

微囊化重组 CHO 细胞制备和培养条件的优化 Preparation and Cultivation of Microencapsulated Recombinant CHO Cells

张 英^{1,2}, 王 为¹, 吕国军^{1,2}, 于炜婷¹, 郭 昕¹, 雄 鹰¹, 马小军^{1*}

ZHANG Ying^{1,2}, WANG Wei¹, LÜ Guo-Jun^{1,2}, YU Wei-Ting, GUO Xin¹, XIONG Ying¹ and
MA Xiao-Jun^{1*}

1 中国科学院大连化学物理研究所生物医学材料工程组, 大连 116023

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

1 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 微囊化重组基因细胞移植治疗肿瘤是一种新兴的肿瘤基因治疗方法,然而由于目前微囊化细胞规模化制备和培养技术还不成熟,阻碍了其在临床治疗中的推广与应用。以重组 CHO 细胞为模型,考察了不同的微囊制备和培养条件对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响。实验表明,种子细胞所处的生长阶段和细胞接种密度对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响较大,对数生长期的细胞进行包囊并且细胞接种密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ cells/mL 微囊时微囊内细胞生长良好、内皮抑素表达量高。微囊制备时间对细胞活性和内皮抑素表达也有较大的影响,制备时间延长对细胞的损伤增大,因此制备时间应控制在 5h 以内。生物微胶囊在制备过程中会造成细胞损伤,而体外培养是恢复细胞活性的良好方法,在培养过程中微囊接种量为 5% 时对细胞生长和内皮抑素表达有利。

关键词 细胞移植, 肿瘤抗血管治疗, 微囊制备和培养, 重组 CHO 细胞, 内皮抑素

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0502-06

Abstract Transplantation of the microencapsulated recombinant cells is a novel alternative approach to gene therapy of tumors. The semi-permeable membrane of microcapsule protects cells from host's immune rejection, increases the efficiency of gene transfer and reduces the need for frequent injection. Optimization of the preparation and culture is needed to acquire biological microcapsule with high cell viability and protein production. In this work, we studied the effect of different preparation and culture condition on the microencapsulated recombinant CHO cells growth and endostatin production. The result showed that the inoculum cells growth phase and seeding density potently affected the growth and endostatin production of the recombinant CHO cells in the microcapsule. The exponential growth phase recombinant CHO cells with a seeding density of $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ cells/mL microcapsules benefited to the cells growth and endostatin production. The time of preparation was another important effect factor of cells viability, the cells viability decreased with the increase of preparation time and the time of preparation should be under 5h for maintaining the cell viability and endostatin production. The highest viable cell density and endostatin production was acquired when the microcapsule percentage was 5% in the culture of the microencapsulated cells, the cell growth and endostatin

Received: August 23 2006; Accepted: November 8 2006.

This work was supported by the grants from the National Basic Research Program of China (No. 2002CB713804 and 2005CB522702) and the National Natural Science Foundation of China (No.20236040 and 30472102).

* Corresponding author. Tel: +86-411-84379139; Fax: +86-411-84379139; E-mail: maxj@dicp.ac.cn

国家 973 攻关项目(No.2002CB713804, 2005CB522702)和国家自然科学基金(No. 20236040 和 30472102)资助
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

production decreased with the increase of the microcapsule percentage.

Key words cell transplantation, anti-angiogenic therapy; microcapsule preparation and culture, recombinant CHO cells, endostatin

血管生成(angiogenesis)对肿瘤生长、浸润和转移具有重要意义,实体肿瘤体积超过 1mm^3 就需要新生血管维持营养供给和排泄代谢产物。抑制新生血管的生成可使肿瘤细胞进入休眠状态并诱导凋亡,因此抗肿瘤血管生成可以有效的抑制肿瘤的生长,达到治疗肿瘤的目的^[1,2]。肿瘤抗血管治疗已成为当前各国肿瘤医学领域里新的研究热点,被认为是有望彻底根治恶性肿瘤的重要方法。近几年已有 20 多种血管生成抑制剂正在进行

