

细胞移植用微胶囊的制备材料与制备方法

薛伟明 于炜婷 王 为 刘袖洞 马小军*

(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)

摘 要 免疫排斥是细胞移植面临的关键问题。微胶囊的选择透过性膜可对微囊化细胞进行免疫保护,维持其正常的生理状态和功能表达,实现细胞的同种或异种移植,应用前景良好。本文评述了细胞微囊化材料的最新研究进展,如:海藻酸钠、聚赖氨酸、壳聚糖、琼脂等在细胞微囊化中的理化特性与应用;评述了聚电解质络合、界面相转化、共形包衣等细胞微胶囊制备方法。

关键词 细胞 移植 微胶囊 材料 制备方法

Materials and Fabricating Methods of Microcapsules for Cell Transplantation

Xue Weiming, Yu Weiting, Wang Wei, Liu Xiudong, Ma Xiaojun*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy Sciences, Dalian 116023)

Abstract Immunological rejection is the key problem of cell transplantation. Based on the permselective property of microcapsule membrane, encapsulated cells can be immuno-protected. The normal physiological state and function expression of cells can be maintained so as to realize allo- or xeno-transplantation. In this paper, the latest progress relevant to materials and fabricating methods for cell microencapsulation was reviewed. The physicochemical characteristics and applications of alginate, polylysine, chitosan and agarose as well as fabricating methods such as polyelectrolyte complexation, interfacial phase inversion and conformal coating techniques were mainly concerned.

Key words Cell transplant, Microcapsule, Material, Fabricating method

当人体组织或器官病变受损后,除了实行器官移植外,将生物材料与细胞结合制备成人工器官,用于恢复病变组织或器官的功能一直是人们努力的方向。Chang^[1]首先提出采用微囊化技术构建生物人工器官的思想,即采用微胶囊包裹具有特定功能的组织或细胞,利用微囊膜对其免疫保护,可在避免使用免疫抑制剂的条件下维持细胞的正常生理功能,并对病损组织进行形态、结构和功能的重建或替代,达到治疗疾病的目的。

1 微胶囊与免疫隔离

免疫排斥是器官移植面临的突出问题。目前克服免疫排斥的主要方法是:(1)组织配型,但供体来源有限;(2)减小供体组织的免疫原性,如紫外线照射、抗体处理;(3)对宿主暂行免疫抑制(如使用免疫抑制剂),但易造成宿主免疫力过度低下;(4)采用人造半透膜将移植植物与宿主免

薛伟明 女,36岁,副教授,博士后,现从事膜分离及生物医学材料研究。 *联系人 E-mail:maxj@dicp.ac.cn
国家 863 计划基金资助项目(2001AA326020)及中国科学院特别支持课题(STZ-00-08)资助项目
2002-05-31 收稿,2002-09-29 修回

疫系统隔离，如微胶囊系统。

作为免疫隔离的技术平台，微囊化技术能将生物材料与细胞构成一种生物功能机构，移植后可代行天然器官的某些功能。微胶囊免疫隔离原理是：微囊膜具有分子选择透过性，允许低分子量物质(营养物、代谢物等)自由通过，保证囊内细胞存活及正常功能表达；允许囊内细胞分泌的低分子量药物(如胰岛素、多巴胺)释出囊外，对宿主进行治疗和调节；阻止囊外免疫细胞和免疫分子通过，避免宿主对移植组织或细胞产生免疫排斥。例如，Lim 等^[2]发明的海藻酸盐(Alginate,简称 Alg)-聚赖氨酸(Polylysine,简称 PII)-海藻酸盐微胶囊(简称 APA 微胶囊)的囊膜可截留分子量大于 $11\times10^4\text{Da}$ 的物质，故分子量 $16\times10^4\text{Da}$ 左右的抗体和免疫细胞不能进入微囊，微囊化异种胰岛可在宿主体内存活并保持 26 个月的降血糖功能，体现了微囊对移植细胞的免疫保护作用。

作为细胞移植的有效免疫隔离工具，微胶囊的主要优点是：(1)具有免疫隔离作用；(2)死腔体积小，利于营养物和代谢物的传质，利于囊内细胞对宿主体内生理信号的快速应答；(3)可减小移植物体积；(4)虽然微囊膜很薄，但其机械强度很高，可承受 3~6N 的正面压力，不易造成移植物泄漏。

