

细胞微囊化免疫隔离技术在移植医学中的应用

刘红云 张才乔*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要 作为一种十分有效的免疫隔离技术, 细胞微囊化可排除细胞移植中出现的宿主与移植物之间的双向排斥作用, 从而使能分泌生物活性物质的细胞在移植后得以存活。目前报道的多种微囊材料中, 以海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠的应用最为广泛, 可通过提高其生物相容性来减弱免疫排斥反应。细胞微囊化在医学治疗上正在发挥越来越大的作用, 特别是基因修饰细胞日益成为研究的焦点。尽管该技术尚需改进, 但它在异体和异种组织或细胞移植等方面有着广阔的应用前景。

关键词 免疫隔离; 细胞移植; 微囊化

许多研究表明移植具有分泌功能的细胞可治疗很多疾病, 但免疫排斥和同种移植物来源稀少限制了细胞移植治疗的发展。发展异种移植物和基因工程细胞有望提供大量的功能细胞作为移植物。但这同样存在严重的免疫排斥反应, 因此, 克服免疫排斥反应是细胞移植治疗的关键问题。作为免疫隔离屏障的微囊为克服细胞移植治疗疾病研究中的免疫排斥反应和移植物来源稀少问题提供了新的途径。1964年, Chang^[1]首次提出微囊可应用于细胞移植, 防止免疫排斥反应。时至今日, 细胞微囊化技术已经日趋成熟。作为一种十分有效的免疫隔离技术, 细胞微囊化可应用于许多能分泌生物活性物质并发挥功能的细胞移植、小分子的酶及其他活性物质的包裹等, 同时微囊技术还可望在细胞培养及药物缓释等一系列生物医学问题方面发挥重要作用。近年来, 这一技术逐步被许多异体或异种移植所采用, 应用研究主要集中在胸腺上皮细胞、胰岛、多巴胺分泌细胞、肝细胞、甲状旁腺细胞、甲状腺细胞、垂体细胞及基因工程细胞等方面, 并取得了不同程度的进展^[2-4]。

1 细胞微囊化原理

免疫隔离是微囊技术的核心。采用无毒的高分子聚合物制成具有半透膜功能的小球囊, 将待移植细胞包裹于此球囊内。囊内细胞可以透过此微囊膜获得营养, 所分泌的生物活性物质也可通过微囊排出, 同时具有免疫活性的大分子物质如免疫细胞、

免疫球蛋白等不能通过此膜, 因而起到免疫屏障作用。将这种人工细胞移植到宿主体内, 可防止宿主免疫系统攻击而长期存活。因此, 要应用此技术, 待包裹移植的细胞必须具备以下条件: ①能分泌生物活性物质和或处理生物活性物质以发挥功能; ②此种生物活性物质的分子量必须远比免疫球蛋白小, 能通过半透膜。而细胞微囊化也须满足以下条件: (1)包裹过程温和、快速, 不损伤细胞, 尽可能在生理条件下制备; (2)包裹材料无细胞毒性, 具有良好的生物相容性; (3)移植细胞被完全包入微囊内, 不突出于微囊表面; (4)微囊大小均一, 直径适中, 利于细胞吸收氧气和营养物质; (5)囊壁光滑坚实, 具有足够的机械强度; (6)微囊的膜能为细胞提供充分的免疫保护作用, 同时还具有良好的生物相容性。

2 微囊材料和微囊制备

微囊材料的主要作用是为移植物提供免疫保护环境, 因而膜材料化学成分将直接影响微囊的生物相容性和物理稳定性。膜材料主要有藻酸盐、多聚赖氨酸、琼脂糖、脱乙酰己丁质、聚丙烯胺及羟甲基纤维素钠等。目前以海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(alginate-polylysine-alginate, APA)微囊技术发展最为成熟。APA具有较低的细胞毒性和较好的细

收稿日期: 2004-01-14 接受日期: 2004-03-03

国家自然科学基金资助项目 (No.30371051)

*通讯作者: Tel/Fax: 0571-86971976, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn

胞黏附性,长期的稳定性和较高的生物相容性等优点。海藻酸是存在于褐藻中以1,4键连接的聚醛酸,其主要成分是甘露糖醛酸和古罗糖醛酸,海藻酸钙呈凝胶状态,经螯合剂处理去钙后溶解恢复至溶液状态。与聚赖氨酸(PLL)反应后的海藻酸钙凝胶不能被螯合剂去钙而保持凝胶状态。根据这一原理,将细胞与海藻酸溶液混合,经过微囊发生器滴入CaCl₂溶液中形成凝胶微球,然后加PLL处理微球表面,再用柠檬酸去除微球中的钙离子,这样微球内的海藻酸成液态,细胞悬于其中,由于微球表面的PLL和海藻酸反应形成一层不溶性的膜,细胞被包在微球中,即制成微囊化细胞。最近,Zimmermann等^[5]和Yoshioka等^[6]报道,藻酸盐微球在接触外部的BaCl₂/CaCl₂之前,向其内部注入BaCl₂晶体可得到均相交联的藻酸盐微囊。经过这种处理后的微囊稳定性提高,免疫保护作用增强。

目前APA微囊制备有两种方法:(1)气体喷雾制囊法。将细胞和海藻酸溶液混合后,置于注射容器中,在一定压力作用下,含细胞的混合液经连于容器的针头流出,同方向的气流将液滴吹落至CaCl₂溶液中而形成凝胶。调节气流的速度及针头的孔径可以控制微滴的直径。(2)静电微囊发生法。在静电微囊发生器中,一个电极连于针头处,另一个电极连接CaCl₂溶液中的导电环,两者之间形成静电场。混有细胞的海藻酸溶液置于针管装置内,针管内液体在压力作用下通过针头形成液滴,液滴落下过程中,改变电压、针头孔径及两电极距离(即电场距离)可以调节液滴的滴速和直径。与气体喷雾法相比较,静电微囊发生法制备的微囊直径小,而且大小相对均一。

鉴于APA微囊仍然存在膜脆性强,难处理,高成本以及PLL的免疫原性和细胞毒性等缺点,人们一直希望能够找到更好的替代物。最新的研究采用了可以提高微囊大小一致性及其稳定性,增加囊壁厚度的聚亚甲基二胍·氯化氢(poly(methylene-co-guanidine), PMCG)来代替PLL,Orive等^[7]证明,海藻酸钠-聚亚甲基二胍·氯化氢-海藻酸钠(alginate-PMCG-alginate, A-PMCG-A)微囊比目前最常用的APA微囊强度更高,同时可以提供给细胞更充分更妥当的微环境。

3 影响微囊性能的主要因素

微囊化细胞能否移植成功与微囊性能关系很

大,影响微囊性能的因素很多,现归纳如下:①膜的厚度。是微囊强度的主要决定因素,反应时间2~7 min内,膜的厚度随着海藻酸、PLL、CaCl₂的浓度增加而增厚;②材料的纯度。未纯化的海藻酸制备的微囊形态不规则,有尾状物和条带,表面粗糙,机械强度差,移植后易破裂,囊周细胞浸润增加,易和周围发生黏连;③海藻酸成分。古罗糖醛酸在海藻酸中比例高时黏度大,易于成囊,含量为40%~45%时微囊生物相容性较好,移植于免疫增强的动物体内可明显减轻免疫排斥反应;④多聚赖氨酸分子量。一般来说,分子量高的多聚赖氨酸制备的微囊孔径大。当分子量一定时,PLL浓度达到一定程度(0.01%)后,进一步增加浓度不再改变膜的通透性;⑤pH值。pH值为5.5时,制备的微囊强度最高;用不同种类和不同pH的缓冲液处理微囊发现,磷酸盐缓冲液处理的微囊机械强度最差,pH值为3的硼酸盐缓冲液相对较好,而pH值8~9的Trizma碱溶液处理后的微囊机械强度最好;⑥微囊的存在状态。包埋在液化藻酸盐-琼脂糖微囊中的杂交瘤细胞比生活在固化藻酸盐-琼脂糖微囊中的细胞生长形态更正常,产生的抗体更多,生命力更强。

4 细胞微囊化的应用研究

糖尿病、帕金森症、早老性痴呆、肝功能障碍、甲状腺功能减退和侏儒症等神经/内分泌系统疾病是部分组织细胞功能丧失引起的,对此类疾病目前尚无法实现相关的整体器官移植,只能期望通过细胞水平移植得以治疗。但是裸露的细胞移植入体内又将遇到强烈的机体免疫排斥反应。微囊则可以依靠膜的隔离保护性能和选择通透作用,保证生物活性物质扩散通过,抗体或免疫细胞被截留隔离,从而在生理上避免了个体的免疫排斥,成为解决细胞移植过程免疫排斥问题的理想手段,因而引起众多研究者的兴趣。

