http://pmse.scu.edu.cn

开放大孔海藻酸微球的制备及三维细胞培养应用

陈思珂，巨晓洁
（四川大学 化学工程学院，四川 成都 610065）

摘要：开放大孔微球能够帮助细胞-细胞和细胞-细胞外基质相互作用的形成，适合作为三维细胞培养支架。采用微流控技术和在线紫外引发交联法制备得到尺寸均一、大小可控的甲基丙烯酰化海藻酸（AlgMA）微球，利用冷冻干燥制孔法得到具有开放大孔的AlgMA微球。系统研究了内/外相流速比的变化和AlgMA浓度对微球尺寸、形貌和稳定性的影响，并以人肝癌细胞HepG2作为模型细胞，系统考察了AlgMA微球对细胞活性和增殖的影响。结果表明，当AlgMA质量分数为10 %时，微球的复溶胀性能和孔洞结构最好，分别培养HepG2细胞24 h，48 h和72 h后，细胞活性均在85%以上，培养48 h和72 h后，相较于前一天细胞数量分别倍增了1.24倍和1.76倍。该研究工作为开放大孔海藻酸微球的制备提供了新方法。

关键词：开放大孔微球；海藻酸微球；三维细胞培养；甲基丙烯酰化海藻酸；肝癌细胞
中图分类号：Q813.1+1 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-7555（2023）08-0126-08

三维细胞培养是一种广泛使用的使细胞成自然态培养的方法[1]，将细胞与具有三维结构的载体在体外的三维立体空间中培养，使其进行生长、增殖和迁移活动，为药物筛选[2,3]、疾病治疗[4,5]和组织工程[6,7]等提供了重要的平台。早在1980年，海藻酸凝胶就被用于活细胞培养[8]。由于其良好的生物相容性和生物可降解性，被广泛用于三维支架材料。另外，大孔凝胶微球由于其孔道结构能够帮助细胞-细胞和细胞-细胞外基质相互作用的形成[9]，同时体积比传统大孔支架更小，所以适合作为细胞培养支架。但是由于海藻酸与Ca^{2+}交联速度过快，导致海藻酸大孔凝胶微球无法获得开放性孔洞[10,11]，进而导致细胞代谢物无法排出。因此，制备具有开放大孔结构的海藻酸凝胶球对于三维细胞培养具有重要意义。

2012年，Liu等[12]将分散有细胞的海藻酸溶液填充在模具中，凝胶化制备得到包封人脐带间充质干细胞（hUCMSCs）的海藻酸凝胶，对比传统包封细胞的凝胶，该方法提高了细胞活存率。2020年，Amini等[13]利用电喷雾法制备包封大鼠心肌母细胞（H9C2）的海藻酸微球。此种方法能够诱导细胞功能性生物活性，有助于提高靶组织细胞移植效率。目前，关于海藻酸凝胶微球的研究较为广泛，但是仍然存在离子交联得到的凝胶内部交联程度不均一，凝胶球尺寸过大不利于营养物质输送等问题。为了克服这些缺点，选用烯烃双键改性的甲基丙烯酰化海藻酸（AlgMA）作为支架材料，光交联制备的凝胶球结构更加均一；采用微流控技术制备的微球尺寸分布较为集中。由于光交联过程中引发剂会释放对细胞有高毒性的自由基，过量紫外照射也会影响细胞存活率，所以在制备得到支架之后再负载细胞。

本文利用同轴流动微流控技术结合紫外交联法和冷冻干燥制孔法制备了开放大孔AlgMA微球。将人肝癌（HepG2）细胞悬浮液滴加到AlgMA微球上，细胞吸附在微球表面孔洞，逐渐聚集成球状体。微球的开放大孔结构能够为细胞提供生物相容性好、便于细胞球状体培养和转移的载体，为体外细胞培养和疾病模型的建立提供了一种新想法。

doi:10.16865/j.cnki.1000-7555.2023.0172
收稿日期：2023-05-05
基金项目：国家自然科学基金资助项目（22078202）
通讯联系人：巨晓洁，主要从事智能化控制释放与靶向式药物送达系统研究，E-mail：juxiaojie@scu.edu.cn

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

甲基丙烯酰化海藻酸钠（AlgMA，取代度为30%）和光引发剂（LAP）：苏州永沁泉智能设备有限公司；大豆油：食品级，中粮集团有限公司；正己烷、异丙醇、75%乙醇和无水乙醇：分析纯，成都市科隆化学品有限公司；聚异丁烯衍生物（T154）：广州锐圣研化工科技有限公司；人肝癌细胞（HepG2）：中科院北京细胞库；青霉素-链霉素混合液（双抗）、硝酸缓冲盐溶液（PBS）和胰蛋白酶：生物试剂，Gibco 公司；CCK-8 试剂盒和活细胞/死细胞双染试剂盒：生物试剂，同仁化学研究所。

