

细胞培养用琼脂微球的制备与初步应用

崔梦楠^{1,2} 李明生^{1,2} 张健² 张磊² 马素娟³ 龙仕和² 靳冬武² 冯玉萍^{1,2*}

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030; 3. 兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] 用4%的琼脂溶液作为水相, 环己烷为油相, 司盘-80为乳化剂, 采用乳化分散法制备了琼脂微球, 再通过化学交联法固化。用DEAE-HCl修饰了微球表面的电荷密度, 并通过正交试验优化了改性工艺, 最终制得细胞培养用琼脂微球。通过对比研究了Cytodex1微载体与琼脂微球的表征及细胞培养效果。结果显示, 最优改性工艺为: 加入微球2倍体积4.5 mol/L的NaOH溶液, 再加入微球2倍体积2.5 mol/L的DEAE-HCl溶液, 在搅拌状态下加热至60℃, 密闭反应4 h。最终制得琼脂微球表面电荷密度为4.00 mmol/100 g, 与Cytodex1微载体的4.05 mmol/100g几乎相当。静置培养时, 四种细胞在两种微球上的贴壁率和伸展性各有优劣。悬浮培养BHK-21细胞时, Cytodex1微载体表面出现一定程度的“空球”现象, 而琼脂微球表面细胞较均匀地伸展。培养至120 h时, 两种微球表面的细胞均达到 4.5×10^7 cells。继续培养, Cytodex1表面的细胞数开始下降, 而琼脂微球表面仍增殖至168 h时才开始下降。综上所述, 自制琼脂微球具备作为细胞培养用材料的条件。

[关键词] 琼脂微球; 微载体; 细胞培养

[中图分类号] R318.08

[文献标识码] A

[文章编号] 1009-2102(2014)04-0057-07

微载体是一类能够适用于贴壁细胞悬浮培养的高分子聚合物微球的统称。微载体培养技术首先由Wezel^[1]等于1967年提出, 经过近半个世纪的发展, 目前已成为生物医药制品领域主导的生产方法。在国内, 微载体培养技术相对滞后, 主要是培养基、生物反应器和微载体三方面依赖于进口原因造成的。而国内外目前使用最广泛的微载体是GE公司的Cytodex系列微载体^[2]。它们是以葡聚糖为基质, 经过交联改性(包被胶原蛋白和修饰表面电荷), 从而使其适用于细胞生长。但交联改性后的葡聚糖凝胶机械强度与弹性均不是十分理想^[3], 并且价格昂贵, 供货周期长。因此, 开发适用于多种动物细胞生长的理想微载体是我国生物医药制品领域重要的研究方向之一。

琼脂主要由琼脂糖和硫琼胶组成, 生物相容性好, 理化性质稳定。琼脂凝胶交联后机械强度高, 弹性大^[4], 是一种理想的微载体基质。其中琼脂糖为中性糖, 与蛋白质几乎不产生非特异性吸附, 因此, 微球已被广泛开发为生物分离介质。近年来, 王国祥^[5]等采用包被明胶对琼脂糖颗粒进行修饰, 使其能适用于细胞培养, 但明胶修饰仍未摆脱动物源性材料的困扰。另外, 琼脂糖的分离提纯也大大增加了成本。因此, 试验以琼脂(琼脂糖和硫琼胶的复合物)为原料, 采用乳化-固化交联法制备, 再进行表面电荷修饰, 最终制得适合细胞培养的琼脂微球, 并与Cytodex1微载体进行了表征和细胞培养方面的对比研究。

[收稿日期] 2014-11-20

[基金项目] 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT13091); 兰州市科技计划项目(2014-1-158); 国家民委创新团队计划项目([2013]231号); 国家外专项目(GDW20146200235)资助。

[通讯作者] *

[作者简介] 崔梦楠(1988—) 陕西汉中, 硕士研究生, 主要从事生物材料的开发与应用方面的研究。

1 材料

1.1 细胞株

BHK-21 细胞、VERO 细胞、CHO 细胞、MARC-145 细胞均由甘肃省动物细胞工程中心提供。

1.2 试验材料

琼脂粉(上海山浦化工)、环氧氯丙烷(天津市凯信化学)、环己烷(烟台市双双化工)、司盘 80(莱阳市双双化工)、氢氧化钠(烟台市双双化工)、硼氢化钠(上海中泰化学)、新生牛血清(兰州民海)、DMEM(兰州百灵生物)、细胞消化用酶(兰州百灵生物)、搅拌器(上海欧河)、JSM-5600LV 扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司)、傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet Nexus670)、真空水泵(上海耀特仪器)、砂芯漏斗、滤纸、抽滤瓶、细胞培养多孔板。

