

两种微载体培养鼠肝细胞对低温保存后的影响

杨 波* 庄灵霞 刘宝林 王 政 许 可

(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要 为了研究细胞培养方式对低温保存后细胞功能的影响, 将大鼠肝细胞接种至两种不同微载体(实体微载体Cytodex、多孔微载体Cytopore), 微重力高密度培养后于-80 °C冻存(冻存速率是1 °C/min, 5% DMSO+0.4 mol/L山梨糖醇)。2周后复温细胞与载体材料, 用显微镜观察细胞生长形态, 计算细胞活力情况, 并通过细胞代谢功能指标葡萄糖、白蛋白、尿素等的测定, 反映细胞在两种载体培养和低温保存后的生长和代谢情况。结果表明, 在细胞培养期间, Cytopore的MTT值、代谢指标值是Cytodex的1~1.5倍, 低温保存后, Cytopore的各项指标与低温保存前差异不显著, 而Cytodex的代谢指标差异显著。因此, 大鼠肝细胞在微载体Cytopore的高密度培养及低温保存比Cytodex更有利于细胞的生长和代谢。

关键词 大鼠肝细胞; Cytodex; Cytopore; 高密度培养; 低温保存

Influence of Two Culture Configuration on the Post-Cryopreservation of Rat Hepatocytes

Yang Bo*, Zhuang Lingxia, Liu Baolin, Wang Zheng, Xu Ke

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science & Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract In order to study the influence of cell culture configuration on cell function after cryopreservation, we propose to administer rat hepatocytes to two different microcarriers (entity microcarrier Cytodex, porous microcarrier Cytopore) and cryoperserved in -80 °C after being cultured in minute gravity and high density (cooling at 1 °C/min using 5% DMSO+0.4 mol/L sorbitol). After two weeks of cryopreservation, the cells and microcarrier materials were thawed. Through the cell metabolism index determination of glucose, albumin, urea and the observation of the cell growth and cell vitality to show the situation of the growth and metabolism cells cultured in two kinds of carriers. The result demonstrated that during the time of cell culture, the MTT value and metabolic index of Cytopore were about 1-1.5 times compared to Cytodex. Furthermore, there were no significant difference among the each indicators of Cytopore after cryopreservation, while the indicators of Cytodex were quite different. Hence, the cultivation of rat liver cells in carrier Cytopore with high density and cryoperserved is better for the growth, proliferation and metabolism of cells than that in the carrier Cytodex.

Keywords rat hepatocytes; Cytopore; Cytodex; cell culture techniques; cryopreserved

肝细胞是贴壁性细胞, 当细胞生长达到一定数量时, 存在细胞接触抑制效应, 阻碍细胞的继续生长^[1]。

因此, 体外高密度培养肝细胞需要使用载体材料, 其表面供肝细胞黏附生长, 是后续细胞增殖生长、进

收稿日期: 2017-02-20 接受日期: 2017-05-25

国家自然科学基金(批准号: 51076108)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-55271208, E-mail: yangbo6899@126.com

Received: February 20, 2017

Accepted: May 25, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.51076108)

*Corresponding author. Tel: +86-21-55271208, E-mail: yangbo6899@126.com

网络出版时间: 2017-07-24 11:50:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170724.1150.010.html>

而组织化的关键^[2-3]。目前, 应用较多的是美国GE公司实体微载体Cytodex与多孔微载体Cytopore等, 这些微载体可以提供足够大的表面积, 使细胞在其表面及内部黏附生长, 并使营养物质进入其空间。近年来, Cytodex与Cytopore系列载体常常应用于细胞的高密度培养, 取得了一些令人满意的结果^[4-7], 但载体细胞高密度培养后如何进行复合冻存目前研究较少, 传统研究较多的是细胞冻存^[8]。如何低温保存细胞与载体的复合体, 是我们解决的一个问题。

