

微囊化 K562 细胞生长周期及代谢特性的研究

Characteristics of Cell Cycle and Metabolism in Microencapsulated K562 Cell Culture

马 娟^{1,2}, 綦文涛^{1,2}, 王秀丽^{1,2}, 王 为¹, 郭 昕¹, 马小军^{1*}

MA Juan^{1,2}, QI Wen-Tao^{1,2}, WANG Xiu-Li^{1,2}, WANG Wei¹, GUO Xin¹ and MA Xiao-Jun^{1*}

1 中国科学院大连化学物理研究所生物医学材料工程组 大连 116023

2 中国科学院研究生院 北京 100039

1 Laboratory of Biomedical Material Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 以 K562 细胞为模型, 分别进行微囊化和游离培养, 运用流式细胞术考察两种培养体系下细胞周期和生长代谢变化; 建立数学模型, 模拟了两种培养体系下细胞的生长活性和代谢特性。实验发现, 微囊化培养过程中的 K562 细胞处于 DNA 合成期(S 期)的百分含量显著高于游离培养, 并且细胞保持较高的增殖活性。模型计算表明, 所建模型动力学参数能够很好地描述微囊化和游离两种培养体系下细胞的代谢情况; 对细胞活性的理论计算表明, 微囊化的细胞具有较高的增殖和代谢活性, 同时细胞能够较长时间保持此活性。模型参数表明, 两种培养体系下, 葡萄糖对细胞生长的影响无显著差别($k_A^{Free} \approx k_A^{APA}$), 乳酸对游离培养细胞的生长具有明显抑制作用, 但对微囊化培养细胞抑制作用较小($k_L^{Free} > k_L^{APA}$)。

关键词 微囊化培养, 游离培养, 细胞周期, 细胞活性

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-0923-06

Abstract Human K562 leukemia cells were cultured under free and microencapsulated condition, respectively. The cell cycles in the two kinds of cultures were investigated by flow cytometry. Moreover, mathematical model was established to simulate the cell viability and metabolized characteristic in different cultures. It was found that the cell percent in S phase was higher and the cell viability was better when cultured in microcapsule than that in free culture. The results showed that the model successfully described the substrate consumption and product formation in microencapsulated culture as well as in suspension culture. Based on the model, it was indicated that not only there was a higher proliferation and metabolic activity but also the time of the high activity could keep longer in microencapsulated culture. The parameters of the model showed that there was no significant difference between the two kinds of cultures when the influence of the glucose on the cell viability was concerned ($k_A^{Free} \approx k_A^{APA}$), but lactate had a obvious suppression effect on cell viability in free culture, and neglectable suppression in microencapsulated culture ($k_L^{Free} > k_L^{APA}$).

Key words microencapsulated cell culture, free cell culture, cell cycle, cell viability

Received: June 13, 2005; Accepted: August 23, 2005.

This work was supported by a grant from National Natural Science Foundation of China(No. 20236040) and National High Technology Research and Development Program(No. 2003AA205111).

* Corresponding author. Tel and Fax: 86-411-84379139, E-mail: maxj@dicp.ac.cn

国家自然科学基金(No. 20236040)和国家高技术研究与项目(No. 2003AA205111)基金资助

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

20世纪80年代初, Lim和Sun等人^[1,2]首次将微囊化技术与组织工程细胞移植相结合, 制备了具有良好生物相容性的海藻酸钠/聚赖氨酸/海藻酸钠(APA)微胶囊。该微胶囊不但可以维持被包埋细胞正常的生理学功能, 而且还能够成功避免组织细胞移植中的免疫排斥反应, 实现对病损组织在形态、结构和功能方面的重建或替代^[3-6]。基于此, 在细胞基础研究及多种疾病的细胞替代治疗领域^[7,8], 微囊化技术均显示出不可替代的应用价值^[9]。

近年来, 伴随生物工程领域的迅猛发展, 微囊化技术在规模化细胞培养的相关研究中再次被广泛关注。由于微胶囊形成的微环境^[10]为细胞生长提供了温和和稳定的生长空间, 因此与普通游离培养相比, 微囊化的细胞在生长和代谢等方面都表现出一些特有的性质及优势。如: 细胞在微胶囊的环境下呈三维方式生长, 细胞易于成团且密度较高, 细胞生长稳定期较长, 细胞能较长时间维持较高活性等。研究这些性质对明确微胶囊载体中细胞的增殖特性及更高效发挥微胶囊内细胞的生物学功能具有重要的指导意义。