I ~ III 期临床试验研究^[3-7],其中影响最大的是血管内皮细胞生长抑制因子(内皮抑素, Endostatin)^[8,9],它是目前发现的功能最强大的抗血管治疗药物,国内、外已经相继进行了内皮抑素的 I 期、II 期临床试验^[10-13],但在临床治疗试验中存在体内生物半衰期短、用量大、频繁注射病人耐受性差等问题。采用微囊化细胞移植可以有效地解决上述问题,2001 年 Tatsuhiro Joki 和 Read TA 采用微囊化细胞移植的方法治疗恶性肿瘤,取得了良好的治疗效果,开辟了一条新的肿瘤基因治疗方法^[14,15]。微囊化技术克服了免疫排斥反应使同种/异种移植成为可能,由于基因工程细胞包裹在微囊内,重组细胞可以在病人体内长期持续释放内皮抑素产生治疗作用。因此微囊化重组基因细胞移植是一种新型具有良好疗效并且安全的基因治疗方法,有望替代基因工程药物成为治疗恶性肿瘤的重要方法。然而,目前对微囊化细胞制备和培养的研究仅限于小规模实验室范围,无法满足临床需求。如果将微囊化细胞移植技术推广到临床应用,必需制备出大量的生长状态良好、产物分泌旺盛的微囊化细胞^[16],因此有必要对微囊化细胞规模化制备和培养过程进行优化。

在生物微胶囊制备过程中,由于细胞处于一种缺少培养液的环境,会对细胞造成一定的损伤,尤其是在规模化制备时这种损伤会更大,因此在规模化制备过程中保持细胞活性及重组基因产物表达能力是十分重要的。本文着重研究不同制备和培养条件对微囊化重组 CHO 细胞生长和内皮抑素表达的影响,以期对微囊化细胞规模化制备和培养提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及试剂 表达人重组内皮抑素的中国

仓鼠卵巢细胞(rCHO),由中科院上海细胞所藤怀宁博士惠赠。基础培养基为 DMEM/F12 培养液(美国, Sigma 公司),添加 10% 的新生牛血清(北京三利生物制品厂),100u/mL 的青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素(美国, Sigma 公司),海藻酸钠(Alginate),聚赖氨酸(Poly-L-lysine),四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma 公司,其它试剂均为国产分析纯产品。

1.1.2 主要仪器:MS-353 酶联免疫检测仪(Labsystems Co, Ltd, 芬兰),Heraeus BB16UV CO₂ 恒温培养箱(Heal Force Development Co. Ltd, 中国),大功率高压脉冲微胶囊制备仪(本实验室研制)。

1.2 方法

1.2.1 微囊化重组 CHO 细胞的制备:收集对数生长期的重组 CHO 细胞与无菌的 1.5%(W/V)海藻酸钠溶液混合均匀。细胞悬液通过 0.4mm 针头压出,利用高压脉冲微胶囊制备仪滴入 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液中进行凝胶化反应,制备含有细胞的海藻酸钙凝胶珠。钙化 20min 后海藻酸钙凝胶珠与适量的 0.05%(W/V)的聚赖氨酸溶液发生电解质络合反应形成微胶囊膜。成膜后的海藻酸钙凝胶珠重悬于 0.15%(W/V)的海藻酸钠溶液中,中和其表面多余的正电荷。最后,用 55mmol/L 的柠檬酸钠溶液液化微囊内的海藻酸钙凝胶,形成液化的 APA 微胶^[17]。

1.2.2 微囊化细胞培养:将微囊化的重组 CHO 细胞分装于 24 孔板中,每孔分装 0.1mL 微胶囊并加入 DMEM/F12 培养液 2 mL。微囊化细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养,每 4 天换培养液并收集培养上清于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,每组 3 个重复。

1.2.3 微囊内活细胞密度测定:活细胞数量测定采用 MTT 分析法^[18],即利用 MTT 检测细胞活性间接反映活细胞密度。具体方法如下:在 24 孔板的每孔中加入 100 μL 5mg/mL MTT 溶液,继续培养 24h,待结晶完全后将微囊筛出,用 1mL DMSO 将微囊内细胞形成的结晶充分溶解,吸取 200 μL 溶解液加入 96 孔板中用酶联检测仪检测波长 570nm 下的光密度值(OD)(630nm 为参考波长)。根据吸光度值与细胞密度的标准曲线,即可计算出活细胞密度。

