

可视化微囊化细胞共培养分离体系的建立

吴昊^{1,2} 马颖^{1,2} 单爽¹ 谭明乾^{1*} 马小军^{1*}

(¹中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023; ²中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 细胞微囊化共培养在细胞诱导分化、细胞增殖调节和提高细胞代谢物产量方面是一种很有价值的技术。两种微囊化细胞的可视识别和分离在共培养过程中有重要作用。作为磁性介质, 顺磁四氧化三铁纳米粒(Fe_3O_4 nanoparticles, Fe_3O_4 NPs)可用于实现对微囊的磁场驱动分离。该研究通过微胶囊膜内装载亲水四氧化三铁纳米粒(water soluble Fe_3O_4 nanoparticles, W- Fe_3O_4 NPs), 同时使用荧光壳聚糖成膜, 制备荧光可视顺磁性海藻酸-壳聚糖(alginate-chitosan, AC)微胶囊, 用于中国仓鼠卵巢上皮细胞系(Chinese hamster ovary cell, CHO)细胞培养。结果表明, 共培养细胞可以经荧光信号加以识别并利用磁场驱动加以分离。所构建的荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊在细胞微囊化共培养方面展现出较好的应用潜力。

关键词 细胞微囊化; 细胞共培养; 磁性驱动分离; 荧光辨识

Establishment of Visible Microencapsulated Cell Co-culture Separation System

Wu Hao^{1,2}, Ma Ying^{1,2}, Shan Shuang¹, Tan Mingqian^{1*}, Ma Xiaojun^{1*}

(¹Laboratory of Biomedical Material Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Cell microencapsulation co-culture has been proved to be a valuable technology in the fields of cell induced differentiation, cell proliferation regulation and improving the production of metabolites. Visible identification and separation of two kinds of microencapsulated cells play an important role in cell co-culture. Fe_3O_4 nanoparticles (Fe_3O_4 NPs) as a kind of paramagnetic material can be used for microencapsulated cell separation. In this study, microencapsulated cell co-culture system, fluorescent visible paramagnetic microcapsules were developed by doping water soluble Fe_3O_4 NPs into alginate acid-fluorescent chitosan microcapsules (AC microcapsules) membrane for co-culture of Chinese hamster ovary cell (CHO). The results showed that two kinds of cell culture microcapsules could be identified by fluorescence signal and separated by magnetic driving in the process of cell co-culture. The fluorescent visible paramagnetic microcapsules system shows a great potential for cell co-culture.

Key words microencapsulation; cell co-culture; magnetic driving separation; fluorescence identification

Holtfreter^[1]于1947年首次实现了胚胎干细胞聚集培养。目前, 细胞类组织三维培养开始广泛应用于细胞研究的各个领域^[2], 已建立了多种共培养模式用于细胞的体外三维培养、细胞诱导分化、细胞

收稿日期: 2012-12-19 接受日期: 2013-01-31

国家自然科学基金(批准号: 91227126)和中国科学院大连化学物理所“百人计划”支持的课题

*通讯作者。Tel: 0411-84379139, Fax: 0411-84379096, E-mail: mqtan@dicp.ac.cn; E-mail: maxj@dicp.ac.cn

Received: December 19, 2012 Accepted: January 31, 2013

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (Grant No.91227126) and the Dalian Institute of Chemical Physics (DICP)-100-talents Program Foundation of Chinese Academy of Sciences

*Corresponding authors. Tel: +86-411-84379139, Fax: +86-411-84379096, E-mail: mqtan@dicp.ac.cn; E-mail: maxj@dicp.ac.cn

网络出版时间: 2013-04-22 15:05 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130422.1505.006.html>

增殖调节和提高细胞代谢产物产量^[3-7]。而细胞微胶囊化技术是其中有代表性的培养方式之一,具有其独特优势^[8-9]。细胞微囊化技术利用具有半透膜性质的微囊膜对细胞进行包埋、借助囊内高分子骨架形成的三维空间使细胞保持生长的优势。微囊化细胞以类组织的三维立体方式生长,生长模式与功能均接近在体细胞与组织,目前在体外细胞类组织培养中已得到广泛应用,并可以实现不同细胞的共培养^[10-11]。