K562细胞是一种从人白血病细胞中分离建立的可长期体外悬浮生长的细胞系, 具有增殖周期短和生长代谢规律稳定的特性, 是生物医学研究常用的模型细胞系^[11,12]。本实验以K562细胞为模型, 对其在微囊化与游离两种培养方式下的生长和代谢进行对比性研究, 在明确细胞在微胶囊内生长和代谢活性的变化特点的基础上, 进一步建立数学模型对细胞活性变化和代谢过程进行了模拟, 以阐明主要生长底物和代谢产物对微囊化细胞生长过程的影响, 为微囊化动物细胞的规模化培养提供实验依据和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

海藻酸钠(黏度=100cp, 青岛晶岩生物科技开发有限公司); 聚赖氨酸(MW=24500, 美国, Sigma公司); 1640培养液(美国, GIBCO公司), 含10%小牛血清(北京三利生物制品厂); 其他试剂均为国产分析纯。K562细胞(第四军医大学提供)。

1.2 方法

1.2.1 微囊化K562细胞的制备: 收集对数生长期的K562细胞, 重悬于过滤除菌的1.5%(W/V)海藻酸钠溶液中, 调整细胞终浓度为 (2×10^6) mL。细胞悬液通过注射器泵(Scientific Instruments, INC)针头

压出, 经由大功率高压脉冲微胶囊制备仪(本实验室研制)产生的静电场, 滴入100mmol/L CaCl₂溶液中, 制备含有细胞的海藻酸钙凝胶珠; 钙化30min后的海藻酸钙凝胶珠在0.05%(W/V)的聚赖氨酸溶液中发生电解质络合反应以形成微胶囊膜; 成膜后在0.15%(W/V)的海藻酸钠溶液中覆膜, 以中和多余正电荷, 形成APA微胶囊; 最后, 置于55mmol/L的柠檬酸钠溶液中, 使微胶囊内部的海藻酸钙凝胶液化。

1.2.2 细胞培养: 微囊化培养: 将微囊化的细胞分装于24孔板中; 每孔分装约 1×10^5 个细胞, 加入1640培养液2mL。

游离培养: 取同批细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种于24孔板中, 每孔加入1640培养液2mL, 以保证两种培养方式下每孔的细胞数量和培养液体积一致。

两种培养方式下的细胞在37℃, 5% CO₂培养箱(日本, 三洋公司)中培养。

1.2.3 微囊化细胞形态观察: 隔天在显微镜(XDS-1生物倒置显微镜, 重庆光学仪器厂)下观察微囊化细胞的生长状态并拍照记录。

1.2.4 细胞数量的测定: 细胞数量测定采用DNA分析法^[13]。即将微囊化细胞或游离细胞用PBS清洗2遍; 用含proteinase K的缓冲液50℃保存12h裂解细胞, 以释放DNA; 之后加入荧光试剂Hoechst 33258, 荧光试剂特异的与双链DNA结合(可排除RNA的干扰)后, 测定荧光光度值(激发光波长: 355nm; 发射光波长: 460nm), 根据细胞数量和DNA荧光光度的标准曲线, 确定细胞含量。

1.2.5 葡萄糖和乳酸含量的测定: 用生物传感分析仪(SBA-40C, 山东省科学院生物研究所)测定培养液中葡萄糖和乳酸的含量。

1.2.6 细胞周期的测定: 游离培养细胞每天收集约 1×10^6 个细胞, 70%乙醇溶液固定; 微囊化培养细胞隔天收集, 机械破囊后, 用300目筛网过滤除去微囊碎片后离心、固定。细胞收集完后将所有样品离心, 收集细胞, PBS漂洗2次, 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 /mL, 1mL细胞悬液中加入1mL PI染色液, 置于4℃冰箱中染色30min后用流式细胞分析仪(FACSVantage SE, BD)分析细胞周期。