目前，细胞微囊化技术在生物医学领域的研究主要集中在以下几方面：(1)微囊化胰岛替代胰岛素治疗^[3]；(2)微囊化肝细胞为急性肝衰提供暂时性代谢支持，或作为肝脏移植前的过渡治疗^[4]；(4)微囊化肾上腺髓质嗜铬细胞治疗帕金森氏病及疼痛症^[5,6]；(5)微囊化甲状旁腺细胞治疗甲状腺机能低下^[7,8]等。

2 微胶囊制备材料

作为细胞移植的微胶囊制备材料，一般要求具有优良的生物相容性、长期的生物稳定性、良好的机械强度和成膜性，在微胶囊制备中无需苛刻的制备条件。已成功地用于细胞微囊化的材料如表 1 所示。

表 1 用于哺乳动物细胞微囊化的材料^[9]
Tab.1 Materials used for mammalian cells microencapsulation^[9]

聚合物材料	微囊化细胞类型	宿主动物模型
羟乙基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯	PC-12	体外
	CHO	体外
	人成纤维细胞	体外
各种聚丙烯酸酯	大鼠胰岛	体外
	HepG2	大鼠
海藻酸盐-聚赖氨酸	大鼠胰岛	糖尿病大鼠
	mGH-C2C12 成肌细胞	侏儒小鼠
海藻酸盐-聚赖氨酸-海藻酸盐	大鼠胰岛	大鼠
	人胰岛	人腹膜
	大鼠肝细胞	大鼠腹膜
	小牛肾上腺嗜铬细胞	啮齿类动物颅脑
海藻酸钡	PC-12	灵长类动物颅脑
	大鼠胰岛	STZ-糖尿病小鼠
	猪胰岛	STZ-糖尿病小鼠

琼脂	小鼠 B6-胰岛	STZ-糖尿病小鼠
	仓鼠胰岛	NOD 小鼠
琼脂/聚苯乙烯磺酸/聚凝胺/羧甲基纤维	PC-12	几内亚猪
素复合物	大鼠胰岛	STZ-糖尿病小鼠
光交联聚乙烯醇	小鼠胰岛	小鼠腹膜

目前,细胞微囊化装置几乎都由水凝胶制备而成。水凝胶是一类可在水中膨胀但不溶解的合成或天然聚合物。作为细胞微囊化的理想材料,水凝胶具有以下特性:(1)组织周围的机械或摩擦刺激可通过凝胶柔软圆滑的特性而消除;(2)作为材料亲水性的结果,在流体和组织周围没有界面张力,可将蛋白吸附和细胞粘附减小到最低限度,使微囊具有高的生物相容性;(3)易于形成光滑透明的微囊,可方便地观察微囊内的细胞状态;(4)水凝胶对低分子量营养物和代谢物具有高的通透性;(5)成囊条件温和,有利于移植细胞的活性保存。

2.1 海藻酸钠

海藻酸钠是来自褐藻的天然多糖,是由 α -L-甘露糖醛酸(M 单元)与 β -D-古罗糖醛酸(G 单元)依靠 1,4-糖苷键连接并由不同 GG、GM、MM 片段组成的共聚物。海藻酸钠可溶于水,不溶于乙醇、乙醚等有机溶剂。其水溶液遇 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 等二价阳离子时,将由均相液态转变为凝胶态。 Ca^{2+} 引起海藻酸钠凝胶的机理是:1 个 Ca^{2+} 与 2 个 GG 单元通过 4 个配位键形成具有 2 个六元环结构的稳定螯合物,即“蛋格”结构。而 Ba^{2+} 既可与 M 单元交联,又能与 G 单元交联。

目前,利用海藻酸钠的微囊化技术已出现在胰岛、肝细胞、生长激素、肾上腺和甲状腺等移植领域,免疫隔离性能良好。但是,该微囊化系统的生物相容性仍不理想,这与微胶囊制备过程中诸多因素,尤其与海藻酸钠的性能相关。

2.1.1 海藻酸钠纯度 海藻酸钠纯度是影响 APA 微胶囊生物相容性的重要因素。在空胶囊移植研究中,分别将纯化前、后的 APA 微胶囊移植到小鼠腹腔中,发现未纯化样品在移植 1 个月后会粘附在网膜及肝上,并伴随纤维化增生。而纯化样品在移植 12 个月后,大多数都自由漂浮在腹腔中,80% 以上的胶囊都能从腹腔回收,只有不到 10% 的回收胶囊有纤维增生现象。这表明纯化从本质上减轻了宿主免疫反应。

