

果糖修饰壳聚糖微载体的制备及其原代大鼠肝细胞培养

张立国 潘继伦* 李结良 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所生物活性材料教育部重点实验室,天津 300071)

摘 要 利用果糖修饰的壳聚糖为材料,液体石蜡作分散介质,戊二醛作交联剂,通过反相悬浮法制备了性能优良的微米级果糖修饰壳聚糖微载体。用其进行原代大鼠肝细胞培养,利用相差显微镜和扫描电镜对细胞形态进行观察,并测定了细胞的代谢活性。结果显示果糖修饰的壳聚糖微载体是一种优良的肝细胞培养支架。

关键词 果糖,壳聚糖,微载体,肝细胞培养

中图分类号 O636.1,R967.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0116-04

生物人工肝支持系统是近年来发展起来的用于肝功能衰竭治疗的体外肝功能支持装置。由于其功效优于其它人工肝支持系统,近年来相关的研究取得了长足进展^[1-2]。生物人工肝支持系统的核心问题是高活性、高密度肝细胞的培养。微载体培养是高密度培养动物细胞的有效方法^[3-4],在生物工程中得到了广泛应用。球形聚集体的培养是增加细胞培养密度提高细胞活性的新技术,在聚集体培养中细胞间的相互作用对于维持肝细胞的功能是非常重要的,细胞的代谢活性比单层培养细胞有较大的提高^[5-6]。聚集体中的肝细胞形态和超微结构类似于细胞在体内的形态^[6]。这种三维结构的形成有助于提高细胞的特异性功能。

壳聚糖是近年来在生物医药、组织工程领域得到广泛应用的一种天然生物高分子,具有生物功能性、生物相容性、低毒性、生物降解性及几乎无过敏性等性质^[7-10]。本文以果糖修饰的壳聚糖为原料合成了微米级的壳聚糖微载体,并结合肝细胞聚集体的培养方法在微载体上培养原代大鼠肝细胞^[11],观察了肝细胞在微载体上的贴壁和生长情况,并测定了其代谢活性。

1 材料和方法

1.1 材料

壳聚糖,脱乙酰化度 90%,分子量 80 万,浙江省玉环县化工厂;果糖(进口分装),中国医药公司北京公司;硼氢化钠,上海化学试剂公司;小牛血清,中国医学科学院血液研究所;L-Gln(层析纯),政翔化学试剂研究所;Insulin,上海生物化学制药厂;肝素钠,北京鼎国生物技术发展中心;胶原酶, SIGMA CHEMICAL CO.;白蛋白液体试剂盒,北京中生生物工程高技术公司;血糖液体试剂盒,北京中生生物工程高技术公司;雄性 Wistar 大鼠,200~250g,购自天津市药物研究院。

1.2 果糖修饰壳聚糖微载体的制备

在醋酸的催化下,果糖的羰基与壳聚糖的氨基发生加成反应,形成 Schiff 碱。



称取 7.65g 果糖加入到 150mL 2.5% 的壳聚糖乙酸溶液中,40℃ 摇床反应 3d。取一定量的液体石蜡和适量司班 80,混合均匀后,加入到三口瓶中,按 4:1 的油水比加入适量果糖修饰的壳聚糖溶液,在 37℃ 下充分搅拌至壳聚糖溶液均匀分散成大小合适的液滴后,加入一定体积 10% 的戊二醛溶液,搅拌反应 1h 后加入适量 6% NaOH 溶液,调 pH 至 9~10,继续反应 2h,过滤,充分洗涤,得到壳聚糖微载体。

1.3 壳聚糖微载体的还原

取一定量的壳聚糖微载体,加入乙酸钠至终浓度为 30mmol/L,按还原剂对初始氨基摩尔比为 3:1,加入硼氢化钠,室温反应 12h,用蒸馏水洗至中性。

1.4 微载体含水量的测定

微载体的含水量(Q)用下式计算得到:

$$Q = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$$

W_1 和 W_2 分别是湿态和干态微载体的重量。

1.5 微载体密度的测定

将壳聚糖微载体浸泡于 0.9% 的氯化钠溶液中,平衡后测定湿态微载体的密度。

1.6 原代大鼠肝细胞的分离和培养

从重约 200~250g 的大鼠上获得原代肝细胞,采用 Seg-len 两步灌流法^[12]。先用预灌流液(8.3mg/mL NaCl,0.5mg/mL KCl,2.4mg/mL HEPES,pH=7.4)灌流 8min,然后用含 0.05% 胶原酶的灌流液(预灌流液中加入 5mmol/L CaCl₂,0.05% 胶原酶)继续灌流 10min。将肝叶剪下,用剪刀将消化