注射泵：LSP01-3A 型，保定兰格恒流泵有限公司；紫外面光源：XM8-711A8CDX 型，艾优威（苏州）光电科技有限公司；冷冻干燥机：FD-1D-50 型，北京博医康实验仪器有限公司；二氧化碳培养箱：370 型，美国 Thermo Fisher 公司。

1.2　不同浓度和流速条件下开放大孔 AlgMA 微球的制备

利用微流控法制备微米级开放性大孔 AlgMA 微球。以 AlgMA 和质量分数 0.25% LAP 水溶液为内相流体（IF），质量分数 2% T154 的大豆油溶液为外相流体（OF），如 Fig.1 所示。一级微流控装置的注射管外径为 960 μm，内径为 500 μm，锥口内径为 100 μm；接收管外径为 960 μm，内径为 500 μm；将毛细管嵌套在内径 1 mm 的方形玻璃管内组装成一级微流控装置。用 365 nm 的紫外光照射微流控装置内产生的 AlgMA 液滴，光引发剂 LAP 吸收光子形成激发态，均裂形成 2 个自由基，自由基攻击 AlgMA 的双键结构，进而相互交联形成凝胶网络。AlgMA 微球在－20 ℃环境下凝胶网络中的液态水逐渐凝固形成冰晶，冷冻干燥过程中冰晶升华留下孔隙结构，制备得到开放性连通大孔微米级 AlgMA 凝胶球。

为了体现微流控方法的均一可控性，在一级微流控装置内，依次改变 AlgMA 质量分数分别为 3%，5% 和 10%，在每个浓度条件下改变内/外相流速比分别为 10/200，10/150，20/150 和 20/100，在不同条件下制备得到 AlgMA 微球。先用正己烷洗涤除去大豆油，再用异丙醇洗去正己烷，然后用体积分数 75% 乙醇洗涤异丙醇，最后用 PBS 缓冲溶液除去乙醇、未交联的水凝胶单体和光引发剂，每个步骤洗涤 2~3 次。最后，将微球在－20 ℃冷冻 8 h，凝胶球内部的水转变为冰晶，冷冻干燥 12 h 后冰晶升华留下孔隙，制备得到大孔微球。

1.3　负载 HepG2 细胞的 AlgMA 大孔微球的制备

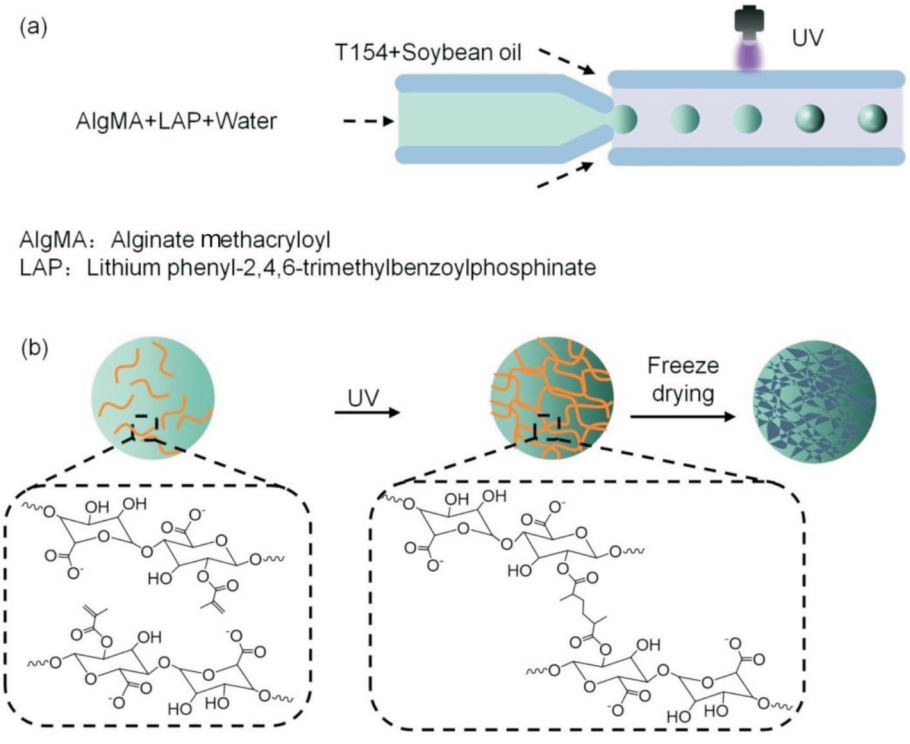


Fig.1　(a) Preparation of AlgMA microspheres; (b) schematic diagram of UV crosslinking of AlgMA microspheres

