject headings: biocompatible materials; collagen; drug compounding; hepatocytes

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30870614*; the Translational Medicine Special Fund of West China Hospital, Sichuan University & Science and Technology Bureau of Chengdu*

Tian M, Han B, You C, Wan CX. Galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule: How to encapsulate hepatocytes? *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(47): 8215-8221.

0 引言 Introduction

微胶囊技术是20世纪末发展起来的一项新型技术,它已在细胞和酶的固定化、微生物和动植物细胞大规模培养、药物控制释放等诸多领域得到广泛运用,并展现出良好的发展前景^[1-2];其主要制备方法包括复合沉淀法、界面相变法、喷雾干燥、静电复合法等。静电复合法是利用带有相反电荷的两种聚合物之间的静电吸引作用形成静电复合物^[3]。这种制备方法条件温和,工艺简单,能够避免化学反应制备中所添加的有毒的化学交联剂及反应中生成的某些小分子对细胞培养的影响。自Sun^[4]采用静电复合法制备出海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊以来,吸引了越来越多研究者的关注,但由于聚赖氨酸成本较高,限制了其大量使用。Bartkowiak等^[5]采用壳低聚糖替代聚赖氨酸,将海藻酸钠直接滴入壳低聚糖溶液中来制备微胶囊。相比“二步法”制备的海藻酸钙-壳聚糖微胶囊^[6],一步法制备工艺更简单。

将肝细胞包裹在微胶囊中具有一些明显的优点。首先,微胶囊具有的三维结构不但可提供细胞黏附的基质,还更有利于肝细胞之间的相互接触。此外,可以通过控制微胶囊膜的孔径来允许白蛋白、营养

物质及代谢产物的自由扩散,同时阻止高分子量物质如免疫球蛋白和补体通过,从而避免免疫细胞及免疫分子对囊内细胞的损伤。因此,胶囊内的肝细胞可不受宿主的免疫排斥而长期存活,发挥其生物学功能,达到治疗目的。

半乳糖是肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体ASGPR的特异性配体。据报道,经过半乳糖修饰的材料表面可以改善肝细胞的黏附能力,进而影响肝细胞的形态和功能。比如,将半乳糖固定在聚乙酰内酯,聚丙烯,聚偏氟乙烯和壳聚糖上以后,都观察到了肝细胞形态的改变和肝特异功能的增强^[7-10]。因此实验研究设想是将半乳糖修饰和微胶囊包裹肝细胞两个方面结合起来。在上一篇文章中报道了将半乳糖引入海藻酸钠分子链中,然后采用“一步法”制备出具有半乳糖修饰的海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊,主要研究这种微胶囊的结构和性能,以及将其用于肝细胞的包裹。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 实验于2010年4月至2011年12月在四川大学组织工程支架材料研究室完成。

材料:

半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊结构、性能与肝细胞包裹实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
壳低聚糖 ($M_n < 3\ 000$)	浙江澳兴生物技术有限公司
海藻酸钠	青岛晶岩有限公司
半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊 (半乳糖化海藻酸钠的含量分别为 50%和30%, 分别记为 $r=0.5$ 和 0.3); 海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0$)	四川大学组织工程支架材料 研究室
RPM-1640 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
FITC 标记的人血清白蛋白 (FITC-HAS)、FITC 标记的人血清 免疫球蛋白(FITC-IgG)、尿素氮试 剂盒	南京建成
人白蛋白 Elisa 试剂盒	美国 Bethyl Laboratories 公司
PHS-3C 数显酸度计	上海宇隆仪器有限公司
台式高速冷冻离心机, 1-15K 型	Sartorius 公司
回旋式振荡器	江苏中大仪器厂
倒置相差显微镜(CX41)	日本 OLYMPUS 公司
激光共聚焦显微镜(Spinning Disk)	美国 Perkin Elmer 公司
F-7000 荧光分光光度计	日本 HITACHI 公司

实验方法:

半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊膜的结构与膜厚: 采用激光共聚焦显微镜观察半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊及海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的膜和测定膜厚。观察前微胶囊使用0.01%的伊红/PBS溶液染色半小时, 然后用PBS清洗。

半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的力学性能: 将半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊及海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊转移到6孔板中(每孔100个, 加入3 mL PBS)。然后将孔板固定在回旋式振荡器上。设定振荡频率250 r/min, 测定不同摇振时间(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 h)微胶囊的机械破损百分率^[11]。

半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的通透性: 在1%的海藻酸钠/PBS, 以及1%的半乳糖化海藻酸钠与海藻酸钠的混合物/PBS溶液中分别加入FITC-HSA和FITC-IgG至质量浓度为1 g/L。配制0.8%的壳低聚糖溶液, 调节pH值至7.0。将含FITC标记蛋白的海藻酸钠和半乳糖化海藻酸钠与海藻酸钠的混合物溶液($r=0.3$)分别吸入1 mL一次性注射器中(针头为削平针尖的4号针头), 然后滴入搅动中的壳低聚糖溶液中制备微胶囊。将制备好的微胶囊用PBS洗涤后, 分别浸泡在含1 g/L FITC-HSA和FITC-IgG的PBS中, 在室温下平衡2 h。然后快速用PBS洗涤后重新加入PBS进行蛋白释放实验, 分别在5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 min释放时间点

吸出1 mL释放溶液, 同时补加1 mL PBS到释放液中。各时间点的蛋白释放量使用荧光分光光度计测定。

肝细胞的微囊化: 将海藻酸钠或半乳糖化海藻酸钠与海藻酸钠的混合物在紫外光下照射30 min消毒灭菌, 分别溶于RPM-1640培养基中, 配制成1%的溶液。将对数期生长的L02肝细胞(四川大学华西医院移植工程与免疫实验室提供)用胰酶消化后吹打均匀, 细胞计数板计数, 离心5 min后去上清液, 加入1%海藻酸钠或混合物溶液配制细胞浓度为 $1 \times 10^9\ L^{-1}$ 的细胞悬液。另配制0.8%的壳低聚糖溶液, 调节pH值为7.0后过滤除菌。将细胞悬液吸入1 mL一次性注射器中(针头为削平针尖的4号针头)直接滴入搅动中的壳低聚糖溶液中制备微囊化肝细胞。微胶囊在壳聚糖溶液中成膜10 min后, 用RPM-1640培养基清洗。然后转移至12孔板中, 每孔微胶囊为0.1 mL细胞悬液所制备, 作四个平行实验组。对照组使用海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊在相同条件下包裹肝细胞。包裹了肝细胞的微胶囊置于37 °C, 体积分数5%CO₂, 饱和湿度下的二氧化碳恒温培养箱中培养, 每24 h换1次培养液, 每天观察细胞并照相。

微囊化肝细胞白蛋白合成检测: 每天收集培养液并在14 000 r/min下离心10 min后使用Sartorius 1-15K型台式高速冷冻离心机取上清液保存于-20 °C。白蛋白含量测定采用酶联免疫法, 具体操作步骤按说明书。

微囊化肝细胞尿素合成检测: 测定尿素合成能力时, 换上含5 mmol/L氯化铵的无酚红的RPMI-1640培养液继续培养120 min后, 收集培养液并在14 000 r/min下离心10 min后取上清液保存于-20 °C。尿素含量的测定采用尿素氮试剂盒测定。需要注意的是培养基应采用无酚红的RPMI-1640培养液, 以免酚红对测试结果产生干扰。

