

刘成圣 陈西广 刘晨光 刘万顺 郎刚华:

## 甲壳质及其衍生物作为贴壁依赖性动物细胞生长微载体的研究现状\*

### THE IMPRESS OF CHITIN AND THE DERIVATIVE MICROCARRIER RESEARCH ON ANIMAL CELL CULTURE

动物细胞大规模培养研究的动力源于1950年为对付病毒性疾病而兴起的群体接种运动。1962年Capstick Telling等人采用悬浮培养

法培养出小鼠肾细胞(BHK)。1967年荷兰的Van Wezel首次在贴壁依赖性动物细胞培养中使用了微载体(Microcarrier, MC),此后,微载体

山东省科委资助项目 981164801 号。  
收稿日期:2000-01-17;  
修回日期:2000-04-20

系统 (MCS) 迅速发展, 并成为当前贴壁细胞培养最有工业化发展前途的一种培养方法。

随着微载体开发与研究成为这一领域的热点, 目前已出现的微载体根据其制备材料大致可分为: 葡聚糖、塑料、明胶 (Collagen)、玻璃、纤维素 5 大类。以上述材料制成的 MC 在细胞培养方面均表现出自身的一些特性, 但仍与人们理想中的 MC 有一定的差距。因此, 优良 MC 的开发, 特别是优质 MC 材料的开发仍是当前主要研究方向。

甲壳质 (Chitin) 是一种天然高分子材料, 结构比较特殊。其分子链之间可以形成许多氢键, 能够牢固地结合在一起, 分子中  $\beta(1,4)$  糖苷键为其提供分子的刚性和稳定性; 分子中含有氨基, 可提供弱的正电性; 乙酰基提供疏水性; 羟基具有良好的亲水性, 但又不溶解于水。另外, Chitin 可修饰成多种具有生物活性的衍生物。这些性能为 Chitin 在微载体方面的开发研究提供了许多有益的条件。国内外已经做了大量的研究, 有希望开发成为新一代性能良好的 MC 基质。本文就 Chitin 及其衍生物 MC 在贴壁依赖性动物细胞培养方面的主要相应关系作以下综述。

## 1 细胞与微载体的黏着 (Adhesion) 作用

贴壁依赖性动物细胞在 MC 表面的增殖, 可分为黏着 (贴壁)、生长和扩展成单层 3 个阶段。动物细胞只有黏着于固体基质表面才能增殖。所以, 细胞在 MC 表面的黏着是进一步生长和铺展的关键。细胞和 MC 表面之间的黏着力, 主要依靠电荷亲和与范德华力。

细胞能否在微载体表面黏着,

一是取决于细胞与 MC 的接触机率; 二是取决于细胞与 MC 的相容性。M. IZUME 1988 年就甲壳胺 (Chitosan) 与明胶对鸡胚成纤维细胞的表面亲和速度进行过研究。结果表明, 在同样搅拌速度条件下, 细胞在 Chitosan 表面比在 Collagen 表面黏着速度高出 1.7 倍。如果明胶中加入 10% 以上的 Chitosan 时, 细胞黏着速度将明显增加。

## 2 细胞对微载体表面电荷的要求

贴壁依赖性动物细胞要达到顺利贴壁、生长并铺展, 是由 MC 表面的电荷密度决定的。而不同类型和处于不同状态的细胞对电荷的极性和电荷密度要求不同。据 Maroudas 报道, 对于 Biosilon 来说, 最适宜的 MC 表面要求是带负电荷, 电荷密度为  $20\,000 \sim 100\,000 \text{ Me/cm}^2$ 。电荷密度过高, 则产生“毒性”效应, 表现为细胞容易贴壁并铺展, 却不能良好地生长; 电荷密度过低, 则影响细胞贴壁率, 即使部分细胞吸附到表面并铺展, 也很容易脱落下来。表面带负电荷的微载体与细胞结合是靠培养基中二价阳离子和表面吸附糖蛋白作介质, 细胞是非特异地吸附到 MC 表面上的。

从电性来说, 在正常的生理 pH 值下, 真核细胞表面带有不均匀的负电荷, 因此, 表面带有正电荷的微载体, 更有利于细胞的吸附。根据这一理论, Famarcia 公司利用中性葡聚糖凝胶表面偶联正电荷基团开发出 Cytodex1, Cytodex2, Cytodex3 系列商品, 是目前普遍认可的品种。图 1 列出 Cytodex 系列产品和甲壳质系列 MC 的电荷结构。从电性角度看, 二者均为正电性, 提

供正电荷的基因也有相似性。但 Chitosan 的电荷密度相对较高, 有利于细胞贴壁, 却不利于生长。因此, Chitosan 的化学改性显得更为合理 (见图 1)。

## 3 细胞对微载体密度的要求

细胞悬浮培养对 MC 的密度有严格的要求, 即 MC 的密度应略大于培养基, 一般要求在  $1.03 \sim 1.05$  之间, 最大应不超过 1.1。只有这样, 经轻度搅拌, MC 才能悬浮在培养基中; 而停止搅拌, 微载体又能较快地沉降下来。所以密度值是衡量 MC 优良与否的特性参数之一。而这一参数除了与材料本身有关外, 还与 MC 制备工艺有关。Chitin 及其衍生物 MC 的密度值均在  $1.03 \sim 1.06$  之间。