用传统低温保存法保存细胞载体复合体, 可能破坏细胞和载体的黏附关系。研究报道, 细胞与细胞及细胞与载体之间的互相接触对维持细胞的存活率至关重要, 细胞生存能力下降的主要原因是由于细胞被分离后无法黏附, 从而引起大量细胞凋亡^[9-10], 只有黏附于载体上的细胞才能继续增殖分化以及维持肝细胞正常的代谢功能。因此, 本文将培养于微载体Cytodex与Cytopore的肝细胞进行低温保存, 研究不同培养方式对复苏后细胞与复合体黏附关系的影响, 探讨肝细胞在微载体上的生长及肝细胞的代谢功能, 为研究细胞与微载体复合体的低温保存机理提供有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肝细胞购于中国科学院细胞库; Cytodex为实心小球微载体(球径133~215 μm , Pharmacia公司), Cytopore为大孔微载体(平均粒度235 μm , Pharmacia公司), 均购于上海国药集团化学试剂有限公司; Me_2SO (无菌)、胎牛血清、RPMI1640培养液购于上海索莱宝生物科技有限公司; 测定白蛋白、葡萄糖等试剂盒也购于上海索莱宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 微载体Cytodex和Cytopore大鼠肝细胞的培养 (1)硅化培养板。(2)高温灭菌微载体Cytodex和Cytopore。(3)大鼠肝细胞的接种: 在超净台上, 将大鼠肝细胞接种于含Cytodex或Cytopore的6孔培养板中, 将培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和100%湿度的培养箱中。(4)大鼠肝细胞与载体的“相对”静止培养: 前6 h, 匀速轻柔水平摇晃1次, 每次摇晃时间均为1~2 min, 16 h停止摇晃, 置于培养箱中静止培养。培养24 h后换液, 以后根据培养液颜色和透亮度来更换培养液。

1.2.2 微载体Cytodex和Cytopore大鼠肝细胞的冻存和复温 (1)在无菌台上, 将6孔板中培养4 d或6 d的肝细胞微载体上清液先用移液枪吸弃, 然后把肝细胞微载体吸到低温保存管中。(2)将配制好的低温保存液(5% DMSO+0.4 mol/L山梨醇)加入到低温保存管中, 将低温保存管放入程控降温盒内, 再放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱内。低温保存2周。(3)从-80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中取出保存2周的低温保存管, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱内迅速复温, 整个时间控制在2 min, 注意不要剧烈摇晃。(4)用同样的方法单独低温保存Cytodex和Cytopore载体支架。

1.2.3 电镜的形态学观察 为了清晰反映Cytodex和Cytopore的3D结构, 本研究利用扫描电镜进行观察。第一步取材, 小心用镊子取0.5 cm^3 左右的支架样本, 放入样品管内。第二步喷金, 喷镀均匀后扫描电镜下观察。

1.2.4 细胞形态学观察 用倒置生物显微镜对培养细胞进行观察并拍照。

1.2.5 细胞MTT值的测定 分别在培养0、2、4、6、8、10 d时, 使用MTT试剂盒进行细胞MTT值测定。

1.2.6 白蛋白、葡萄糖和尿素的含量测定 以溴甲酚绿法、二乙酰-一脒显色法、葡萄糖氧化酶法的试剂盒在酶标仪分别测定白蛋白、尿素和葡萄糖的含量。

1.2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用Excel数据作单向方差分析。

2 结果

2.1 微载体浓度与细胞生长的关系

在细胞培养的第0、2、4、6、8 d, 计算所得各浓度Cytopore与Cytodex的细胞密度如图1。

由于微载体浓度过高, 对细胞的生长有不利的影响, 因此, 需要考虑Cytopore与Cytodex的浓度, 而多孔载体Cytopore的表面积为2.8 m^2/g , 远远大于其他的微载体。浓度不宜过大, 实验选取0.5~2 mg/mL 4个浓度。图2A结果发现, 1.0 mg/mL 浓度的微载体培养出的细胞密度值最大, 即细胞生物活性最大、生长增殖快, 所以本实验所用的Cytopore接种浓度为1.0 mg/mL 。Cytodex是实体载体, 比表面积小于Cytopore, 因此, 实验选取高于Cytopore的浓度, 故选用2.0~3.5 mg/mL 4个浓度, 由图1B可知, 3.0 mg/mL 的微载体细胞密度值最大, 故选用3.0 mg/mL 作为Cytodex的最佳接种浓度。