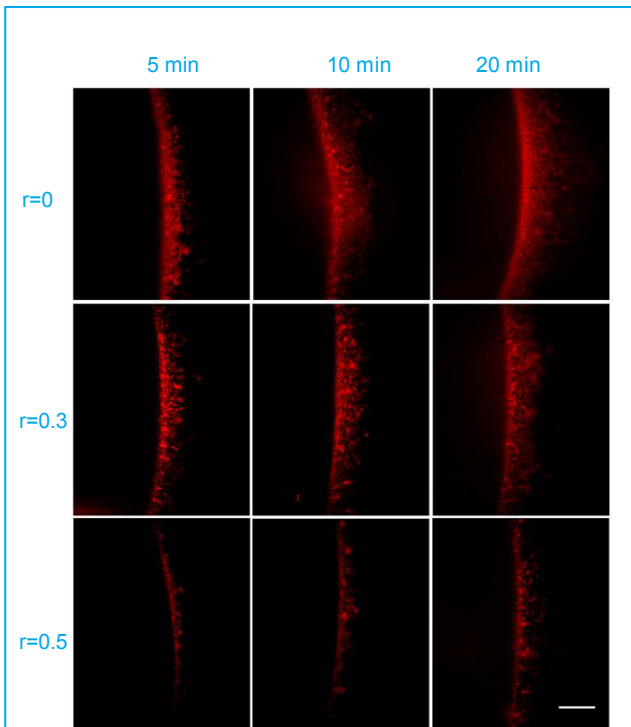
主要观察指标: ①激光共聚焦显微镜观察微胶囊的膜和测定膜厚。②微胶囊的力学性能。③微胶囊的通透性能。④微胶囊包裹肝细胞的形态、蛋白和尿素合成。

统计学分析: 使用SPSS 13.0软件进行统计学处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊膜结构与膜厚 制备的半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊膜的共聚焦显微镜图片见图1所示, 从膜的结构可以看出: 微胶囊的膜内层致密而外层疏松, 呈一种非对称膜的结构, 而且膜的外表比较粗糙。从图1中还可以看到: 对于所有的微胶囊随着成膜时间的增加, 膜厚也增加。在刚开始的10 min内膜厚增加很快, 然后膜厚增加变慢。对于海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0$), 成膜5, 10和

20 min的微胶囊的膜厚分别为 (31 ± 4) , (52 ± 6) 和 (63 ± 9) μm 。含30%半乳糖化海藻酸钠制备的微胶囊($r=0.3$)在各时间点的膜厚与不含半乳糖化海藻酸钠的微胶囊没有明显的差别, 成膜5, 10和20 min的微胶囊膜厚分别为 (35 ± 6) , (50 ± 5) 和 (61 ± 7) μm 。当半乳糖化海藻酸钠的含量增加到50%时($r=0.5$), 其各时间点的膜厚度都明显比前两种微胶囊要小, 成膜5, 10和20 min微胶囊的膜厚分别为 (9 ± 3) , (24 ± 5) 和 (32 ± 8) μm 。



注: 微胶囊的膜内层致密而外层疏松, 呈一种非对称膜的结构, 而且膜的外表比较粗糙; 对于所有的微胶囊随着成膜时间的增加, 膜厚也增加; 当半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中半乳糖化海藻酸钠的含量为 30%($r=0.3$)时, 微胶囊在各时间点的膜厚与不含半乳糖化海藻酸钠的微胶囊没有明显的差别; 当半乳糖化海藻酸钠的含量增加到 50%时($r=0.5$), 其各时间点的膜厚度都明显比前两种微胶囊要小。

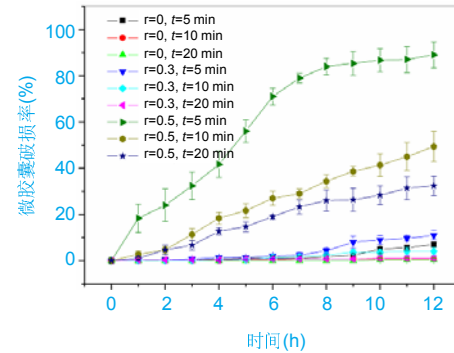
图1 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊膜的共聚焦显微镜图片(标尺 50 μm)

Figure 1 The confocal micrographs of the membrane of the prepared galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule (Scale bar: 50 μm)

2.2 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的力学性能

海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0$)和30%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0.3$)都表现出良好的力学性能, 经过 12 h 的剪切振荡后微胶囊的破损率都低于 10%。而50%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0.5$)的力学性能较差, 成膜5, 10和20 min的微胶囊的破损