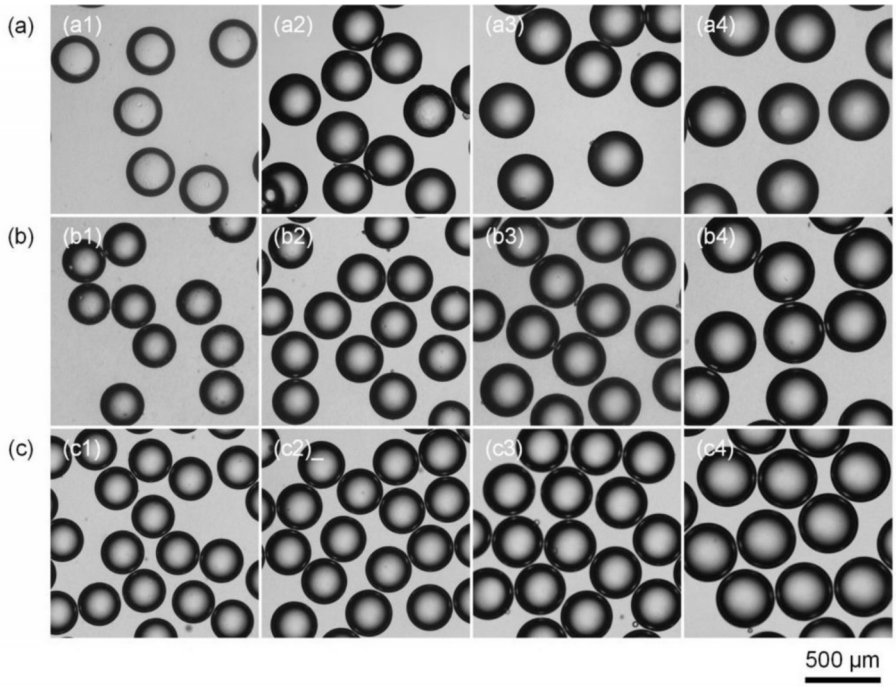


Fig. 2 Optical photographs of AlgMA particles (before washing); AlgMA mass fractions are (a)3%, (b)5% and (c)10%; inner/outer phase flow rates ratios are (a1~c1)10/200, (a2~c2)10/150, (a3~c3)20/150 and (a4~c4)20/100

称取11.5 mg AlgMA大孔微球用紫外照射4 h灭菌，浸泡于11.5 mL完全培养基溶液中溶胀微球，待微球完全溶胀后用移液枪移取250 μL微球悬浮液到24孔板中。向孔板中加入500 μL细胞密度为5×10^6 mL^{-1}的细胞悬液，静置1 h后转移微球到新24孔板中，再加入1 mL新鲜完全培养基，静置于恒温培养箱中培养。

1.4 测试与表征

1.4.1 形貌表征：利用工业显微镜（BX61，奥林巴斯株式会社）拍摄AlgMA微球洗涤前后的光学照片。测量微球直径时，每个条件至少测量100颗微球，并根据式(1)计算微球变异系数（*CV*）值

$$CV=\frac{1}{\bar{d}}\left[\sum_{i=1}^{n}\frac{(d_i-\bar{d})^2}{n}\right]^{\frac{1}{2}} \tag{1}$$

式中：$\bar{d}$——AlgMA微球的平均直径；d_i——第i个AlgMA微球的直径；n——所测量AlgMA微球的个数。

另按照式(2)计算AlgMA微球浸泡在PBS缓冲液（洗涤后）和大豆油溶液（洗涤前）中的体积变化率

$$V=\frac{D_a}{D_b} \tag{2}$$

式中：D_a——浸泡在PBS缓冲液中的AlgMA微球平均直径；D_b——浸泡在大豆油溶液中的AlgMA微球平均直径。

通过扫描电子显微镜（SEM，Phenom G2 Pro，上海复纳科学仪器有限公司）观察冷冻干燥后干态微球的形貌。微球用导电胶粘在样品台上做喷金处理，测试的加速电压为15 kV。

1.4.2 AlgMA微球的复溶胀性能测试：冻干后用PBS缓冲液重新溶胀AlgMA微球，静置2 h后用工业显微镜拍摄再次溶胀后微球的光学照片。为了研究浓度对AlgMA微球复溶胀性能的影响，需要尽可能排除其他条件的干扰，考虑到微球尺寸在100~400 μm更利于细胞的贴附[14]，因此选择制备300 μm左右的微球来分析冻干前和复溶胀后的尺寸变化以评价其稳定性。至少测量100颗微球的粒径。