收稿日期 2002-06-26,修回日期 2002-10-21。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30070222)。

* 通讯作者。Tel: 86-22-23508259; Fax: 86-22-23501393; E-mail: panji@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

好的肝细胞轻轻刮下,获得的肝细胞悬液 400r/min 离心 3 次,每次 2min,然后重新悬浮于 WE 培养基中(含 10% 血清, 0.2u/mL Insulin, 0.292mg/mL L-Glutamine)。利用台盼蓝拒染法检测细胞存活率。

将分离所得的肝细胞按 5×10^5 细胞/mL 的密度接种于加入微载体的 6 孔细胞培养板中(培养板的底部预先铺有琼脂薄层),放入二氧化碳培养箱中,在 37°C 5% CO₂, 100% 湿度下进行培养,前 6h 每 30min 振荡 1 次,每次 2min。6h 后更换新鲜培养基,以后每 24h 更换 50% 培养液。取更换的培养液用于代谢活性的测定。

1.7 代谢活性的测定

白蛋白的测定采用白蛋白液体试剂盒,葡萄糖的测定利用血糖液体试剂盒。

2 结果与讨论

2.1 果糖修饰壳聚糖微载体的制备

表 1 反应条件对微载体性能的影响

Table 1 The influence of reaction conditions on the characters of microcarriers

Conc. of chitosan solution /%	10% glutaraldehyde/mL	Water content/%	Density of microcarrier(g/mL)	Appearance and rigidity
2.5	3.5	95.1	1.03	Light yellow, bad rigidity
2.5	7	91.4	1.04	yellow, good rigidity and elasticity
2.5	10	86.0	1.05	snuff color, good rigidity, bad elasticity
2.5	15	84.2	1.06	Yellow, good rigidity and bad elasticity
1.0	7	95.6	1.02	Light yellow, bad rigidity
3.0	7	89.5	1.06	Yellow, good rigidity, bad elasticity

2.2 细胞培养

2.2.1 形态观察:分离的肝细胞呈单个球形状态悬浮于培养基中,用台盼蓝拒染法检测细胞存活率达 90% 以上。将其接种于壳聚糖微载体上,间隙振荡培养 6h 后,果糖修饰的

果糖与壳聚糖反应 3d 后,壳聚糖溶液变为浅黄色且粘稠度明显降低,因此在制备微载体时要控制较低的搅拌速度,否则制备的微载体过小,当搅拌速度为 300 ~ 350r/min 时,制备的微载体约 90% 粒径在 100 ~ 250 μ m 范围内。另外,壳聚糖溶液的浓度,戊二醛的用量等都是影响微载体性能的主要因素,见表 1。

从表中可看出,壳聚糖溶液浓度和戊二醛用量是影响微载体密度的主要因素。随着壳聚糖溶液浓度和戊二醛用量的增加,微载体的密度也随之增加。在微载体细胞培养技术中,要求微载体有适当的密度(1.03 ~ 1.05g/mL),当给予一定速度搅拌时,微载体能悬浮在培养基中,有利于细胞的生长与代谢。另外,壳聚糖微载体应具有一定的弹性,以避免对细胞的机械损伤。

壳聚糖溶液浓度和交联剂用量对壳聚糖微载体的含水量也有一定影响,随着壳聚糖溶液浓度和交联剂用量的增加,壳聚糖微载体的含水量明显降低。

微载体表面大部分贴附了肝细胞,培养 48h 后,形成细胞粘附聚集的球形特征(图 1A),从图 1B 清晰可见细胞间存在着相互协调,表明细胞之间相互作用有利于细胞代谢活性的提高。