率在12 h后分别达到了89.0%, 50.0%和32.3%; 而且可以看到微胶囊的破损率是随着振荡时间的增加而增加的。



注: $r=0, 0.3, 0.5$ 分别代表半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中半乳糖化海藻酸钠的含量为 0, 30%, 50%; $t=5, 10, 20$ min 分别代表不同的成膜时间; 海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0$)和 30%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0.3$)都表现出良好的力学性能, 经过 12 h 的剪切振荡后微胶囊的破损率都低于 10%。而 50%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊($r=0.5$)的力学性能较差, 成膜 5, 10 和 20 min 的微胶囊的破损率在 12 h 后分别达到了 89.0%, 50.0%和 32.3%; 而且可以看到微胶囊的破损率是随着振荡时间的增加而增加的。

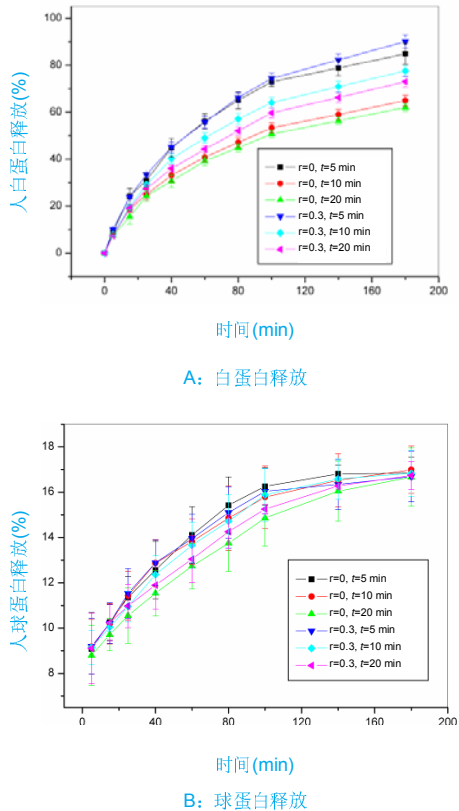
图2 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的力学性能

Figure 2 The mechanical property of the galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule

2.3 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的通透性

由于50%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的力学性能差, 没有实际用途。因此在通透性表征中只研究了前两种微胶囊。微胶囊的白蛋白释放曲线见图3A所示, 所有的微胶囊在前20 min时间内, 都释放了20%的白蛋白, 这一阶段属于初始的暴释阶段。然后所有微胶囊的释放速率逐渐变慢。成膜5 min两种微胶囊的白蛋白释放速率明显比其他微胶囊更快。经过50 min以后, 这两种微胶囊的白蛋白释放率达到了50%。到180 min时, 海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊和30%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的白蛋白释放率分别为 $(84.9\pm4.5)\%$ 和 $(90.2\pm2.7)\%$ 。成膜10 min和20 min的30%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的白蛋白释放速率比成膜10 min和20 min的海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的白蛋白释放速率也要快。在180 min时, 两种微胶囊的释放率达到了70%以上。而成膜10 min和20 min的海藻酸钠-壳低聚糖两种微胶囊的白蛋白释放率在180 min时分别为 $(65.0\pm2.3)\%$ 和 $(62.1\pm1.7)\%$ 。几种微胶囊的球蛋白释放曲线见图3B所示。所有的微胶囊球蛋白释放曲线表现出相同的变化趋势。在前