2 方法

2.1 琼脂微球的制备

准确配制 4% 的琼脂溶液^[6]作为水相。按照 100:1 的体积比配制环己烷和司盘-80 的混合溶液作为油相。在搅拌的条件下将水相缓慢地倒入油相,保温乳化一段时间后降至室温,停止搅拌,洗涤。

2.2 琼脂微球的交联固定

称取洗净抽干的琼脂微球,按照 1:1 的体积比加入 1 mol/L 的 NaOH 0.1% 硼氢化钠粉末,搅拌均匀后,再缓慢加入 10% 的环氧氯丙烷,温度升至 40 °C 交联 30 min 后,提升温度至 70 °C 交联 2 h,停止搅拌并置于室温下过夜。最后用纯水洗涤干净,过筛,30% 酒精 4 °C 保存。

2.3 琼脂微球表面化学修饰

称取交联后抽干的微球,加入 2 倍体积一定浓度的 NaOH 溶液,再加入微球 2 倍体积一定浓度的 DEAE-HCl 溶液,在搅拌状态下加热至一定温度,反应一段时间,用纯水洗涤干净后,30% 酒精 4 °C 保存。

2.4 琼脂微球表征测定

2.4.1 微球表面电荷测定^[7,8] 称取纯水洗净抽干的微球 10 g,用 2.0 mol/L 的 NaCl 50 mL 浸洗,分别用 100 mL 0.1 mol/L 的 HCl,500 mL 0.000 1 mol/L 的 HCl 洗涤,真空抽干。再用 100 mL 10% 的 Na₂SO₄ 滤洗,用 SO₄²⁻ 置换 Cl⁻,收集滤液。最后,以 1 mL 5% 的 K₂CrO₄ 为指示剂,用 0.05 mol/L 的 AgNO₃ 滴定,测定 Cl⁻ 的用量。由滴定所得的 Cl⁻ 摩尔数除以载体的湿重,即得微球表面的电荷量 E (mmol/g)。

$$E = \frac{V \times C}{m}$$

其中 E 为微球表面电荷密度; V 为消耗 AgNO₃ 的体积; C 为 AgNO₃ 的浓度; m 为微球湿重。

2.4.2 扫描电镜 用 PBS 洗涤微球,再用砂芯漏斗抽干,加入 4% 的戊二醛固定,滤纸吸干表面液体后,用 JSM-5600LV 扫描电子显微镜于 5 000 倍 20 kV 条件下对两种微球表面进行扫描和对比。

2.4.3 红外光谱 以琼脂粉末原料为对照,乙醇梯度脱水法干燥的自制琼脂糖微球(交联微球和表面修饰微球)做样本,用傅里叶变换红外光谱仪进行扫描和对比,波数范围 4 000 ~ 500 cm⁻¹,分辨率 0.009 cm⁻¹。

2.5 自制琼脂微球与 Cytodex1 微载体细胞培养效果

2.5.1 静置培养 细胞密度为 3 × 10⁵ cells/mL,接种于含微球的多孔培养板中,于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,取出适量载体到 24 孔板中,用无 Ca⁺、Mg⁺ 的 PBS 吹洗三遍,最后用含 4% 戊二醛的 PBS 溶液固定,置于显微镜下观察。

2.5.2 悬浮培养 取 5 g(湿重)琼脂微球和 Cytodex-1 高压灭菌后,分别加入到 100 mL 已灭菌的悬浮瓶中,再加入 4 × 10⁶ 细胞悬液,混匀后补充营养液至 50 mL。最后置于 35 r/min、37 °C 进行 24 h 培养。48 h 时抽取 100 μL 微球进行计数并补液至 100 mL,之后每隔 24 h 半量换液并计数。

3 结果与讨论

3.1 改性条件对微球表面电荷的影响

3.1.1 正交试验 细胞能够在微载体表面成功粘附并生长,主要是依靠二者间的电荷亲和力与范德华力^[9].微球表面的电荷密度是影响电荷亲和力的主要因素.为了确定改性的最优工艺,试验设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验(见表1).试验考察了DEAE浓度、NaOH浓度、反应时间三个因素对微球表面电荷密度的影响,根据单因素试验结果确定了三个水平,制备了9批微球.