现有以膜支撑结构为代表的二维细胞共培养模型和以微囊结构为代表的三维细胞共培养模型^[11-12],都难以实现对共培养的细胞实现可视化鉴别和分离,因而不能对细胞间相互作用及细胞生长微环境等因素进行精确调控与分析。基于以上原因,本研究在磁性微囊制备技术基础上^[13],将可视化荧光性壳聚糖(fluorescent chitosan, F-CS)[而非接枝外源荧光物质的壳聚糖衍生物^[14-15]、亲水性顺磁四氧化三铁纳米粒(water soluble Fe_3O_4 nanoparticles, W- Fe_3O_4 NPs)]与海藻酸-壳聚糖(alginate-chitosan, AC)细胞微囊化技术相结合,建立可视化磁场驱动微囊化细胞共培养分离体系,以实现细胞微囊化共培养体系的可视化鉴别和磁驱动分离,为两种细胞三维培养提供了可视化培养平台和分离手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及培养基 中国仓鼠卵巢上皮细胞系(Chinese hamster ovary cell, CHO)由同济大学生命科学与技术学院费俭教授惠赠。基础培养基为DMEM培养液(Sigma公司)添加10%的新生牛血清(北京三利生物制品厂)、100 U/mL的青霉素、100 U/mL的链霉素。

1.1.2 主要试剂 壳聚糖(chitosan, CS, 分子量为25.5 kDa, 脱乙酰度90%, 实验室自制); 可视化荧光性壳聚糖(fluorescent chitosan, F-CS, 分子量为5 kDa, 脱乙酰度90%, 浙江金壳生物化学有限公司); 海藻酸钠(alginate, Alg, 100 cP, 青岛晶岩生物科技开发有限公司); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (天津光复科技发展有限公司, 分析纯); 还原铁粉(天津大茂化学试剂厂, 分析纯); CCK8染液(Dojindo公司)。月桂胺、正己烷、油酸、环己烷、叔丁醇、 K_2CO_3 、 KMnO_4 、 NaIO_4 、丙酮、氯化钠、柠檬酸钠等均为分析纯, 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 W- Fe_3O_4 NPs的制备 按照文献[16]称取2.3 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.25 g铁粉溶于15 g月桂胺、30 mL正己烷与7 mL油酸组成的混合溶剂中, 混合均匀后投入高压釜180 °C反应24 h。反应完成后, 将产物冷却至室温, 乙醇清洗除去杂质, 制得 Fe_3O_4 NPs。称取0.24 g Fe_3O_4 NPs溶于由25 mL环己烷、17.5 mL叔丁醇和15 mL 5% K_2CO_3 水溶液所组成的混合溶液中, 搅拌20 min, 加入10 mL Lemieux-von Rudloff试剂(0.09% KMnO_4 、2.25% NaIO_4 水溶液), 磁力搅拌, 水浴40 °C反应48 h。所得产物加入丙酮超声分散, 离心收集沉淀, 真空干燥, 制备W- Fe_3O_4 NPs。

1.2.2 CHO细胞培养 CHO细胞使用DMEM培养液在体积分数为5%的 CO_2 细胞培养箱中进行常规培养。

1.2.3 材料对细胞生长影响的检测 96孔板接种CHO细胞, 细胞贴壁后更换加入了相应浓度材料的培养基培养。培养48 h后, 使用CCK8染液染色4 h, 酶标仪450 nm波长检测, 630 nm参比。

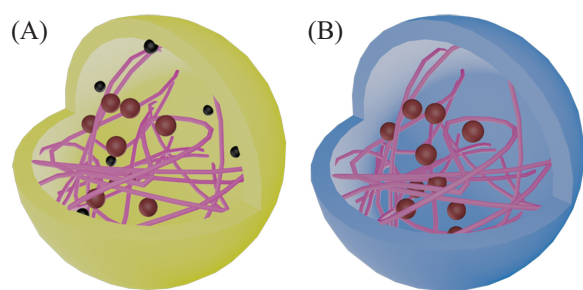
1.2.4 CHO细胞微囊化 称取1.5 g Alg, 溶于100 mL生理盐水中, 搅拌1 h, 0.22 μm 滤膜过滤, 制备Alg溶液。称取1 g CS或者F-CS, 溶于200 mL醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 搅拌1 h, 用2 mol/L氢氧化钠调节溶液pH至6.0, 溶液过0.22 μm 滤膜, 制备CS或F-CS溶液, 经0.22 μm 无菌滤膜过滤处理灭菌备用。称取10 mg经高压灭菌后的W- Fe_3O_4 NPs与5 mL Alg溶液充分混合, 将CHO细胞用PBS清洗, 以 $10^6/\text{mL}$ 的密度混入Alg溶液, 利用微囊静电液滴发生器喷入1.1% CaCl_2 溶液, 经F-CS溶液成膜, 柠檬酸钠溶液液化, 制备荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊(图1A)。对照组的CHO细胞微胶囊制备过程相近, 不同处在于Alg溶液不混入W- Fe_3O_4 NPs, 由CS溶液成膜(图1B)。荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊粒径控制在1 000~1 100 μm 之间, 对照组CHO细胞微胶囊粒径控制在250~300 μm 之间, 便于微囊镜下的直观分辨及与荧光显微成像结果对照。