100 min释放时间内随着释放时间的增加球蛋白的释放率也增加, 然后逐渐达到释放平衡, 最后几种微胶囊的球蛋白释放率大约为16%。

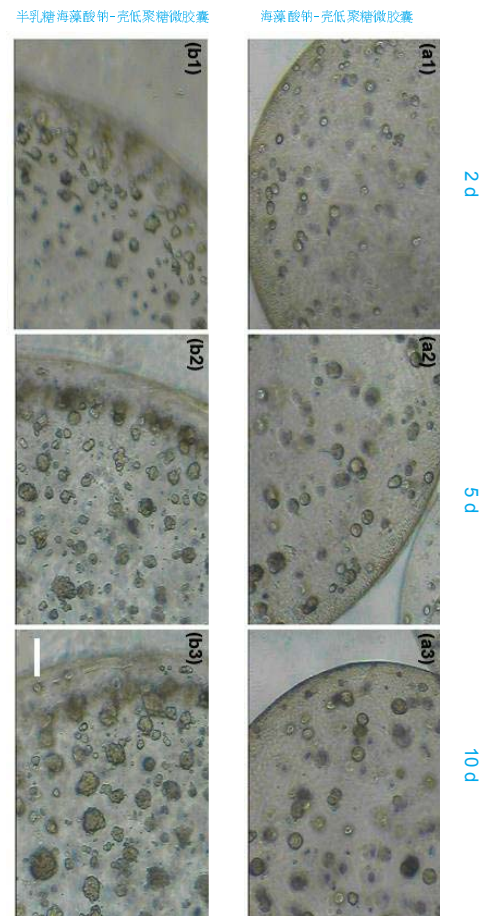


注: $r=0, 0.3, 0.5$ 分别代表半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中半乳糖化海藻酸钠的含量为 0, 30%, 50%; $t=5, 10, 20$ min 分别代表不同的成膜时间; 所有的微胶囊在前 20 min 时间内, 都释放了 20% 的白蛋白, 然后所有微胶囊的释放速率逐渐变慢。成膜 5 min 两种微胶囊的白蛋白释放速率明显比其他微胶囊更快。经过 50 min 以后, 这两种微胶囊的白蛋白释放率达到了 50%。成膜 10 min 和 20 min 的 30% 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的白蛋白释放速率比成膜 10 min 和 20 min 的海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的白蛋白释放速率也要快; 所有的微胶囊球蛋白释放曲线表现出相同的变化趋势: 在前 100 min 释放时间内随着释放时间的增加球蛋白的释放率也增加, 然后逐渐达到释放平衡, 最后几种微胶囊的球蛋白释放率大约为 16%。

图3 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的人白蛋白和球蛋白释放

Figure 3 The release of fluoresceine isothiocyanate-labeled human serum albumin and immunoglobulin G from the galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule

2.4 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊包裹肝细胞
图4为L02肝细胞分别在海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊和30%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中的相差显微镜图片。



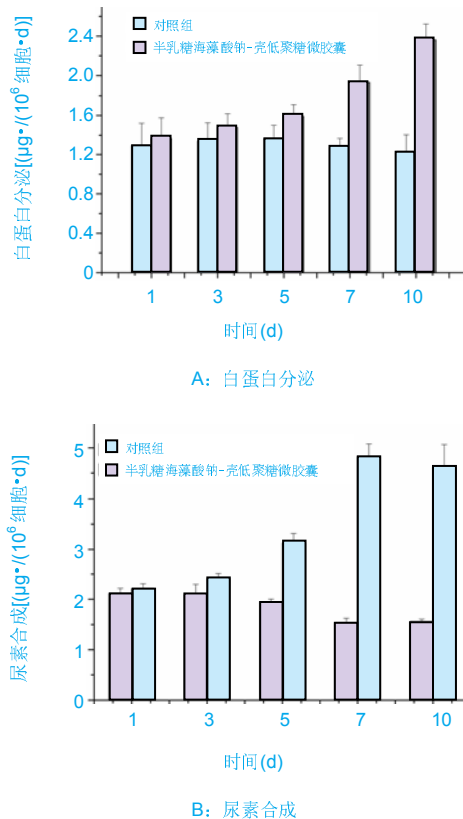
注: 肝细胞在海藻酸钠的微胶囊中始终保持着单细胞均匀分布的形态, 而在含半乳糖海藻酸钠的微胶囊中却表现出不同的细胞形态: 培养 2 d 后, 即可观察到有肝细胞球形聚集体的形成; 到第 5 天和第 10 天, 这种球形聚集体的数量不但逐渐增多, 而且其体积也在变大。