表1 正交试验方案及结果

试验号	试验因素				表面电荷(E) mmol/100 g
	空列(A)	DEAE浓度 mol/L(B)	NaOH浓度 mol/L(C)	反应时间 h(D)	
1	1	1(2.5 mol/L)	1(2.5 mol/L)	1(2h)	2.00
2	1	2(3.0 mol/L)	2(3.5 mol/L)	2(3h)	1.75
3	1	3(3.5 mol/L)	3(4.5 mol/L)	3(4h)	4.25
4	2	1(2.5 mol/L)	2(3.5 mol/L)	3(4h)	4.20
5	2	2(3.0 mol/L)	3(4.5 mol/L)	1(2h)	1.55
6	2	3(3.5 mol/L)	1(2.5 mol/L)	2(3h)	2.50
7	3	1(2.5 mol/L)	3(4.5 mol/L)	2(3h)	3.90
8	3	2(3.0 mol/L)	1(2.5 mol/L)	3(4h)	2.25
9	3	3(3.5 mol/L)	2(3.5 mol/L)	1(2h)	1.80
K_1	2.67	3.37	2.25	1.78	
K_2	2.75	1.85	2.58	2.72	
K_3	2.65	2.85	3.23	3.57	
R	0.10	1.52	0.98	1.79	

最优组合: $B_1C_3D_3$; 主次顺序: $D > B > C$.

表2 正交试验方差分析

试验因素	离差平方和	自由度	均方	F值	P值	显著水平
DEAE浓度(B)	3.567	2	1.784	207.129	0.005**	极显著
NaOH浓度(C)	1.501	2	0.750	87.129	0.011*	显著
反应时间(D)	4.774	2	2.387	277.194	0.004**	极显著
误差(空列A)	0.017	2	0.009			

结果表明:三个因素对微球表面电荷密度影响的顺序为反应时间 > DEAE浓度 > NaOH浓度.方差分析结果(见表2)显示,三因素对微球表面电荷密度的影响均显著.因此,结合均值分析可知,改性的最佳工艺条件:准确称取交联后抽干的微球,加入2倍体积4.5 mol/L的NaOH溶液,再加入微球2倍体积2.5 mol/L的DEAE-HCl溶液,在搅拌状态下加热至一定温度,密闭反应4 h.

3.1.2 正交试验制备微球细胞生长对比测试

试验组3(C)、4(D)、7(G)均有细胞生长,三组试验微球表面的电荷密度依次为:4.25、4.20、3.90 mmol/100 g.其中4(D)空球率最少,3(C)和7(G)空球率稍多,而其余6组试验微球表面电荷密度均较小,细胞没有贴附.

综上所述,微球表面的电荷密度过高会产生局部细胞毒性作用,导致细胞局部不能粘附,出现“空球现象”;过低则会细胞不的贴附^[10,11].

3.1.3 验证试验 按照正交试验筛选的最优改性工艺修饰琼脂微球, Cytodex1微载体对比测定表面电荷,结果见表3.从表3可以看出,自制琼脂微球和Cytodex1表面电荷密度基本相当.