1.2.5 微囊化细胞共培养 将荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊1 mL与对照组的CHO细胞微胶囊1 mL掺混, 加入10 mL的DMEM培养基, 在5% CO_2 、37 °C条件下共培养24 h(图2A)。

1.2.6 共培养微囊化细胞的分离 非接触式分离: 将1 mL共培养微囊化细胞用PBS清洗, 在微囊自由

沉降过程中施加钕铁硼强磁铁磁场作用, 荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊向强磁铁一侧聚集, 而对照组的CHO细胞微胶囊则不发生定向聚集, 从而实现了两种微胶囊共培养水平的分离(图2B)。接触式分离: 将PBS清洗后的共培养微囊化细胞, 置于洁净表面皿中, 在体式显微镜下, 借助磁性微镊牵引荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊, 实现与对照组CHO细胞微胶囊的微观水平分离(图2C)。

1.2.7 微胶囊荧光识别 微囊化细胞经PBS清洗, 在成像条件为蓝光激发、曝光时间=2 s、gain=2.4荧光显微镜下成像, 相同视野下拍摄明场照片为对照。

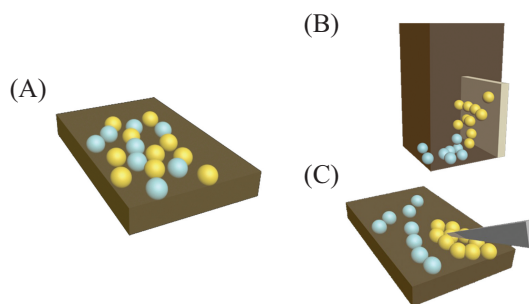


A: 荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊, 黄色外壳为F-CS膜, 粉色线条为Alg骨架, 红色颗粒为CHO细胞, 黑色颗粒为W-Fe₃O₄ NPs; B: 对照组的CHO细胞微胶囊, 蓝色外壳为CS膜。

A: fluorescent visible paramagnetic microencapsulated CHO cells, yellow shell shows F-CS membrane, pink lines show Alg skeleton, red balls show CHO cell, black balls show W-Fe₃O₄ NPs; B: control microcapsules loading CHO cell, blue shell was CS membrane.

图1 微囊化CHO细胞结构示意图

Fig.1 Structure scheme of microencapsulated CHO cells



A: 共培养微囊化细胞; B: 非接触式分离; C: 接触式分离。黄色球体为荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊, 蓝色球体显示对照组的CHO细胞微胶囊。

A: co-culture of microencapsulated cells; B: non-contacting separation; C: contacting separation. Blue balls show control microencapsulated CHO cell, yellow balls were fluorescent visible paramagnetic microencapsulated CHO cells.

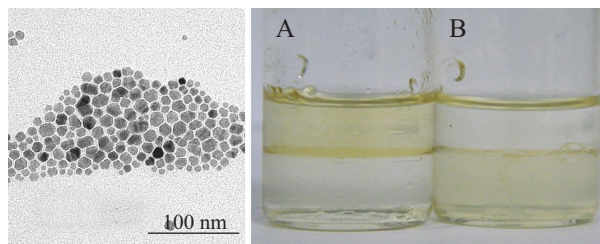
图2 两种磁驱动微囊化细胞分离方法示意图

Fig.2 Two ways of magnetic drive separation of microcapsules loading cells

2 结果

2.1 W-Fe₃O₄ NPs的TEM表征

顺磁Fe₃O₄纳米粒呈规则六边形, 粒径分布在20~50 nm之间, 粒径均一(图3左), 经氧化亲水修饰后可在水相中均匀分布(图3右), 在磁场作用下具备顺磁性性质, 能够由磁场进行定向驱动。



Fe₃O₄纳米粒TEM图像(左)和表面修饰前(A)后(B)的照片(右)。右图中上层为环己烷有机相, 下层为水相。

TEM image of Fe₃O₄ nanoparticles(left) and photograph of Fe₃O₄ NPs before(A) and after modified(B) with Lemieux-von Rudloff reagent.

