

细胞成囊装置的设计及基础应用研究

宁国伯 郭明珠

(第二军医大学三六九研究室, 上海)

本文报道了细胞成囊装置的设计及微珠大小的控制方法, 首次表明了微珠直径与微珠堆密度的关系, 微珠堆密度及克隆满载率的计算方法, 观察了杂交瘤细胞在海藻胶中的分布及微囊和克隆大小的关系问题。微囊技术的成功率达到90%左右。这对细胞荚膜工程的深入研究和开发, 具有重要意义。

关键词 成囊装置; 微珠堆密度; 满载率

近年来, 包被活细胞的荚膜工程正在引起国内外有关学者的极大兴趣, 在大规模培养杂交瘤细胞方面, 微囊法是较有发展前景的技术途径之一, 在人工细胞方面, 研究进展也较迅速, 用它治疗糖尿病, 动物试验的结果表明, 具有良好的医用前景。但有关基础研究弱, 且国内起步较晚, 缺乏试验装备, 给实际工作带来一定困难。为此, 我们开展了探索, 现报告如下。

细胞成囊装置的设计

在荚膜工程中微珠是形成微囊的基础, 微珠固定细胞后, 经制膜, 液化成囊。因此, 微珠发生器和微囊反应器是不可缺少的, 也是密切相关的。为更好地形成微囊, 我们作了如下设计。

(一) 微珠发生器

因为海藻酸钠溶液粘性较大, 设计要求能使细胞充分混匀, 细胞悬液的射流流线较细, 气流有足够大剪切力, 射流和气流要同步运行。根据上述特点, 我们设计了喷嘴式发生器, 它主要由样品室、气室和同心圆喷嘴构成。如图1所示。混匀后的海

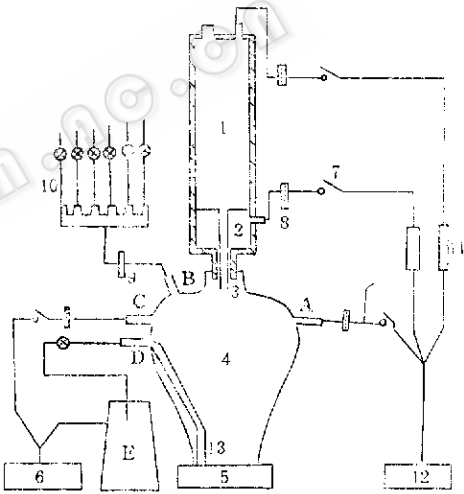


图1 细胞成囊装置简图

Fig.1 Schematic diagram of a cell enveloped microcapsule device

- 1. 样品室 Sample chamber 2. 气室 Air chamber
- 3. 喷嘴 Jet 4. 反应器 Reactor
- 5. 搅拌器 Agitator 6. 真空泵 Vacuum pump
- 7. 开关 Switch 8. 空气滤器 Air filter
- 9. 液体滤器 Liquid filter
- 10. 分道开关 Branch switch
- 11. 空气流量计 Air flowmeter
- 12. 无油空气压缩机 Oilless air compressor
- A. 空气入口 Air entrance
- B. 液体入口 Liquid entrance
- C. 排气孔 Exhaust hole
- D. 排液孔 Exhausting liquid hole
- E. 收液瓶 Collect liquid bottle

本文于1988年4月8日收到。
本文研究为国家自然科学基金资助课题。

藻酸钠细胞悬液盛于样品室中,在正压条件,液体从射流孔出来,同时高压无菌气体从气室流出,形成较大的剪切力,将液体射流分割成微珠,进入反应器中与氯化钙溶液作用,变成实心的固态微珠,达到固定细胞的目的。

(二) 微囊反应器

由于 $\text{Lim}^{[1]}$ 的微囊制备方法是多级反应,因此,反应器的设计考虑了反应的顺序性,试剂输入和输出的可靠性,操作方便和防止污染等问题。细胞固定、制膜、成囊等程序,均在反应器中进行,试剂和洗涤液设计成单向连续操作。

