

研究简报

用于肿瘤细胞三维培养的多孔玉米蛋白微载体制备

宋洁梁, 王国武, 王瑾晔*

(上海交通大学生物医学与工程学院, 上海 200240)

摘要:皮下荷瘤模型是常用的体内肿瘤模型,其构建需要高浓度的肿瘤细胞。使用了微载体的三维培养技术因能够提供更大的表面积,比传统的二维培养更容易富集大量细胞。本研究用多种方法制备了玉米蛋白多孔微载体,并选择孔结构符合要求的一种微载体用于肿瘤细胞的扩增富集,以提高皮下荷瘤模型的成瘤率。实验结果表明,细胞在微载体上有良好的贴壁能力,与用相同材料制备的无孔微载体相比,具有更高的细胞密度。该微载体有望应用于 3D 肿瘤模型的构建。

关键词:玉米蛋白; 多孔微载体; 肿瘤模型

引言

恶性肿瘤是全球第二大致死病因,2018 年全球新增 1809 万癌症病例,956 万人死于癌症^[1]。目前,二维细胞培养模型仍是最常用的抗肿瘤药物研发初筛模型,但是该模型缺乏三维组织中细胞之间以及细胞与基质之间的相互交流;另外,实体瘤内血管形态异常,血液流动不均匀,导致氧、营养物质和代谢产物等分布不均匀,这些差异使得二维细胞模型结果常与药物在体内的实际效果不一致^[1~8]。因此,药物的筛选仍依赖于动物肿瘤模型。其中皮下荷瘤模型具有成瘤时间和生长速度等实验条件相对容易控制、费用低廉的特点,目前应用最为广泛^[9, 10]。该方法需要较高的细胞浓度。如小鼠黑色素瘤细胞(B 16 细胞)植入密度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ^[11, 12]。如果接种细胞量过低,肿瘤细胞会被免疫系统清除,无法成瘤。利用微载体富集细胞,然后一起植入皮下,不仅可以达到 10^8 mL^{-1} 的高细胞密度^[13]。而且粘附于载体的细胞易于存活,因此有望提高成瘤率^[14]。微载体的形状、孔隙率和制备微载体所用材料的性能等因素都会影响细胞在微载体上贴壁、增殖和分化等细胞行为^[15]。对微载体材料本身的要求是细胞粘附性好,对微载体的结构也有要求,即尽可能大的表面积;要有开放的贯通性多孔结构,其孔径至少比细胞尺寸大,在满足力学强度的情况下,越大的孔更有利于物质交换以及细胞迁移。 $40 \sim 100 \mu\text{m}$ 孔径的微载体已被成功制备并用于装载细胞^[16, 17]。通常细胞尺寸为 $10 \sim 100 \mu\text{m}$,例如小鼠胚胎成纤维细胞(NIH 3T3)形态为成纤维细胞样,当细胞完全铺展开后,其长轴长度为 $30 \sim 50 \mu\text{m}$,短轴长度为 $8 \sim 15 \mu\text{m}$;B 16 细胞也是成纤维细胞样形态,完全铺展开后长轴长度为 $20 \sim 30 \mu\text{m}$,短轴长度为 $7 \sim 15 \mu\text{m}$ 。Sung 等^[16]分别制备了孔径为 $13.1 \pm 7.3 \mu\text{m}$ 和 $35.8 \pm 12.5 \mu\text{m}$ 的微载体,细胞在微载体上贴壁 1 天后将其切片染色,在荧光显微镜中观察到大孔结构微载体内部有多细胞。为了确保细胞能长入微载体内部并保持一定的机械强度,制备表面孔径为 $50 \mu\text{m}$ 且内部孔结构相互贯通的微载体是本研究的目的之一。

玉米醇溶蛋白是玉米中的主要贮藏蛋白,其来源广泛,价格低廉,已被证明具有良好的生物相容性和生物降解性,已被研究用于骨组织修复和神经修复等组织工程领域^[18]。然而,目前仅有 Li 等^[19]报道过

10.14028/j.cnki.1003-3726.2019.09.004

收稿:2019-04-25;修回:2019-06-18;

基金项目:科技部国际合作计划项目(2015DFG32730),上海市科学技术委员会(13JC1403400, 15540723900),上海市教育委员会(高峰学科,ZXGF082101);

作者简介:宋洁梁(1993—),男,学士学位,主要从事生物材料研究;王国武,1987,男,博士学位,主要从事生物材料研究;

* 通讯联系人:王瑾晔,女,教授,主要从事生物材料研究。E-mail: jinyewang@sjtu.edu.cn

玉米蛋白微球作为微载体用于细胞培养,其结果表明,玉米蛋白微载体具有不劣于商业化产品 Cytodex 1 的细胞增殖能力。根据 Shiragami 等建立的模型,微载体表面剪切应力与微载体的粒径和结构有关,大的粒径和多孔结构都能减小剪切应力,从而增加细胞存活率^[20]。为了得到粒径分布在 450~550 μm ,表面孔径为 50 μm 左右,且内部有贯通孔的微载体,本文采用不同方法制备了玉米蛋白微载体,研究了 B 16 细胞在微载体上的贴壁和增殖能力,并与用 Li 的方法制备的无孔玉米蛋白微载体进行了对比。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米醇溶蛋白:吴江市八坼药用辅料厂(江苏,中国),符合《中华人民共和国药典》2015 版规定的质量指标;氯化钠:AR,国药集团化学试剂有限公司(上海,中国);RPMI 1640 培养基干粉:Gibco(美国);青霉素 G 钠盐、硫酸链霉素:梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(上海,中国);胰酶:吉泰科技有限公司(上海,中国);小牛血清:上海远慕生物科技有限公司(上海,中国);小鼠黑色素瘤(B 16)细胞株:中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海,中国);二乙酸荧光素(FDA),上海翊圣生物科技有限公司(上海,中国);碘化丙啶(PI),上海翊圣生物科技有限公司(上海,中国);其它试剂购买自国药集团化学试剂有限公司(上海,中国)。

1.2 多孔微载体的制备

1.2.1 球形微载体 用不同浓度无机盐或有机酸溶液配制 90%酒精溶液,再使用该溶液配制 10mL 400g/L 玉米蛋白溶液,加到液体石蜡中用搅拌器(IKA, OST20 D,德国)搅拌。用无水乙醚洗涤后,过滤微载体,最后用蒸馏水清洗微载体并用筛网过滤,收集微载体,冷冻干燥后,放于干燥皿保存备用。

1.2.2 多孔颗粒微载体 参考 Qu 的方法^[21]制备玉米蛋白三维多孔支架,用多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司,Q-100A2,中国)将支架粉碎后,筛选 450~550 μm 粒径的颗粒作为多孔颗粒微载体。

1.3 灭菌方法对多孔微载体表面形貌的影响

为了评估不同灭菌方式对细胞贴壁能力的影响,分别对 1.2.2 制备的多孔微载体在灭菌锅(TOMY KOGYO CO. LTD.,HVE-50,日本)内进行湿热灭菌处理,或在电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司,DHG-9070A,中国)内 160℃干热灭菌 3h。

1.4 多孔微载体的表征

用倒置荧光显微镜(OLYMPU,IX71,日本)进行粒径统计分析。使用组织切片刀将微载体剖开,在倒置荧光显微镜下观察微载体内部孔的分布。将微载体固定于导电胶上,用真空镀膜仪(LEICA,SCD 050,德国)喷金 120s,在扫描电子显微镜(SEM, HITACHI, S-3400,日本)下观察微载体的表面和剖面形貌。

1.5 微载体上的细胞贴壁率

B 16 细胞培养于 37℃,5% CO₂ 浓度的二氧化碳培养箱(NUAIRE 公司,NU-4750E,美国)中,在 RPMI 1640 培养基中添加 0.08g/L 青霉素、0.08g/L 链霉素和 10%新生牛血清。当细胞融合度达到 80%左右时,使用 0.25%胰酶进行消化传代。

对照组为无孔微球,尺寸为 132±15 μm ,参考 Li 的方法制备^[19]。为了便于区分,以下用 Li 的方法制备的微载体被称为微球。实验组分别为未处理的多孔颗粒微载体、湿热灭菌多孔颗粒微载体、干热灭菌多孔颗粒微载体。

玉米蛋白颗粒微载体和微球用量为 10mg/mL,每孔加 0.2mL 细胞悬液,细胞悬液浓度为 5×10⁵ 细胞/mL。在培养箱中培养 4h 后,收集细胞悬液,在计数板上计数,细胞数为 N_悬;然后将微球吸走,每孔加 0.2mL 0.25%的胰酶溶液消化 6min,将细胞从孔板中吹下,收集计数,细胞数为 N_板,细胞贴壁率按以下公式计算:

$$\text{贴壁率}(\%) = 1 - \frac{N_{\text{悬}} + N_{\text{板}}}{1 \times 10^5} \times 100\%$$