2.1.2 海藻酸钠类型 虽然 APA 微囊化细胞具有一定疗效,但仍存在移植后引起的生物不相容现象,主要为促有丝分裂、刺激 $\text{TNF-}\alpha$ 和白细胞介素释放、激活巨噬细胞、微囊周围的纤维化反应和多核巨大细胞反应。这种生物不相容性与海藻酸钠类型相关。而海藻酸钠类型主要以古罗糖醛酸在分子中的含量来衡量。

2.1.2.1 对免疫系统的反应 在海藻酸钠中,是甘露糖醛酸(M)而不是古罗糖醛酸(G)刺激受体组织中的抗体生成和纤维化反应^[10]。高 M 含量的海藻酸钠通过刺激单核细胞产生 TNF 、 IL-1 、 IL-6 等炎前细胞因子和激素免疫应答引发炎症反应。在移植了这类微囊的小鼠血清中,测定出了针对高 M 而不是对高 G 海藻酸钠的抗体。因此,采用高 G 含量海藻酸钠制备微胶囊,可有效改善微囊化移植物的生物相容性。

2.1.2.2 对微胶囊光洁度与机械稳定性的影响 生物相容的 APA 微胶囊的基本特性是光滑性和机械稳定性。表面光滑的胶囊不易粘附免疫细胞,宿主免疫反应较轻,微囊化细胞活性与功能

维持时间长。实验表明, 具有光滑表面的微囊在链脉佐菌素诱导的糖尿病大鼠中寿命可达 10 周以上, 而表面粗糙的微囊在移植不到 1 周便引起了显著的纤维化反应。

由高 G 含量海藻酸钠制备的胶珠不易拖尾, 应力小, 球形度好。而由低 G 含量海藻酸钠制备的微胶囊在移植后会过度膨胀, 继发囊膜破损, 造成移植失败。为了改善微胶囊的机械稳定性, 应采用高 G 含量的海藻酸钠制备 APA 微胶囊。

2.1.2.3 对囊膜完整性的影响 微胶囊的生物相容性与囊膜完整性密切相关, 而海藻酸钠类型是影响囊膜完整性的重要因素。采用高 G 含量海藻酸钠替代中等 G 含量海藻酸钠时, 发现未囊化胰岛的比率显著降低(从 24%降低到 12%), 这是由两种类型海藻酸钠在微囊化步骤中膨胀性质的差别引起的。高 G 海藻酸钠的膨胀度较低, 可减少胰岛突起物的生成机会, 因此减少了未囊化的几率。显然, 采用 G 含量较高的海藻酸钠能够减少囊膜缺陷的几率。

海藻酸钠微胶囊的最新研究进展主要为: (1)对最优粘度和最低纯度的认识; (2)对 G/M 最优比率的认识; (3)海藻酸钠包衣的共价交联或接枝改性; (4)电泳法除去海藻酸钠中促有丝分裂成分。作为天然多糖, 海藻酸钠的品质受来源或产地的影响较大, 通常采用相同来源和产地的产品以保证微胶囊品质的一致性。作为囊核基质, 海藻酸钠分子量将对微囊中细胞的生长、生产状态产生重要影响, 但目前尚未见海藻酸钠分子量对微囊化细胞影响的文献报道。

2.2 琼脂

琼脂是另一种来自海藻的、热致性天然多糖, 42°C 以上熔化为液态, 冷却后成为凝胶。它具有一些优于海藻酸钠的特点: (1)质量更好控制; (2)在体内更稳定; (3)已长期用于细胞培养研究, 生物相容性更好。但其缺点是缺乏长期的免疫隔离性。Tun 等^[11]开发了一种多层修饰的琼脂微囊, 它由琼脂与聚苯乙烯磺酸(简称 PSSa)的混合基质组成囊核, 其外包覆由聚凝胶(简称 PB)与羧甲基纤维素(简称 CMC)组成的囊膜。添加 PSSa 是为了通过与补体蛋白反应来抑制补体活性, 以减轻或消除微囊移植位点周围的炎性反应和纤维化反应。与仅由琼脂组成的微囊相比, 将这种包封大鼠胰岛的修饰微囊移植到小鼠腹腔中, 可显著延长微囊的寿命, 增进微囊化细胞的功能表达。