图3 Fe₃O₄纳米粒的TEM图像和水溶性修饰照片

Fig.3 TEM image of Fe₃O₄ NPs and photograph of Fe₃O₄ NPs before and after surface modification

2.2 W-Fe₃O₄ NPs与F-CS对细胞活率的影响

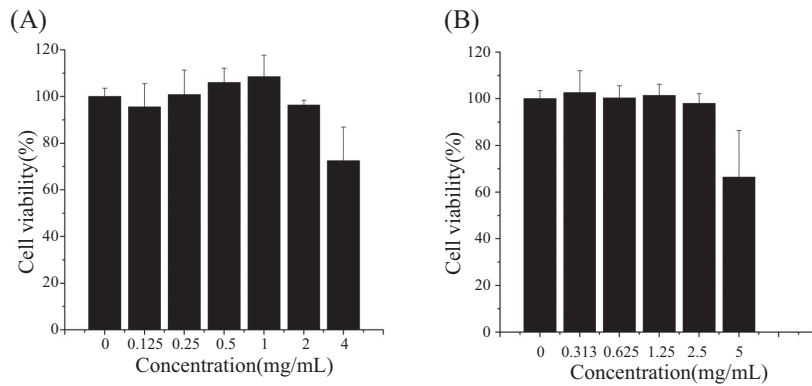
W-Fe₃O₄ NPs不同浓度培养48 h后对CHO细胞活率影响的结果(图4A)显示: W-Fe₃O₄ NPs浓度低于2 mg/mL时, 细胞活率均大于90%; 浓度为4 mg/mL时, 细胞活率在70%左右。F-CS不同浓度培养48 h后对CHO细胞活率影响的结果(图4B)显示: F-CS浓度低于2.5 mg/mL时, 细胞活率均大于95%; 浓度为5 mg/mL时, 细胞活率在65%左右。

2.3 微囊化CHO细胞形态表征

在显微镜下, 对照组CHO细胞微胶囊呈球形, 大小均一、直径在250~300 μm之间, 壁厚约5 μm, 微胶囊内所装载的CHO细胞分布均匀、生长状态良好、微胶囊囊壁完整(图5A)。荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊呈球形, 大小均一, 直径在1 000~1 100 μm之间, 壁厚约5 μm, 微胶囊内所装载的CHO细胞及顺磁Fe₃O₄纳米粒分布均匀, CHO细胞生长状态良好, 微胶囊囊壁完整(图5B)。

2.4 荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊磁驱动

荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊在自由沉降过程中, 会均匀分布于容器底部(图6A)。荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊在沉降过程中在强磁铁的磁

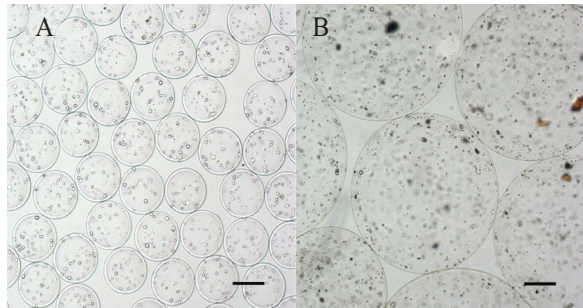


A: W-Fe₃O₄ NPs浓度对CHO细胞活率的影响; B: F-CS浓度对CHO细胞活率的影响。

A: effect of W-Fe₃O₄ NPs concentrations on CHO cell viability; B: effect of F-CS NPs concentrations on CHO cell viability.

图4 W-Fe₃O₄ NPs与F-CS浓度对细胞活率的影响(48 h)

Fig.4 Effect of W-Fe₃O₄ NPs and F-CS concentrations on cell viability(48 h)

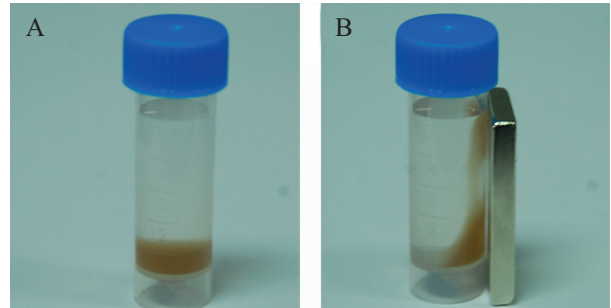


A: 对照组的CHO细胞微胶囊; B: 荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊。标尺=200 μm。

A: control microencapsulated CHO cells; B: fluorescent visible paramagnetic microencapsulated CHO cells. Bar=200 μm.