1.4.3 AlgMA微球的三维细胞培养试验：采用活死细胞双染色法评价体外细胞活性，分别用钙黄绿素乙酰甲氧基甲酯/碘化丙啶（Calcein-AM/PI）对活/死细胞染色。采用300 μm左右的AlgMA微球进行体外细胞实验，将HepG2细胞在开放大孔AlgMA微球上分别培养24 h，48 h和72 h后，用1 mL细胞双染工作液（Calcein-AM：2 μmol/L；PI：4.5 μmol/L）在室温下避光染色15 min，用荧光显微镜（pE-300^{lite}，德国Leica公司）观察细胞存活情况。另随机量化5个区域的活/死细胞数量来计算活性。

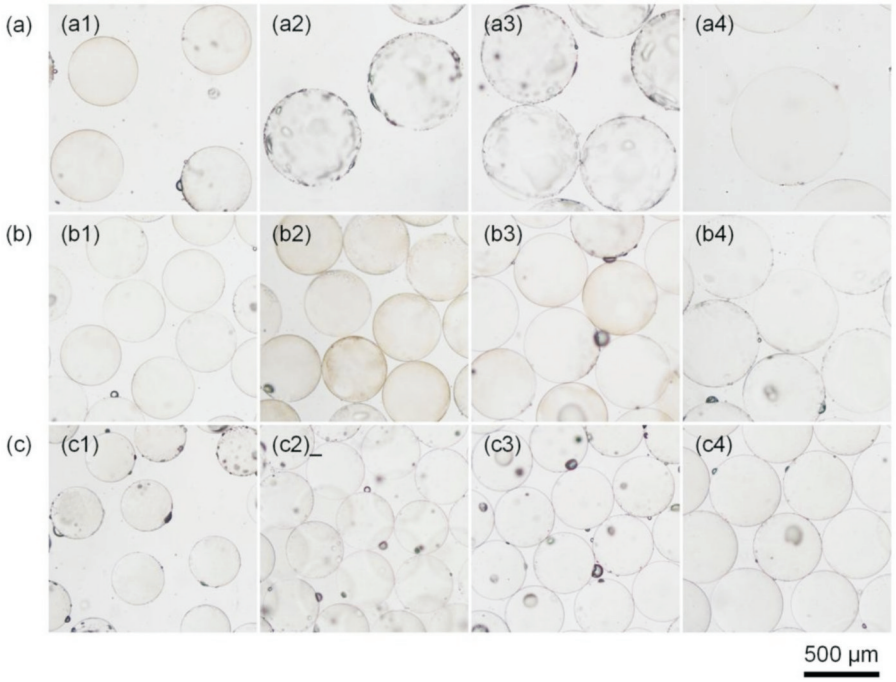


Fig. 3 Optical photographs of AlgMA particles (after washing); AlgMA mass fractions are (a)3%, (b)5% and (c)10%; inner/outer phase flow rates ratios are (a1~c1)10/200, (a2~c2)10/150, (a3~c3)20/150 and (a4~c4)20/100

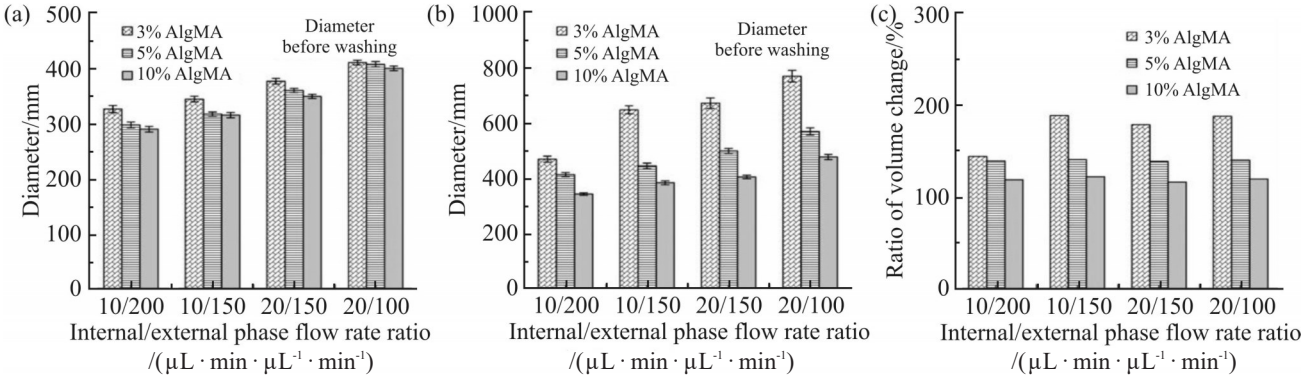


Fig. 4 (a)Diameter before washing, (b)diameter after washing, and (c) ratio of volume change before and after washing of AlgMA microspheres prepared under different conditions