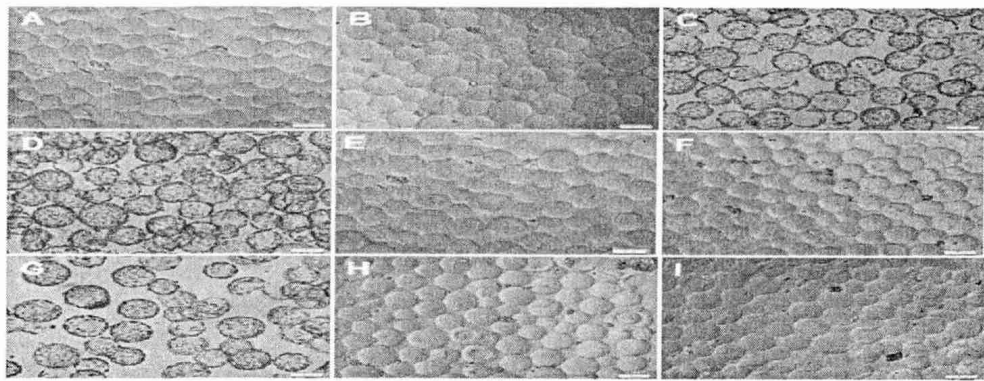


图1 微球细胞生长测试

A-I 依次是正交试验中1-9号试验组制备的微球细胞生长情况

表3 验证性试验

微球类型	微球重量(g)	AgNO ₃ 的体积(mL)	电荷密度 (mmol/100g)
Cytodex1 微载体	10.0	8.1	4.00
自制琼脂微球	10.0	8.0	4.05

3.2 微球表征

3.2.1 形态观察

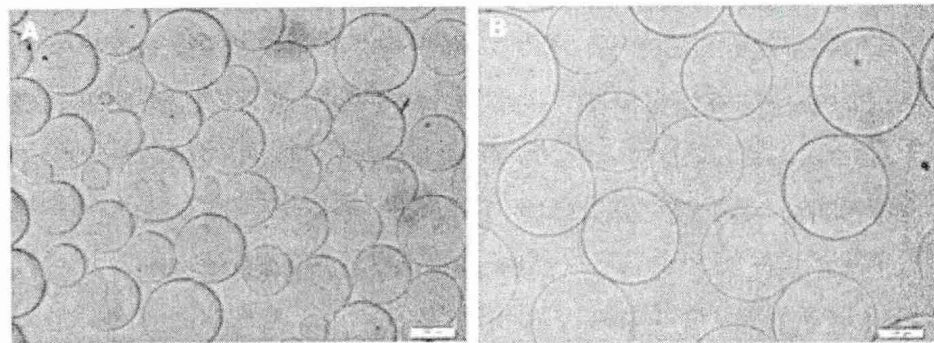


图2 高压灭菌后微载体的形态

A: 自制琼脂微球; B: Cytodex1 微载体

由图2可以看出,二者高压灭菌后轮廓清晰可见.自制琼脂糖微球表面光滑透明,与Cytodex1差异不明显.在大小方面,自制微球的均匀度较差.在培养细胞过程中,不同尺寸微球表面的细胞生长状况难以同步.这在一定程度上限制了其在细胞培养中的优越性,后续试验证实可通过筛分进行优化.

3.2.3 电镜观察

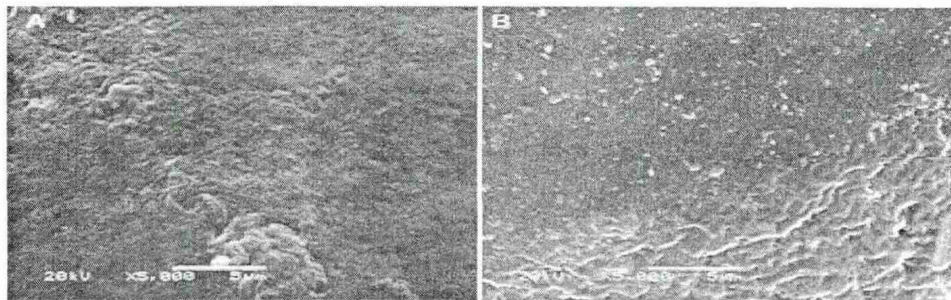


图3 微球电镜扫描图

A: 自制琼脂微球; B: Cytodex1 微载体

由图3可知,自制琼脂微球和进口Cytodex1微载体的表面均有褶皱,说明两者在细胞贴附方面都有一定的物理作用.而不同的原材料结构、不同的配置液体的浓度、不同的交联剂等等都会导致其分子间形成的价键、构成的空间形成一定的差异,因此图A、B中出现了不同形状的表面褶皱.

3.2.4 红外光谱扫描 将琼脂粉原料 交联后的琼脂微球以及改性后的琼脂微球通过红外光谱扫描 , 监测不同阶段琼脂特征峰的变化情况 结果见图 4.