2.3 聚赖氨酸和壳聚糖

聚赖氨酸是合成阳离子聚合物, 在以海藻酸钠为基质的微胶囊研究中, 几乎都采用它制备囊膜。但是, 聚赖氨酸价格十分昂贵(300~400\$/g), 极大程度限制了它在细胞微囊化和组织工程领域中的实际应用。因此, 寻找一种新的替代材料具有重要的理论和现实意义。

壳聚糖(Chitosan, 简称 CS)是源于甲壳素的(1-4)-2-氨基-2-脱氧-*b-D*-葡聚糖, 侧链含大量伯氨基, 能与海藻酸钠等阴离子聚电解质反应成膜, 可作为聚赖氨酸的替代物。马小军等^[12-14]通过材料筛选改性, 获得了用于细胞微囊化的、具有自主知识产权的壳聚糖产品, 具有高脱乙酰度(>95%)、水溶性、全生理条件下与海藻酸钠成膜的特点。采用壳聚糖/海藻酸钠微囊化技术, 开展了胰岛、肾上腺髓质嗜铬细胞、雪旺氏细胞等的微囊化培养与移植研究(图 1~4)。长期研究表明, 壳聚糖/海藻酸钠微囊化系统具有与聚赖氨酸/海藻酸钠系统相当的特性, 与聚赖氨酸相比, 其竞争优势更在于材料来源广泛、易于加工和价格低廉。

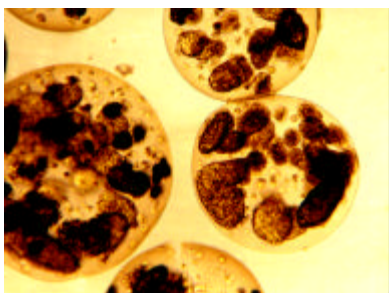


图 1 微囊化肝癌细胞, 培养 40d

Fig.1 Microencapsulated liver cancer cells, 40d cultivated

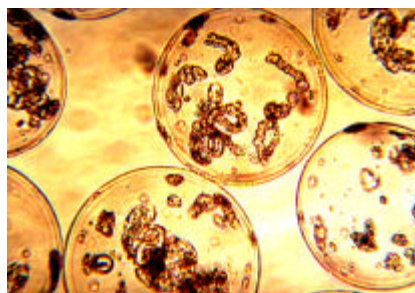


图 2 微囊化大鼠雪旺氏细胞, 培养 15d

Fig.2 Microencapsulated Schwann cells of rat, 15d cultivated

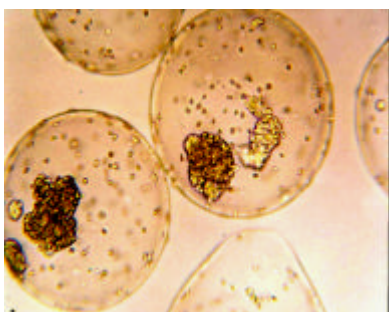


图 3 微囊化人胰岛, 培养 15d

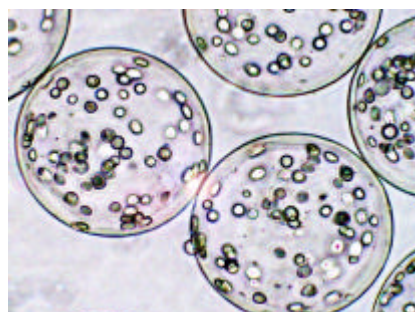
Fig.3 Microencapsulated pancreatic islet of human being
15d cultivated

图 4 微囊化小牛肾上腺嗜铬细胞, 培养 0d

Fig.4 Microencapsulated bovine adrenal chromaffin cells, 0d
cultivated

3 细胞微胶囊的制备方法

3.1 聚电解质络合

3.1.1 基于海藻酸钠、聚赖氨酸和壳聚糖 带相反电荷聚合物的反应是在活细胞周围形成膜屏障的最简单的方法。聚阴离子海藻酸钠与聚阳离子聚赖氨酸复合物已被广泛用于各种细胞表型的微囊化。近年来, 由于壳聚糖具有优良的生物相容性和生物可降解性, 尤其是价格优势, 海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠微胶囊(简称 ACA 微胶囊)包埋细胞的研究日益增多。最具代表性的 APA 或 ACA 微胶囊的制备工艺为: (1)将细胞与海藻酸钠的混悬液滴入 CaCl_2 溶液中, 形成海藻酸钙凝胶珠; (2)将凝胶珠置于 PII 或 CS 溶液中, 胶珠表面形成 Alg-PII 或 Alg-CS 复合膜; (3)囊膜形成后, 其表面存在净正电荷, 在移植过程中易引起宿主免疫细胞附着, 引发炎症反应和纤维化反应。故采用海藻酸钠溶液中和微囊膜表面过剩的正电荷, 改善其生物相容性; (4)将微囊置于柠檬酸钠溶液中, 使囊核恢复为液态。