采用CCK-8法评价体外细胞增殖。在开放大孔AlgMA微球上分别培养HepG2细胞24 h，48 h和72 h后，弃去原培养基加入1 mL含有10% CCK-8溶液的完全培养基，37 ℃孵育2 h，用酶标仪测定上清液在450 nm处的吸光度。每组设置6个平行实验，最终*OD*值取6组数据的平均值。

2　结果与讨论

2.1　不同浓度AlgMA微球尺寸随流速的变化

洗涤前，质量分数3%，5%和10%的条件下，AlgMA微球随流速的变化的光学照片如Fig.2所示。从图片中可以看出，AlgMA微球尺寸均一、单分散性较好。当改变单一条件时，AlgMA微球尺寸呈现出规律性。分别用正己烷、异丙醇、乙醇和PBS缓冲溶液洗涤除去大豆油、未交联的AlgMA单体和残余的光引发剂之后，得到溶胀后的AlgMA微球，其光学照片如Fig.3所示。洗涤后的微球呈透明状，AlgMA微球明显比洗涤前溶胀了许多。少许微球表面残留有未洗涤干净的大豆油液滴。

微球尺寸的测量结果如Fig.4(a,b)所示。AlgMA浓度一定时，随着外/内相流速比减小，AlgMA微球的尺寸逐渐增大；当流速比固定时，随着AlgMA浓

Tab. 1 Specific values of various parameters of AlgMA microspheres

Internal/external phase flow rate ratio ($\mu L \cdot min \cdot \mu L^{-1} \cdot min^{-1}$)	*w*(AlgMA)/%	Diameter before washing/μm	Diameter after washing/μm	Ratio of volume change/%
10/200	3	326.48	470.76	144.2
	5	297.73	415.12	139.4
	10	289.81	343.97	118.7
10/150	3	344.36	650.01	188.8
	5	317.09	446.28	140.7
	10	315.59	385.5	122.0
20/150	3	376.95	673.97	178.8
	5	360.30	500.75	139.0
	10	349.22	406.21	116.3
20/100	3	410.78	772.13	188.0
	5	407.87	571.75	140.2
	10	400.48	478.91	119.6

度的增加，洗涤前微球尺寸变化不大，但是洗涤之后尺寸差值随着浓度增加而增大。这是因为低浓度的AlgMA微球光交联的程度低于高浓度AlgMA微球，所以低浓度的微球能吸收更多的水分、溶胀更大的体积。另外，微球尺寸分布范围小，对细胞在不同微球上的均匀吸附比较有利。

计算AlgMA微球洗涤前后的体积变化率，结果如Fig.4(c)所示。3%AlgMA微球溶胀率最高，当外/内相流速比为10/150，20/150和20/100时，AlgMA微球溶胀率相近，而5%和10%AlgMA微球的体积变化率几乎不随着流速比变化。这是因为3%，5%和10%AlgMA微球溶胀程度与交联程度有关，当浓度固定时，光固化得到的微球交联程度较为均一，微球的尺寸并不影响溶胀。当外/内相流速比为10/200时，3%AlgMA微球溶胀率较小，这可能是因为更换AlgMA溶液后，未对装置润洗完毕时接取了样品，导致微球实际浓度产生偏差。各项参数的具体数值见Tab.1。

2.2 AlgMA浓度对微球孔洞的影响

利用扫描电镜观察AlgMA微球的形貌如Fig.5所示。随着AlgMA浓度的增加，微球的球形度更好。3%AlgMA微球交联程度过低，溶胀时吸水较多，导致冻干后孔洞极大，微球结构坍塌。5% AlgMA微球孔洞分布不均，同样由于交联程度较低而导致结构部分坍塌。10%AlgMA微球球形度相对较好，孔洞分布较为均匀，从截面SEM图可以看出，微球内外均具有孔洞结构。