2 数学模型的建立与求解方法

2.1 细胞活性与代谢模型的建立

由于微囊化细胞在生长过程中容易出现聚集和成团现象, 所以微囊化培养过程的细胞活性变化也

与游离培养状态下的不同。为了考察微囊化细胞的生长特性,并与游离培养方式下的情况进行对比,本文建立了数学模型以模拟不同培养方式下的细胞活性变化和代谢规律。模型主要考察以下三个主要因素:底物(葡萄糖)浓度;产物(乳酸)浓度和细胞活性。模型建立的基础如图 1 所示(1)底物葡萄糖的存在导致了活细胞对底物的消耗和产物乳酸的生成(2)葡萄糖和乳酸的存在对细胞活性分别具有激活和抑制作用(3)由于取材是同一批细胞,且微胶囊制备过程考虑了细胞数量和活性的损失,所以,可认为游离和微囊化培养初始细胞具有相同的活性,且定义大小为 1 个活性单位。由此,可得到如下的表达式:

$$\frac{dG}{dt} = -k_d[G][C] \quad (1)$$

$$\frac{dL}{dt} = k_p[G][C] \quad (2)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_A[G][C] - k_I[L][C] \quad [C]_{t=0} = 1 \quad (3)$$

其中: G 为葡萄糖; L 为乳酸; C 为细胞活性;

k_G 为葡萄糖消耗速率系数; k_E 为乳酸生成速

率系数; k_A 为细胞活性激活系数; k_I 为细胞活性抑制系数。

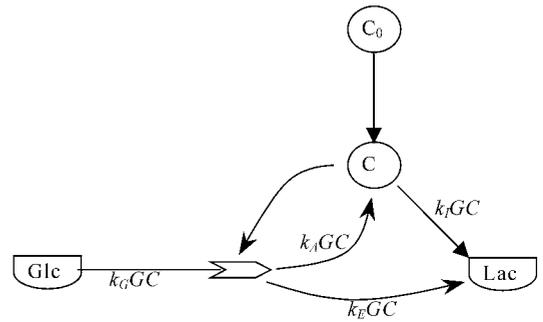


图 1 葡萄糖和乳酸对细胞活性影响示意图

Fig. 1 Diagram of the influence of glucose and lactate on cell activity

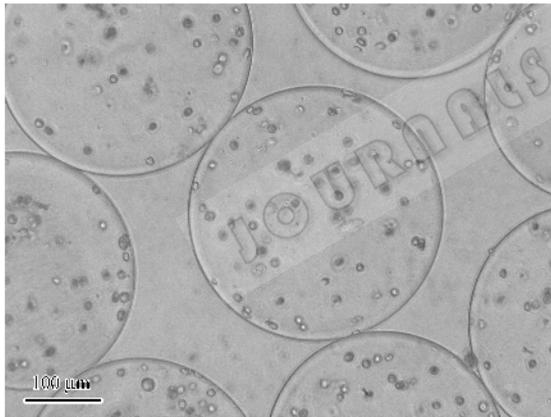
2.2 求解方法

模型参数采用 matlab 软件中的多变量函数最小化法求解。

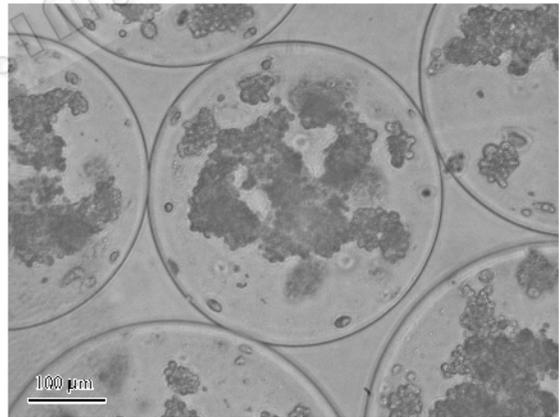
3 结果

3.1 微囊化细胞的形态

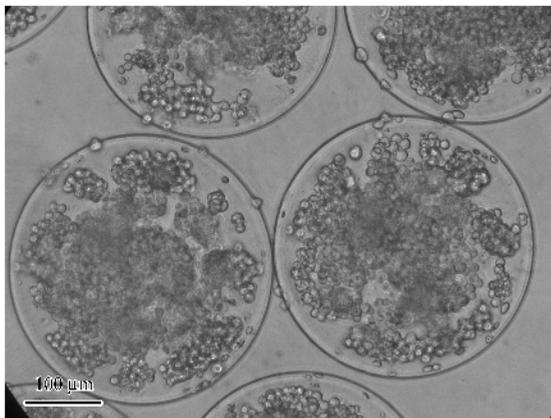
为了解悬浮动物细胞在微胶囊内的生长状态,



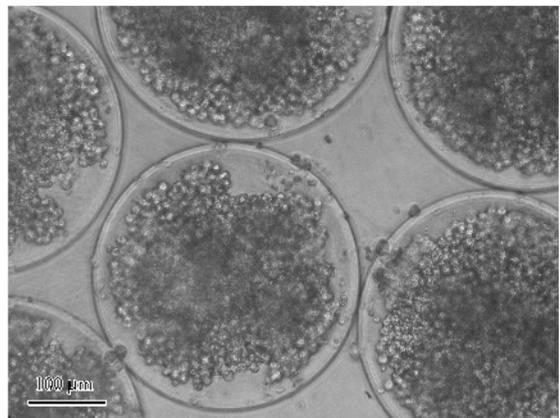
0 day (40×)