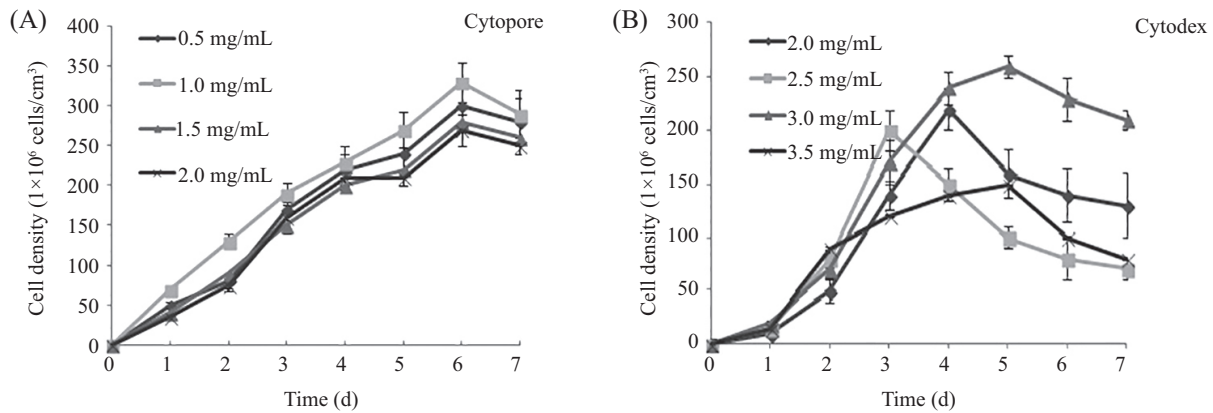
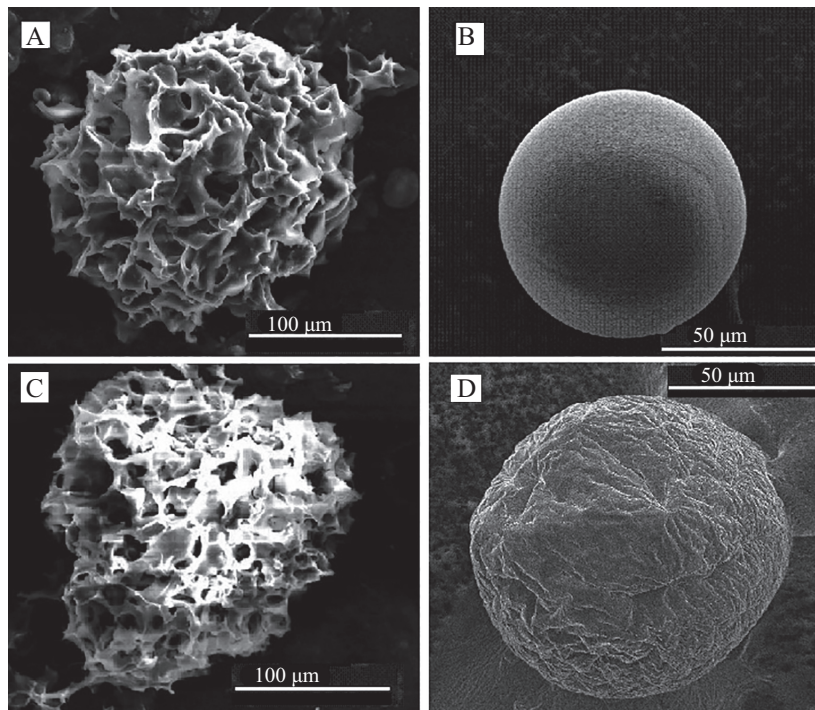


图1 Cytopore和Cytodex浓度与细胞的密度关系

Fig.1 The relationship between cell density and microcarrier concentration of Cytopore and Cytodex



A: Cytopore; B: Cytodex; C: 冻存后Cytopore; D: 冻存后Cytodex。

A: Cytopore; B: Cytodex; C: vitrified Cytopore; D: vitrified Cytodex.