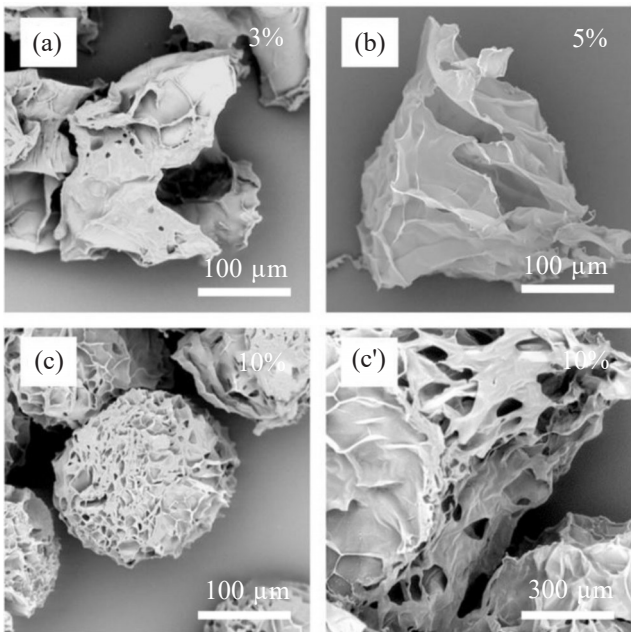


Fig. 5 SEM images of different concentrations of AlgMA microspheres
(a~c): surface SEM image; (c'): section SEM image

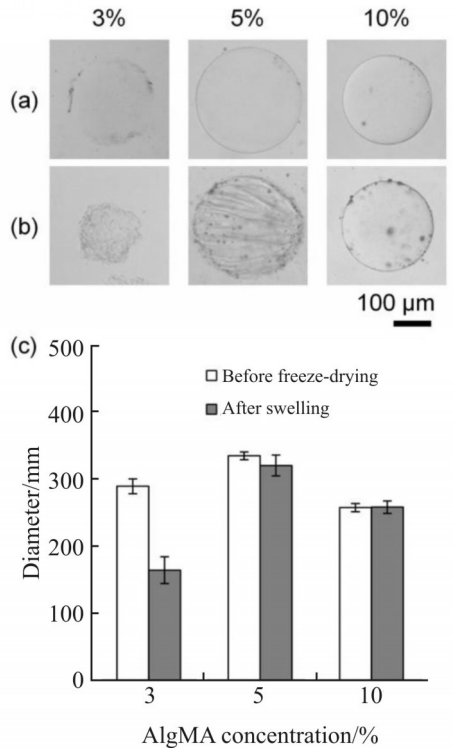


Fig. 6 (a) Optical images of AlgMA microspheres before freeze-drying; (b) optical images of AlgMA microspheres after reswelling; (c) diameter of AlgMA microspheres

2.3 不同浓度 AlgMA 微球的复溶胀性能

用工业显微镜拍摄冻干复溶胀前后的光学照片分别如 Fig.6(a,b)所示。3%AlgMA 微球冻干复溶胀后无法恢复冻干前形貌，微球皱缩较为严重，基本不呈现球形；5%AlgMA 微球复溶胀后表面存留许多褶皱，无法完全恢复球形，表面的黑色小液滴是未洗涤干净的油滴；10%AlgMA 微球复溶胀后基本完全恢复形貌，呈透明规整的球体。

测量微球复溶胀前后的尺寸如 Fig.6(c)所示。冻干前（后）3%，5%和 10%AlgMA 微球的尺寸分别为 289.26 μm，334.78 μm 和 257.45 μm（164.23 μm，320.22 μm 和 258.17 μm）。随着 AlgMA 浓度的增加，复溶胀之后微球尺寸缩比减小，10%AlgMA 微球复溶胀前后尺寸几乎一致。综合上述 AlgMA 微球的孔洞结构，最终选用 10%AlgMA 微球作为细胞培养实验的载体。

2.4 AlgMA 微球中 HepG2 细胞的活性和增殖

将吸附有 HepG2 细胞的 AlgMA 微球转移到 24 孔板中培养 24 h，48 h 和 72 h 后，用活死染色法直观观察细胞存活情况，结果如 Fig.7(a)所示。细胞在微球上呈球状体生长，球状体大小随着培养时间延长而变大。在 AlgMA 微球外围分散有游离细胞，这是由于实验过程中，将细胞悬浮液滴加到含有微球的孔板后，微球与细胞一起沉淀在孔板底部，转移微球到新的孔板时不可避免地会带有游离细胞。另外，培养 24 h 后几乎看不到红色死细胞，培养 48 h 和 72 h 后，逐渐出现了死细胞，这是因为细胞贴附在微球表面，当细胞增殖后外侧被更多的细胞逐渐包裹起来，营养物质和氧气递送不及时导致核心细胞的死亡，有研究表明这种结构更接近实体肿瘤组织的真实结构，能够更好地在体外模拟肿瘤结构，有利于癌症研究[15,16]。