6 days (40×)



10 days (40×)



14 days (40×)

图 2 微囊化 K562 细胞生长状态

Fig. 2 Microphotographs of K562 cells entrapped in APA microcapsules

在培养的不同时间拍摄微胶囊相片,如图 2 所示。从图中可以看出,微囊化的悬浮细胞表现出了与游离培养条件下不同的特征,即在培养一段时间后开始聚集,出现大小不一的团块,随着培养时间的延长,团块逐渐变大,并最终形成一个大的细胞团,充满整个微胶囊。当培养时间大于 10d 的时候,细胞团块中央出现细胞坏死现象,这可能是由于伴随细胞团的增大,团块中央传质受阻,细胞得不到充分的营养供应而坏死。此外,微胶囊在作为细胞移植用载体时,形态保持完整是非常重要的。实验中,制备的微胶囊直径在 300 ~ 400 μm ,细胞培养 14d 以上仍然保持完整,无细胞泄漏现象发生。

3.2 微囊化培养方式对细胞周期的影响

运用流式细胞术分析两种培养方式下细胞的 S 期比例发现,在细胞培养时间小于 7d 时,微囊化的 K562 细胞生长过程中 S 期细胞的百分含量与游离培养情况下差别不大,而当培养时间大于 8d 时,游离培养的细胞其 S 期比例明显下降,而微囊化的细胞 S 期仍保持了较高的比例,且持续时间达到 12d 以上,如图 3 所示。

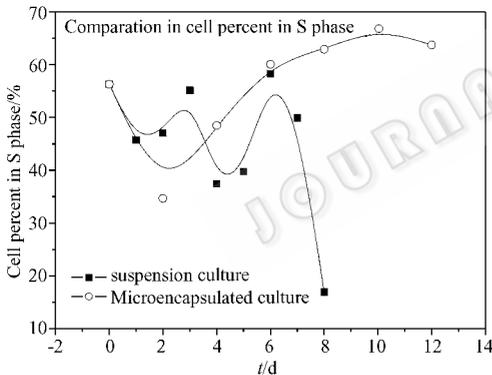


图 3 不同培养方式细胞 S 期百分含量变化情况
Fig. 3 Comparison of cell percent in S phase in free and microencapsulated cultures

3.3 数学模型对活性的拟合结果

本文所建模型主要考虑了底物(葡萄糖)和主要产物(乳酸)对细胞活性的影响。根据实验数据和上述模型,采用多变量函数极小化法进行数据拟合,结果发现,所建模型能够很好地模拟葡萄糖的消耗和乳酸的生成过程,如图 4、图 5 所示。模型计算所得参数值如表 1 所示。

表 1 模型参数计算结果

Table 1 The calculated parameter values from the model

Parameters	Free culture(s^{-1})	Microencapsulated culture(s^{-1})
k_C	0.0417	0.0161
k_A	0.5729	0.5571
k_E	0.0292	0.0089
k_L	0.0568	0.0035

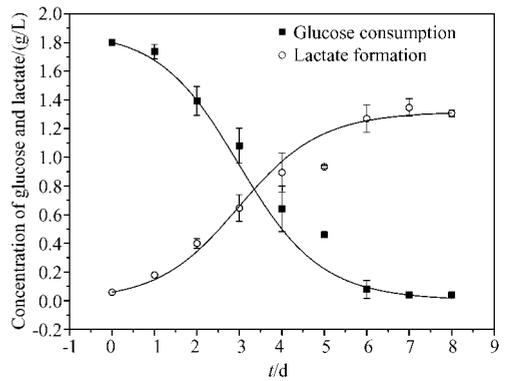


图 4 游离培养过程葡萄糖消耗和乳酸生成模拟结果
Fig. 4 The simulation of glucose consumption and lactate production in suspension culture
Line: calculated curve using the model. Experimental data points: solid square, concentration of glucose; hollow circle, concentration of lactate