1.2.4 内皮抑素浓度测定:内皮抑素浓度采用双抗体夹心 ELISA 法,试剂盒购自美国 R&D 公司,实验

步骤严格按照试剂盒说明书进行。应用酶联检测仪检测波长 450nm 下的光密度 (OD) 值(630nm 为参考波长),内皮抑素浓度与 OD_{450} 值之间呈正比,根据吸光度值与内皮抑素浓度的标准曲线,即可求出样本中的内皮抑素浓度。

1.2.5 实验条件:

(1)在种子细胞不同生长阶段对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响实验中,种子细胞采用延迟期、对数期、稳定期的细胞进行包裹。其它条件为细胞接种密度为 2×10^6 cells/mL 微囊,接种量为 5%(微囊/培养液),微囊制备时间为 3h。

(2)在细胞接种密度对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响实验中,细胞接种密度分别为 1×10^7 cells/mL 微囊、 5×10^6 cells/mL 微囊、 2×10^6 cells/mL 微囊、 1×10^6 cells/mL 微囊、 5×10^5 cells/mL 微囊。其它条件为种子细胞为对数期细胞,微囊接种量为 5%(微囊/培养液),微囊制备时间为 3h。

(3)在微囊制备时间对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响实验中,微囊制备时间分别为 3h、5h、7h。其它条件为种子细胞为对数期细胞,细胞接种密度分别为 2×10^6 cells/mL 微囊,微囊接种量为 5%(微囊/培养液)。

(4)在微囊接种量对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响实验中,微囊接种量为 20%、15%、10%、5%(微囊/培养液)。其它条件为种子细胞为对数期细胞,细胞接种密度分别为 2×10^6 cells/mL 微囊,微囊制备时间为 3h。

1.2.6 参数计算:

比生长速率(μ)采用如下公式计算^[19]:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

X_1 和 X_2 是在 t_1 和 t_2 时的活细胞数量。

2 结果与讨论

2.1 种子细胞不同生长阶段对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响

图 1 显示了种子细胞不同生长阶段对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响,处于对数生长期的细胞进行包裹微囊内的细胞活性最好、细胞生长延迟期短,包裹后的第 2 天进入对数生长期,此时比生长速率最大,为 0.863/d。随着培养的进行比生长速率下降,在第 14 天时细胞生长达到稳定期,此时活细胞密度为 4.17×10^7 cells/mL microcapsule。延迟期细胞包裹细胞延迟期延长,在第 4 天时细胞生长进入对数生长期,最大比生长速率为 0.611,在第 16 天时达到最大活细胞密度 3.64×10^7 cells/mL microcapsule。稳定期细胞包裹重组细胞活性较差、细胞生长较慢,最大比生长速率只有 0.453。在第 16 天时最大活细胞密度只达到 1.24×10^7 cells/mL microcapsule。内皮抑素表达规律与细胞生长相符,对数期细胞包裹内皮抑素表达量最高,在培养的第 16 天达到 753.5ng/mL;延迟期细胞表达量次之;稳定期细胞内皮抑素表达量最低,在培养的第 16 天只有 112ng/mL。动物细胞生长可分为延迟期、对数生长期、稳定期和衰亡期四个不同的生长阶段。不同生长阶段的细胞由于细胞活性不同,对包裹过程中不良环境的适应能力也就不同,处于稳定期的细胞已经开始衰老、死亡,细胞活性较差,包裹后大部分细胞已经死亡,因此,细胞增殖和内皮抑素表达能力较差。而对数生长期和延迟期的细胞活性较好,抵抗包裹过程中不良环境的能力较强,细胞增殖和内皮抑素表达能力较好。因此,包裹细胞采用对数生长期的细胞最好,细胞增殖和内皮抑素的表达能力都最高。