为了量化细胞活性，计算活死染荧光图像中至少五个区域的活细胞占比，结果如 Fig.7(b)所示。AlgMA 微球培养 HepG2 细胞 24 h，48 h 和 72 h 后细胞活性分别为 99.3%，87.8%和 90.5%。细胞培养 48 h 后活性降低是因为球状体核心层的细胞因缺乏营养物质而死亡，72 h 后细胞活性有所提升可能是因为活细胞增殖速率大于核心层细胞死亡速率，所以细胞活性比培养 48 h 的活性高，但是因为核心层死细胞的存在，所以总体来看细胞活性仍比初始培养 24 h 的活性低许多。

采用 CCK-8 检测法来评价 AlgMA 微球上细胞增殖的结果如 Fig.7(c)所示，细胞增殖用 *OD* 值来表示。微球分别培养 HepG2 细胞 48 h 和 72 h 后，相较于前一天细胞数量分别倍增了 1.24 倍和 1.76 倍，随

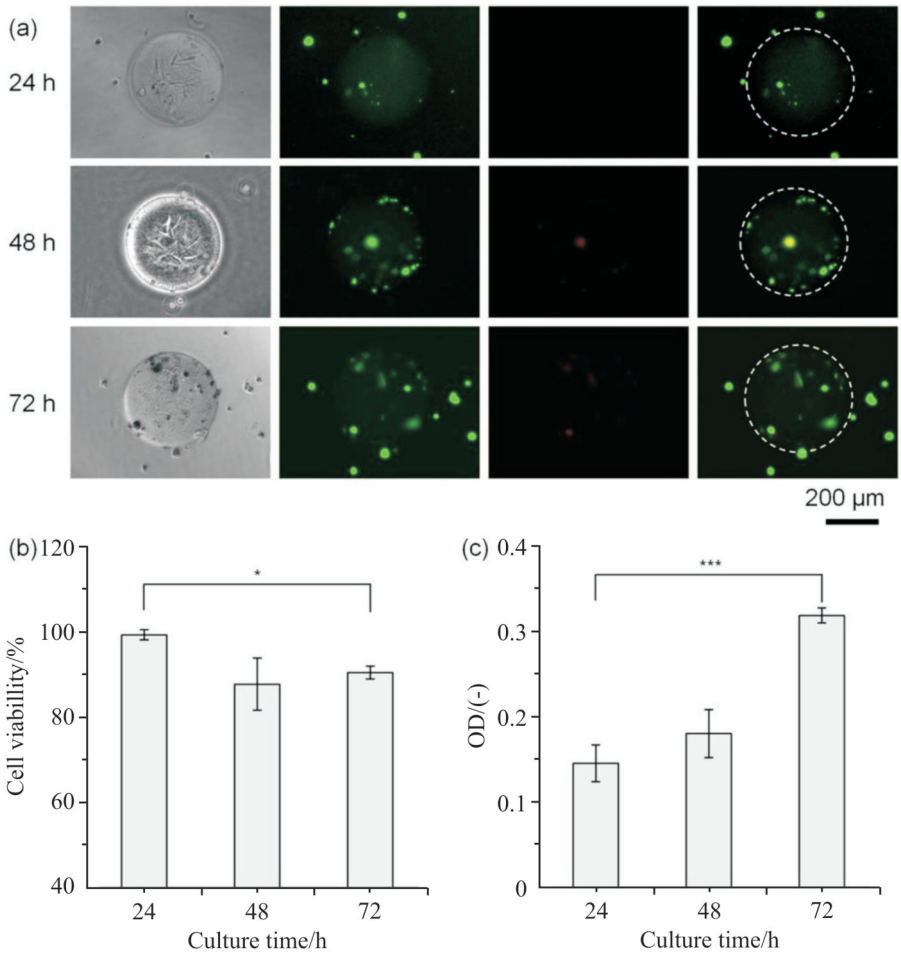


Fig. 7 (a) Fluorescence images of HepG2 cells cultured on AlgMA microspheres, from left to right: bright field, blue fluorescence field, green fluorescence field, and synthetic field. Green represents live cells, red represents dead cells; (b) HepG2 cell activity; (c) HepG2 cell proliferation

着培养时间的延长，细胞增殖速率逐渐增加，符合HepG2细胞的生长规律[17]。综合来看，这种内层为死细胞和外层为具有活性增殖细胞的结构与肿瘤组织的3层结构较为相近，具有建立体外三维肿瘤模型的潜力。