图5 微囊化CHO细胞

Fig.5 Image of microencapsulated CHO cells



A: 荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊自由沉降; B: 荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊磁力驱动沉降。

A: free sedimentation of microencapsulated CHO cells; B: magnetic force driving sedimentation of microencapsulated CHO cells.

图6 磁力驱动下CHO细胞微胶囊

Fig.6 Magnetic force driving microencapsulated CHO cells

力作用下,在磁铁放置一侧发生聚集(图6B)。

2.5 荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊荧光识别

荧光显微镜表征结果显示,在蓝光激发下荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊呈黄绿色荧光,每个微胶囊荧光分布均匀,荧光信号集中在微囊壁,通过黄绿色荧光能够显著显示出微囊的完整轮廓(图7A₂),可以实现荧光可视化,与同一视野白场微胶囊对应准确(图7A₁)。对照组CHO细胞微胶囊在相同蓝光激发条件下无荧光信号产生,无法通过荧光区分背景与微胶囊(图7B₁和图7B₂)。

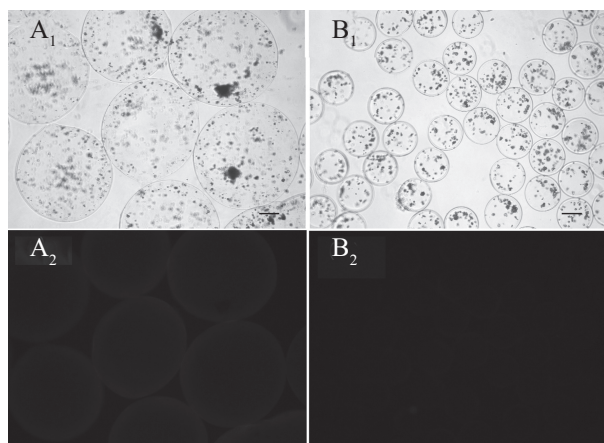
2.6 共培养微囊化细胞非接触式分离

微囊化细胞共培养24 h后,显微镜成像结果显示:荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊及对照组微胶囊形态完整,微胶囊内CHO细胞生长状态良好(图

8A₁)。荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊与对照组微胶囊通过所发荧光可进行准确区分,具有黄绿色荧光轮廓的微胶囊为荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊,无荧光轮廓的微胶囊为对照组微胶囊,与明场结果对比可区分两种微胶囊(图8A₂)。借助强磁铁驱动可将荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊与对照组微囊化CHO细胞微胶囊分离,所有具有荧光的微胶囊均被分离除去,明场结果也显示无粒径1 000~1 100 μm之间微胶囊存在(图8B₁和图8B₂)。

2.7 共培养微囊化细胞接触式分离

表面皿内共培养的微囊化细胞(图9A)在磁性手术镊通过时,在镊子的磁力驱动下,使荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊特异性地聚集在镊子周围(图9B),待聚集充分后,牵引荧光可视顺磁性CHO细胞

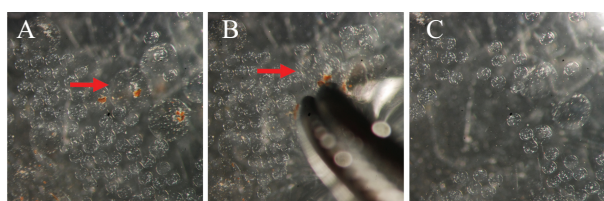


荧光可视顺磁性CHO细胞微囊明场成像(A₁)及其荧光成像照片(A₂), 对照组的CHO细胞微胶囊明场成像(B₁)及其荧光成像照片(B₂)。荧光成像条件: 蓝光激发、曝光时间=2 s、增益值=2.4。标尺=200 μm。
Bright field(A₁) and fluorescent images(A₂) of fluorescent visible paramagnetic microencapsulated CHO cells. Bright field(B₁) and fluorescent images(B₂) of control microencapsulated CHO cells. Fluorescence imaging condition: exposure time=2 s, gain=2.4. Bar=200 μm.

