

移植用微囊化神经细胞/组织制备及运输的实验研究

雄鹰 于炜婷 王为 马小军 陈绍宗

[摘要] 目的 探讨海藻酸钠/聚赖氨酸(APA)微胶囊用于神经细胞/组织移植的可行性。方法 使用大功率高压脉冲微胶囊制备仪制备 APA 微胶囊,包埋分离自大鼠周围神经的神经细胞/组织;应用 ELISA 双抗体夹心法检测微囊化神经细胞/组织培养液中神经生长因子(NGF)的浓度。结果 包埋神经细胞/组织的 APA 微胶囊在培养后及经过一定时间的空运后,囊内的神经细胞/组织正常生存并保持分泌神经生长因子的功能。结论 微囊化的神经细胞/组织可以在体外培养和运输,并可分泌 NGF。

[关键词] 微胶囊;神经生长因子;细胞移植

Experimental study of microencapsulated nerve cell/ tissue for transplantation XIONG Ying, YU Wei ting, WANG Wei, et al. Biochemical Engineering Department, DaLian Institute of Chemical Physics, DaLian 116023, Shandong, China

[Abstract] Objective To investigate the feasibility of poly-Lysine to preparation microencapsules for cell transplantation therapies. Methods Using drop generative technique preparation Alginate-poly-Lysine-Alginate (APA) microencapsules containing nerve cell/tissue. The concentration of nerve growth factor in supernatant was detected by two-antibody sandwich method of enzyme-linked immunosorbent assay. Results The nerve cell/tissue in microencapsules retain reliable cell viability and function. Conclusions The APA is proved with reliable biocompatibility and strength, would work as an immunoisolation tools to exert important function in nerve renovate.

[Key words] microencapsules; nerve growth factor; cell transplantation

中图分类号:R318.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2002)05-0296-02

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)能促进中枢及外周神经系统的发育与分化,维持神经系统的正常功能,并可以加快神经系统损伤后的修复^[1]。但其临床大规模应用,目前受到许多问题的限制。首先,重组人 NGF 虽已在哺乳类动物和昆虫细胞获得成功表达,但价格过于昂贵;其次,NGF 的本质是蛋白质,生物半衰期短,需要反复给药,而采用口服的方式,在胃肠道可以被蛋白水解酶降解;另外,NGF 不能通过血脑屏障,需要脑室或腰椎穿刺注射给药,既不方便,又不安全。因此,移植能分泌 NGF 的神经细胞/组织,是克服现有治疗方法局限性最有希望的途径。本研究用聚赖氨酸和海藻酸钠制备微胶囊并包埋神经细胞/组织,观察神经细胞/组织在微胶囊存活、增殖及 NGF 的分泌情况,考察长时间运输对微囊化神经细胞/组织的影响。

1 材料与仪器

1.1 药品 海藻酸钠(大连化学试剂厂);聚赖氨酸(Gibco 公司);一抗:羊抗大鼠 NGF 抗体(Sigma 公

司);二抗:兔抗羊,HRP 标记(晶美生物工程公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 注射器泵(Razel Scientific Instruments Inc., 美国),大功率高压脉冲微胶囊制备仪(本实验室研制),酶标仪(BIO-RAD 550 型,美国)。

1.3 动物 健康雄性 SD 幼鼠,体重在 120—125 克(大连医科大学实验动物中心)。

2 方法

2.1 神经细胞/组织分离 乙醚麻醉 SD 幼鼠,常规碘酒酒精浸泡消毒 30 min。置幼鼠于含解剖用 D 液玻皿中,玻皿下放冰袋。尽量多切取 SD 幼鼠的坐骨神经,取下的神经置 4℃解剖用 D 液中。解剖显微镜下剥除神经外膜和神经束膜,用锋利手术剪刀剪成 0.1 mm³ 左右的神经组织小块,加入消化液 20 ml, 37℃消化 30 min,用 DME M10% FCS 终止消化。用 50 目细胞筛过滤后,800 rpm 离心 5 min,弃去上清。

2.2 神经细胞/组织微囊化 将神经细胞/组织重新悬浮在过滤除菌的海藻酸钠溶液中。海藻酸钠-神经细胞/组织悬浮液通过注射器泵的针头滴出,通过大功率高压脉冲微胶囊制备仪剪切注射器泵滴出的液滴,并控制其粒径。海藻酸钠-神经细胞/组织液滴在氯化钙溶液中凝胶化,形成海藻酸钙-神经细胞/组织胶珠;将海藻酸钙-神经细胞/组织胶珠悬浮在过滤除菌的聚赖氨酸溶液中,聚赖氨酸与海藻酸钙发生发生聚电解质络合反应成膜,形成包埋神经细胞/组织的聚赖氨酸

基金项目:中国科学院特别资助项目(STZ-00-08);

科学院创新工程项目(KSCX2-3-03)。

作者单位:1. 116023 大连市,中国科学院大连化学物理研究所生物技术部生物医用材料工程组(雄鹰、于炜婷、王为、马小军);2. 710038 西安市,第四军医大学唐都医院整形外科(陈绍宗)。作者简介:雄鹰(1960-),女,博士后,研究方向:组织细胞移植用微胶囊的制备;马小军(1958-),男,研究员,主要研究方向:生物医用材料与人工器官。

/海藻酸钠(APA) 微胶囊。用生理盐水洗去残渣,再浸入海藻酸钠溶液形成又一层海藻酸钠外衣,然后使微胶囊的中心部分再液化。制成的微胶囊,贮存于 40℃ 待实验用^[2]。