3.1.2 基于琼脂 琼脂具有温敏溶解特性, 可用来包封哺乳动物细胞。在典型的制备步骤中, 通过挤压或乳化工艺, 可将琼脂/细胞混悬液转变成液滴, 再通过降低温度使之硬化。该工艺的缺点是微囊易形成细胞突起物, 但可以通过再次涂层而消除。通过制备较致密的胶珠(如, 将琼脂浓度从 5% 提高到 7.5%~10%)或在胶珠表面形成半透膜, 可以改进微囊化移植物在体内的寿命与功能表达。这种半透膜由带相反电荷的聚电解质组成^[11], 即由 PSSa、PB 和 CMC 组成。PSSa 的功能是阻止异源抗原暴露在宿主免疫系统中, 改进微胶囊强度并阻止代偿性活化。PB 的目的

在于防止 PSSa 从胶珠中泄漏。CMC 的目的在于改进体内生物相容性。

3.1.3 基于合成聚电解质 将合成聚电解质替代 APA 系统的研究是 Gharapetian 等^[15]首先报道的。所用合成聚合物包括阴离子丙烯酸/甲基丙烯酸、二甲基氨基乙基丙烯酸甲酯/二乙基氨基乙基丙烯酸酯、丙烯酸甲酯、聚乙烯醇等。微胶囊的基本制备工艺是将聚合物与细胞的混悬液挤压成液滴,并滴入带相反电荷聚合物的水溶液中。

合成聚合物制备载细胞微胶囊的主要问题是,某些聚合物可能有严重的细胞毒性。Hunkeler 等^[16]首次评价了合成聚合物(如丙烯酸酯及其衍生物)的细胞毒性,发现合成聚合物毒性较强,但其毒性依赖于分子量,而且当其凝聚后毒性还能降低,表明略有毒性的合成聚合物也能用于细胞微囊化。使用合成聚合物的重要挑战在于对移植细胞在体内存活性的明确表达。在体外研究中,虽然某些合成聚合物比 APA 微胶囊性能优越,但体内研究却远远滞后。尽管如此,合成聚合物在细胞微囊化中的初步研究仍是鼓舞人心的并将为聚合物工程开拓新的途径。

3.2 界面相转化

Sefton 等^[17]开发了一种界面沉淀工艺,可在非水溶性的、热塑性聚合物中包封哺乳动物细胞。微囊化过程为:将细胞悬液挤压形成液核,再用聚合物包被液核以形成液壳,抽提聚合物溶剂使液壳固化。由于采用了非水溶性聚合物,在微囊制备中存在有机溶剂对细胞的毒性问题。另一个问题是溶剂在微囊中的长期滞留。当微囊表面溶剂被抽提后,相转化导致固化微囊膜的形成,微囊内部的少量溶剂难以向外扩散,造成微囊内局部溶剂浓度较高。在聚合物溶剂中,早期采用的是相对无毒的 PEG-200。Morikawa 等^[18]建议采用碘帕醇(Iopamidol)作为细胞相容性溶剂,37%碘帕醇水溶液可溶解聚丙烯酸酯,使非水溶性聚合物在含水系统中包封哺乳动物细胞成为可能。

在界面相转化工艺中,羟乙基丙烯酸甲酯/甲基丙烯酸甲酯(质量比为 75:25)是具有最优亲水(即通透性)-疏水(即机械强度)平衡的候选聚合物。这种聚合物已成功用于各种细胞的微囊化。研究表明,这种微囊化系统可支持大鼠 PC-12 细胞移植用于多巴胺的给药。

3.3 共形包衣

共形包衣是细胞微囊化的一个特例,这是在小的细胞群或小组织块上直接形成免疫屏障的方法。这种方法通过囊膜包围细胞群而消除了微胶囊的死腔,能有效改善胶囊表面和细胞群之间的质量传递,这不仅对细胞存活很重要,而且对细胞产生的治疗性药物的快速传递也很重要。