## 4 细胞对微载体其他方面的要求

优良微载体除对上述方面有所要求以外, 对粒径、表面光滑程度、光学透明性、耐热、耐压 (刚性)、与细胞分离难易、重复使用性等方面均有要求。

采用喷射法制作的 Chitin 微载体一般颗粒较大, 均匀度不易控制; Chitosan 和 CMChitosan 材料, 采用油相分散法制备出的 MC 粒经比较均匀, 直径一般在  $100 \sim 200 \mu\text{m}$ ; 其表面光滑, 表面积可达到  $4\,000 \sim 5\,000 \text{ cm}^2/\text{g}$  干 MC; 光学透明性较好, 在电镜下可以较容易地观察到细胞的生长情况。Chitin 及其衍生物 MC 耐热性较好, 可以在 pH  $6.5 \sim 7.5$  缓冲液中高温灭菌。青岛海洋大学海洋生命学院利用改性 Chitosan 研制出 CX1 型微载体, 经实验证明: 具有较好的韧性, 不容易破裂, 可以重复使用 10 次上, 其

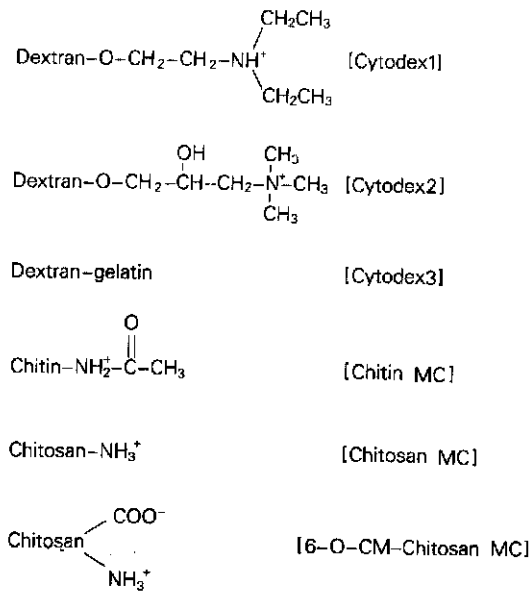


图1 Cytodex系列与Chitin系列微载体电荷结构

性能没有很明显的改变。

## 5 甲壳质微载体的制备及培养细胞的应用效果

Chitin 不溶于水,也不溶于稀酸、碱和一般的有机溶剂,仅溶于少数的几种溶剂,如:六氟异丙醇、六氟丙酮水化物、吡咯烷酮的氯化锂溶液、一些氯醇和浓酸等。因此直接用 Chitin 为基质制造 MC,在溶剂方面受到了很大的制约。1985 年日本ユニチカ株式会社<sup>[1]</sup>进行过用 Chitin 制备 MC 的研究,先将 Chitin 降解成 2.5 Pa·s 低分子,然后用饱和 LiCl 的 N-甲基吡咯烷酮溶解后,喷到搅拌的甲醇中,制备成微载体。用 Dulbecco 法,在 Eagle 培养基中添加必需的氨基酸、核苷酸和 10% 体积的胎牛血清,接种 250 000 cells/ml 浓度人纤维母细胞,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 d,结果表明,细胞回收量比对照组提高了 2 倍,并且

第 1 次证明 Chitin 直接制备微载体是可行的。

Chitosan 与 Chitin 相比溶剂的可选择范围明显扩大。氨基的正电荷密度也明显增高,对细胞的黏着十分有利。M. IZUME 将 Chitosan 溶解于 1% 的醋酸溶液,涂于聚苯乙烯载体上,用红外光照射 20 min,再用氨蒸汽熏 2 h,然后用磷酸缓冲液冲洗,脱水干燥,制成 Chitosan 微载体。在 Eagle·s 培养基中添加 10% 胎牛血清进行鸡胚纤维细胞 (CEF) 接种,CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,结果 Chitosan 微载体对细胞的黏着明显比 Collagen 对照组快近 1 倍,但生长速度慢,经过 5 d 培养细胞生长量仅为 Collagen 组的 1/10 左右。

M. IZUME 的研究中还将 Chitosan 和 Collagen 按不同的比例混合制成微载体,分别进行细胞培养对照试验,结果发现,微载体对细胞黏着能力随着 Chitosan 比例的增加

而增加,但增强的差别不十分明显,而对细胞生长速度和生长量是随着 Chitosan 的增加而明显减弱。综合两种试验现象认为: Chitosan 和 Collagen 按 1: 9 或 1: 4 的比例混合制成的 MC 在细胞黏着和生长速度方面最佳。

刘万顺等<sup>[2]</sup>曾报道,将 Chitosan 制成 6-O-CM-Chitosan 用于细胞培养,对人胚肺成纤维细胞的培养有促进作用。陈西广等报道,用 Chitosan 与 6-O-CM-Chitosan 复合,采用有机溶剂分散,固化成型,制成直径为 100 ~ 200 μm 的 CX1 型微载体,在 PRIM 640 培养基中添加 10% 的小牛血清,以 1 mg/ml 的微载体浓度分别进行 BHK 细胞<sup>[3]</sup>、Vero 细胞<sup>[4]</sup>、BB 细胞<sup>[5]</sup>培养,72 h 细胞均可铺满 MC 表面,120 h 可达到多层生长,每 ml 培养基中的细胞量可增大约 3 倍。载体稳定性好,可多次使用,表现出许多优良的性能,现正在研究开发中。

## 6 结语

甲壳质及其衍生物在微载体材料方面的研究,已取得了很大的进展,这些研究将为推动一种新型的贴壁依赖性动物细胞生长用微载体的产生起重要作用。甲壳质在微载体方面的研究还有很大的潜力,在磁性 MC、多孔 MC、液膜 MC 等方面都将是很有意义的研究方向。

### 参考文献

- 1 日本公开特许公报 A. 昭 60-208302
- 2 刘万顺. 生物化学杂志, 1997(专刊): 218
- 3 陈西广等. 细胞生物学杂志, 1997, 1: 30 ~ 32
- 4 陈西广等. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(1): 51 ~ 55
- 5 陈西广等. 生物化学杂志, 1997(专刊): 218 (本文编辑: 张培新)