图2 扫描电镜下的Cytopore和Cytodex

Fig.2 SEM images of microcarriers Cytopore and Cytodex

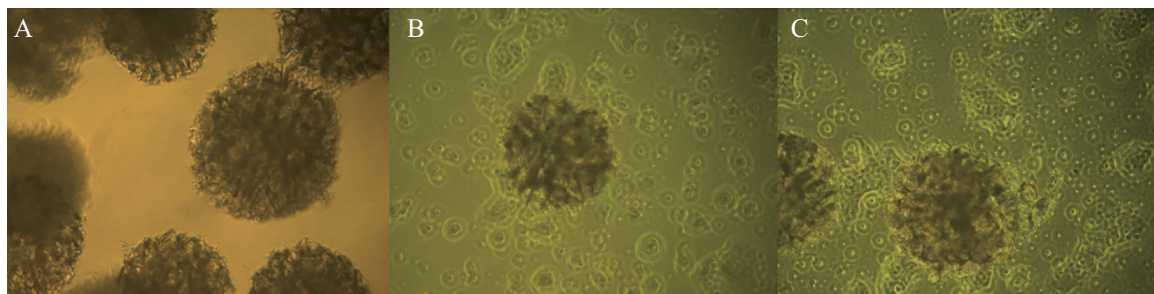
2.2 Cytopore和Cytodex的扫描电镜观察

由扫描电镜结果(图2)可知, Cytopore是多孔载体支架, 主要成分是纤维素, 在其内部存在大量相通和相连的孔洞, 细胞可以黏附在其孔洞内部生长。而Cytodex是实心球体, 主要成分是交联葡聚糖, 由于其外表面化学偶联一层较薄的变性胶原, 因此细胞容易贴附其表面生长。低温保存后, Cytopore与Cytodex外表型貌都发生变化, Cytopore由于表面及内部都是多孔结构, 因此变化较小, 仅是形状发生变化, 而Cytodex变化较大, 不仅形状发生变化, 载体表

面出现皱缩, 不光滑。

2.3 Cytopore和Cytodex的显微镜观察

大鼠肝细胞接种于Cytopore微载体培养2 d, 倒置显微镜观察微载体贴附生长的细胞(图3)。图中用箭头指出了几处黏附生长的细胞, 显微镜可观察到载体孔隙内充满密集的细胞, 因载体透光性差, 拍照后在图片中不易观察清楚; 细胞的直径一般在10 μ m, 而Cytopore是多孔结构, 平均孔径为235 μ m, 因此, 可供细胞生长的空间巨大, 细胞可以大量黏附生长, 在载体黏附较多时, 就可以聚集成团生长, 不受载体

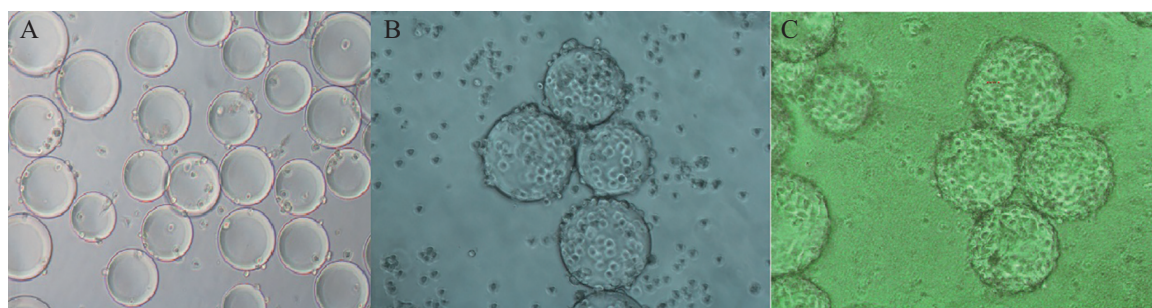


A: 培养2 d后; B: 培养4 d后; C: 培养6 d后。

A: cultured for 2 days; B: cultured for 4 days; C: cultured for 6 days.