1.6 微载体上的细胞增殖

细胞种板步骤同 1.5,培养第 4 天时,将微载体转移到新的 96 孔板中继续培养,每天更换培养液。
每天从各组中取微球或颗粒微载体(n=4),转移至另一块干净的 96 孔板中,将未贴在微球和颗粒微载体上的细胞洗掉,然后每孔加 0.2mL 用培养基稀释 10 倍的 cck 8 试剂,放于培养箱中孵育 4h 后,取 0.1mL 用酶标仪检测吸光度,检测波长为 450nm。

1.7 细胞存活率分析

使用二甲基亚砜配制 5mg/mL FDA 母液,去离子水配制 1mg/mL PI 母液,-20℃ 保存备用。染色前,将上述 FDA 母液和 PI 母液按 1 : 5(v : v)的比例混合后,使用 PBS 稀释 1000 倍,配制成 FDA/PI 染色液。
将微载体从 96 孔板转移至无细胞的板中,使用 0.2mL FDA/PI 染色液染色 5min,用 PBS 润洗 3 遍,荧光显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 微载体的表征

氯化钠致孔微载体如图 1 所示,粒径分布均匀,尺寸为 $486\pm30\mu\text{m}$ 。在荧光显微镜下可以观察到微载体剖面有阴影部分分布(见图 1B),SEM 照片显示,微载体表面存在小孔结构,其孔径范围为 $20\sim30\mu\text{m}$,微载体内部的孔多为小孔,孔径小于等于 $25\mu\text{m}$,而大孔数量很少且分布不均匀,其孔径为 $50\sim70\mu\text{m}$ 之间,且不是贯通孔(见图 1D)。有关微载体的成孔机制还有待进一步研究。

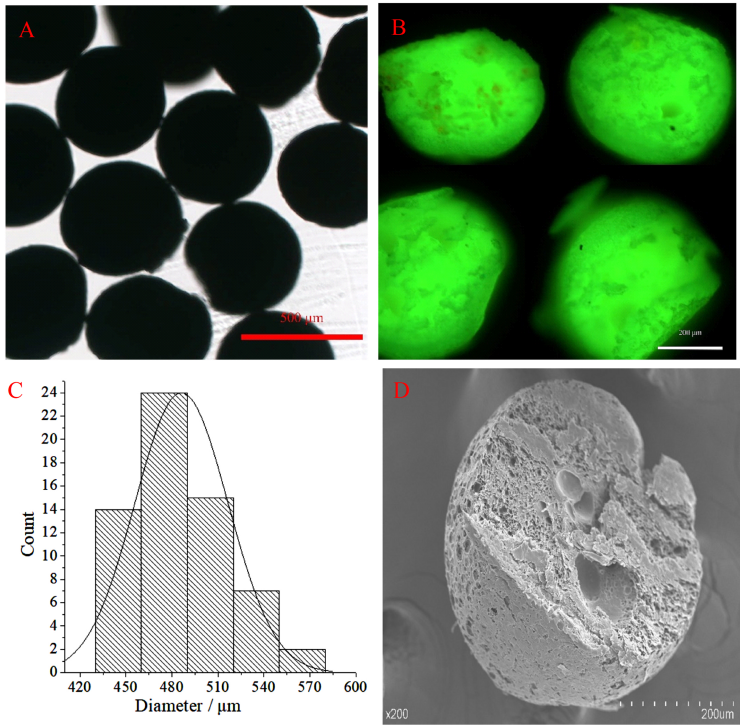


图 1 氯化钠致孔微载体照片

(A)微载体光镜照片;(B)微载体荧光照片;(C)微载体粒径统计;(D)微载体 SEM 照片

Figure 1 Photos of sodium chloride-induced microcarriers

(A) Microscope photos of microcarriers; (B) fluorescence microscope photos of microcarriers;
(C) particle size statistics of microcarriers; (D) SEM photos of microcarriers

图 2 为磷酸盐致孔微载体, 粒径分布均匀, 尺寸为 $478 \pm 38 \mu\text{m}$, 其剖面阴影部分尺寸为 $10 \sim 70 \mu\text{m}$ 。在扫描电镜下观察用该条件制备的微载体, 表面均匀分布小孔, 孔径 $8 \sim 40 \mu\text{m}$, 有 $5 \mu\text{m}$ 的小孔向内贯通。微载体内部有更密集的孔, 尺寸比表面的孔小, 为 $2 \sim 10 \mu\text{m}$ 之间。