4.1 微囊化胰岛移植治疗糖尿病

微囊化胰岛移植能明显逆转糖尿病慢性高血糖状态,缓解糖尿病症状,使糖尿病模型动物较长时间无糖尿病状态存活,而不依赖外源胰岛素。未微囊化胰岛移植后存活时间明显低于微囊化胰岛,说明微囊具有免疫隔离作用,能抑制免疫排斥,延长移植细胞存活时间。但是移植细胞很容易被氧化而导致移植实验的失败。最近Luca等报道^[8]维生素D₃等

抗氧化剂可提高体外胰岛细胞活力, 证实胰岛细胞在移植前用抗氧化剂处理对延长其寿命非常有利。李崇辉等^[9]以微囊静电液滴发生器制作 APA 微囊化 BTC6-F7 细胞, 体外培养可保持常量释放胰岛素至少 80 天, 移植入糖尿病小鼠腹腔, 可纠正其高血糖状态至少 4 周。不过, 微囊化胰岛移植目前仍处于实验阶段, 主要原因是移植物免疫排斥反应和微囊异物反应所致的纤维组织过度生长, 这种纤维化将胰岛和周围环境隔离, 影响微囊半透膜的通透性, 导致胰岛难以摄取氧气和营养物质, 胰岛因缺氧而死。

4.2 微囊化肝细胞治疗肝脏疾病

微囊化肝细胞移植的发展为治疗急、慢性肝功能衰竭提供了一种可能的新疗法。微囊化肝细胞移植在肝衰动物实验上有良好的肝功能支持效果。同时, 微囊化肝细胞移植治疗某些遗传性肝脏代谢障碍疾病方面也取得了较大的进展。Yin 等^[10]最近以甲基化胶原为核, 被覆甲基丙烯酸甲酯(MMA)、甲基丙烯酸(MAA)、甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)三元聚合物制成微囊进行肝细胞培养, 发现微囊化肝细胞功能增强。同时他还发现, 该三元聚合物的分子量对微囊膜厚、血清蛋白的渗透及尿素合成和细胞色素 P450 的代谢功能等都无明显影响。张阳德等^[11]研究发现微囊化大鼠肝细胞腹腔移植后, 其存活率大大提高, 而且延迟了细胞免疫发生的时间。

4.3 治疗中枢神经系统疾病

到目前为止, 已有大量的动物实验表明中枢神经系统内移植微囊化细胞的可行性。Barberi 等^[12]将多能干细胞和核转移干细胞分别有选择的与神经干细胞、星形胶质细胞、少突神经胶质细胞或神经细胞联合培养, 在特定诱导条件下, 细胞可以向前、中、后脑和脊髓细胞定向分化。同时证明, 多能干细胞和核转移干细胞诱导产生的多巴能神经细胞对患有帕金森病的小鼠有治疗作用。实验表明^[13], 将能够分泌腺嘌呤核苷的微囊化细胞植入小鼠局部癫痫模型的脑室后, 由刺激所诱导癫痫的发作频率及程度明显减轻。另外, 由 Bachoud-Levi 等^[14]制定的利用可分泌睫状神经营养因子(CNTF)的微囊化细胞治疗 Huntington 病的临床适应症标准已于 2000 年发表。虽然人出生后不能再产生浦肯野神经细胞, 但 Weimann 等^[15]将微囊化骨髓细胞移植入脑后, 可促进中枢神经细胞的产生, 机制可能与浦肯野神经细胞源于骨髓细胞或骨髓细胞和浦肯野神经细胞受体

结合有关。

4.4 治疗甲状旁腺功能低下症

采用微囊化甲状旁腺细胞治疗甲状旁腺功能低下症已取得了一定的进展。用 APA 微囊包裹人的取自腺肿或增生腺体的甲状旁腺细胞, 体外培养可测得钙依赖的甲状旁腺激素分泌, 细胞增殖良好^[16]。这为采用功能性人工甲状旁腺细胞临床治疗甲状旁腺功能低下症迈出了重要一步。林乐岷等^[17]最近将新生猪的甲状旁腺细胞微囊化后移植入甲状旁腺功能低下的小鼠体内, 40 周后微囊化细胞生长良好, 小鼠症状减轻。