图3 Cytopore培养的大鼠肝细胞(100×)

Fig.3 Image of rat hepatocytes growth in microcarrier Cytopore (100×)



A: 培养2 d后; B: 培养4 d后; C: 培养6 d后。

A: cultured for 2 days; B: cultured for 4 days; C: cultured for 6 days.

图4 Cytodex培养的大鼠肝细胞(100×)

Fig.4 Image of rat hepatocytes growth in microcarrier Cytodex (100×)

表面的限制; 培养6 d后, Cytopore中细胞数量明显增加, 且细胞在微载体中分布较均匀。

从图4可得出, 细胞接种于Cytodex材料表面, 6 h后显微镜观察可见黏附于Cytodex材料表面的细胞, 到第4 d微载体表面黏附大量细胞, 第6 d时微载体表面几乎贴满细胞, 细胞生长空间接近饱和, 从第8 d开始细胞出现凋亡现象。

2.4 Cytopore和Cytodex微载体培养大鼠肝细胞的MTT值及代谢指标的对比

分别在培养0、2、4、6、8、10 d后对Cytopore与Cytodex培养的大鼠肝细胞BRL进行MTT值及代谢指标的测定, 计算各值后作出柱状图进行对比。

2.4.1 MTT值 大鼠肝细胞黏附于Cytopore、Cytodex微载体, 在前6 d里所测得的MTT值均呈现上升趋势, 细胞增殖活性最大值出现在第6 d, 即黏附于Cytopore的细胞MTT最大值为0.64, 黏附于Cytodex的细胞MTT最大值为0.53, 两种载体的细胞MTT值从第6 d开始下降(图5)。结果显示, 微载体Cytodex培养的细胞的MTT值明显小于Cytopore。

2.4.2 低温保存前后分泌白蛋白量 由图6可知,

大鼠肝细胞黏附于Cytopore、Cytodex微载体。在培养前6 d里所测得的白蛋白分泌量均呈现上升趋势, 细胞分泌白蛋白量的最大值出现在第6 d, 黏附于Cytopore细胞白蛋白分泌量最大值为8.59 g/L, Cytodex最大值为6.55 g/L。两种载体培养细胞6 d后开始缓慢下降。结果显示, 黏附于Cytodex微载体培养的细胞的白蛋白分泌量小于Cytopore。低温保存后, Cytopore白蛋白含量变化较小, Cytodex白蛋白含量变化较大。主要由于载体经冻存后, Cytopore外表虽然变得不规则, 但是载体的多孔还存在, 只不过孔型出现了变化, 这些变化对细胞的黏附影响不大; 因此, 低温保存前后细胞白蛋白的含量变化较小; Cytodex低温冻存后, 载体表面出现皱缩, 可能对细胞的贴壁黏附产生影响, 显微镜观察, 部分细胞从载体脱落, 细胞凋亡, 低温保存后细胞白蛋白含量变化较大。

2.4.3 尿素合成量 由图7可知, 大鼠肝细胞黏附于Cytopore、Cytodex微载体, 在培养前6 d里所测的尿素合成量均呈现上升趋势。黏附于Cytopore的细胞尿素合成量最大值出现在第8 d, 最大值为