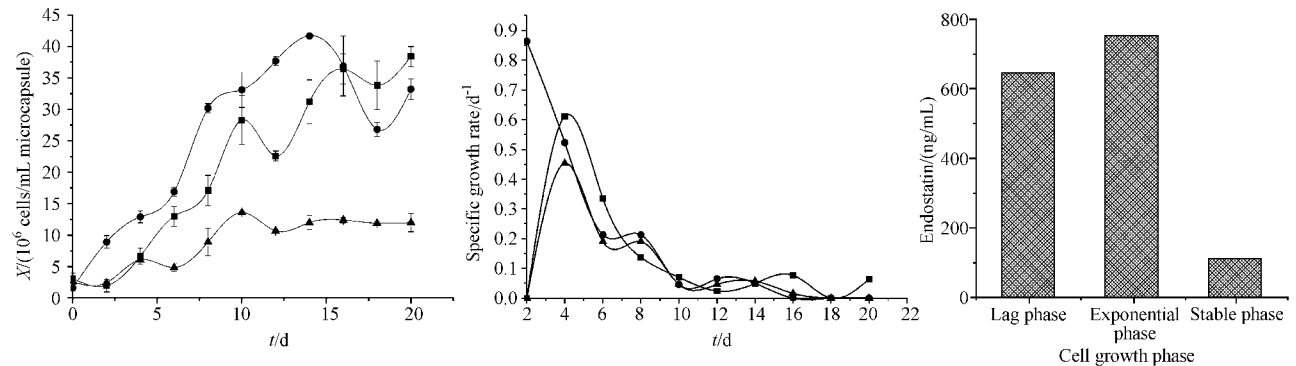


图 1 种子细胞生长阶段对微囊化重组 CHO 细胞生长和内皮抑素表达的影响

Fig. 1 The effect of the inoculum cells growth phase on the microencapsulated recombinant CHO cell growth and endostatin production

■ lag phase ; ● exponential growth phase ; ▲ stable phase

2.2 细胞接种密度对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响

细胞接种密度对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响见图 2。细胞接种密度为 2×10^6 和 1×10^6 cells/mL microcapsule 时细胞生长最好,最大活细胞密度分别达到 4.17×10^7 和 4.03×10^7 cells/mL microcapsule。当细胞接种密度降低为 5×10^5 cells/mL microcapsule 时细胞生长很慢,在第 18 天时活细胞密度只达到 1.27×10^7 cells /mL microcapsule。细胞接种密度增加到 1×10^7 和 5×10^6 cells/mL microcapsule 时细胞在前 4 天生长较快,然后细胞停止生长、细胞数保持稳定,最大活细胞密度只有 2.02×10^7 和 2.47×10^7 cells/mL microcapsule。细胞接种密度为 2×10^6 和 1×10^6 cells/mL microcapsule 时最大比生长速率为 0.863/d 和 0.966/d,提高接种密度到 1×10^7 和 5×10^6 cells/mL microcapsule 时最大比生长速率降低,只有 0.312/d 和 0.625/d。降低细胞接种密度到比生长速率 5×10^5 cells/mL microcapsule 时最大比生长速率为 0.904/d,与接种密度为细胞接种密度为 2×10^6 和 1×10^6 cells/mL microcapsule 时接近。内皮抑素表达量分析表明,细胞接种密度为 2×10^6 和 1×10^6 cells/mL microcapsule 时内皮抑素表达量较高,在培养的第 16 天分别为 753.5ng/mL 和 722.9ng/mL,增加和减少细胞接种密度都会降低内皮抑素的表达量。在固定化细胞培养中,细胞接种密度是重要的控制参数,为了维持细胞的快速增殖就要保证一定的细胞接种密度,细胞接种密度过低细胞生长会受到影响。W. S. Hu 报告在微载体培养中,当细

胞接种密度为 4×10^5 cells/mL 时细胞生长最好,减少细胞接种密度会抑制细胞的增殖。并且每个微载体接种细胞数应大于 7 个,否则细胞就不生长^[20,21]。L. Arús 研究表明细胞接种密度也影响微囊化杂交瘤细胞生长和抗体生成,当细胞接种密度为 1×10^7 cells /mL microcapsule 时细胞生长良好,并且抗体表达量高。减少细胞密度到 1×10^6 和 5×10^6 cells/mL microcapsule 时细胞生长都受到抑制,抗体表达量也减少^[22]。但接种密度为 1×10^7 cells/mL microcapsule 太高了,甚至高过了悬浮培养所能达到的最大细胞密度,这就增加了种子细胞制备的难度,因此需要优化细胞接种密度,减少细胞接种密度到合适的程度。本实验结果表明微囊化重组 CHO 细胞最佳接种密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ cells/mL microcapsule,在此接种密度下不仅细胞生长良好,内皮抑素表达量也最高。提高细胞接种密度,最大比生长速率降低,因此最大活细胞密度降低。当细胞接种密度减少到 5×10^6 cells/mL microcapsule 时,尽管最大比生长速率与接种密度为 1×10^6 和 2×10^6 cells/mL microcapsule 时相差不多,但是由于许多微囊接种细胞数少于 7 个(微囊平均粒径为 $300 \mu\text{m}$,每毫升大约含有 7 万个微囊,平均每个微囊含有细胞约 7 个。制备微囊时细胞不可能平均分配到每个微囊中,并且在微囊制备过程中有部分细胞死亡,因此部分微囊细胞数高于 7 个,部分微囊细胞数低于 7 个)因此细胞不生长。少数细胞接种量高于 7 个的微囊细胞生长良好,因此最大活细胞密度只达到 1.27×10^7 cells/mL microcapsule。

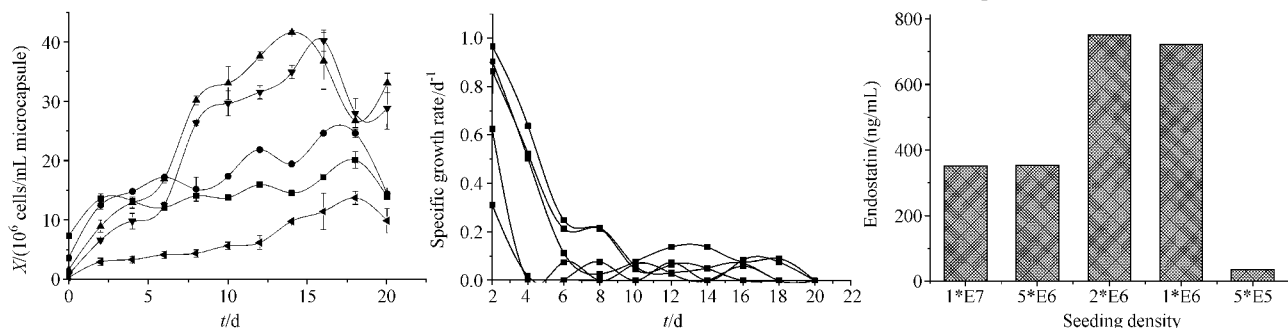


图 2 细胞接种密度对微囊化重组 CHO 细胞生长和内皮抑素表达的影响

Fig.2 The effect of the seeding density on microencapsulated recombinant CHO cell growth and endostatin production

■ 1×10^7 cells /mL microcapsule ; ● 5×10^6 cells /mL microcapsule ; ▲ 2×10^6 cells /mL microcapsule ; ▼ 1×10^6 cells /mL microcapsule ; ◀ 5×10^5 cells /mL microcapsule.

2.3 微囊制备时间对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响

在微囊制备过程中由于细胞处于无培养液的环境会对细胞造成一定的损伤,尤其是在规模化制备

时随着制备时间的延长对细胞的损伤会增大。图 3 显示了微囊制备时间对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响。如图所示,当微囊制备时间为 3h 时细胞生长延迟期很短,包裹后的第 2 天细胞生长进入

对数生长期,比生长速率为 0.863/d。在第 14 天时活细胞密度达到最大的 4.17×10^7 cells /mL microcapsule。当制备时间为 5h 时细胞生长经短暂的停滞,在第 4 天进入对数生长期,最大比生长速率为 0.728/d。在第 14 天时最大活细胞密度为 3.22×10^7 cells/mL microcapsule,然后活细胞密度保持稳定。当制备时间为 7h 时细胞生长较慢,最大活细胞密度只达到 6.59×10^6 cells /mL microcapsule,最大比生长速率也只有 0.241。当制备时间为 3h 时,在培

养的第 16 天内皮抑素表达量最高为 753.5ng/mL,制备时间为 5h 内皮抑素表达量为 514.1ng/mL,制备时间为 7h 内皮抑素表达量最低只有 88.7ng/mL。微囊制备过程会对细胞活性造成损伤,因此在制备过程中需要严格控制制备时间,以保持细胞活性和内皮抑素表达能力。本实验结果显示微囊制备时间应低于 5h,也就是细胞离开培养液的时间应控制在 5h 以内。

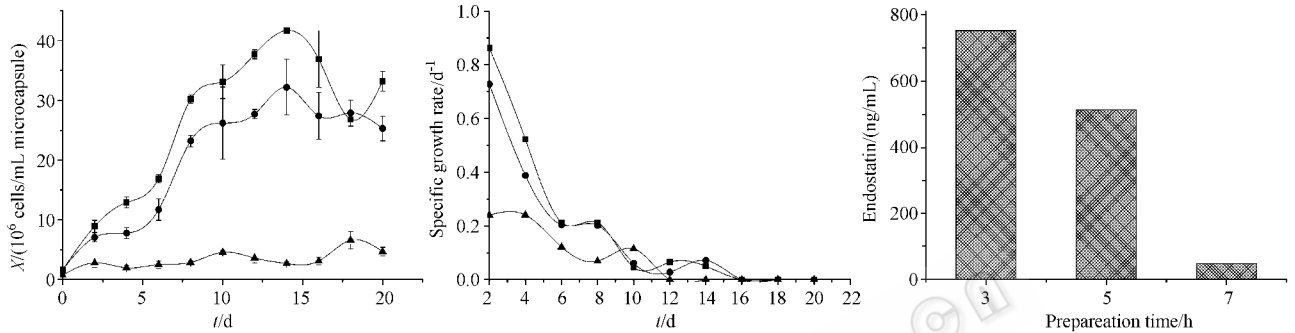


图 3 微囊制备时间对微囊化重组 CHO 细胞生长和内皮抑素表达的影响

Fig.3 The effect of the preparation time on microencapsulated recombinant CHO cell growth and endostatin production.

■ 3h ; ● 5h ; ▲ 7h.

2.4 微囊接种量对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响

微囊接种量对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响见图 4,微囊接种量为 5% 时细胞生长最好,最大活细胞密度达到 4.86×10^7 cells /mL microcapsule。微囊接种量增大会抑制细胞生长,当微囊接种量为 10% 时最大活细胞密度只达到 3.52×10^7 cells /mL microcapsule,微囊接种量进一步增加到 15% 和 20% 时最大活细胞密度降低到 2.74×10^7 cells /mL microcapsule 和 2.31×10^7 cells /mL microcapsule。微囊接种量为 5% 时最大比生长速率为 0.442,随着接种量增加最大比生长速率下降,当

微囊接种量增加到 20% 时最大比生长速率降为 0.278。内皮抑素表达实验结果表明,尽管微囊接种量对细胞生长有较大的影响,但是对内皮抑素的表达的影响不大。在培养的第 16 天内皮抑素的表达量为 840ng/mL 左右。本实验结果显示微囊接种量为 5% 时有利于细胞生长和内皮抑素的表达。微囊接种量增加会降低细胞增殖能力,这种降低可能是由于营养物质(主要是氧)供应不足造成的。微囊接种量增加会提高单位培养液中的细胞密度,因此对氧的需求量也就增加。由于氧在培养液中的溶解度较低并且传质系数较小,这就造成了氧供应的不足,严重影响了细胞的生长。

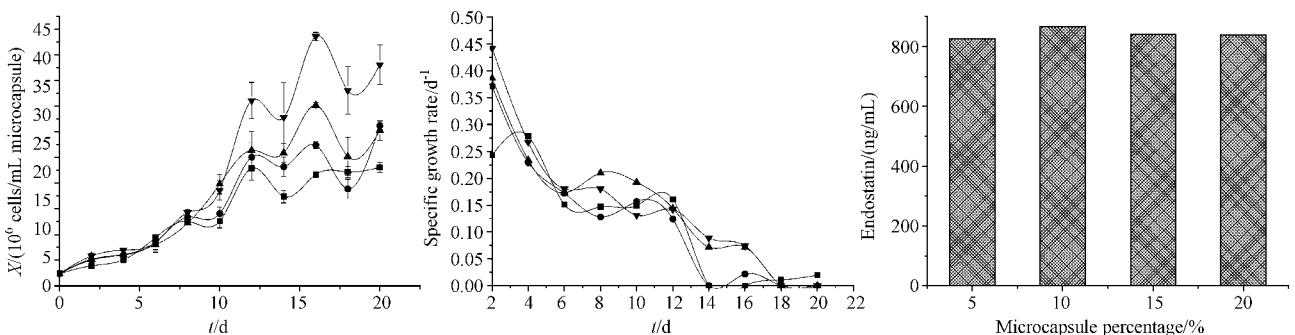


图 4 微囊接种量对微囊化重组 CHO 细胞生长和内皮抑素表达的影响

Fig.4 The effect of the microcapsule percentage on microencapsulated recombinant CHO cell growth and endostatin production

■ 20% ; ● 15% ; ▲ 10% ; ▼ 5%.