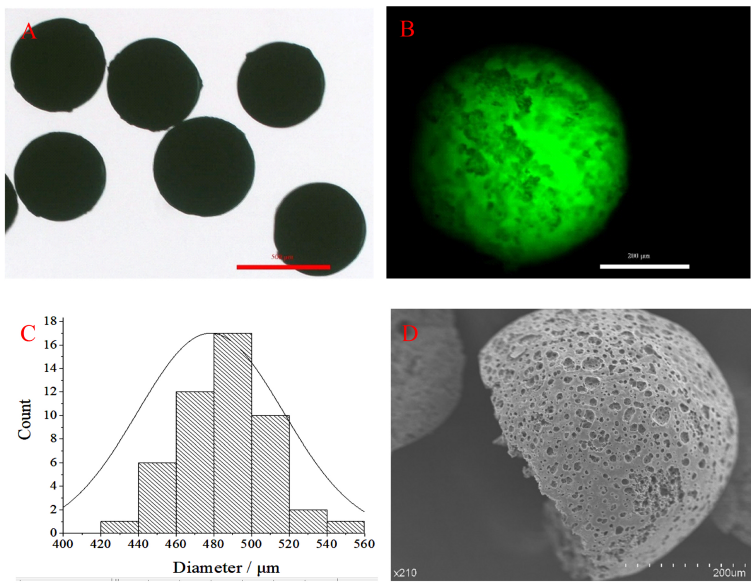


图 2 PBS 致孔微载体照片
(A)微载体光镜照片;(B)微载体荧光照片;(C)微载体粒径统计;(D)微载体 SEM 照片

Figure 2 Photos of PBS-induced microcarriers
(A) Microscope photos of microcarriers; (B) fluorescence microscope photos of microcarriers;
(C) particle size statistics of microcarriers; (D) SEM photos of microcarriers

为了制备出更大的孔, 又选择了在乙醇中溶解度高的柠檬酸作为致孔剂。柠檬酸致孔微载体如图 3 所示, 粒径分布均匀, 尺寸为 $483 \pm 26 \mu\text{m}$ 。SEM 照片显示, 微载体内部有大孔且分布较均匀, 孔径 $30 \sim 60 \mu\text{m}$, 孔与孔之间有几微米到几十微米的贯通结构(见图 3D)。微载体表面光滑无孔。

图 4 显示用碳酸氢铵致孔法制备的微载体具有多孔结构, 孔与孔之间相互贯通, 孔的尺寸分布在 $50 \sim 200 \mu\text{m}$ 之间。SEM 观察到的剖面与荧光照片一致, 证明微载体内部多孔结构的存在, 但未能观察到微载体表面的孔结构(见图 4C)。

根据 Qu 等^[21]报道的方法先制备支架, 该支架内部有 $50 \mu\text{m}$ 左右的孔, 并具有贯通的孔结构。利用粉碎机将该支架粉碎, 筛选合适尺寸颗粒作为微载体用于后续实验。玉米蛋白多孔颗粒微载体的荧光照片如图 5 所示, 呈不规则颗粒状, 表面显示不光滑的多孔结构, 在大孔内还观察到 $10 \mu\text{m}$ 左右的小孔, 且相互贯通。

对比以上五种微载体, 用氯化钠和磷酸盐作为致孔剂得到的微载体孔径太小, 孔分布不均匀, 不能满足作为细胞载体的要求; 而用柠檬酸和碳酸氢铵作为致孔剂得到的微载体内部有孔但部分孔径太大, 而且微载体表面无孔, 细胞无法长到载体内部的孔中, 内部的多孔结构未能提供给细胞更大的表面积; 不规则形状的多孔颗粒微载体表面多孔, 孔径大于 $50 \mu\text{m}$, 且内部有小孔呈贯通结构, 符合最初设计要求, 因此后续细胞实验仅使用该多孔微载体作为实验材料。

2.2 不同灭菌方法对多孔微载体表面形貌的影响

在对玉米蛋白微载体湿热灭菌时, 要经过高温高压处理。湿热灭菌时的水作为一种塑化剂, 有可能导致玉米蛋白塑化^[22], 进而影响到微载体表面形貌和细胞的贴壁能力。因此, 本文还评估了不同灭菌方法对玉米蛋白微载体的表面形貌以及细胞贴壁能力的影响。未处理的微载体的扫描电镜照片如图 6A