图7 微囊化细胞明场和荧光成像照片

Fig.7 Bright and fluorescence images of microencapsulated cells

微胶囊, 即可完成局部视野的共培养微囊化细胞的分离, 结果显示视野内无粒径1 000~1 100 μm之间微胶囊存在(图9C)。



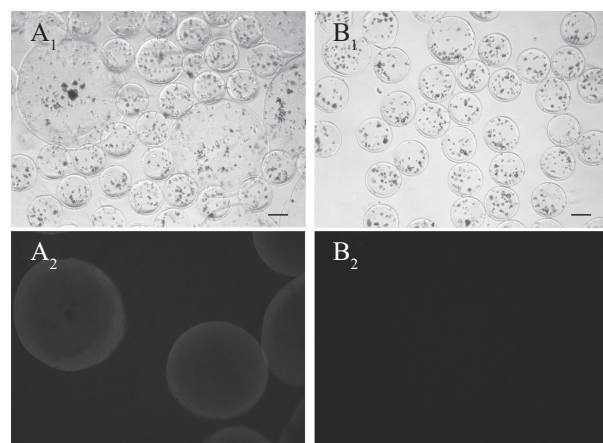
共培养微胶囊(A)、磁性镊分离荧光可视顺磁性CHO细胞微胶囊(B)及分离后的微胶囊(C)明场照片。
Bright field images of co-culture microcapsules(A), fluorescent visible paramagnetic microencapsulated CHO cells separated with magnetic forceps(B) and after separation(C).

图9 共培养微胶囊的接触式分离

Fig.9 Contacting separation of co-culture microcapsules

3 讨论

与二维平面细胞培养相比, 微囊化三维细胞培养的细胞, 会形成紧密连接和类组织化的结构, 并具有与在体细胞相近的特点^[17-18], 所以微胶囊是优良的细胞三维共培养平台^[11,19]。本次实验首次构建了荧光可视顺磁性微胶囊, 具备优良的支撑强度与物



分离前明场成像(A₁)和荧光成像照片(A₂); 分离后明场成像(B₁)和荧光成像照片(B₂)。荧光成像条件: 蓝光激发、曝光时间2 s、gain=2.4。标尺=200 μm。

Bright field(A₁) and fluorescent images(A₂) before separation. Bright field(B₁) and fluorescent images(B₂) after separation of fluorescent visible paramagnetic microencapsulated CHO cells. Fluorescence imaging condition: exposure time=2 s, gain=2.4, bar=200 μm.

图8 共培养微胶囊的非接触式分离

Fig.8 Non-contacting separation co-culture microcapsules

质通透性, 用以细胞的装载与三维培养。荧光可视顺磁性微胶囊与对照组微胶囊结合, 构建了全新的微囊共培养体系。

体系中加入的W-Fe₃O₄ NPs在微囊内浓度为1 mg/mL, 此浓度下对CHO细胞活率的影响不显著。体系中加入的F-CS作为微囊膜材料不与细胞直接接触, 在海藻酸钠的静电作用下只有极少量溶解作用于细胞, 而在2.5 mg/mL浓度下F-CS对CHO细胞活率的影响不显著。因而荧光可视顺磁性微胶囊引入的两种材料不会对培养细胞的细胞生长产生显著影响, 与对照组相比, 其对细胞的代谢产物和代谢途径产生影响有待进一步的深入研究。

目前, 细胞三维共培养体系都难以实现对共培养细胞的有效分离^[11]。而本文中的荧光可视顺磁性微胶囊具备磁场驱动的特点, 能够以接触式与非接触式两种方式对共培养微囊化细胞进行有效分离。为进一步研究细胞间的相互影响, 自由调控细胞共培养时间提供可能。

共培养细胞分离后, 分离效率难以确定, 荧光可视顺磁性微胶囊可以有效解决这一问题, 通过荧光信号能够进行高效的微胶囊筛选, 从而确认共培养细胞的分离情况。本次实验使用F-CS形成微胶囊