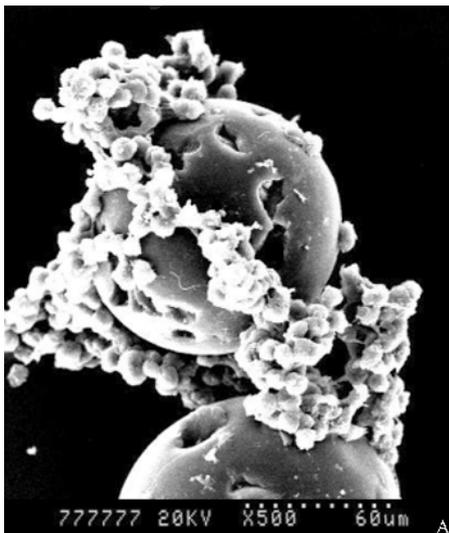


图 1 原代大鼠肝细胞在果糖修饰的壳聚糖微载体上的生长 a \times 500; b \times 1000

Fig. 1 Hepatocytes cultured on fructose-modified chitosan microcarriers A \times 500; B \times 1000

(Reaction conditions. oil : water = 4 : 1, 50mL 2.5% chitosan solution, 7mL 10% glutaraldehyde solution, 300r/min)

2.2.2 壳聚糖微载体上肝细胞的代谢活性:白蛋白分泌和葡萄糖代谢是肝细胞代谢活性的两个重要指标,图 2、3 分别给出了肝细胞白蛋白分泌和葡萄糖代谢活性的测定结果。

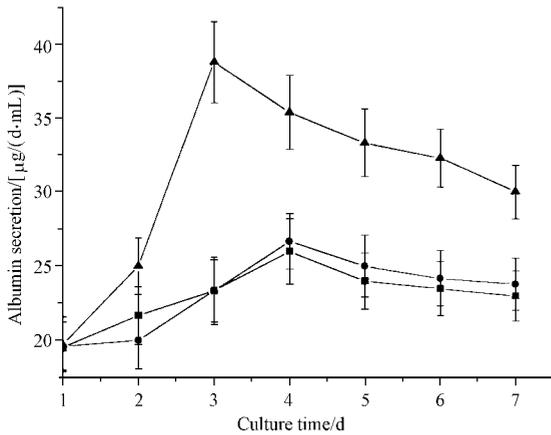


图 2 不同微载体上培养肝细胞的白蛋白分泌

Fig. 2 Albumin secretion of hepatocytes cultured on microcarriers

■Cytodex III ●Glutaraldehyde cross-linked chitosan microcarriers ▲Fructose-modified chitosan microcarriers
(Reaction conditions: oil : water = 4:1, 50mL 2.5% chitosan solution, 7mL 10% glutaraldehyde solution, 300r/min)

从图 2 可看出,在培养期间,果糖修饰壳聚糖微载体上肝细胞的白蛋白分泌量始终高于未修饰壳聚糖微载体上肝细胞的分泌量,最高值达到 $38.8\mu\text{g}/24\text{h}/\text{mL}$,而肝细胞在 Cytodex III 和未修饰壳聚糖微载体上白蛋白最大分泌量分别为 $26.0\mu\text{g}/24\text{h}/\text{mL}$ 和 $26.7\mu\text{g}/24\text{h}/\text{mL}$ 。这说明果糖修饰有利于提高肝细胞的代谢活性。

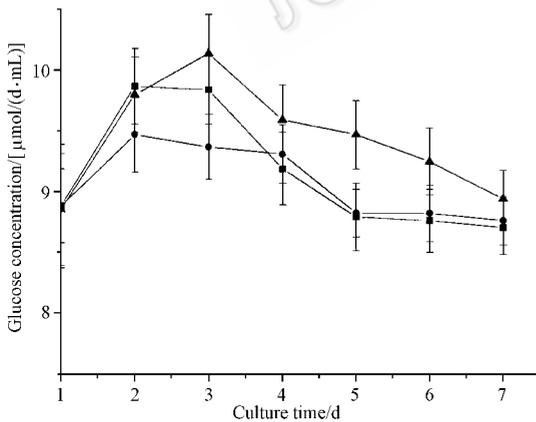


图 3 不同微载体上培养的肝细胞的葡萄糖代谢

Fig. 3 Glucose metabolism of hepatocytes cultured on microcarriers

■ Cytodex III ● glutaraldehyde cross-linked chitosan microcarriers ▲ fructose-modified cross-linked chitosan microcarriers
(Reaction conditions: oil : water = 4:1, 50mL 2.5% chitosan solution, 7mL 10% glutaraldehyde solution, 300r/min)