本文中考察了微囊制备条件对微囊化重组 CHO 细胞生长和内皮抑素表达的影响,实验结果表明在微囊化培养体系下细胞具有长期稳定的增殖活性和目的产物表达能力,不同制备和培养条件对微囊化细胞生长和内皮抑素表达具有很大的影响。采用对数生长期的细胞进行包囊,并且细胞接种密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ /mL microcapsule 细胞生长良好、内皮抑素表达量高。微囊制备时间对细胞活性和内皮抑素表达也有较大的影响,制备时间延长对细胞损伤增大,因此制备时间应控制在 5h 以内。在微囊体外培养过程中微囊接种量为 5% 时细胞生长最好、内皮抑素表达量高。在制备过程中可以通过优化制备条件来获得高细胞活性、高目的产物表达量的生物微胶囊,以满足移植治疗对微囊化细胞的需求。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, **285** (10): 1182 - 1186.
- [2] Brem S, Brem H, Folkman J, *et al.* Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Research*, 1976, **36** : 2807 - 2812.
- [3] Kurger EA, Figg WD. TNP-470 : an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert Opin investing Drugs*, 2000, **9** (7): 1382 - 1396.
- [4] Ezekowitz RAB, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alfa-2a therapy for life threatening hemangiomas of infancy. *N Engl J Med*, 1992, **326** : 1456 - 1463.
- [5] Voest EE, Kenyon BM, O 'Reilly MS, *et al.* Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst*, 1995, **87** : 581 - 586.
- [6] O 'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, *et al.* Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, **79** : 315 - 328.
- [7] Yohei M, Mark M, Corinne R, *et al.* Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem*, 2001, **276** : 15240 - 15248.
- [8] O 'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin : An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, **88** : 277 - 285.
- [9] Boehm T, Folkman J, Browder T, *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 1997, **390** : 404 - 407.
- [10] Eder JP, Supko JG, Clark JW, *et al.* Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administration as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol*, 2002, **20** (18): 3772 - 3784.
- [11] Kulke M, Bergsland E, Ryan DP, *et al.* A phase II, open-label, safety, pharmacokinetic, and efficacy study of recombinant human endostatin in patients with advanced neuroendocrine tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2003, **22** : 239.
- [12] Yang L (杨林), Wang JW (王金万), Tang ZM (汤仲明) *et al.* A phase I clinical trial for recombinant human endostatin. *Chinese Journal of New Drugs* (中国新药杂志), 2004, **13** (6): 548 - 553.
- [13] Shi HL (史鹤玲), Xu LY (徐丽艳), Liu Z (刘哲). Phase II clinical trial of homemade human rh-endostatin in the treatment of patients with stage III B-IV non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer* (中国肺癌杂志), 2004, **7** (4): 325 - 328.
- [14] Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, *et al.* Local endostatin treatment of gliomas by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** : 29 - 34.
- [15] Joki T, Machluf M, Atala A, *et al.* Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** : 35 - 39.
- [16] Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, *et al.* Encapsulated cell technology : from research to market. *Trends Biotechnol*, 2002, **20** (9): 382 - 387.
- [17] Ma XJ, Vacek I, Sun A. Generation of alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules : the relationship between the membrane strength and the reaction conditions. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1994, **22** : 43 - 69.
- [18] Zhou J (周晶), Zhang Y (张英), Wang W (王为), *et al.* The effect of glutamine on the growth, metabolism and endostatin production of microencapsulated rCHO cells. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22** (1): 162 - 166.
- [19] Astrid Voigt, Felix Zintl. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *J Biotechnol*, 1999, **68** : 213 - 226.
- [20] Hu WS, Meier J, Wang DIC. A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers. *Biotechnol Bioeng*, 1984, **28** : 585 - 595.
- [21] Hu WS, Wang DIC. Selection of microcarrier diameter for the cultivation of mammalian cells on microcarriers. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **30** : 548 - 557.
- [22] Arús L, Orive G, Hernández R, *et al.* The influence of cellular seeding density in the microencapsulation of hybridoma cells. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 2005, **16** : 521 - 529.