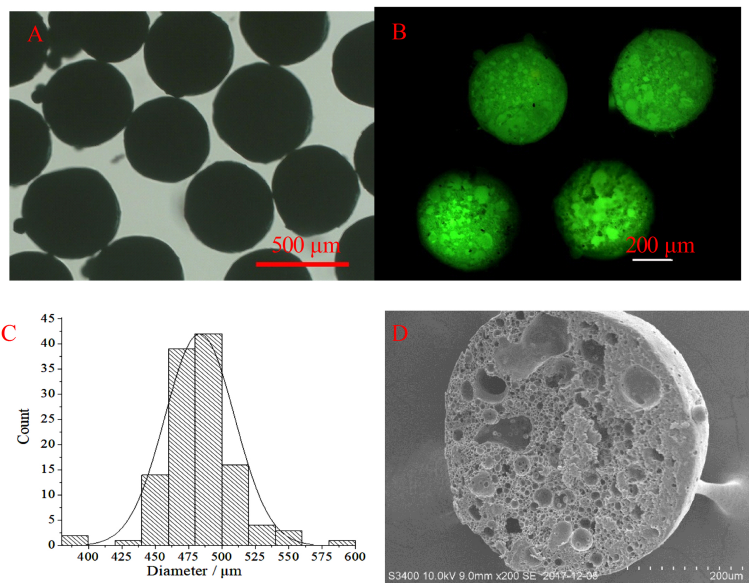


图 3 柠檬酸-PBS 致孔微载体照片

(A)微载体光镜照片;(B)微载体荧光照片;(C)微载体粒径统计;(D)微载体 SEM 照片

Figure 3 Photos of citric acid-PBS-induced microspheres

(A) Microscope photos of microcarriers; (B) fluorescence microscope photos of microcarriers;
(C) particle size statistics of microcarriers; (D) SEM photos of microcarriers

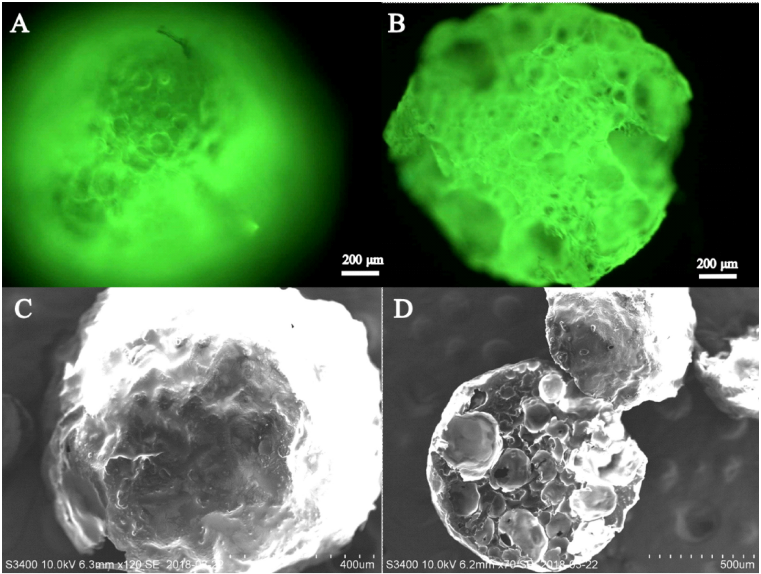


图 4 $\text{NH}_4^+ \cdot \text{HCO}_3^-$ 致孔微载体照片

(A) 微载体表面荧光照片;(B) 微载体剖面荧光照片;(C) 微载体表面 SEM 照片;(D) 微载体剖面 SEM 照片

Figure 4 Photograph of the microcarriers of ammonium bicarbonate

(A) Fluorescence microscope photos of the surface of microcarriers; (B) fluorescence microscope photos of the cross section of microcarriers; (C) SEM photos of the surface of microcarriers; (D) SEM photos of the cross section of microcarriers

所示,相比未处理组,干热灭菌和湿热灭菌后的微载体表面与未处理组相比并无显著差异(见图 6)。

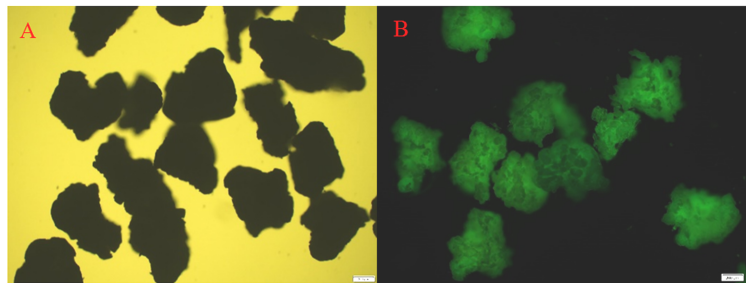


图 5 多孔颗粒微载体照片
(A)微载体光镜照片;(B)微载体荧光照片

Figure 5 Porous particle microcarrier photo
(A) Microscope photos of microcarriers; (B) fluorescence microscope photos of microcarriers