(三) 细胞成囊装置有关参数的调试及选择

由于微珠发生器的有关参数对微珠大小,均匀性及其形状影响较大,因此,首先必须使海藻酸钠的理化性质(如粘度、浓度、糖醛酸组分等)恒定,分别改变射流动力(即发生器压力),射流孔径以及气体流量(它是剪切力大小的决定因素)等条件。调试结果表明,当射流孔径和气体流量一定时,发生器压力由 $0.6\text{kg}/\text{cm}^2$ 上升到 $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$ 时,微珠质量有明显差异,压力在 $0.6\text{—}0.8\text{kg}/\text{cm}^2$ 时,产生的微珠小而均匀,压力在 $1.0\text{—}1.2\text{kg}/\text{cm}^2$ 时,微珠大小极不均匀。因此,我们把工作压力选在 $0.6\text{—}0.8\text{kg}/\text{cm}^2$ 之间,同样,如果工作压力和气体流量恒定,射流孔径由小变大,则微珠直径也由小变大,且不均匀,于是,把孔径选在 $0.42\text{—}0.55\text{mm}$ 之间,结果比较理想。

(四) 动力及调控系统

这部分包括无油空气压力泵,真空泵,气体流量计,空气除菌器及分道开关等。

材 料 和 方 法

(一) 主要器材

海藻酸钠(国产),聚-L-赖氨酸(PLL, Sigma), CHES(国产),细胞成囊装置,倒置显微镜及杂交瘤细胞珠等。

(二) 主要方法

1. 微囊形成方法:将一定数量的杂交瘤细胞悬于海藻酸钠液体中(最终浓度为 1.2%),搅拌均匀,盛于发生器样品室中,打开开关和阀门,形成微珠,再按照 $\text{Lim}^{[1]}$ 和 $\text{Goosen}^{[2]}$ 的方法,在反应器中形成含细胞的微囊。

2. 微珠堆密度的测定方法:所谓堆密度是指一定数量的微珠在液相中自然沉积一定时间与所占容积的比值。具体测定方法是将一定容积的微珠适量的分配在 96 孔组织培养板各孔中,在倒置显微镜下,对各孔的微珠进行扫描式计数,微珠总数与容积的比值,即堆密度。

3. 微囊直径和克隆大小的测定方法:用标定过的目镜测微器,在倒置显微镜下,测定微珠(或微囊)和克隆直径,对不规则克隆,调节测微器方向,采用补差法,测定近似值。

4. 微囊中杂交瘤细胞的培养方法:将微囊悬于 RPMI 1640 完全培养基中,分装在组织培养板或组织培养瓶中,在二氧化碳培养箱中静置培养 6 至 9 天,观察结果。

结 果 和 讨 论

(一) 气体流量对微珠大小的影响

为了观察微珠发生器的气体流量与微珠直径的关系,我们把微珠发生器的一些参数选在最佳值,用批号相同的海藻酸钠

试验,调节气体流量,改变剪切力大小,并测定相应条件形成微珠的大小。结果表明(如图2)气体流量与微珠直径密切相关。气体流量增加,微珠直径则减小,而且,在一定的气体流速范围内,微珠大小比较均匀。这一结果与 Seften^[4]的结果是一致的。它提示我们,在一定条件下(如海藻酸钠浓度,射流孔径,工作压力等恒定的条件下),通过控制气体流速,就可获得一定大小的微珠以满足工作的需要。

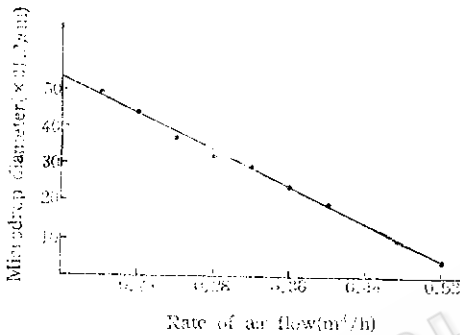


图 2 微珠直径与气体流速之间的关系
Fig.2 Relation between microdrop diameter and rate of air flow