图4 L02 肝细胞在海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊和半乳糖化海藻酸钠含量为 30% 的半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中的相差显微镜图片(标尺 100 μ m)

Figure 4 Phase-contrast micrographs of L02 hepatocytes respectively encapsulated in alginate-chitosan oligomer microcapsule and 30% galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule (Scale bar: 100 μ m)

肝细胞在海藻酸钠的微胶囊中始终保持着单细胞均匀分布的形态, 而在含半乳糖海藻酸钠的微胶囊中却表现出不同的细胞形态。培养 2 d 后, 即可观察到有肝细胞球形聚集体的形成; 到第 5 天和第 10 天, 这种球形聚集体的数量不但逐渐增多, 而且其体积也在变大。

图5为L02肝细胞分别在海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊和30%半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中的白蛋白分泌和尿素合成随培养时间的变化图。



注: 对照为海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊; 随着培养时间的增加, 对照组中肝细胞的白蛋白分泌量没有明显变化。而半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中肝细胞的白蛋白分泌量在第 7 天时出现了明显的增加($P < 0.05$); 与白蛋白合成相似, 随着培养时间的增加, 对照组中肝细胞的尿素合成量在前 5 d 没有明显变化, 到第 7 天和第 10 天出现了一定的下降。而第 5, 7, 10 天半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中肝细胞的尿素合成量随培养时间的增加出现了明显增加。

图 5 肝细胞在半乳糖化海藻酸钠含量为 30% 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊中的白蛋白分泌与尿素合成

Figure 5 The albumin secretion and urea synthesis of the hepatocytes encapsulated in the 30% galactosylated alginate-chitosan oligomer microcapsule

从图5A中可以看出: 随着培养时间的增加, 海藻酸钠微胶囊中肝细胞的白蛋白分泌量没有明显变化。而半乳糖化海藻酸钠微胶囊中肝细胞的白蛋白分泌量在第 7 天时出现了明显的增加($P < 0.05$), 从第 1 天的 $1.3 \mu\text{g}/(10^6 \text{细胞} \cdot \text{d})$ 增加到了 $2.0 \mu\text{g}/(10^6 \text{细胞} \cdot \text{d})$ 。到了第 10 天时, 白蛋白分泌量增加到了 $2.4 \mu\text{g}/(10^6 \text{细胞} \cdot \text{d})$, 是海藻酸钠微胶囊中肝细胞白蛋白分泌量的 2 倍。对于尿素合成来说, 从图 5B 中可以看出: 与白蛋白合成相似, 随着培养时间的增加, 海藻酸钠微胶囊中的肝细胞的尿素合成量在前 5 d 没有明显变化, 到第 7 天和第 10 天出现了一定的下降, 从第 1 天的 $2.0 \mu\text{g}/(10^6 \text{细胞} \cdot \text{d})$ 下降到了 $1.5 \mu\text{g}/(10^6 \text{细胞} \cdot \text{d})$ 。而第 5, 7, 10 天半乳糖化海藻酸钠

中的肝细胞尿素合成量随培养时间的增加出现了明显增加, 从第 1 天的 $2.2 \mu\text{g}/(10^6 \text{细胞} \cdot \text{d})$ 分别增加到了 3.1, 4.8, $4.6 \mu\text{g}/(10^6 \text{细胞} \cdot \text{d})$ 。

3 讨论 Discussion

3.1 微胶囊膜的结构 通过激光共聚焦显微镜研究微胶囊膜的结构表明这种静电复合膜的成膜过程与溶剂/非溶剂交换得到的非对称膜的成膜过程是相似的, 即当海藻酸钠或半乳糖化海藻酸钠滴入壳低聚糖溶液以后, 首先在海藻酸钠液滴表面形成一个相对致密的皮层膜(由于正负电荷密度高的原因), 然后皮层膜里面的海藻酸钠或半乳糖化海藻酸钠溶液通过膜上的孔流出, 膜生长慢慢向外进行。随着膜慢慢变厚, 海藻酸钠或半乳糖化海藻酸钠流出越来越困难, 经过一定时间后膜的生长最终停止。