2.3 微囊化神经细胞/组织培养 1640 培养液(Gibco 公司),含 10% 小牛血清(三利生物制品厂),双抗。微囊化的神经/组织细胞在培养瓶中悬浮生长,在 37℃ 饱和温度,5% CO₂ 孵箱中培养,2—3 天换液一次。

2.4 光镜下观察各过程中神经形态,双抗体夹心法测定 NGF 浓度,严格按说明书操作测定。

3 结果

3.1 神经细胞/组织 经过机械修剪和酶消化的周围神经,除去结缔组织,一部分成为神经细胞团,一部分成为神经单纤维。由于部分神经组织仍然保留原有的细胞及细胞间的结构,不影响或轻微影响原有的功能。

3.2 微囊化的神经细胞/组织 微囊化后的神经细胞/组织包裹在 APA 微胶囊内,神经细胞部分分散,部分聚集;神经组织形成团块状。APA 微胶囊的直径在 200—300μm 之间。将微囊化的神经细胞/组织移植到实验性大鼠周围神经损伤的局部,1 月后回收,得到了形态完整的微胶囊。

3.3 APA 微胶囊制备过程对神经细胞/组织活性的影响 对新鲜制备的微囊化的神经细胞/组织的培养液进行检测,有 NGF 分泌,表明微胶囊的制备过程接近细胞生存的生理环境,不影响细胞的活性和功能。

3.4 微空间对神经细胞/组织活性的影响 对微囊化的神经细胞/组织培养 9 天后的培养液进行了检测,有 NGF 分泌,表明神经细胞/组织微囊化后,生长空间的变化不影响活性。

3.5 长时间运输对神经细胞/组织活性的影响 对经过 3 天从大连空运到西安后再培养的微囊化的神经细胞/组织培养液的检测发现,仍然有 NGF 分泌。

4 讨论

神经修复的一个重要问题,是要创造一个能为受损神经的再生修复提供充分营养的“微环境”。

雪旺细胞可分泌多种神经营养因子,在神经再生和修复中起着非常重要作用^[3,4]。神经纤维受损时,可以激活处于静止期的雪旺细胞,分泌 GNF 及其他神经营养因子,并促进神经再生修复所需的各种营养成分汇聚,为神经纤维修复提供一个合适的微环境^[5]。虽然通过细胞培养的方法,可获得高纯度及长生存期的雪旺细胞,但过程较繁琐。同时,未作特殊处理的异体神经移植因为免疫排斥作用未能达到预期效果。

微囊化技术的基本原理是利用化学的方法包埋移植用细胞^[2]。微胶囊为囊内的细胞提供了一个免疫保护的微环境,可免受宿主免疫系统的攻击,保证生存并

分泌治疗性物质。在细胞移植治疗周围神经损伤中使用微囊化技术,不仅可以不使用免疫抑制剂,而且扩大了移植用周围神经的来源。

海藻酸钠与聚赖氨酸制备微胶囊的原理是两种高分子发生聚电解质络合反应的过程,反应条件十分温和,有利于细胞活性的保持。由于细胞移植后要在宿主体内长期生存,要求微胶囊必须具有良好的生物相容性和机械强度。海藻酸钠是从海洋的褐藻中提取的直链阴离子多糖,生物相容性好;而聚赖氨酸具有良好的机械强度,同时也有较好的生物相容,已被证实是理想的制备微胶囊的材料。

培养雪旺细胞的材料来源目前多数取自动物的坐骨神经,腓神经或脊神经及人的浅表神经。我们将剥除结缔组织及血管后的大鼠的坐骨神经,修剪成 0.1 mm³ 大小。然后用 APA 微胶囊包埋。这样,尽可能多地保留了雪旺细胞,尽可能少地破坏雪旺细胞的原有结构和与其他细胞的联系,可以使雪旺细胞保持原有的功能,移植后在局部发挥作用。

虽然细胞被包埋在微胶囊,生存条件发生变化,生存空间和营养物质是有限的,但由于微胶囊膜允许小分子物质进出,使囊内细胞生长需要的营养物质可以进入,代谢产生的废物可以排出;同时,周围神经的雪旺细胞增殖速度相对较慢,使得囊内的细胞有相对充足的生长空间,可以正常生存。

我们制备的微囊化的神经细胞/组织,在连续培养的情况下和长时间运输后仍然可以检测到其分泌的 NGF;于移植 1 个月后回收,可以得到形态完整的微胶囊,保证了微囊化的神经细胞/组织移植后,可以在局部持续分泌 NGF,为神经纤维修复提供一个合适的微环境,有可能在周围损伤的治疗中,发挥一定的作用。

[参考文献]

- [1] Pellitteri R, Zicca A, Mancardi GL. Schwann cell-derived factors support serotonergic neuron survival and promote neurite outgrowth[J]. Eur J Histochem, 2001, 45(4): 367—76.
- [2] 马小军,何洋,雄鹰.组织细胞移植用生物微胶囊技术介绍[J].中华整形外科杂志, 2000, 16(5): 2.
- [3] Pang QJ, Luo YX, Wu YG, et al. Experimental studies on peripheral nerve regeneration enhanced by nerve growth factor[J]. J Tongji Med Univ, 1993, 13(1): 34—9.
- [4] Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, et al. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system[J]. J Neurosci Methods, 1998, 85(1): 119—27.
- [5] Fang H, Luo Y. Effects of nerve growth factor on axonal retrograde transport after axonal injury of motoneurons[J]. J Tongji Med Univ, 1996, 16(1): 27—31.

(收稿日期:2002-03-28)