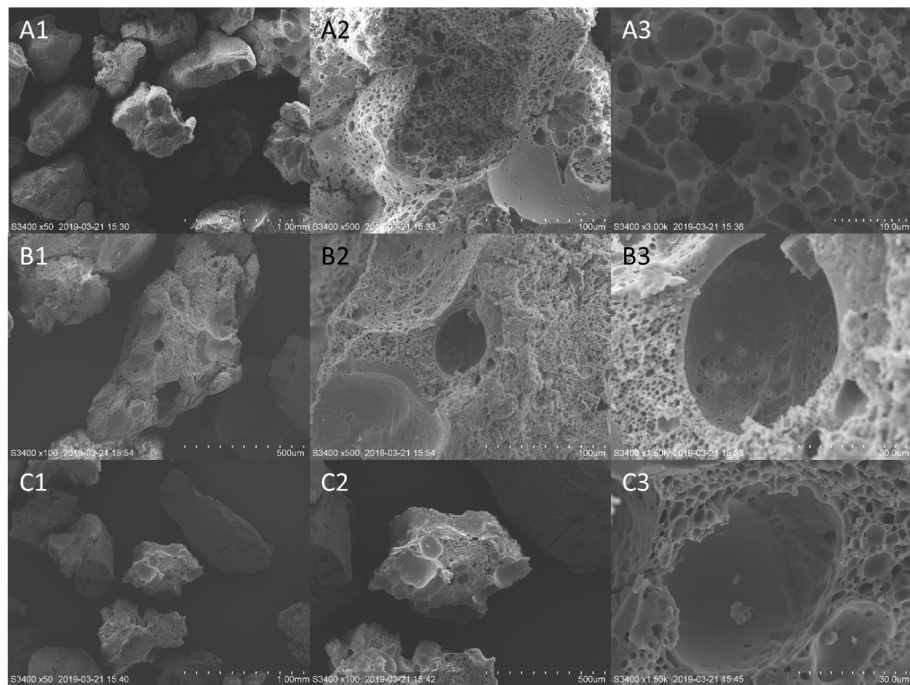


图 6 不同灭菌方式处理的玉米蛋白颗粒微载体
(A)未处理;(B)干热灭菌;(C)湿热灭菌

Figure 6 Zein microcarriers treated by different sterilization methods
(A) Untreated microcarriers; (B) microcarriers treated by hot air sterilization;
(C) microcarriers treated by autoclaved sterilization

2.3 微载体上的细胞贴壁率

细胞在微载体上的贴壁结果如图 7 所示,其中未处理组的贴壁率最低,仅有 $48.17 \pm 2.02\%$ ($n=4$),干热灭菌组和微球组的贴壁率较高,分别为 $61.17 \pm 10.78\%$ 和 $61.17 \pm 7.29\%$,而湿热灭菌组的贴壁率在两者之间,为 $52.8 \pm 1.16\%$,仅未处理组与湿热灭菌组之间存在显著性差异。由于未经过灭菌处理的微载体观察到微生物污染,所以导致其贴壁率比湿热灭菌组低。

2.4 微载体上的细胞增殖

细胞贴壁 3 天后,细胞密度达到最高值(见图 8),同时微载体上的部分细胞迁移至孔板中,该部分细胞同样也在增殖。由于培养基中的营养物质已无法维持细胞增殖,因此在第 4 天时,将微球和颗粒再次

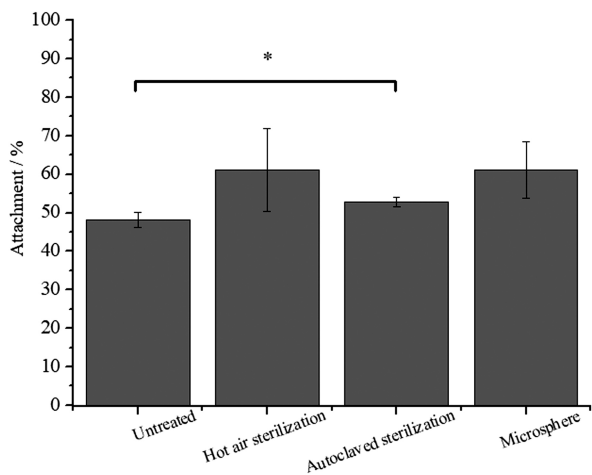


图 7 细胞在不同灭菌处理后的微载体和微球上的贴壁率, * 表示 $p < 0.05 (n = 4)$
Figure 7 The attachment of cells on microcarriers prepared by different sterilization treatments and microsphere, * means $p < 0.05 (n = 4)$