3 结 论

本文将微载体培养技术和聚集体培养方法结合起来,进行了微载体上肝细胞聚集体的培养,实验结果表明,肝细胞在果糖修饰的壳聚糖微载体上聚集生长,保持良好的球形形态,显著提高了肝细胞的代谢活性,这在杂化人工肝支持系统的研究中是很有意义的。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Watanabe F D, Amaout W S, Ting P *et al.* Artificial liver. *Transplantation Proceedings*, 1999, **31**(1-2): 371-373
- [2] Kaneko M, Fukuda J, Ijima H *et al.* Development of hybrid artificial liver support system using spheroid culture and application to warm ischemic liver failure in dog and pig as a preclinical test. *Materials Science and Engineering: C*, 1998, **6**(4): 245-248
- [3] Kong D, Chen M, Gentz R *et al.* Cell growth and protein formation on various microcarriers. *Cytotechnology*, 1999, **29**: 149-156
- [4] Schrimpf G, Friedl P. Growth of human vascular endothelial cells on various types of microcarriers. *Cytotechnology*, 1993, **13**(2): 89-98
- [5] Florence J W, Julie R, Friend C, Hsiao C *et al.* Efficient assembly of rat hepatocyte spheroids tissue engineering applications. *Biotechnology and bioengineering*, 1996, **50**: 404-415
- [6] Hiroshi Mizumoto, Masashi Hayakami *et al.* Formation of cylindrical multicellular aggregate (cylindroid) and expression of liver specific functions of primary rat hepatocytes. *Cytotechnology*, 1999, **31**: 69-75
- [7] Hirano S. *Progress in Biomedical Polymers*. 2nd ed, New York: Plencem Press, 1990
- [8] Chandy T, Shama P, Chitosan as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif*, 1990, **18**: 1-24
- [9] Maswa KAWASE *et al.* Application of Glutaraldehyde-crosslinked Chitosan as a Scaffold for hepatocyte Attachment. *Biol Pharm Bull*, 1997, **20**(6): 708-710
- [10] Maswa KAWASE *et al.* Effectiveness of fructose-modified chitosan as a Scaffold for hepatocyte attachment. *Biol Pharm Bull*, 1997, **20**(12): 1290-1294
- [11] LI S I(李少林), PAN J I(潘继伦), XU T(徐涛) *et al.* The application of agar in the culture of hepatocyte aggregates. *Science Bulletin(科学通报)*, 1999, **44**(18): 1977-1980
- [12] Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976, **13**: 29-83

The Preparation of Fructose-modified Chitosan Microcarrier and Culture of Primary Rat Hepatocyte

ZHANG Li-Guo PAN Ji-Lun* LI Jie-Liang YU Yao-Ting

(*The Key Laboratory of Bioactive Materials , Ministry of Education , Nankai University , Tianjin 300071 , China*)

Abstract Crosslinked chitosan microcarriers were prepared by the reaction of glutaraldehyde with fructose – modified chitosan. Various factors that influence the preparation were studied and the reaction conditions were optimized. Morphology of rat hepatocyte cultured on chitosan microcarriers was observed using phase contrast microscopy and scanning electron microscope , the metabolic activity was measured. Rat hepatocytes cultured on chitosan microcarrier retained the spherical shape as they have in vivo and had high metabolic activity. Fructose can enhance the metabolic activity of hepatocytes and fructose – modified chitosan microcarrier is a promising scaffold for hepatocytes attachment , which can be used in bioartificial liver support system.

Key words fructose , chitosan , microcarrier , hepatocyte culture

Received : 06-26-2002

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(No. 30070222).

* Corresponding author. Tel : 86-22-23508259 ; Fax : 86-22-23501393 ; E-mail : panjilun@eyou.com