

## \* 研究简讯 \*

## 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊生物相容性的研究\*

付颖丽 雄鹰 于炜婷 刘袖洞 薛伟明

包德才 王一力 马小军\*\*

中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

**摘要** 以天然高分子材料海藻酸钠(alginate)和壳聚糖(chitosan)为原料制备海藻酸钠/壳聚糖(alginate-chitosan-alginate, ACA)微胶囊, 用于动物和微生物细胞的微囊化培养与移植. 考察了壳聚糖材料对细胞生长的影响. 采用活体实验方法, 将制备的ACA微胶囊移植入小鼠腹腔, 8个月后微胶囊能够成功回收, 且囊内细胞出现聚集现象, 小鼠腹腔无炎症等免疫排斥现象发生, 初步证明了ACA微胶囊具有良好的生物相容性.

**关键词** 壳聚糖 海藻酸钠 微胶囊 生物相容性

众多的研究表明: 移植具有分泌功能的组织细胞或基因修饰细胞可望治疗很多疾病<sup>[1]</sup>. 但是细胞移植过程中免疫排斥反应的发生, 限制了细胞移植在临床疾病治疗中的推广与应用. 目前, 在克服免疫排斥反应的各种方法中, 微囊化免疫隔离方法受到了各国研究者的广泛关注. 即: 将组织细胞或基因修饰细胞包封在一层半透的微囊膜内, 通过控制微囊膜的选择透过性使细胞所需的小分子营养物质、细胞代谢产物和分泌物自由通过微囊膜, 而有害的大分子物质如: 抗体、免疫活性细胞等被阻隔在微囊膜外, 从而达到培养、免疫隔离或基因运载的目的<sup>[2,3]</sup>. 海藻酸钠和聚赖氨酸(poly-L-lysine)是目前最常用的制备微囊膜的材料<sup>[4]</sup>. 海藻酸钠是从海洋的褐藻中提取的直链阴离子多糖, 生物相容性好. 而聚赖氨酸是人工合成的阳离子聚合物, 价格昂贵, 目前全部需要进口. 本实验室在聚赖氨酸替代材料的筛选和改性方面取得了成功, 获得了具有理想成膜性能的壳聚糖材料, 并成功制备出ACA微胶囊.

对于用于细胞培养与移植的ACA微胶囊而言, 生物相容性是首要的性能指标, 通常采用活体试验方

法, 即将空微胶囊或微囊化细胞植入动物体内, 定期回收, 考察微胶囊的物理形态. 包括: 微胶囊表面光洁度和膜的完整性, 微胶囊周围是否为宿主细胞所浸润, 以及宿主体是否出现炎症等异物排斥反应.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

壳聚糖(本实验室改性所得), 海藻酸钠(Kelco Div of Merck Co Inc, USA); 其他试剂均为国产分析纯. 肿瘤细胞(TC)由上海细胞生物研究所惠赠, 1640培养基 Sigma, 昆明系小白鼠(18~20 g, 解放军大连高等医学专科学校实验动物中心提供).

### 1.2 方法

**1.2.1 肿瘤细胞的微囊化** 参照王勇等<sup>[5,1]</sup>制备ACA微胶囊的方法略加改动: 将贴壁培养所得的TC细胞用质量分数 $w$ 为0.25%的胰酶消化, 离心分离后, 与 $w$ 为1.5%的海藻酸钠均匀混合. 在高压电场作用下滴入100 mmol/L的氯化钙溶液中进行凝胶化反应, 制备海藻酸钙凝胶珠, 然后与 $w$ 为0.3%的壳聚糖溶液进行成膜反应, 最后用 $w$ 为

2001-06-13 收稿, 2002-01-30 收修改稿

国家自然科学基金资助项目(批准号: 29906011)

\*\* 联系人, E-mail: maxj@dicp.ac.cn

1) 王勇. 改性壳聚糖及其微胶囊的制备. 中国科学院大连化学物理研究所硕士学位论文, 1998

0.15%的海藻酸钠覆膜,以55 mmol/L的柠檬酸钠液化其内核。

**1.2.2 微囊化肿瘤细胞的培养** 将ACA微囊化肿瘤(TC)细胞放入50 mL螺口细胞培养瓶中,于5% CO<sub>2</sub> 碳自动培养箱中,37℃条件下培养,培养液用体积分数 $\varphi$ 为10%胎牛血清的1640培养液,隔天换液。

**1.2.3 壳聚糖材料的生物相容性** 采用平板菌落计数法考察壳聚糖材料的引入对微生物细胞生长状况的影响。将一定量的壳聚糖粉末溶解后与含1.5%琼脂糖的LB培养基混合,配制成壳聚糖 $\varphi$ 为0.2%和0.6%的LB培养基,高压灭菌后制成琼脂糖平板。将含有大肠杆菌的菌悬液(OD值为0.45),经一系列10倍稀释后,取稀释倍数分别为10<sup>4</sup>,10<sup>5</sup>,10<sup>6</sup>的3种稀释倍数的菌体各0.1 mL接种在已制成的琼脂糖平板上。然后用无菌涂棒将菌液涂布整个平板表面,放入培养箱,在37℃条件下静止培养10 h,计算菌落数。