转移到新的孔板中,细胞在微球上又重新开始增殖,到第 6 和第 7 天时细胞密度再次达到最高值。经显著性分析发现,第 3 天时,干热灭菌多孔颗粒微载体上的细胞密度是无孔微载体的 1.7 倍,而不同灭菌方法对 B 16 细胞在微载体上的增殖并没有显著影响^[19]。

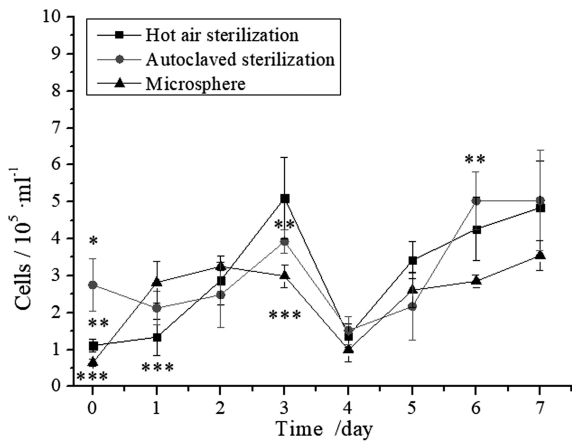


图 8 细胞增殖曲线
* 表示干热灭菌组与湿热灭菌组之间 $p < 0.05$; ** 表示湿热灭菌组与微球组之间 $p < 0.05$;
*** 表示干热灭菌与微球组之间 $p < 0.05 (n = 4)$

Figure 8 Cell proliferation curve
* means $p < 0.05$ compared with hot air sterilization group and autoclaved sterilization group,
** means $p < 0.05$ compared with autoclaved sterilization group and microsphere group,
*** means $p < 0.05$ compared with hot air sterilization group and microsphere group($n = 4$)

2.5 细胞存活率分析

从图 9 中可以观察到,微载体上大部分细胞都是活细胞,而且随着细胞培养时间增加,细胞密度也开始增加,这与用 cck8 法得到的细胞增殖结果一致。

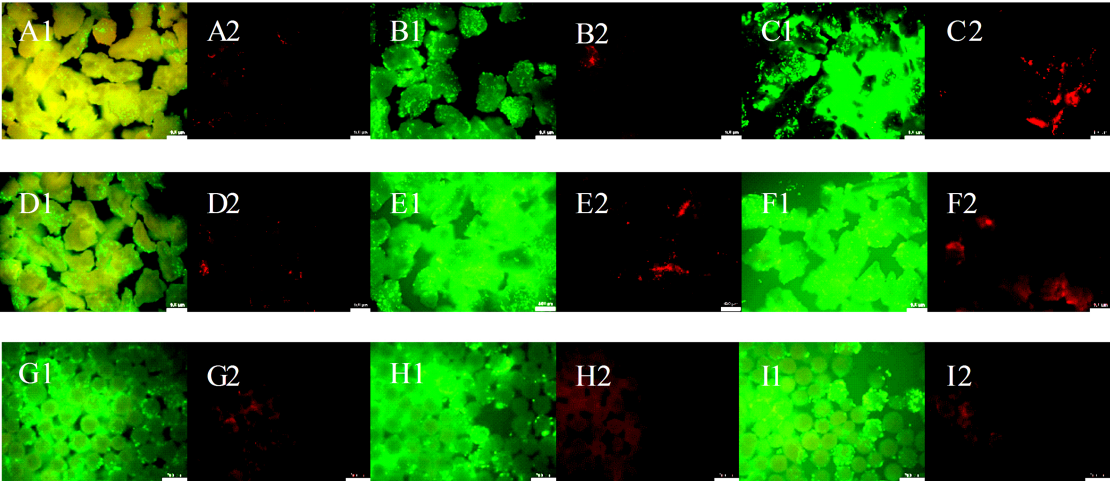


图 9 干热灭菌组细胞存活率分析,绿色为活细胞,红色为死细胞,A、0 天;B、3 天;C、6 天;
湿热灭菌组细胞存活率分析,D、0 天;E、3 天;F、6 天;微球组细胞存活率分析,G、0 天;H、3 天;I、6 天
Figure 9 Hot air sterilization group dead and live cell staining, A, 0 days; B, 3 day; C, 6 day;
autoclaved sterilization group dead and live cell staining, D, 0 day; E, 3 day; F, 6 day; microsphere group,
dead cells, G, 0 day; H, 3 day; I, 6 day