(二) 微珠直径与微珠堆密度之间的关系及计算公式的建立

在荚膜工程中,微珠大小和堆密度都是重要的参数。为寻找二者的关系,我们制备不同直径的微珠,并测定相应的堆密度。由表1可知,二者的关系十分密切。随着微珠直径减小,其堆密度迅速增加。比如,微珠直径从1540μm减小到659μm,其堆密度则从353.6迅速增加到4219(粒/ml),前者只减小2.3倍,后者却增加11.9倍。由此可见,两者的关系,不是一般的线性关系,为了用数学公式表达,根据气溶胶的发生原理和形成微珠的特点,建立了下述经验公式。

$$D = \frac{900}{\pi} \left(\frac{1600}{d} \right)^3 \tag{1}$$

D 微珠堆密度(粒/ml)
d 微珠直径(μm)
π 圆周率

为验证公式的可靠性,用已知d值计算出理论堆密度,并与实测堆密度比较。结果表明(表1),除个别值外,两组值几乎是一致的,说明公式(1)具有一定的可靠性。

由于(1)式的建立,即可求得任何大小的微珠堆密度,只要测出所产生的微珠体

表 1 微珠直径与堆密度的关系
Table 1 Relation between diameter of microdrop and pile density

	微 珠 直 径 Microdrop diameter (μm)									
堆密度(粒数/ml) Pile density (number/ml)	1540	1422	1177	1012	941	772	659	550	500	
测 定 值 Determined	353.6 ±11.4	468.2 ±15.8	724.0 ±1.9	1079.5 ±3.4	1301.0 ±8.6	2677.3 ±10.7	4218.8 ±420.7	—	—	
计 算 值 Computed	337.0	420.0	756.0	1182.0	1500.0	2661.0	4305.0	7320	9830	
比率(%) * Rate	104.9	111.5	95.8	91.3	86.7	100.6	98.0	—	—	

* 测定值除计算值后,乘100
Determined value divided by computed value × 100

积,就可算出总的微珠数。这对合理使用微囊试剂(尤其是PLL的用量),估算需要接种的杂交瘤细胞数等,都是必要的。

(三) 微囊中克隆的满载率及其计算

与一般微载体一样,用微囊法培养杂交瘤细胞也存在满载率的问题。所谓满载率是指长成克隆的微囊数与总微囊数的百分比。但与一般微载体不完全相同,除包被杂交瘤细胞的机率外,杂交瘤细胞的存活及微囊大小等因素,对满载率都有很大影响,在实验的基础上,提出如下计算满载率(L)的方法。

$$L = \frac{V \cdot f \cdot N_1}{N_2} \times 100\% \quad (2)$$

V 在微包过程中杂交瘤细胞的存活率

f 杂交瘤细胞在海藻酸钠中分布的均匀程度

N₁ 接种杂交瘤细胞的微囊数

N₂ 总微囊数(在数值上等于微珠堆密度与它的容量之乘积)

根据需要的d值,经计算可确定N₂。根据N₂即可估算所需接种的细胞数,如果f为1,它在数值上应等于N₁。V和f必须根据实验确定。为了观察满载率的情况,按上述方法制备微囊,观察每个微囊中的克隆数,计算满载率。由表2结果可见,只要杂交瘤的存活较好,接种足够的

细胞数,分布也较均匀,每个微囊则能长出一个或多个克隆。因此,满载率是能够达到100%的。但是,我们也看到,每个微囊中的克隆数低于接种的细胞数。这可能有两种原因,一是由于微珠被液化后,微囊中的细胞在重力作用下,多个细胞凝聚在一起,长成一个克隆;二是在制备微囊过程中,有一部分细胞死亡。