Alg-PLL 共形包衣技术包括采用非连续梯度的海藻酸钠及交联剂(Ca^{2+} 或 Ba^{2+})对胰岛进行离心,亦可再增加 PLL 包衣步骤。与经典 APA 微囊化技术形成的膜厚度相似,共形包衣形成的微囊膜厚度约 $10\mu\text{m}$ 。共形包衣胰岛的胰岛素分泌动力学与游离胰岛相似,表明共形包衣胰岛的传质性能优良。在共形包衣技术的改进研究中,May 等^[19]使胰岛在离心过程中通过聚丙烯酸酯的 PEG-200 溶液,随后再通过水相,使聚合物在胰岛周围沉淀。Sawhney 等^[20]报道了一种在胰岛周围形成聚乙烯醇膜的共形包衣工艺。该工艺在水相中进行,通过吸附在细胞表面的光引发剂在胰岛表面引发聚合,并有 PEG-丙烯酸酯单体在共形膜中的自由基聚合反应的参与。所形成的共形膜是均相膜,厚度为 $10\sim 100\mu\text{m}$ 。对光引发剂的选择极其重要,它不仅应具有一定的细胞膜相关的疏水性,还不会过度吸附以干扰细胞膜的自身结构。目前,还没有对膜通透性详

细研究的报道, 但是包衣胰岛的刺激指数(即与对照条件相比, 胰岛在刺激条件下胰岛素的分泌比率)等价于游离胰岛的刺激指数, 表明较小的分子可通过 PEG 共形包衣膜自由传递。

4 展望

在细胞缺损性或基因缺陷性疾病(如糖尿病、帕金森氏病、侏儒症、肿瘤等)的治疗中, 微囊化细胞移植技术因具备良好的免疫隔离特性和功能替代作用而必将成为这类疾病安全、有效、价格适度的治疗新技术。随着基因及克隆技术, 特别是干细胞研究的发展, 移植用细胞来源的局限性也必将被克服。这就对细胞移植的免疫隔离和载体工具——微胶囊研究提出更新的挑战。所以, 今后还需在以下方面开展深入研究: (1)开发新型细胞微囊化材料; (2)改善微囊材料在体外培养和体内移植的生物相容性; (3)对微囊免疫隔离膜的通透性、降解性进行调控; (4)开发细胞微囊化的规模生产工艺, 使之适应临床应用的需要。

参考文献

- [1] T M S Chang. Research Report for Honours Physiology. Medical Library, McGill University, 1957.
- [2] F Lim, A M Sun. Science, 1980, 210: 908~909.
- [3] S S Maria-Engler, M Mares-Guia, M L C Correa et al. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2001,34(6):691~697.
- [4] 张阳德, 马 仁, 何剪太 等. 中华实验外科杂志, 2001,18(1): 47~49.
- [5] 薛毅琰, 王振福, 李新建 等. 解放军医学杂志, 1999, 24(4): 238~241.
- [6] 何立敏, 张 莉, 薛毅琰 等. 中华医学杂志(英)网络版, 2001, (11).
- [7] L Picariello, S Benvenuti, R Recenti et al. Journal of Surgical Research, 2001,96(1): 81~89.
- [8] 武林枫, 宋一民, 宋 纯 等. 中国急救医学, 2000, 20(6): 330~332.
- [9] H L Rebecca. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 33:87~109.
- [10] B Kulseng, G Skjåk-Bræk, L Ryan et al. Transplantation, 1999, 67: 978~984.
- [11] T Tun, K Inoue, H Hayashi et al. Cell Transplant, 1996, 5: S59~S63.
- [12] 李明春, 王 勇, 马小军. 化学通报(网络版),1999: W99060.
- [13] 王 勇, 何 洋, 马小军 等. 国际网上化学学报, 2000,2(6):02b051ne.
- [14] 刘 群, 薛伟明, 于炜婷 等. 高等学校化学学报, 2002, 23(7): 1417~1420.
- [15] H Gharapetian, N A Davies, A M Sun. Bioeng., 1986, 28: 1595~1600.
- [16] D Hunkeler, A Prokop, S DiMari et al. Polym. Sci., 1998, 136: 1~52.
- [17] M V Sefton, R M Dawson, R L Broughton et al. Biotechnol. Bioeng., 1987, 29: 1135~1143.
- [18] N Morikawa, H Iwata, S Matsuda et al. Journal of Biomater. Sci., 1997, 8: 575~586.
- [19] M H May, M V Sefton. Ann. NY Acad. Sci., 1999, 875: 126~134.
- [20] A S Sawhney, C P Pathak, J A Hubbell. Biotechnol. Bioeng., 1994, 44: 383~383.