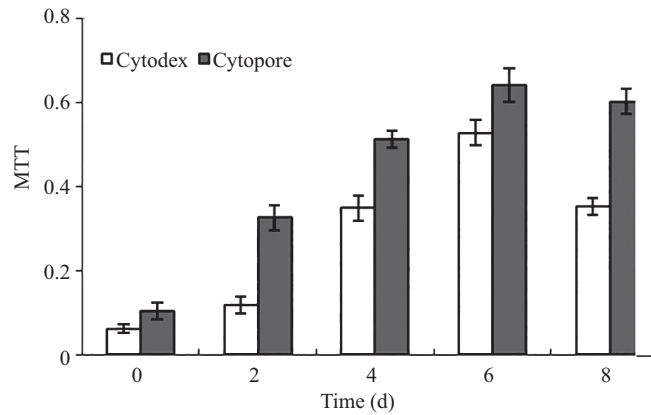


图5 微载体培养的大鼠肝细胞MTT值比较

Fig.5 MTT of rat hepatocytes growth in microcarrier

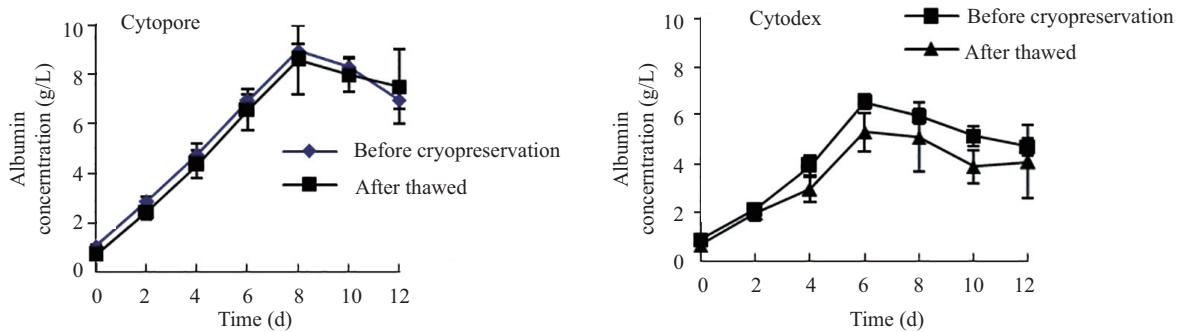


图6 微载体培养的大鼠肝细胞分泌白蛋白比较

Fig.6 Albumin concentration of rat hepatocytes growth in microcarrier

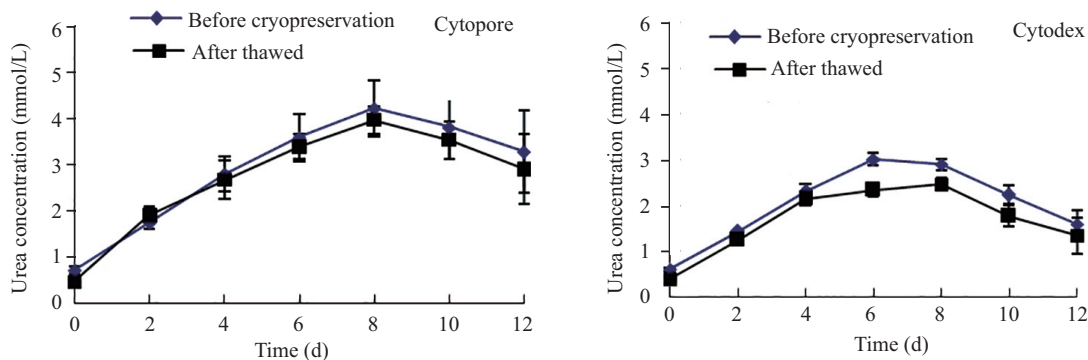


图7 微载体培养的大鼠肝细胞尿素合成量比较

Fig.7 Synthesized urea of rat hepatocytes growth in microcarrier

4.21 mmol/L; 黏附于CytoDex的细胞尿素合成量最大值为3.01 mmol/L, 出现在第6 d, 随后开始逐渐下降。总体来说, Cytopore微载体培养的细胞尿素合成量明显大于CytoDex培养细胞的值, 是CytoDex的1~2倍。低温保存后, Cytopore尿素含量变化较小, CytoDex尿素含量变化较大。

2.4.4 葡萄糖消耗量 由图8可知, 大鼠肝细胞黏附于Cytopore、CytoDex微载体, 在培养前6 d里所测

得的大鼠肝细胞所消耗的葡萄糖量均呈现上升趋势, 黏附于Cytopore细胞葡萄糖消耗量最大值出现在第8 d, 最大值为15.10 $\mu\text{mol/mL}$, 黏附于CytoDex细胞葡萄糖消耗量最大值为12.27 $\mu\text{mol/mL}$, 随后开始下降, 黏附于CytoDex的细胞葡萄糖消耗量明显小于黏附于Cytopore细胞的值。低温保存后, Cytopore葡萄糖含量变化较小, CytoDex葡萄糖含量变化较大。