(四) f值试验

所谓f值,它是与细胞混合方法有关的分配系数。假定在制备微珠的过程中,细胞无损耗,所有的细胞悬液全部制成微珠,而且,接种的细胞数等于或大于制备的微珠数,细胞混合非常均匀。在上述情况下,应该有下列结果。一个或几个细胞占有一个微珠,如果多个细胞占有一个微珠,则每个微珠所含细胞数应是相同的。这时,我们认为细胞分布是均匀的,并确定分布系数f为1,否则分配系数小于1。根据这一概念,对小样品(15ml左右)进行了试验即将一定数量的细胞悬于海藻酸钠溶液中,反复进行吸进推出,充分搅拌,制成微珠,在镜下观测每个微珠中的细胞数,为便于比较,还用堆密度公式计算每个微珠中应含的细胞数。从表3可知,尽管海藻酸钠溶液的粘性较大(1.2%的浓度100℃加热10min,其相对粘度相当于0.85%生理盐水672倍),但经混合搅拌,细胞在500μm以上的每个微珠中,分布基本上是均匀的,也就是说,f值接近1。但大样品的f值,因设备有限,尚未研究。同样,低于500μm的微珠,也未研究。

(五) 微囊大小的选择

据报道,对人工细胞,微囊直径在500μm以上,就获良好效果。但对培养杂交瘤细胞,所需微囊多大,未见报告。为此,我们进行了实验性观察。把杂交瘤细

表 2 在微囊中杂交瘤细胞的满载情况
Table 2 Full load of hybridoma in microcapsule

实验次 No. of test	微囊数 Number of capsule (10 ⁴)	接种细胞数 Cells (10 ⁴)	满载率 Rate of full load (%)
1	3.9	82.0	78.8
2	4.6	78.0	100.0
3	未测	78.7	100.0
4	3.3	71.0	100.0
5	3.4	25.0	87.1

表 3 杂交瘤细胞在微珠内的分布

Table 3 Distribution of hybridoma in microdrops

实 验 次 No. of test	观察微珠数 No. of capsules	观察细胞数 No. of cells	每个微珠中的细胞数 Cell number in capsule	
			测 定 值 Determined	计 算 值 Computed
1	30	435	14.5 ± 2.4	18.5
2	20	314	16.2 ± 2.2	21.6
3	25	180	7.2 ± 1.0	11.2
4	20	115	5.7 ± 1.0	7.3
5	20	292	14.6 ± 1.6	18.9
6	29	241	8.3 ± 0.5	26.0
7	30	101(2—8)	3.4 ± 0.6	4.1

表 4 微囊直径与克隆大小的关系

Table 4 Relation between microcapsule diameter and clone size

实 验 次 No. of test	微 囊 直 径 Microcapsule diameter (μm)	克 隆 大 小 Clone size (μm)	克隆面积/微囊面积 Clone area/capsule area (%)
1	1696.9	584.4	34.4
2	1403.1 ± 4.5	675.0 ± 9.4	48.1
3	1009.4 ± 2.1	606.2 ± 5.9	60.1
4	781.2 ± 1.6	518.5 ± 1.4	66.4
5	571.9 ± 2.6	400.0 ± 1.1	70.0
6	434.4 ± 2.6	378.1 ± 2.9	87.1

胞悬于海藻酸钠溶液中,制成不同大小的微囊,静态培养在 CO_2 培养箱中,待克隆长到最大时(一般 6—7 天),同时观测微囊直径和克隆大小。表 4 的结果表明,在静态培养时,微囊直径大者,克隆也有所增大,但克隆长到一定程度,不再继续长大,以致不能充满整个微囊,而且微囊越大,囊内剩余空间越多。相反,微囊小,克隆几乎充满整个微囊,如图 3 所示。此外,从堆密度分析,500 μm 的微囊比 1500 μm 的微囊高 17.7 倍,可以推断,开囊后,从小微囊获得的细胞密度远远超过大微囊。因此,对培养杂交瘤细胞,选择小微囊更好。