在Wandre等^[12]早期的研究中, 采用分析超速离心法合成边界技术也观察到了相同的现象。另外还可以看到, 随着半乳糖化海藻酸钠含量的增加, 微胶囊的膜也越来越疏松。这些现象都表明半乳糖的引入削弱了海藻酸钠分子链上负电荷的密度, 从而影响了静电复合反应。

3.2 微胶囊的力学性能和通透性 微胶囊的力学性能与胶囊膜的结构和厚度都有关^[5, 13]。从膜结构和膜厚看到, 随着半乳糖化海藻酸钠含量的增加, 膜结构是越来越疏松, 同时膜的厚度也减小, 因此其力学性能也变差。微胶囊的通透性与胶囊膜的结构有关。制备的几种微胶囊的膜都是一种具有非对称结构的膜, 这种膜的通透性主要决定于皮层的孔径, 而疏松的亚层结构对通透性影响不大。

在实验中观察到 30% 半乳糖化海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的白蛋白释放速率比海藻酸钠-壳低聚糖微胶囊的白蛋白释放速率要快, 这一现象可以解释为: 当海藻酸钠分子链上的部分羧基被半乳糖取代后, 电荷密度降低可能会造成静电反应时皮层的致密度下降, 进而孔径变大, 通透性增强。对于球蛋白的释放来说, 几种微胶囊都表现出对球蛋白的截留能力。说明制备的微胶囊具有选择性通过白蛋白, 而截留球蛋白的能力, 表明胶囊膜的皮层孔径介于白蛋白和球蛋白尺寸之间。

3.3 微胶囊包裹肝细胞 半乳糖是肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体 ASGPR 的特异性配体, 在材料表面进行半乳糖修饰已被证明可以增加肝细胞在材料表面的黏附能力, 并可以影响肝细胞的形态和功能。Akaike 等^[7]将半乳糖链接枝到 PVLA 聚合物上, 观察了肝细胞在涂敷有这种半乳糖接枝聚合物的培养板表面的黏附情况, 结果表明肝细胞能保持圆形的细胞形态, 当表面的半乳糖含量较高时, 肝细胞具有较好的胆汁合成功能; 而半乳糖含量较低时, 细胞功能降低。Ying 等^[14]也报道

了固定在PET膜表面的半乳糖含量与肝细胞形态和功能之间的关系,其结果与Akaike等的报道一致。除了半乳糖的浓度以外,其他的影响因素还包括基质材料的构型,半乳糖链的类型和半乳糖分子的取向。例如,三维基质通常比二维材料能更好地诱导肝细胞的分化功能。

球形聚集体结构是肝细胞的一种特殊的形态,它是由多个肝细胞自发聚集在一起形成^[15-16]。在该结构中,肝细胞之间通过细胞间相互作用而紧密接触。有报道称,在球形聚集体中的这些细胞间会生成微绒毛和微胆管,与体内肝细胞相似^[17]。在多数的文献报道中,肝细胞在半乳糖修饰的材料中都会展现出圆形的细胞形态。而要使肝细胞形成球形聚集体结构,则往往需要在培养液中加入表皮生长因子^[18]。

在实验中,L02肝细胞在半乳糖化的海藻酸钠微胶囊内自发形成了球形聚集体的结构,并且其白蛋白分泌和尿素合成能力都有明显的改善,表明通过引入半乳糖的方法,成功地制备了一种对肝细胞具有生物活性的新型微胶囊。

致谢: 感谢南加州大学 Keck 医学院 Doheny 眼科研究所在实验中提供的帮助。

作者贡献: 第一作者进行实验设计,实施,评估,资料收集和成文,第四作者审校,第一、四作者对文章负责。

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。

伦理要求: 未涉及与伦理相冲突的内容。

学术术语: 微胶囊技术-是微量物质包裹在聚合物薄膜中的技术,是一种储存固体、液体、气体的微型包装技术。具体来说是指将某一目的物(芯或内相)用各种天然的或合成的高分子化合物连续薄膜(壁或外相)完全包覆起来,而对目的物的原有化学性质丝毫不损,然后逐渐地通过某些外部刺激或缓释作用使目的物的功能再次在外部呈现出来,或者依靠囊壁的屏蔽作用起到保护芯材的作用,微胶囊的直径一般为1-500 μm,壁的厚度为0.5-150 μm。

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 References

- [1] 陈文俊,杨虹琦,王征. 生物微胶囊技术及其应用[J]. 湖南农业科学, 2007,37(6):70-73
- [2] 刘袖洞,于炜婷,王为,等. 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊及其生物医学应用[J]. 化学进展,2008,20(1):126-139.
- [3] 张所信,刘丽荣. 壳聚糖微胶囊的制备[J]. 应用科技,2003,30(4): 51-53.
- [4] Sun AM. Microencapsulation of cells. Medical applications. Ann N Y Acad Sci. 1997;831:271-279.
- [5] Bartkowiak A,Hunkeler D. Alginate-Oligochitosan Microcapsules: A Mechanistic Study Relating Membrane and Capsule Properties to Reaction Conditions. Chem Mater. 1999; 11:2486-2492.
- [6] Goosen MFA,King GA,Mcknight CA,et al. Animal cell culture engineering using alginate polycation microcapsules of controlled membrane molecular weight cut-off. J Membrane Sci. 1989;41:323-343.
- [7] Kobayashi K,Kobayashi A,Akaike T. Culturing hepatocytes on lactose-carrying polystyrene layer via asialoglycoprotein receptormediated interactions. In: Lee YC, Lee RT, editors. Methods in Enzymology: Neoglycoconjugates part B Biomedical Applications, Vol. 247. San Diego, California: Academic Press,1994:409-418.
- [8] Zhang Y,Wang W,Feng Q,et al. A novel method to immobilize collagen on polypropylene film as substrate for hepatocyte culture. Mater Sci Engin. 2006;26:657-663.
- [9] Lu HF, Lim WS, Wang J, et al. Galactosylated PVDF membrane promotes hepatocyte attachment and functional maintenance. Biomaterials. 2003;24(27):4893-4903.
- [10] Ding Z,Chen J,Gao S,et al. Immobilization of chitosan onto poly-L-lactic acid film surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells. Biomaterials. 2004;25(6):1059-1067.
- [11] Yin C,Mien Chia S,Hoon Quek C,et al. Microcapsules with improved mechanical stability for hepatocyte culture. Biomaterials. 2003;24:1771-1780.
- [12] Wandrey C,Bartkowiak A. Membrane formation at interfaces examined by analytical ultracentrifugation techniques. Colloid Surf A: Physicochem Engin Aspect. 2001;180:141-153.
- [13] Bartkowiak A,Hunkeler D. Alginate-Oligochitosan Microcapsules. II. Control of Mechanical Resistance and Permeability of the Membrane. Chem Mater. 2000;12:206-212.
- [14] Ying L,Yin C,Zhuo RX,et al. Immobilization of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly(ethylene terephthalate) film and its application to hepatocyte culture. Biomacromolecules. 2003;4:157-165.
- [15] Landry J,Bernier D,Ouellet C,et al. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. J Cell Biol. 1985;101(3):914-923.
- [16] Koide N,Sakaguchi K,Koide Y,et al. Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments, Exp Cell Res. 1990;186(2):227-235.
- [17] Yumoto AU,Watanabe S,Hirose M,et al. Structural and functional features of bile canaliculi in adult rat hepatocyte spheroids. Liver. 1996;16(1):61-66.
- [18] Park IK,Yang J,Jeong HJ,et al. Galactosylated chitosan as a synthetic extracellular matrix for hepatocytes attachment. Biomaterials. 2003;24:2331-2337.