3 结 论

本文使用多种方法制备了玉米蛋白微载体,通过表面和剖面的荧光显微镜观察以及 SEM 表征确定了多孔微载体的制备条件。细胞的增殖实验结果证明,不同的灭菌方法不会显著影响细胞的贴壁率和增殖能力,本研究制备的玉米蛋白多孔微载体比用 Li 等的方法制备的玉米蛋白无孔微球具有更优的细胞增殖能力,细胞密度是其 1.7 倍。

参考文献:

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A.CA: A Cancer J Clinicians,2018,68(6):394~424.
[2] Nath S, Devi G R.Pharmacology And Therapeutics,2016,163:94~108.
[3] Drife J O.Annals of the New York Academy of Sciences,1986,464(1):58~65.
[4] Pampaloni F, Reynaud E G, Stelzer E H K.Nature Reviews Molecular Cell Biology,2007,8(10):839~845.
[5] Fukumura D, Jain R K.Microvascul Res,2007,74(2/3):72~84.
[6] Krishna Priya S, Nagare R, Sneha V, Sidhanth C, Bindhya S, Manasa P, Ganesan T.Int J Cancer,2016,139(4):729~735.
[7] Brown J M.Cancer Res,1999,59(23):5863~5870.
[8] Vukovic V, Tannock I. Br J Cancer,1997,75(8):1167.
[9] Hoffman-Goetz L. Med Sci Sports Exercise,2003,35(11):1828~1833.
[10] 王力伟, 张丽云, 王忠敏.介入放射学杂志,2015,24(07):645~649.
[11] Calvani M, Bruno G, Dal Monte M, Nassini R, Fontani F, Casini A, Cavallini L, Becatti M, Bianchini F, De Logu F.Br J Pharmacol,2019, (Accepted manuscript online; 15 March 2019).
[12] He M, Huang L, Hou X, Zhong C, Bachir Z A, Lan M, Chen R, Gao F.Int J Pharm,2019,560:1~10.
[13] Tharmalingam T, Sunley K, Spearman M, Butler M. Molecular Biotechnol,2011,49(3):263~276.
[14] Kang S W, Bae Y H.Biomaterials,2009,30(25):4227~4232.
[15] Neto M D, Oliveira M B, Mano J F.Trends Biotechnol,2019, (Available online 19 March 2019).
[16] Choi S W, Yeh Y C, Zhang Y, Sung H W, Xia Y.Small,2010,6(14):1492~1498.
[17] Jin G Z, Park J H, Seo S J, Kim H W.Biotechnol Lett,2014,36(7):1539~1548.
[18] Wang G W, Yang H, Wu W F, Zhang P, Wang J Y.Biomaterials,2017,131:145~159.

- [19] Weiying L, Yilong H, Hui Y, Guowu W, Run L, Jin-Ye W. Mater Sci Eng: C, 2016, 58:863~869.
- [20] Shiragami N, Honda H, Unno H. Bioprocess Eng, 1993, 8(5/6):295~299.
- [21] Qu Z H, Wang H J, Tang T T, Zhang X L, Wang J Y, Dai K R. Acta Biomater, 2008, 4(5):1360~1368.
- [22] Gillgren T, Barker S A, Belton P S, Georget D M, Stading M. Biomacromolecules, 2009, 10(5):1135~1139.

Preparation of Porous Zein Microcarriers for Three-dimensional Culture of Tumor Cells

SONG Jie-liang, WANG Guo-wu, WANG Jin-ye*

(School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Transplanted tumor model is a commonly used in vivo tumor model. However, it requires a high concentration of tumor cells. Considerable cells are easier to be collected by using three-dimensional (3D) culture technology than traditional two-dimensional culture technique. In this study, zein porous microcarriers were prepared for expanding tumor cells to construct a reliable tumor model. The experimental results show that the cells have good adhesion ability on the microcarriers, and the porous microcarriers have higher cell density than the nonporous microcarriers prepared from the same material. The microcarriers can apply in the construction of transplanted tumor models.

Key words: Zein; Porous microcarriers; Tumor model