为了包埋活细胞,Lim 等^[1]发展和改进了微包技术,还利用振动原理设计成微囊装置,所产生的微珠小而均匀,但此

法产量太低。Herman 等^[3]利用电场原理,设计的微囊装置用于包埋胰岛细胞,获得成功,但方法不详。我们把 Lim 的微囊技术和 Seften 等^[4]产生微珠的原理结合起来,加以改进,取得了较好效果,微珠直径在 500—1500 μm 范围内,通过改变气体流量,可以随意选择所需微珠。而且比较均匀,单孔用胶量可达 80ml/h,基本上可以满足实验要求。此外,人们通过开关,按制囊程序制备微囊,操作方便,节省人力,设计的密闭系统能够有效地控制细菌污染。由于微囊自身规律的研究报道甚少,例如,微囊大小与堆密度的关系,满载率的影响因素等,在实际应用中,它们都是十分重要的。我们应用上述设计装置,在试验基础上,建立了微珠堆密度和满载率的计算方法,只要知道一定容量的

海藻胶细胞悬液,产生的微珠大小和容积,就能算出总的微珠数,进而就可以估算需要包埋的细胞数。但实际上,一个微珠未必能够包埋一个细胞,每个微囊也未必能长出一个克隆。比如,有时我们接种的细胞数比预计的微囊数高几十倍,甚至数百倍,但有的微囊仍无克隆长出。即所谓空载现象。这就涉及到细胞的分配系数与存活率的问题,主要是存活问题。从(2)式可知,当其他参数一定时,满载率随存活而变化,细胞存活率低,满载率自然也不高。初步试验表明,在微包过程中,影响杂交瘤细胞存活的因素是多方面的。既有某些微囊试剂的毒性作用,也有微包过程的自然死亡。在此基础上,我们改进操作方法,提高细胞存活,基本解决了空载问题,使制囊技术的成功率达到90%左右。

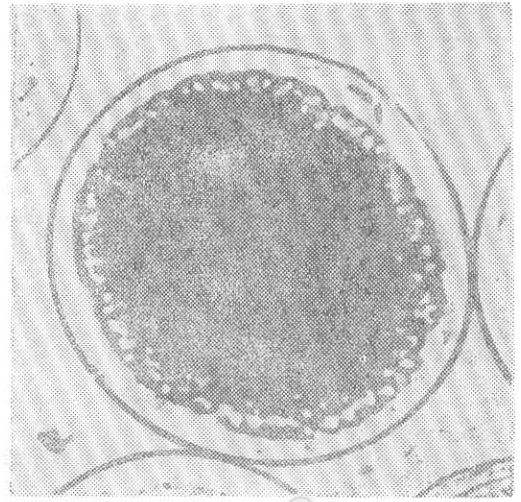


图 3 微囊内生长的杂交瘤细胞
Fig.3 Grown hybridoma cells in the microcapsule

参 考 文 献

- [1] Lim, F. et al., U. S. Patent., 4,352,883. 1982.
- [2] Goosen, H.F.A. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 27(2):146, 1985.
- [3] Herman, R. et al., *New Scientist.*, 109(1494):30, 1986.
- [4] Seften, M.V. et al., *Biotechnol Bioeng.*, 29(9):1135, 1987.

DESIGN OF A CELL ENVELOPED MICROCAPSULE AND ITS APPLICATION STUDY

Ning Guobo Guo Mingzhu

(Department of Radiation Medicine, Second Military Medical college, Shanghai)

In this paper, a device for controlling the size of cell enveloped microcapsules is presented. It is demonstrated that the size of microcapsule varies inversely with the air flow rate, and a empirical formula relating the pile density and diameter is obtained. Then the loading of the microcapsules and distribution of cells in the microcapsule are discussed. Finally, the choice of microcapsule size is evaluated and a conclusion has reached that smaller microcapsules are more adequate for clone development.

Key words

Microcapsule forming device; pile density of microdrop; percentage of full load