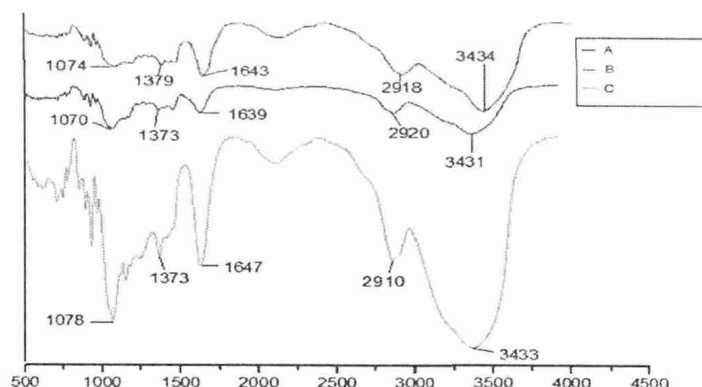


图 4 琼脂红外光谱扫描图

A: 琼脂干粉; B: 交联后的琼脂微球; C: 交联后再进行表面修饰后的琼脂微球

由图 4 可以看出 A、B、C 都具有琼脂的特征峰(1 074 左右) . 这是由于琼脂 3 β - 脱水 - B - 半乳糖骨架结构中的 C - O 振动引起的^[12]. A、B 两条曲线基本无大差异 , 说明琼脂原料与交联过后的琼脂微球中的价键活跃程度没有明显差异 . C 中 1373 处较 A 中 1379 处为羧甲基的伸缩振动峰^[13]; C 中 1647 处较 A 中 1643 处为酯键中羰基的伸缩振动 . 这是由于 DEAE 改性后羰基的活跃度增强 , 所以伸缩振动明显增大^[14]. C 中 2910 处归属于分子内氢键^[15] , C 中 3433 处较 A 中 3434 处峰值上移 , 并且伸缩振动明显增强 . 这是由于 DEAE 改性后产生了分子间氢键^[13].

3.3 Cytodex1 微载体与自制琼脂微球的细胞生长情况

3.3.1 静置培养 四种疫苗领域常用动物细胞: BHK - 21 细胞、CHO 细胞、Marc - 145 细胞和 Vero 细胞在自制琼脂微载体和 Cytodex - 1 微载体表面的生长结果如图 5 所示 .