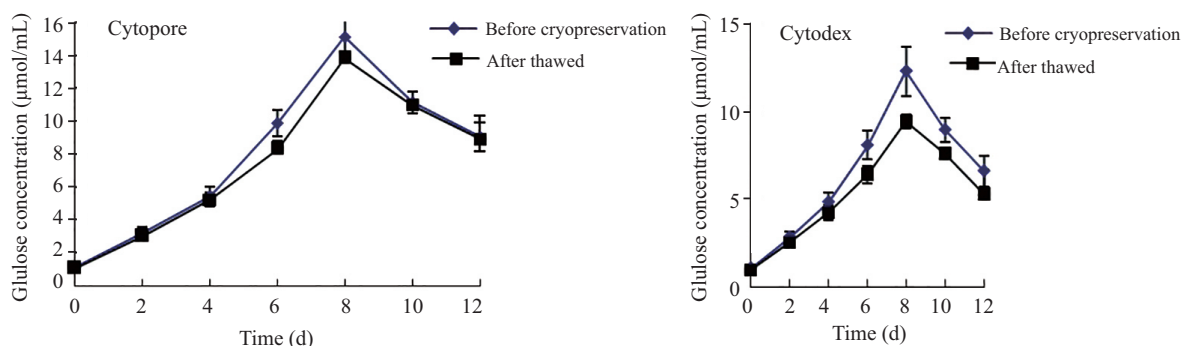


图8 微载体培养的大鼠肝细胞葡萄糖含量比较

Fig.8 Synthesized urea of rat hepatocytes growth in microcarrier

3 讨论

据研究报道,在细胞增殖生长和代谢能力方面,微载体及支架等多维培养细胞明显优于平面培养,对大规模扩增培养细胞很有前景^[11-12]。实验通过两种微载体的对比,结果显示,细胞黏附于载体Cytopore的MTT值、代谢指标是黏附于载体Cytodex的1~1.5倍。在细胞黏附生长期间,以Cytopore为载体培养的培养细胞生长密度比Cytodex高,Cytodex是由葡聚糖构成的实心球体微载体,比表面积为2 700 cm²/g,细胞铺满表面后,就无法继续黏附生长,阻碍细胞在培养期间代谢;而Cytopore为疏松的空心多孔网状结构,比表面积为1.1 m²/g,其比表面积是Cytodex的4倍,为细胞生长提供了足够的空间,其良好的孔隙有利于细胞的代谢。因此,Cytopore更适合大鼠肝细胞BRL的培养。

目前,肝细胞低温保存较成熟方法大都是细胞悬液冻存,其他的低温保存方法有肝细胞胶原单层铺板低温保存、三明治夹心低温保存和微囊包裹低温保存等,这些方法各有其优缺点。如何低温保存黏附于微载体的肝细胞,避免因降温 and 复温过程中受溶液冻结、融化以及溶液渗透压力变化等因素的作用造成的肝细胞脱落,是目前研究中亟待解决的问题。本研究将Cytopore与Cytodex培养的肝细胞低温保存,结果证实,Cytopore比Cytodex更有利于肝细胞的低温保存,包括获得更高的细胞存活率和细胞代谢功能。肝细胞与两种载体经低温保存后,肝细胞与载体(Cytopore、Cytodex)的黏附发生问题,细胞培养期间细胞黏附于载体材料(Cytopore、Cytodex)表面,从接触表面开始其黏附力随时间延长而增强,直到细胞表面黏附受体饱和。当低温保存时,升/降温过程中,温度及其他因素的变化使两