**1.2.4 ACA微胶囊的生物相容性** 本实验采用将ACA微胶囊口服和腹腔移植两种方法考察微胶囊的生物相容性。

(i) 口服实验 将0.2 mL一定粒径的ACA微胶囊通过管饲法灌注入实验小鼠的体内,隔时处死小鼠,解剖小鼠的胃和小肠,取样,于倒置显微镜下观察微胶囊的形态及数目。

(ii) 腹腔移植实验 将0.2 mL包埋有TC细胞的ACA微胶囊移植入实验小鼠的腹腔内,定期回收,考察微胶囊的表面形态、微囊膜内细胞的生长情况以及在与对照组(未移植微胶囊组)饲养条件相同的情况下实验小鼠生理状况的变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳聚糖材料对微生物细胞生长的影响

壳聚糖是甲壳素经过脱乙酰化反应的产物,即使甲壳素结构单元——乙酰氨基葡萄糖脱去乙酰基,生成氨基葡萄糖而得到的产物<sup>[6]</sup>。本实验所用的壳聚糖材料是经过浓碱脱乙酰化反应后再经过强氧化剂氧化降解等一系列处理后得到的。在壳聚糖改性过程中,浓碱和氧化剂等化学试剂的残留可能会对微生物细胞的生长产生不利影响,因此,有必要考察实验过程中所用壳聚糖材料自身的生物相容性。

不同浓度的壳聚糖材料对大肠杆菌的生长的影响如表1所示。表列数据是在含有壳聚糖的琼脂板

上的菌落数。从表1可以看出壳聚糖材料本身对大肠杆菌的生长没有影响,表明该壳聚糖具有良好的生物相容性。另外,壳聚糖作为一种天然多糖,不仅不影响微生物细胞的生长,而且还可能为微生物细胞提供营养源。

表1 壳聚糖材料对大肠杆菌生长的影响

稀释倍数	壳聚糖浓度 $w$		
	0	0.2%	0.6%
10 <sup>4</sup>	218	189	201
10 <sup>5</sup>	28	21	23
10 <sup>6</sup>	2	3	6

### 2.2 ACA微胶囊的动物口服实验

如果实现ACA微囊化细胞直接口服,使囊内细胞的目的表达产物通过微囊膜释放到患者的体内,不仅可以避免目前工业生产中细胞产物的分离纯化步骤,而且还可以利用微囊膜的控制物质跨膜传递作用达到对目的产物的控制释放作用<sup>[7]</sup>。在这里,ACA微胶囊起到了口服药物载体的作用。

药物载体的粘附性能是决定药物在体内停留与发挥疗效时间长短的关键性因素,口服药物载体在肠道内的停留时间长短,直接影响到药物的利用度和给药频率,停留时间越长,药物的作用时间越长,给药频率越低。

为考察ACA微胶囊的体内停留时间,将粒径为400  $\mu\text{m}$ 的ACA微胶囊0.2 mL通过管饲法灌注入实验小鼠的体内,隔时处死小鼠并解剖小肠与胃,于显微镜下观察,同时以价昂的海藻酸钠/聚赖氨酸(APA)微胶囊作为对比实验。实验发现:5 h后APA微胶囊已经全部排出小肠,而ACA微胶囊2 d后在小肠部位仍停留很多且形态完好,如图1所示,说明ACA微胶囊具有较强的亲小肠粘附性能,并能经受胃液和肠液的长时间作用。灌注ACA微胶囊的小鼠的生理状态与正常饲养条件下的小鼠相比没有差异。

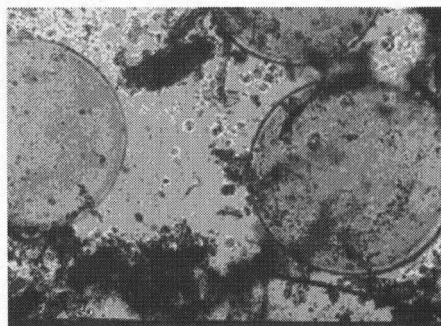


图1 口服2 d后从实验小鼠肠道内回收的ACA微脱囊

上述实验结果表明: ACA 微胶囊具有良好的生物相容性和较强的亲小肠粘膜性能, 具备作为口服药物载体的基本性能.

### 2.3 ACA 微胶囊的动物腹腔移植

考察 ACA 微胶囊生物相容性的一个重要方法就是采用将微胶囊移植入动物体内, 定期回收, 考察微胶囊的表面形态变化以及宿主体是否发生免疫

排斥反应等. 将包埋有 TC 细胞的 ACA 微胶囊 0.2 mL 移植入实验小鼠腹腔后, 于 2, 30 和 240 d 后回收(图 2). 可以看出, 回收后的 ACA 微胶囊表面光洁、球型度好、微囊膜完整且微胶囊表面没有细胞浸润现象发生. 同时实验小鼠腹腔无炎症等异常情况出现, 小鼠的生长状态没有发生变化, 移植组体重与对照组相比没有差异, 初步表明了 ACA 微胶囊具有良好的生物相容性.

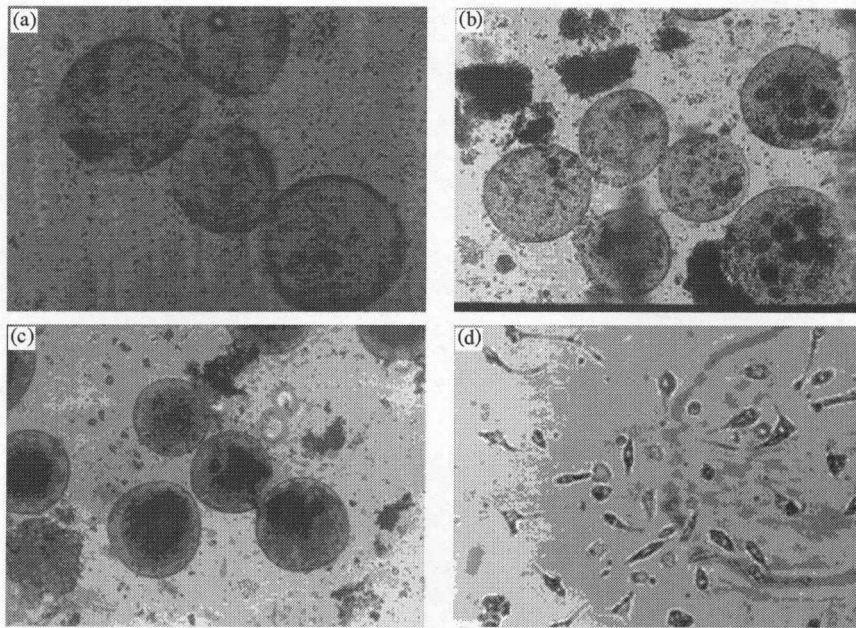


图 2 腹腔移植不同时间后回收的 ACA 微囊化 TC 细胞

(a) 移植 2 d; (b) 移植 30 d; (c) 移植 240 d; (d) 移植 240 d 后回收的微囊化 TC 再培养

值得注意的是, 实验中还观察到, 微胶囊内的 TC 细胞不仅可以在小鼠腹腔内可以存活以及正常生长、繁殖. 而且, 在移植一个月后, 开始形成一定大小的团块(如图 2(b), (c)). 为证明移植后囊内细胞的生理活性, 将移植回收的包埋有肿瘤细胞的 ACA 微胶囊破壁后, 对囊内细胞进行再培养, 结果如图 2(d)所示: 移植 240 d 后回收的微囊化肿瘤细胞, 经培养能够继续贴壁生长, 表明肿瘤细胞在微囊内保持较高的生理活性, 说明了 ACA 微胶囊对细胞无毒副作用, 进一步证明了 ACA 微胶囊具有良好的生物相容性.

以上实验结果表明: (i) 壳聚糖材料对微生物和动物细胞的生长无抑制作用. (ii) 壳聚糖和海藻酸钠为原料制备的 ACA 微胶囊也具有良好的生物相容性和免疫隔离性能. (iii) ACA 微胶囊对细胞具有保护和支撑作用, 而且细胞不会因为扩增而涨破 ACA 微胶囊. ACA 微胶囊可望作为口服药物的良

好载体以及组织细胞移植的免疫隔离工具或基因修饰细胞的运载工具.

### 参 考 文 献

- 薛毅珑, 等. APA 微囊化细胞治疗疾病的研究. 自然科学进展, 2000, 10(4): 299
- Uludag H, et al. Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 42(1-2): 29
- Chang T M. Artificial cells, encapsulation, and immobilization. Ann N Y Acad Sci., 1999, 18(875): 71
- Peirone M, et, al. Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. J Biomed Mater Res, 1998, 42(4): 587
- 王 勇, 等. 壳聚糖/海藻酸钠生物微胶囊的研究进展. 生物工程进展, 1999, 19(2): 13
- 王小红, 等. 甲壳素、壳聚糖及其衍生物的应用. 功能高分子学报, 1999, 2: 197
- Chang P L, et al. The *in vivo* delivery of heterologous proteins by microencapsulated recombinant cells. Trends Biotechnol, 1999, 17(2): 78