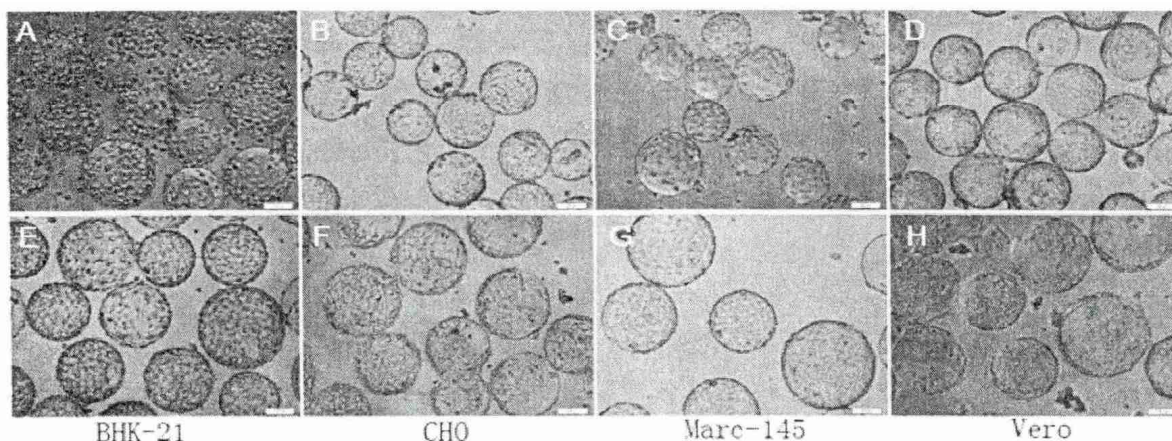


图 5 不同细胞在微载体表面的生长情况

A、B、C、D 为 Cytodex 微载体细胞生长情况; E、F、G、H 为自制琼脂微球细胞生长情况

从图 5 来看 , 四种细胞在两种微球表面均能较好地贴附生长 , 但是不同细胞在两种微球表面的生长情况略有差异 . BHK - 21 细胞培养至 48 h , 在自制琼脂微球表面已有较好的伸展 , 而在 Cytodex1 表面的细胞则为圆缩状态 . CHO 细胞在 Cytodex1 微载体表面伸展较快 , 并且自制琼脂微球出现了一定程度的“空球”现象 . Marc - 145 细胞则在 Cytodex1 出现了“空球”现象 . Vero 细胞在自制微球培养表面生长较

Cytodex1 缓慢。

综上所述,四种不同细胞在两种微球表面都能贴附,但增殖生长有差异,这可能与不同细胞贴壁与生长所需的电荷密度不同有关。因此,后续研究可以结合不同细胞各自的培养效果,对表面电荷密度修饰改性程度进行调整,从而开发适合多种细胞培养的微球。

3.3.2 悬浮培养 选取 BHK-21 细胞,分别用两种微球进行悬浮培养,以相同数量和大小自制微球和进口产品为基础,加入相同细胞量来进行细胞计数测试,结果如图 6 所示。

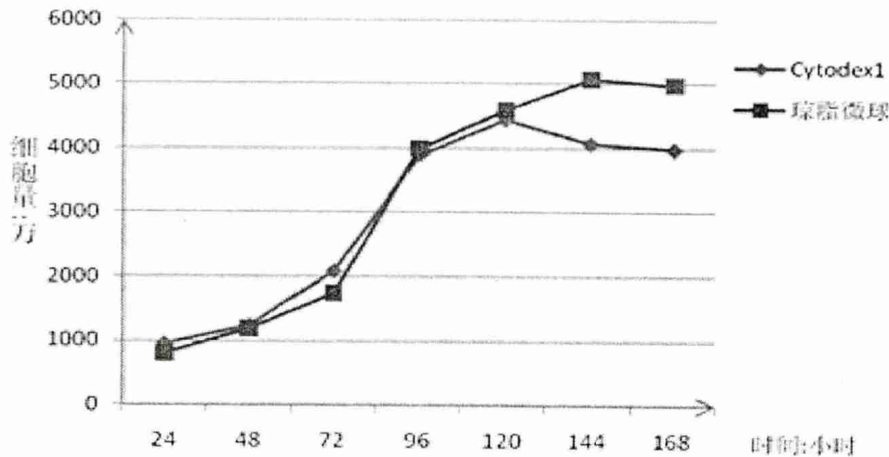


图 6 BHK-21 细胞在两种微球上培养的计数结果

从图 6 可以看出,自制琼脂微球与进口 Cytodex1 微载体整体生长曲线基本一致。5 g 湿球表面 24 h 时细胞生长至 1.0×10^7 左右;72 h 时开始进入对数生长期,Cytodex1 细胞量达到 2.0×10^7 ,自制微球细胞量在 1.7×10^7 左右;96 h 时细胞量跃增明显。此时,两种载体上的细胞量追平,基本在 4.0×10^7 左右。此后 Cytodex1 表面的细胞增殖速度开始变缓,到 144 h 时,Cytodex1 上的细胞量开始下降,但自制琼脂还在小幅度地增加。

4 结论

通过对琼脂微球表面进行化学修饰改性,制备了一种以琼脂微球为基质的微载体。该载体具有一定的弹性和韧性,能高压灭菌,粒径分布适中,便于在搅拌状态下进行贴壁细胞的悬浮培养。表面略有皱褶加上电荷修饰,宜于细胞贴附;微球透明,便于用显微镜观察贴壁生长的细胞状态,具有良好的颗粒性质。BHK-21 细胞、CHO 细胞、Marc-145 细胞和 Vero 细胞等疫苗生产常用动物细胞均能够在其表面良好生长,其中 BHK-21 细胞的生长优于在 Cytodex1 微载体上生长。因此,自制琼脂微球有作为动物细胞培养用微载体的良好前景。

参考文献:

- [1] Van Wezel. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers[J]. Nature, 1967, 216: 64-65.
- [2] 冯见. 一种新的 Vero 细胞微载体放大培养工艺研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
- [3] Reuveny S. Microcarriers for culturing mammalian cells and their application[M]. Advances in Biotechnological Processes, 1983, 2.
- [4] 王国祥. 离子交换及明胶包被琼脂糖凝胶的制备与应用[D]. 北京: 中国科学院, 2011.
- [5] 王国祥, 聂峰光, 苏志国. 明胶包被的琼脂微载体及细胞培养特性[J]. 药物生物技术, 2001, 8(5): 264-267.
- [6] Xu B, Zhang W X, Li C, Wang Y T, et al. Production of agar with low-temperature solubility and high gel strength from Gracilaria by screw extrusion[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29(2): 280-287.
- [7] 卢慧丽, 林东强, 姚善泾. 琼脂糖-DEAE 离子交换介质的配基密度和孔径对 BSA 吸附的影响[J]. 化工学报, 2011, — 62 —

62(11) : 3164 – 3170.

- [8] 葛佳丽,王佳兴,马光辉,等. 魔芋葡甘糖 DEAE 阴离子交换介质的制备及表征[J]. 离子交换与吸附, 2007, 23(4) : 289 – 296.
- [9] 李雨田,陈因良,丁健椿. 生物工程技术下游技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1993. 47 – 57.
- [10] Maroudas, NG. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces[J]. Journal of Theoretical Biology, 1975, 49(2) : 417 – 441.
- [11] Hirtenstein M, Clark J, Lindgren G, et al. Microcarriers for animal cell culture: a brief review of theory and practice[J]. Dev. Biol. Stand, 1980, 46: 109 – 125.
- [12] 蔡华琼,李全利,周健,等. 琼脂-羟基磷灰石复合物的仿生合成及细胞相容性[J]. 中国组织工程研究, 2010, 14(3) : 410 – 414.
- [13] 赵瑞芳,尤玲玲,汤顺清,等. 琼脂糖醋酸酯的制备方法与表征[J]. 材料导报: 研究篇, 2010, 24(1) : 108 – 112.
- [14] 韩艳德,谢长生. 铁琼脂糖磁性微球的制备和表征[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(6) : 19 – 21.
- [15] 曹明昭,李健春,张语樵,等. 羧甲基化琼脂的合成及性能表征[J]. 武汉工程职业技术学院学报, 2014, 26(1) : 9 – 13.

Preparation and Preliminary Application of Agar Microspheres for Cell Cultures

CUI Meng-nan^{1, 2}, LI Ming-sheng^{1, 2}, ZHANG Jian², ZHANG Lei², MA Su-juan₃, LONG Shi-he₂, JIN Dong-wu₂, FENG Yu-ping^{1, 2*}

(1. Engineering & Technology Research Center of for Animal Cells, Lanzhou 730030, China; 2. Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; 3. Life Science and Engineering College of Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] 4% agar solution was used as the water phase, a certain volume ratio of cyclohexane as oil phase, span-80 as the emulsifier, the agar microspheres were prepared by emulsifying dispersion method. Then the chemical crosslinked method was used. At last, orthogonal method was used to optimize the process of Surface charge modification. The contrast research of characterization and cell culture between Cytodex1 microcarriers and agar microspheres. Results show that the optimal modification process is: Adding two times volume 4.5 mol/L of NaOH solution, then 2 times volume 2.5 mol/L DEAE HCL solution into microspheres, stirring in the state of heating and 60 °C, sealed reaction 4 h. Surface charge density of AGAR microsphere was 4.00 tendency for 100 g, was almost of Cytodex1 microcarrier (4.05 tendency/100 g). When cells were stationary culture on the two kinds of microspheres, adherent rate and the extension of four types of cells all had advantage and disadvantage. BHK-21 cells were in suspension culture, Cytodex1 microcarrier surface appeared “empty” phenomenon, and on AGAR microsphere surface, cells were uniformly. Culturing to 120 h, cells on the surface of the two kinds of microspheres were averaging 4.5×10^7 cells, then cells on the surface of Cytodex1 the cells began to decline, while cells on surface of AGAR microsphere were still proliferation. Summarily, homemade gelatin microspheres to have material for cell culture conditions.

[Key words] Agar; Microcarrier; Cell culture