4.5 微囊化转基因修饰细胞

体细胞基因治疗是将正常基因转移到体细胞, 使之表达基因产物, 以达到治疗目的的一种方法。Uteza 等^[18]用基因工程技术把 18 kDa 人成纤维细胞生长因子-2(hFGF-2)导入 NIH 3T3 小鼠成纤维细胞中, 然后用生物相容性好的 AN69 多聚体制成微囊再移植给大鼠, 此转基因成纤维细胞在体内和体外都至少存活 90 天, 而且移植至 45 天和 90 天观察到感光细胞分别出现 2.08 mm² 和 0.95 mm² 的退行性变延缓区, 而各对照组在同一时间所测面积至多 0.08 mm²。Shingo 等^[19]采用微囊化转基因修饰细胞移植到纹状体治疗大鼠的帕金森病, 并取得了良好的治疗效果。潘月龙等^[20]最近报道, 微囊化转 mIL-12 基因 CHO 细胞皮下移植可以明显改善荷瘤小鼠的细胞免疫功能, 部分减轻化疗引起的免疫抑制作用, 对减慢肿瘤的生长速度和延长荷瘤小鼠的生存期均有明显的效果。这些研究初步显示了微囊技术在非自体体细胞基因治疗中具有的良好应用前景。

5 展望

尽管细胞微囊化移植目前尚存在很多问题, 与临床大规模应用还有一定的距离, 但其应用前景不容置疑。细胞微囊化移植急需解决的重要课题包括: 改进微囊制备技术、控制微囊质量和安全性; 了解细胞在微囊内的代谢活动; 尝试进行更多的实验和疾病治疗; 了解移植细胞在体内的存活状态及其膜材料在体内的归宿; 选择合适的移植方法和移植位点; 深入研究微囊化细胞的来源特别是转基因修饰细胞, 并扩大其应用范围; 降低移植物的免疫原性, 诱导受体对移植物的耐受性; 预防自身免疫疾病复发对移植物的损害, 探索新的免疫抑制剂等。作为一种有效的免疫隔离手段, 微囊技术将会

大规模的应用于临床治疗, 在更广阔的研究领域为人类造福。

参考文献 (References)

- [1] Chang TMS. *Science*, 1964, **146**: 524
- [2] Orive G *et al.* *Nat Med*, 2003, **9**: 104
- [3] Orive G *et al.* *Trends Biotechnol*, 2002, **20**: 382
- [4] Xu W *et al.* *FASEB J*, 2002, **16**: 213
- [5] Zimmermann H *et al.* *Biomaterials*, 2003, **24**: 2083
- [6] Yoshioka Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **305**: 353
- [7] Orive G *et al.* *Int J Pharm*, 2003, **259**: 57
- [8] Luca G *et al.* *Biomaterials*, 2003, **24**: 3101
- [9] 李崇辉等. *中国应用生理学杂志*, 2001, **17**: 93
- [10] Yin C *et al.* *Biomaterial*, 2003, **24**: 1771
- [11] 张阳德等. *中华器官移植杂志*, 2001, **22**: 161
- [12] Barberi T *et al.* *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 1200
- [13] Huber A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 7611
- [14] Bachoud-Levi AC *et al.* *Hum Gene Ther*, 2000, **11**: 1723
- [15] Weimann JM *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 2088
- [16] Picariello L *et al.* *J Sur Res*, 2001, **96**: 81
- [17] Lin L *et al.* *Chin Med J*, 2003, **116**: 1161
- [18] Uteza Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 3126
- [19] Shingo T *et al.* *J Neurosci Res*, 2002, **69**: 946
- [20] 潘月龙等. *中华医学杂志*, 2003, **83**: 51

Immunoisolation Technology by Cell Microencapsulation in Transplantation Medicine

Hong-Yun Liu, Cai-Qiao Zhang*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract As an effective immunoisolation technology, cell microencapsulation can overcome the dual repelling interactions between the host and donor cells to keep the transplanted cells excreting bioactive substances. Alginate-polylysine-alginate membrane is the most widely used microencapsulation material that can reduce immune repulsion by improving its biological compatibility. Cell microencapsulation, especially with the transgenic cells is playing more and more important role in medical treatments. Cell microencapsulation will have a promising future in various tissue and cell allograft or xenograft despite the needs of technology improvement.

Key words immunoisolation; cell transplantation; microencapsulation

Received: January 14, 2004 Accepted: March 3, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30371051)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971976, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn