

## • 基础研究 •

## APA 微囊低温保存中降温方法的建立

田磊,潘静坤,高宇红,崔忻,薛毅琰

[摘要] 目的 探讨海藻酸钙-多聚赖氨酸-海藻酸钙(APA)微囊低温保存的降温方法。方法 用静电法制作 APA 微囊,分别以程控降温法、冰箱梯度法或直接液氮法降温,最终将 APA 微囊保存于液氮中。复温后,在显微镜下观察 APA 微囊的破损情况,并用荧光标记的葡聚糖检测 APA 微囊膜通透性的变化。结果 程控降温组为微囊完好率( $91.2 \pm 1.57\%$ )、皱缩率( $3.1 \pm 0.81\%$ )、破损率( $5.7 \pm 2.62\%$ );冰箱梯度组为微囊完好率( $85.3 \pm 1.42\%$ )、皱缩率( $5.2 \pm 0.74\%$ )、破损率( $9.5 \pm 3.81\%$ );直接冻存组为微囊完好率( $14.5 \pm 1.57\%$ )、皱缩率( $84.1 \pm 3.47\%$ )、破损率( $1.4 \pm 2.62\%$ )。冻存复温后,各组完好的 APA 微囊膜通透性无改变。结论 程控降温法可较好地低温保存 APA 微囊并维持其通透特性。

[关键词] 海藻酸钙-多聚赖氨酸-海藻酸钙(APA)微囊;低温保存;膜通透性

**Hypothermia Methods Used in Low Temperature Preservation of Alginate Polylysine Alginate Microcapsules** TIAN Lei, PAN Jing-kun, GAO Yu-hong, et al. The Institute of Geriatrics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

**Abstract:** **Objective** To explore the methods of low temperature preservation for alginate-polylysine-alginate (APA) microcapsules. **Methods** APA microcapsules were prepared with static electricity, and underwent hypothermal treatment respectively through methods of program control, gradient by icebox and put in liquid nitrogen directly, finally preserved in liquid nitrogen. The form and permeability of APA microcapsules were checked after rewarming. **Results** The rates of integrity, crenation and damage were ( $91.2 \pm 1.57\%$ ), ( $3.1 \pm 0.81\%$ ) and ( $5.7 \pm 2.62\%$ ) in the program control group; ( $85.3 \pm 1.42\%$ ), ( $5.2 \pm 0.74\%$ ) and ( $9.5 \pm 3.81\%$ ) in the gradient by icebox group; ( $14.5 \pm 1.57\%$ ), ( $84.1 \pm 3.47\%$ ) and ( $1.4 \pm 2.62\%$ ) in the directly put in liquid nitrogen group. The membrane permeability of full APA microcapsules after frozen and rewarming was not changed obviously. **Conclusion** The program control method can preferably preserve APA microcapsules at low temperature and keep them having normal form and permeability.

**Key words:** alginate-polylysine-alginate (APA) microcapsule; low temperature preservation; membrane permeability

[中图分类号] Q813.1 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)06-0487-02

[本文著录格式] 田磊,潘静坤,高宇红,等. APA 微囊低温保存中降温方法的建立[J]. 中国康复理论与实践,2006,12(6): 487-488.

大量研究表明,海藻酸钙-多聚赖氨酸-海藻酸钙(alginate-polylysine-alginate, APA)微囊作为免疫隔离膜包裹异种细胞移植可以有效防止免疫排斥反应发生,但微囊的保存及运输成为制约其广泛应用的一个重要环节。虽然国内有报道对 APA 微囊化细胞进行低温保存,但仍无满意的方法。本研究拟使用不同的降温方法对 APA 微囊进行低温保存,以建立合适的降温程序。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器和试剂** 静电液滴发生器由加拿大 Sun 教授提供;微机控制降温仪由上海理工大学低温生物工程研究所生产;CX500 型广口液氮罐购于美国 TAYLOR-WHARTON 公司;倒置显微镜为日本 OLYMPUS IX-70 型;恒温水浴锅购于常州国华电器公司;DMSO 购于北京化学试剂厂;分子量分别为  $40\text{ K}_\mu$ 、 $71$

$\text{K}_\mu$  和  $167\text{ K}_\mu$  的荧光标记葡聚糖(FD-40、FD-71、FD-167)购于 SIGMA 公司。

**1.2 APA 微囊制备** 按照本组以前报道的方法将  $1.5\%$  的海藻酸钠溶液用静电液滴发生仪喷入氯化钙溶液中,形成微球,再将微球与多聚赖氨酸溶液及海藻酸钙溶液反应,形成 APA 微囊<sup>[1]</sup>。

**1.3 低温保存** 将 APA 微囊加入冻存液(DMEM 培养液+ $10\%$  DMSO),取 APA 微囊悬液  $1.5\text{ ml}$  (约 250 个 APA 微囊)置于  $2\text{ ml}$  冻存管内,分别采用 3 种方法降温:①程控降温:用程控降温仪,以  $-0.5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度,从  $4\text{ }^\circ\text{C}$  降到  $-30\text{ }^\circ\text{C}$ ,再以  $-2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度,降至液氮温度并保存;②冰箱梯度降温:先在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内放置  $1\text{ h}$ 、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内放置  $2\text{ h}$ ,然后移至  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱过夜,再移至液氮中保存;③直接液氮降温:将冻存物直接放入液氮中保存。

**1.4 复温**  $7\text{ d}$  后,将从液氮中取出的冻存管迅速置入  $39\text{ }^\circ\text{C}$  水浴中,轻摇至完全融解。

**1.5 微囊形态观察** 将复温后的 APA 微囊置于生理盐水中,在倒置光学显微镜下观察其形态,并随机挑选 3 个视野,计数完好、皱缩及破损的 APA 微囊数量,计

基金项目:国家 863 计划资助(No. 2002 AA216141)

作者单位:解放军总医院老年医学研究所细胞生物研究室,北京市 100853。作者简介:田磊(1978-),男,河北阜城县人,技师,主要研究方向:生物型人工器官。通讯作者:薛毅琰。

算完好率( =完好数/微囊总数×100%)。分别将各组的 APA 微囊悬液与 FD-40、FD-71、FD-167 液按 9:1 的体积比混合,置于 37℃水浴内 1 h,在荧光显微镜下观察 FD 分子透过微囊膜的情况<sup>[2]</sup>。

2 结果

2.1 三种不同降温方法对低温保存的 APA 微囊形态的影响 冻存前 APA 微囊为圆球形,完好率为

100%。采用三种不同的降温方法低温保存复温后,可见各组均有部分微囊的形态发生改变,出现皱缩或破损(见图 1),但程控降温冻存的 APA 微囊形态完好率最高,直接液氮降温的微囊形态完好率明显低于程控降温 and 冰箱梯度降温(  $P < 0.01$  ),而后两种方法间无显著性差异(  $P > 0.05$  ),见表 1。

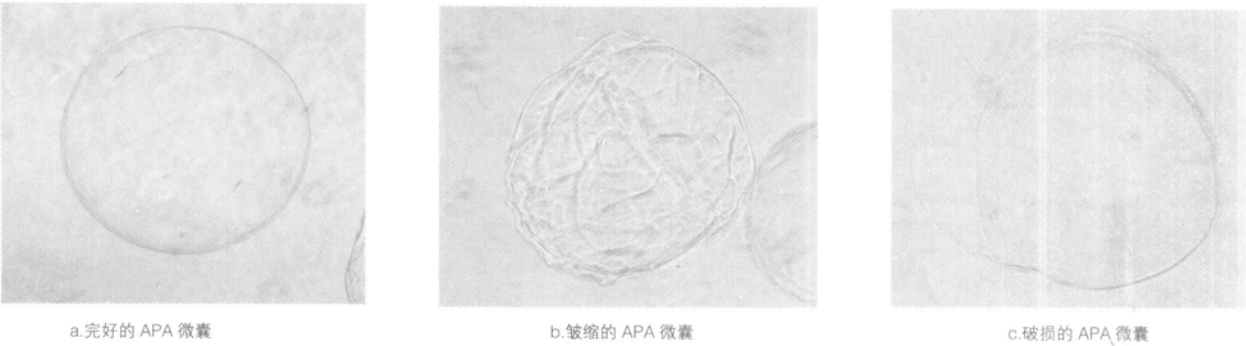


表 1 不同降温方法低温保存后 APA 微囊形态的变化  
[ (  $\bar{x} \pm s$  ) %]

方法	完好率	皱缩率	破损率
程控降温	91.2 ± 1.57	3.1 ± 0.81	5.7 ± 2.62
冰箱梯度降温	85.3 ± 1.42	5.2 ± 0.74	9.5 ± 3.81
直接液氮降温	14.5 ± 1.57 <sup>a</sup>	84.1 ± 3.47 <sup>a</sup>	1.4 ± 2.62 <sup>a</sup>

注:a 与程控降温和冰箱梯度降温比较,  $P < 0.01$ 。

2.2 三种不同降温程序对低温保存的 APA 微囊膜通透性的影响 在低温保存前,荧光显微镜下可见加入 FD-40 的 APA 微囊内外荧光强度相同;加入 FD-71 的 APA 微囊内的荧光强度低于囊外;而加入 FD-167 的 APA 微囊内未见荧光。复温后,形态完好的 APA 微囊的荧光与冻存前相同,而皱缩和破损的 APA 微囊内外荧光强度相同,表明冻存后形态完好的 APA 微囊膜的通透性无改变。

3 讨论

APA 微囊作为一种具有广泛应用前景<sup>[3]</sup>的免疫隔离膜,在本组前期的实验研究中证实具有很高的微囊膜强度及很好的生物相容度<sup>[4]</sup>,用其包裹异种细胞进行移植受到越来越多的人的关注。如何很好地低温保存微囊是影响其能否在临床得到广泛应用的一个重要问题。APA 微囊低温保存的关键步骤是降温 and 复

温,本研究使用程控降温法、冰箱梯度法和直接液氮法三种降温方法对 APA 微囊低温保存。研究结果表明,程控降温法可使 APA 微囊保持较高的完好率,而且 FD 荧光检测显示微囊的通透性在形态完好的基础上未发生改变。但微囊化细胞的低温保存不仅要考虑微囊的形态结构及其膜通透性,也要求保持微囊内细胞的生物活性和功能<sup>[5]</sup>,所以,应该从低温保存的方法及冻存保护液的成分两方面同时着手。另外,微囊制备过程的规范化与合格化也同样重要。

[参考文献]

[1] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islet as bioartificial endocrine pancreas[ J ]. Science, 1980, 210: 908—910.  
[2] 罗芸,薛毅珑,李崇辉. APA 微囊免疫隔离效应的体外测定[ J ]. 军医进修学报, 2003, 24(2): 93—95.  
[3] Sun AM. 包裹生物细胞的临床应用前景[ J ]. 普外临床, 1997, 12(2): 78—80.  
[4] 李新建,薛毅珑,罗芸. 海藻酸盐-多聚赖氨酸-海藻酸盐微胶囊膜的强度和生物相容度测定[ J ]. 军医进修学院学报, 2001, 22(2): 94—96.  
[5] 李学敏,李涛. 微囊牛肾上腺髓质细胞的冻存及其活性评价[ J ]. 生物医学工程与临床, 2003, 7(1): 7—9.

(收稿日期:2006-04-24)