膜, 避免了使用接枝荧光物质的壳聚糖对细胞生长和膜强度造成的影响, 为细胞培养安全性与培养过程中微胶囊的完整性提供了保障。

荧光可视顺磁性微胶囊同时具备磁场分离和荧光识别的能力, 与对照组的微胶囊可以组合构成细胞三维共培养体系。与单独使用对照组微胶囊进行细胞三维共培养相比, 这一体系不仅可以实现对共培养细胞的自由分离结合, 还能够对分离结合效果通过荧光识别进行准确判断, 在微胶囊进行细胞三维培养的基础上拓展细胞共培养、细胞分离和细胞荧光识别的功能, 使微胶囊具备了细胞三维共培养的功能。因而这一细胞共培养体系是一种新颖的可视化微囊化细胞共培养分离体系, 为细胞三维共培养提供了全新的研究平台。借助这一平台技术, 可以对细胞诱导分化、细胞增殖调节和提高细胞代谢产物产量、细胞微环境影响因素分析、细胞间营养物质传递、细胞代谢等方面进行更深入的研究。

参考文献 (References)

- Holtfreter J. Observations on the migration, aggregation and phagocytosis of embryonic cells. *J Morphol* 1947; 80(1): 25-55.
- Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007; 130(4): 601-10.
- Chang TT, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Engineering Part A* 2009; 15(3): 559-67.
- Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioengineer* 2003; 83(2): 173-80.
- Lee J, Cuddihy MJ, Cater GM, Kotov NA. Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds. *Biomaterials* 2009; 30(27): 4687-94.
- Elkayam T, Amitay-Shaprut S, Dvir-Ginzberg M, Harel T, Cohen S. Enhancing the drug metabolism activities of C3A-A human hepatocyte cell line—by tissue engineering within alginate scaffolds. *Tissue Engineering* 2006; 12(5): 1357-68.
- Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, *et al.* Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J Hepatol* 2001; 34(1): 68-77.
- Zhang Z, Wei W, Jun L, Yu WT, Ma XJ. Gene expression and growth features of microencapsulated multicellular tumor spheroid. *Tumor* 2006; 26(1): 3-6.
- Wang Q, Li SY, Xie YB, Yu WT, Xiong Y, Ma XJ, *et al.* Cytoskeletal reorganization and repolarization of hepatocarcinoma cells in APA microcapsule to mimic native tumor characteristics. *Hepatol Res* 2006; 35(2): 96-103.
- Xiao J, Zhang Y, Yu W, Guo X, Wang W, Ma X. Influence of altered lipid metabolism in microencapsulated HepG2 cells on the mitochondrial function and protein synthesis. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 2010; 14(38): 7082-6.
- Sakai S, Inagaki H, Inamoto K, Taya M. Wrapping tissues with a pre-established cage-like layer composed of living cells. *Biomaterials* 2012; 33(28): 6721-7.
- Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T, Kumamoto H, Sasano H. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating *in vivo* environment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012; 131(3/4/5): 68-75.
- Liu X, Chen X, Li Y, Wang X, Peng X, Zhu W. Preparation of superparamagnetic Fe₃O₄@alginate/chitosan nanospheres for *Candida rugosa* lipase immobilization and utilization of layer-by-layer assembly to enhance the stability of immobilized lipase. *ACS Appl Mater Interfaces* 2012; 4(10): 5169-78.
- He G, He Z. To prepared fluorescent chitosan capsules by *in situ* polyelectrolyte coacervation on poly(methacrylic acid)-doped porous calcium carbonate microparticles. *Polymer Bulletin* 2012; 69(3): 263-71.
- 王家锐, 杨 飏, 阎 云, 黄建滨. 基于稀土金属离子配位超分子聚合物的荧光微囊. *物理化学学报* (Wang Jiarui, Yang Yang, Yan Yun, Huang Jianbin. Fluorescent microcapsules based on coordination supramolecular polymers of rare earth metal ions. *Acta Physico-Chimica Sinica*) 2012; 28(10): 2291-7.
- Si SF, Li CH, Wang X, Yu DP, Peng Q, Li YD. Magnetic monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles. *Crystal Growth & Design* 2005; 5(2): 391-3.
- Zhang H, Zhu SJ, Wang W, Wei YJ, Hu SS. Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function. *Gene Therapy* 2008; 15(1): 40-8.
- Lin J, Yu W, Liu X, Xie H, Wang W, Ma X. *In vitro* and *in vivo* characterization of alginate-chitosan-alginate artificial microcapsules for therapeutic oral delivery of live bacterial cells. *J Biosci Bioeng* 2008; 105(6): 660-5.
- Zhang Y, Wang W, Xie Y, Yu W, Lü G, Guo X, *et al.* Optimization of microencapsulated recombinant CHO cell growth, endostatin production, and stability of microcapsule *in vivo*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 84B(1): 79-88.