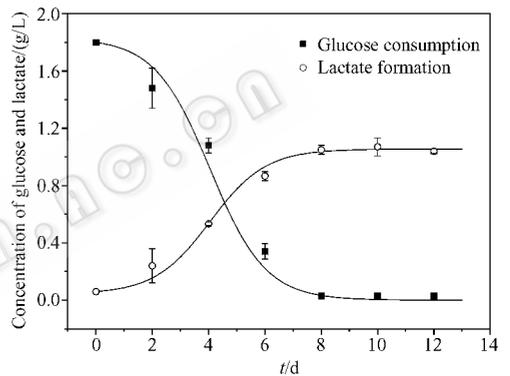


图 5 微囊化培养过程葡萄糖消耗和乳酸生成模拟结果
Fig. 5 The simulation of glucose consumption and lactate production in APA microencapsulated culture
Line: calculated curve using the model. Experimental data points: solid square, concentration of glucose; hollow circle, concentration of lactate

对细胞活性变化的理论计算结果表明,微囊化培养的细胞不但具有较高的细胞活性,且高细胞活性的持续时间较长,而游离培养条件下细胞的活性在第 7 天的时候便开始下降,如图 6 所示。

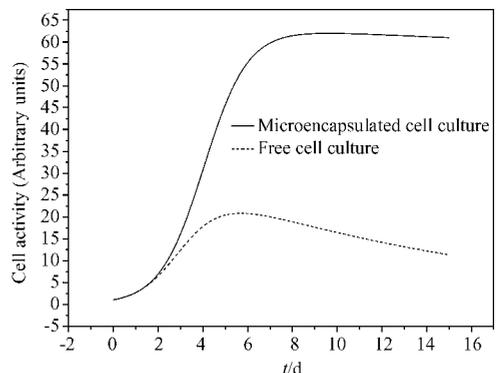


图 6 不同培养方式细胞活性模拟结果
Fig. 6 Simulated results of cell viability by the model in free and microencapsulated cell culture

4 讨论

目前研究表明,动物细胞的大规模培养具有广阔的应用价值与应用范围。从近年来的发展趋势来看,细胞的大规模培养越来越借助于高密度培养的方法而不是单纯依靠培养体积的简单放大。细胞固定化培养如微囊化细胞培养,可以较好的达到高密度的要求^[10],并提供了常规培养所无法得到的许多优势,如细胞保护、环境均一、高活性表达等。因此,考察微囊化培养体系下细胞的增殖和生长代谢特性对应用微囊化技术进行大规模细胞培养具有重要的理论指导意义。

细胞周期各时相的分布是研究细胞增殖动力学的主要指标,细胞周期中最为关键的是 DNA 倍增和染色体复制的 S 期,它的比例反应了细胞群体的增殖能力。本文针对微囊化固定培养细胞的方式,应用流式细胞术比较了游离培养与微囊化培养两种培养体系中细胞 DNA 合成期(S 期)的百分含量变化。APA 微囊化培养的 K562 细胞处于 S 期的百分含量较高,并且这种高 S 期含量的增殖状态较游离培养维持了较长时间,所以微胶囊为细胞的生长提供了稳定温和的环境,有利于细胞长时间保持较高的增殖活性,且微胶囊能保持完整的形态,说明应用微囊化技术能很好的满足动物细胞大规模培养的要求。

葡萄糖为动物细胞培养过程中重要的碳源和能源物质,也是过程优化和控制的主要参数之一。其主要代谢产物为乳酸。乳酸浓度的增加导致了培养液渗透压的增加和 pH 值的下降,因此会抑制细胞正常的生理功能^[14-16]。为减少乳酸的产生,细胞培养过程往往采用葡萄糖限制的方法,以减少乳酸的产生,但过低的葡萄糖浓度又会导致细胞增殖和代谢活性的降低。本文所建模型计算结果表明,游离培养过程中葡萄糖的消耗速率要大于微囊化细胞的消耗速率($k_G^{Free} > k_G^{APA}$)。且葡萄糖对细胞活性的促进作用也大于微囊化培养体系下的促进作用,但两者的差别不大($k_A^{Free} \approx k_A^{APA}$),说明两种培养体系中本文所采用的葡萄糖浓度对细胞的活性影响不明显。两种培养体系中乳酸对葡萄糖的得率系数分别为: $Y_{Lac/ Glu}^{APA} = 0.55g/g$ 和 $Y_{Lac/ Glu}^{Free} = 0.69g/g$,由于两种培养体系最终葡萄糖都能消耗完全,所以游离培养时生成了更高的乳酸浓度,高浓度的乳酸导致了细胞活性的迅速降低,游离培养条件下乳酸对细胞的抑制系数明显大于微囊化培养条件下的结果,如表 1 所示。对细胞活性的理论计算结果表明微囊化培养方

式下由于产生的乳酸较少,所以细胞长时间的维持了较高的增殖活性。细胞数量的测定结果同样表明,微囊化培养的细胞可长时间的维持较高的细胞数量,而游离培养过程细胞达到最大值后,即迅速减少,如图 7 所示。

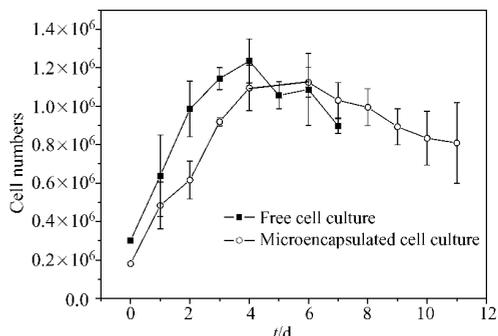


图 7 不同培养方式细胞数量测定结果

Fig. 7 Results of the cell number increase in free and microencapsulated cell cultures

本文中,应用流式细胞术考察的细胞增殖特性和通过细胞代谢拟合的活性变化结果都表明,在微囊化培养体系下细胞具有长期稳定的增殖活性。在生物工程制药中,为了得到更多的目的蛋白,可通过改良细胞、优化培养条件,如提高细胞增殖活性,细胞高密度培养等方法来提高药物的产量。本文的实验结果表明,应用微囊化技术培养杂交瘤细胞,生产单克隆抗体,更容易获得较高的细胞得率,提高细胞对目的产物的表达能力^[17]。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Sciences*, 1980, **210**: 908-909
- [2] O'shea GM, Sun AM. Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. *Journal-American Diabetes Association*, 1986, **35**(8): 943-946
- [3] Sun YL, Ma XJ, Zhou DB *et al.* Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgous monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *The Journal of Clinical Investigation*, 1996, **98**: 1417-1422
- [4] Hortelano G, Al-Hendy A, Ofosu FA *et al.* Delivery of human Factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. *Blood*, 1996, **87**: 5095-5103
- [5] Xu W, Liu L, Charles IG. Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice. *The FASEB Journal*, 2002, **16**: 213-215
- [6] Prakash S, Chang TMS. Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 α cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nature Medicine*, 1996, **2**: 883-

- [7] Bruni S, Chang TMS. Hepatocytes immobilized by microencapsulation in artificial cells : effects of hyperbilirubinemia in guinea rats. *Biomater Artifical Cell and Artifical Organs*, 1989, **17** : 403 - 411
- [8] Orive G, Hernandez RM, Gascon AR *et al.* Cell encapsulation : Promise and progress. *Nature Medicine*, 2003, **9** (1) : 104 - 107
- [9] Dove A, Cell-based therapies go live. *Nature Biotechnology*, 2002, **20** : 339 - 343
- [10] Yu W(于炜婷), Xue WM(薛伟明), Wang W(王为) *et al.* Fabrication of social physico-chemical microenvironment and its application in biomedical fields. *Chinese Bulletin of Life Sciences* (生命科学), 2003, **15** (2) : 104 - 108
- [11] Cao J(曹江), Yang H(杨骅), Wu W(吴伟) *et al.* Study on the effect of allicin on tumor cell cycle using flow cytometry. *Cancer* (癌症), 1996, **15** (6) : 401 - 403
- [12] Guray S, Hikmet AH, Fahri S *et al.* Involvement of protein phosphatase 2A in interferon- γ -induced apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. *Leukemia Research*, 2003, **27** : 709 - 717
- [13] West DC, Sattar A, Kumar S. A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Analytical Biochemistry*, 1985, **147** : 289 - 295
- [14] Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioprocess Engineering*, 1988, **3** : 113 - 122
- [15] Okeson CD, Riley MR. Glutamine replenishment and ammonia removal in hybridoma cell cultures via immobilized glutamine synthetase. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, **9** : 125 - 133
- [16] Ozturk SS, Riley MR, Palsson BO. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, **39** : 418 - 431
- [17] Orive G, Hernandez RM, Gascon AR *et al.* Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, **18** : 23 - 30