种微载体(Cytopore、Cytodex)的表面结构发生变化,进而引起细胞与载体的黏附关系发生变化,造成细胞与材料结合的紧密度降低。而细胞与材料间的黏附力与材料的性质和分子密度相关^[13]。基质为葡聚糖的Cytodex微球与基质是纤维素的Cytopore微球,膨胀系数不同则热应变(thermal strain)也不同。由扫描电镜图像可知,两种载体材料(Cytopore、Cytodex)经低温保存后,Cytodex变化较大,低温保存后原本平滑的表面不均匀,发生细胞和黏附材料之间的脱离,造成细胞本身的破坏。以上说明,细胞以何种载体培养,对其低温保存后细胞的存活率和代谢功能影响较大。

细胞与载体材料的构建受到诸如培养时间、细胞与生物材料类型、表面分子修饰、应力培养等方面的影响,这些可以作为控制细胞形态黏附生长的主要因素,并最终影响低温保存的结果。因此,对细胞与载体材料低温保存机理的研究,有助于我们发展一些新型载体材料及细胞培养方法,以便改善细胞载体低温保存的质量。随着生物技术和三维培养方式技术日趋成熟和完善,细胞复合体低温保存技术又向前迈进了一大步。

参考文献 (References)

- 1 Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. Biotechnol Bioeng 1990; 35(9): 890-6.
- 2 Kemeny SF, Cicalese S, Figueroa DS, Clyne AM. Glycated collagen and glucose increase endothelial cell adhesion strength. J Cell Physiol 2013; 228(8): 1727-36.
- 3 Remya KR, Joseph J, Mani S, John A, Varma HK, Ramesh P. Nanohydroxyapatite incorporated electrospun polycaprolactone/polycaprolactone polyethyleneglycol-polycaprolactone blend scaffold for bone tissue engineering applications. J Biomed Nanotechnol 2013; 9(9): 1483-94.

- 4 胡显文, 肖成祖, 高丽华, 李佐虎. 用多孔微载体大规模长期培养动物细胞的方法. 生物技术通报(Hu Xianwen, Xiao Chengzhu, Gao Lihua, Li Zuohu. Methods for large-scale and long-term animal cell culture with porous microcarriers. Biotechnology Information) 2001; 1(1): 45-8.
- 5 Heath C, Kiss R. Cell culture process development: Advances in process engineering. Biotechnol Prog 2007; 23(1): 46-51.
- 6 Kistner O, Barrett PN, Mundt W, M Reiter, S Schober-Bendixen S, Dorner F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. Vaccine 1998; 16(9/10): 960-8.
- 7 Trabelsi K, Majoul S, Rourou S, Kallel H. Development of a measles vaccine production process in MRC-5 cells grown on Cytodex1 microcarriers and in a stirred bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol 2012; 93(3): 1031-40.
- 8 Tan FC, Lee KH, Gouk SS, Magalhaes R, Poonepalli A, Hande MP, *et al.* Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: Comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols. Cryo Lett 2007; 28(6): 445-60.
- 9 Hoshiba T, Nagahara H, Cho CS, Tagawa Y, Akaike T. Primary hepatocytes survival on non-integrin-recognizable matrices without the activation of Akt signaling. Biomaterials 2007; 28(6): 1093-104.
- 10 Pinkse GG, Voorhoeve MP, Noteborn M, Terpstra OT, Bruijn JA, De Heer E. Hepatocyte survival depends on beta1-integrin-mediated attachment of hepatocytes to hepatic extracellular matrix. Liver Int 2004; 24(3): 218-26.
- 11 Marquette ML, Byerly D, Sognier M. A novel *in vitro* three-dimensional skeletal muscle model. Biol Animal 2007; 43(7): 255-63.
- 12 Facer SR, Zaharias RS, Andracki ME, Lafoon J, Hunter SK, Schneider GB. Rotary culture enhances pre-osteoblast aggregation and mineralization. J Dent Res 2005; 84(6): 542-7.
- 13 Qin TW, Yang ZM, Wu ZZ, Xie HQ, Qin J, Cai SX. Adhesion strength of human tenocytes to extracellular matrix component-modified poly (DL-lactide-co-glycolide) substrates. Biomaterials 2005; 26(33): 6635-42.