

# 微囊固定化东北红豆杉细胞的生长与代谢

孙祺, 葛志强, 元英进

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

**摘要:**通过对海藻酸钠-壳聚糖液芯、固芯胶囊包埋的东北红豆杉细胞生长与代谢的比较研究,发现液芯胶囊包埋的细胞存活率大于固芯胶囊,对糖类营养物质的吸收好于固芯胶囊,更有利于包埋细胞的初生代谢.同时发现,海藻酸钠-壳聚糖固芯、液芯胶囊包埋均利于次级代谢产物等胞内物质向胞外释放,尤其是液芯胶囊的促释作用更为明显,且其酚类物质合成与分泌增多.结果表明,液芯胶囊包埋植物细胞是一种较为理想的微囊固定化植物细胞的方法.

**关键词:**固定化;东北红豆杉细胞;细胞生长;细胞代谢

中图分类号:Q942 文献标识码:A 文章编号:1009-606X(2004)04-0320-05

## 1 前言

细胞微囊化是细胞固定化的一种方式,具有固定化的各种优点,如增加细胞密度、利于细胞团组织分化、防止细胞变异等<sup>[1,2]</sup>.但微囊化使细胞处于与外部相对隔离的状态,物质在微胶囊的传递过程包括微胶囊跨膜的传递和微胶囊内的传递两部分,传质阻力较大,一定程度上限制了外部营养的输入和内部代谢废物输出,可能对细胞造成不利影响<sup>[3,4]</sup>.为此,研究者一般从选择包埋材料、添加剂、调整包埋量等方面进行改进.Orive等<sup>[5]</sup>在动物细胞移植研究中采用海藻酸钠-琼脂糖囊芯液化微胶囊包埋杂种细胞,改善了细胞的传质状况,明显提高了细胞活力;陈益清等<sup>[6]</sup>在废水净化处理中,采用海藻酸钠-壳聚糖囊芯液化微胶囊,增加了有效吸收空间,大大提高了废水处理的效率,而在植物细胞固定化研究中应用胶囊芯液化的方法还未见报道.本研究以海藻酸钠-壳聚糖为微囊材料制成液芯胶囊包埋东北红豆杉细胞,通过与传统的固芯胶囊包埋法的对照,以期进一步认识不同方式包埋对红豆杉细胞生长与代谢的影响.

## 2 材料和方法

### 2.1 细胞系与维护

实验采用的细胞株系是本实验室从东北红豆杉幼茎诱导的东北红豆杉细胞(*Taxus cuspidata*).细胞在盛有100 ml改良B5培养液[含萘乙酸(NAA) 2 mg/L, 6-苄基-嘌呤(6-BA) 0.5 mg/L、酸水解酪蛋白(CA) 1 g/L、蔗糖 30 g/L]的250 ml摇瓶中,于25°C温度下以110 r/min转速于黑暗处培养.10~12 d继代1次.

### 2.2 微胶囊的制备与培养

#### 2.2.1 固芯胶囊实验

取处于指数生长期(培养第8 d)的细胞与由B5培养基配制的20 g/L海藻酸钠(中国医药集团上海化学试剂公司)溶液混合;用注射器将混合液滴入10 g/L氯化钙溶液中,在摇床上振摇30 min;

收稿日期:2003-08-25, 修回日期:2003-11-10

基金项目:国家自然科学基金重点基金资助项目(编号:20236040)

作者简介:孙祺(1976-),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士研究生,生物化工专业;元英进,通讯联系人, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn.

用 7.5 g/L 的生理盐水清洗 2 次后, 转入 2 g/L 壳聚糖(脱乙酰度 85%, Sigma 公司)溶液中, 振摇 30 min; 用 750 g/L 的生理盐水清洗 2 次。制得的微囊包埋密度 60 g/L, 球形度、均一性较好, 粒径为 2.8~3.0 mm。取 200 个微囊接种于装有 50 ml 新鲜培养液的 250 ml 摇瓶中, 25°C 黑暗条件下, 在 110 r/min 的摇床上悬浮培养。每隔 2 d 取样 1 次, 测定相应指标。

### 2.2.2 液芯胶囊实验

同前, 先制成固芯胶囊, 然后将其放入 5 g/L 柠檬酸三钠溶液中, 静置 30 min 使囊芯溶解, 用 7.5 g/L 的生理盐水清洗 2 次后, 取 200 个微囊接种于装有 50 ml 新鲜培养液的 250 ml 摇瓶中, 25°C 黑暗条件下, 在 110 r/min 的摇床上悬浮培养。取样时间和测定指标同固芯微囊。

### 2.3 细胞存活率的测定

取若干胶囊, 以 0.5 mg/ml MTT(购自 Sigma 公司)染液 100 ml 染色 6 h, 活细胞内存在大量紫色颗粒, 死亡细胞则没有<sup>[7]</sup>。将胶囊切片, 在光学显微镜下计数 500 个细胞, 计算紫色细胞所占比率以表征细胞存活率。

### 2.4 培养液蔗糖含量及电导率的测定

采用蒽酮法<sup>[8]</sup>。取 1 ml 待测液加入 4 ml 蒽酮试剂, 混匀后沸水浴中反应 10 min, 于 625 nm 处测其吸光度(OD)。从标准曲线中查出蔗糖含量。电导率采用 DDS-307 型电导率仪测定。

### 2.5 胞外酚的测定

将待测液抽滤, 取滤液 5 ml, 再加入 10 ml 乙酸乙酯, 超声振荡 25 min 后, 静置 2 h, 取上层的乙酸乙酯相 5 ml, 自然风干, 加 75% 的乙醇 3 ml 溶解, 并以 75% 的乙醇为对照样, 在 280 nm 下测定吸光度<sup>[9]</sup>。

### 2.6 淀粉-碘化钾染色

取若干个微囊, 用 pH 5.8 的 PBS 冲洗 3 次, 加入 100 ml 的 KI-I<sub>2</sub> 染液(含 I<sub>2</sub> 和 KI 各 1%), 室温下静置 6 h, 切片, 在普通光学显微镜(Nikon, E-800 型)下观察照像。

## 3 结果与讨论

### 3.1 固定化细胞存活率变化

如图 1, 包埋后固芯胶囊与液芯胶囊中细胞存活率随培养时间逐渐下降。液芯胶囊前 6 d 变化较平稳; 第 6 d 后下降加快; 第 14 d 以后下降的过程又趋缓。固芯胶囊细胞存活率在前 4 d 下降很快, 培养后期先于液芯胶囊趋近于 0 点。而悬浮培养的细胞存活率则始终较高, 下降过程相对平稳。

为实现较好的生物相容性, 本实验使用的海藻酸钠溶液由 B5 培养基配制。因此在包埋后的一段时间, 液芯胶囊细胞有比较充足的营养供应, 利于细胞的生长和活力的保持。但当胶囊材料中的营养成分逐渐耗尽, 细胞不得不从培养液中获取时, 传质成为限制性因素, 使细胞存活率显著下降。对于固芯胶囊, 可能因为传质阻力, 特别是氧气只能在距胶囊表面一定深度内传递<sup>[4]</sup>, 所以固芯胶囊包埋的细胞在培养初期存活率即较低。而在培养过程中液芯胶囊细胞存活率一直高于固芯胶囊, 除了液芯胶囊传质阻力较小的原因外, 还可能因为液芯胶囊对内部细胞束缚少, 有利于细胞生长<sup>[5]</sup>。总体上, 液芯胶囊比固芯胶囊更好地维持了细胞存活率。

### 3.2 培养液蔗糖含量与细胞淀粉粒的变化

如图 2, 培养前期胶囊培养液蔗糖明显减少, 第 8 d 后蔗糖含量变化趋缓, 同期悬浮培养细胞的培养液蔗糖则继续明显减少。整个培养过程中, 固芯胶囊比液芯胶囊培养液蔗糖含量高, 悬浮培养液蔗糖则最少。

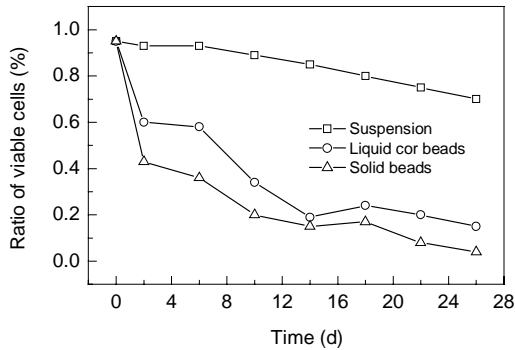


图1 细胞存活率随时间的变化

Fig.1 Change of viable cell ratio

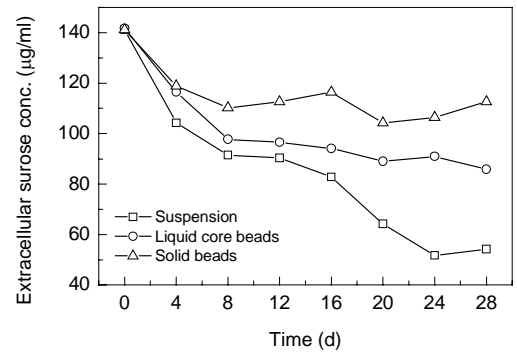


图2 可溶性总糖随时间的变化

Fig.2 Change of sucrose in medium

蔗糖是细胞生长的主要碳源,细胞对糖类物质吸收与代谢活力密切相关.固芯胶囊由于外层包裹了密实的壳聚糖,内部是海藻酸钙固体,使营养物质的传输阻力大,活细胞较少,故培养液中糖含量变化不显著.液芯胶囊传质阻力较小,活细胞数量多,不断吸收糖类等营养物质,培养液中糖含量迅速减少.

图3是接种后第8d经KI-I<sub>2</sub>染色所示胞内淀粉的变化.在普通悬浮细胞中,淀粉颗粒不多,直径不大,多以小斑点形式存在,细胞质颜色较浅[图3(a)];而在固芯胶囊中,细胞内淀粉颗粒多,直径大,以很多小斑点甚至聚集成大的块状存在,细胞质颜色较暗[图3(b)];液芯胶囊中细胞淀粉颗粒则处于两者之间,约一半的细胞有小的斑点,细胞质为浅黄色[图3(c)].



(a) In suspension culture

(b) In solid beads

(c) In liquid core beads

图3 KI-I<sub>2</sub>染色细胞Fig.3 Cells stained by KI-I<sub>2</sub> (after 8 d)

红豆杉细胞体系中碳源代谢是以胞内淀粉变化为核心的. Chang等<sup>[10]</sup>认为细胞先利用培养液中的糖(葡萄糖和果糖),然后是胞内可溶性糖,最后是胞内可溶性淀粉.悬浮培养的细胞生长状况良好,代谢旺盛,所以不仅利用培养液中的糖,也利用胞内可溶性糖和淀粉,故胞内淀粉粒较少.液芯胶囊内细胞则多一些,固芯胶囊内细胞代谢缓慢,因而淀粉颗粒多且显著;Charleta等<sup>[11]</sup>在添加海藻酸钠时发现其浓度高可导致胞内细胞器聚集、淀粉颗粒明显增多,不利于细胞生长,说明淀粉颗粒与细胞逆境相关联.本实验中胶囊包埋是对细胞的一种胁迫,液芯胶囊的胁迫强度明显比固芯胶囊低.

### 3.3 培养液电导率的变化

如图4,液芯胶囊包埋后培养液中电导率即一直处于比固芯胶囊高的水平,两者均随培养时间呈现上升趋势.而悬浮细胞的培养液电导率则总体呈现下降趋势.

电导率反映了细胞所处的培养液中离子的总量。而细胞外离子一部分是作为营养的初始培养液成分，随细胞生长而相应降低；另一部分是细胞通透性改变导致胞内离子向外分泌，随细胞生长而相应增大。培养液电导率受这两个趋势相反的因素共同作用。因此，悬浮培养的细胞由于营养的消耗，培养液中的电导率呈现下降的趋势。固芯胶囊的胞外电导率持续升高可能是由于包埋对细胞造成刺激作用，改变了细胞膜的通透性<sup>[12]</sup>，导致胞内离子等物质外泄，培养液电导率不断上升。液芯胶囊培养液电导率高可能是因为细胞可以在液芯胶囊中运动，直接接触到壳聚糖膜。而壳聚糖带有多个正电荷，能改变细胞膜表面的电位差，使其产生动作电位，有利于胞内物质释放<sup>[13]</sup>。此外，液芯胶囊的制备过程中囊芯液化使用了二价阳离子螯合剂柠檬酸三钠，可能阻止了二价阳离子与细胞膜的结合，而二价阳离子由于可减弱细胞膜上离子中心间的静电斥力而具有稳定细胞膜的作用，故柠檬酸三钠的加入使细胞膜稳定性降低，通透性增加<sup>[14]</sup>。这两方面都利于细胞膜通透性提高。故液芯胶囊比固芯胶囊对细胞内物质有更大的促释作用。

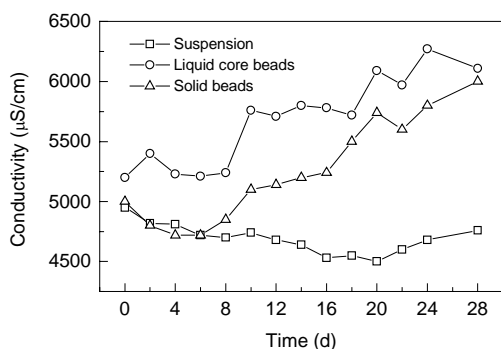


图4 电导率随时间的变化

Fig.4 Change of conductivity

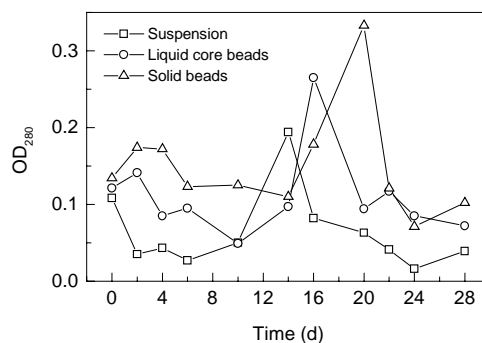


图5 酚随时间的变化

Fig.5 Change of extracellular phenolics

### 3.4 培养液酚含量的变化

如图5，培养初期液芯胶囊与固芯胶囊胞外酚含量均比较高，随后略有减少。第16d液芯胶囊胞外酚含量达到最高，而固芯胶囊在第20d也达到最高。此后两者均下降。两种胶囊包埋的方式均产生比悬浮细胞高的酚积累。

酚类是细胞受到外界环境胁迫时所产生的一种防御性次生代谢产物，有利于细胞壁木质素的沉积、合成相关次生代谢产物。初始酚含量较高是因为细胞刚被包埋时处于逆境，受到环境胁迫，促进了酚的合成。随着细胞对环境的适应，酚合成下降。当细胞处于停滞期时，次生代谢产物大量积累，使酚含量再次上升，从而出现峰值。悬浮培养、液芯胶囊、固芯胶囊依次出现峰值，表明它们的停滞期依次延长，也正是很多研究者发现固定化包埋导致细胞生长延缓的现象之一<sup>[15,16]</sup>。固芯胶囊由于传质不利、细胞生长缓慢，故其峰值出现最晚，但含量最高。液芯胶囊胞外酚含量也较高，虽然它受到的包埋刺激作用较固芯胶囊小，但另有两个可能的原因促进其酚的合成与分泌，一是壳聚糖具有诱导次生代谢产物的能力<sup>[17]</sup>，液芯胶囊中细胞可以直接接触到壳聚糖膜，所以有更多机会受到刺激。二是由于直接接触壳聚糖膜而造成细胞通透性变大，利于向胞外释放物质。从以上分析可见，液芯胶囊较悬浮培养更能促进酚类等次生代谢产物的合成与分泌。

## 4 结论

(1) 微囊化比悬浮存活率低，代谢缓慢；而液芯胶囊比固芯胶囊保持了较高的细胞存活率和代谢能力，对糖类营养物质的吸收较好，比固芯胶囊更有利于包埋细胞的初生代谢。细胞内淀粉粒

在固芯胶囊、液芯胶囊、普通悬浮培养中依次减少。

(2) 海藻酸钠-壳聚糖固芯、液芯胶囊包埋均比悬浮利于次级代谢产物等胞内物质向胞外释放,尤其是液芯胶囊的促释作用更为明显,因而其酚类物质合成与分泌增多。

参考文献:

- [1] Anderson L A, Berlin J, Lambe C A. Plant Cell Culture [M]. Berlin: Eidelberg Springer-Verlag, 1985. 37-58.
- [2] Brodelius P. Immobilized Plant Cells Preparation and Biosynthetic Capacity [A]. Woodward J. Immobilized Cells and Enzymes a Practical Approach [C]. Oxford: IRL, 1985. 127-145.
- [3] Lahooti S, Sefton V M. Effect of an Immobilization Matrix and Capsule Membrane Permeability on the Viability of Encapsulated HEK Cells [J]. Biomaterials, 2000, 21: 987-995.
- [4] Orive G, Hernandez R M, Gascon A R. Survival of Different Cell Lines in Alginate-Agarose Microcapsules [J]. Eur. J. Pharm. Sci., 2003, 18: 23-30.
- [5] Shinmyo A, Kimura H, Okada H. Physiology of  $\alpha$ -Amlase Production by Immobilized Bacillus Amyloliquefaciens [J]. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1982, 14: 7-12.
- [6] 陈益清,孙多先,孙绵方. ACA 离子取代凝胶多价离子置换性能研究 [J]. 高分子材料科学与工程, 2002, 18(6): 133-136.
- [7] 葛志强,元英进,李景川. 一种研究和鉴别悬浮培养红豆杉细胞凋亡与坏死的新方法 [J]. 植物生理学报, 2001, 27(3): 231-234.
- [8] 李健武,余瑞元,袁明秀. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1997. 131.
- [9] Anderson A J, Roger K, Teeper C S. Timing of Molecular Events Following Elicitor Treatment of Plant Cells [J]. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1991, 38(1): 1-13.
- [10] Chang C P, Yamamoto T, Kimura M. Release Characteristics of an Azo Dye from Poly(ureaurethane) [J]. Microcapsules J. Control. Release, 2003, (86): 207-211.
- [11] Charlet S, Gillet F, Villarreal M L. Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* Plant Cells within Ca-alginate Gel Beads to Produce an Antimycotic Spirostanol Saponin [J]. Plant Physiol. Biochem., 2000, 38: 875-880.
- [12] Kewwwloh H, Heipieper H J, Rehm H J. Phenol Tolerance of Immobilized Bacteria [A]. Bont JAM De, et al. Physiology of Immobilized Cells [C]. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1990. 212-223.
- [13] 杨玉敏,元英进,胡宗定. 化学法研究长春花细胞胞内产物释放行为 [J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(2): 1-7.
- [14] Shin S C, Lee H J. Controlled Release of Triprolidine Using Ethylene-vinyl Acetate Membrane and Matrix Systems [J]. Eur. J. Pharma. Biopharma [J]. 2002, 54: 201-206.
- [15] Mevy J P, Rabier J, Quinsac A. Sucrose Metabolism and Indoleglucosinolate Production of Immobilized Horseradish Cells [J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 1999, 57: 163-171.
- [16] Lindsey K, Yeoman M M, Black G M. A Novel Methods for the Immobilization and Culture of Plant Cells [J]. FEBS Lett., 1983, 155: 143-149.
- [17] Zhang C H, Mei X G, Liu L. Enhanced Paclitaxel Production Induced by the Combination of Elicitors in Cell Suspension Cultures of *Taxus chinensis* [J]. Biotechnol Lett., 2000, 22: 1561-1564.

## Growth and Metabolism of *Taxus cuspidata* Immobilized in Microcapsule

SUN Qi, GE Zhi-qiang, YUAN Ying-jin

(Dept. Pharm. Eng., Sch. Chem. Eng. & Technol., Tianjin Univ., Tianjin 300072, China)

**Abstract:** Alginate-chitosan beads with liquid cores as a novel carrier was introduced to immobilize *Taxus cuspidata* cells in this work. Physiology of *Taxus cuspidata* cells enclosed in alginate-chitosan liquid or solid core beads were investigated. It was found that the cell viability was greater in liquid core beads than in solid ones. Liquid core beads enhance the absorption of sucrose and cell metabolism. Intracellular starch granules became gradually less according to the order of solid beads, liquid core beads and suspension. Both alginate-chitosan liquid core and solid core beads improved cell permeability, especially liquid core beads. This benefited the release of secondary metabolite and other intracellular substances into the culture medium. The synthesis and secretion of phenolics increased. Overall, the growth and metabolism of *Taxus cuspidata* cells encapsulated in alginate-chitosan liquid core beads were improved than in solid beads. The results show that liquid core beads is a better carrier for plant cell immobilization.

**Key words:** immobilization; *Taxus cuspidata* cell; cell growth; cell metabolism