3 结论

基于微流控技术和紫外交联法制备了尺寸均一、大小可控、具有良好分散性的AlgMA微球，利用冷冻干燥制孔得到具有开放大孔的AlgMA微球。AlgMA大孔微球尺寸随着流速比增大而减小。AlgMA浓度对微球尺寸影响较小，但是对微球孔隙结构影响较大，随着浓度的增加，AlgMA大孔微球的孔洞逐渐变小。浓度越大，AlgMA微球的复溶性越好，洗涤前后溶胀相对较小，刚性越强。考虑到微球应该具有开放孔隙结构和较好的稳定性，选择AlgMA质量分数为10%。体外培养HepG2细胞24 h，48 h和72 h后，细胞聚集成球状体，细胞活性均在85%以上，48 h和72 h后相较于前一天细胞数量分别倍增了1.24倍和1.76倍。该研究结果为开放大孔AlgMA微球的制备提供了新思路，构建的载体具有建立体外肿瘤模型的潜力。

参考文献：

[1] Baker B M, Chen C S. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues[J]. Journal of Cell Science, 2012, 125: 3015-3024.

[2] Zanoni M, Pignatta S, Arienti C, *et al*. Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2019, 14: 289-301.

[3] Langhans S A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 6-19.

[4] Mellati A, Kiamahalleh M V, Madani S H, *et al*. Poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel/chitosan scaffold hybrid for three-

dimensional stem cell culture and cartilage tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016, 104: 2764-2774.

[5] Strand B L, Coron A E, Skjak- Braek G. Current and future perspectives onalginate encapsulated pancreatic islet[J]. Stem Cells Translational Medicine, 2017, 6: 1053-1058.

[6] Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32: 773-785.

[7] Arslan- Yildiz A, Assal R E, Chen P, *et al*. Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting[J]. Biofabrication, 2016, 8: 014103.

[8] Lim F, Sun A M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas[J]. Science, 1980, 210: 908-910.

[9] Nakazawa K, Izumi Y, Mori R. Morphological and functional studies of rat hepatocytes on a hydrophobic or hydrophilic polydimethylsiloxane surface[J]. Acta Biomaterialia, 2009, 5: 613-620.

[10] Liu T, Yi S, Liu G, *et al*. Aqueous two- phase emulsions-templated tailorable porous alginate beads for 3D cell culture[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 258: 117702.

[11] Fu G B, Xie R, Qin J W, *et al*. Facile fabrication of photocatalyst-immobilized gel beads with interconnected macropores for the efficient removal of pollutants in water[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2021, 60: 8762-8775.

[12] Liu J, Zhou H, Weir M D, *et al*. Fast- degradable microbeads encapsulating human umbilical cord stem cells in alginate for muscle tissue engineering[J]. Tissue Engineering Part A, 2012, 18: 2303-2314.

[13] Amini H, Hashemzadeh S, Heidarzadeh M, *et al*. Cytoprotective and cytofunctional effect of polyanionic polysaccharide alginate and gelatin microspheres on rat cardiac cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 969-976.

[14] 张启英, 张天柱, 胡克, 等. 多孔微球在三维细胞培养中的研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2013, 32(1): 90-94.
Zhang Q Y, Zhang T Z, Hu K, *et al*. Research progress of porous microspheres in three- dimensional cell culture[J]. Journal of Southeast University (Medical Science Edition), 2013, 32(1): 90-94.

[15] Costa E C, Moreira A F, de Melo Diogo D, *et al*. J. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34: 1427-1441.

[16] Weiswald L B, Bellet D, Dangles Marie V. Spherical cancer models in tumor biology[J]. Neoplasia, 2015, 17: 1-15.

[17] 陈富强, 李煜, 李瑶, 等. 人肝癌细胞系 HepG2 生物学特性分析[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2007, 38(3): 306-310.
Chen F Q, Li Y, Li Y, *et al*. Analysis of biological characteristics of human liver cancer cell HepG2[J]. Journal of Inner Mongolia University (Natural Science Editions), 2007, 38(3): 306-310.

Preparation of Open Macroporous Alginate Microspheres for Three-Dimensional Cell Culture

Sike Chen, Xiaojie Ju

(*School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China*)

ABSTRACT: Open macroporous microspheres can assist in the formation of cell- cell and cell- extracellular matrix interactions which are suitable as three-dimensional cell culture scaffolds. Uniform and controllable sized methacrylated alginate (AlgMA) microspheres were prepared by microfluidic technology and online UV crosslinking method. AlgMA microspheres with open macropores were obtained by freeze-drying method. The changes in internal/external phase flow rate ratio and effect of AlgMA concentration on the size, morphology, and stability of microspheres were systematic studied. Using human liver cancer cell HepG2 as model cell, the effects of AlgMA microspheres on cell activity and proliferation were systematically investigated. The results show that when the mass fraction of AlgMA is 10%, the reswelling performance and pore structure of the microspheres are the best. After 24 h, 48 h, and 72 h of culture, the cell activity of HepG2 cells is above 85%. After 48 h and 72 h of cultivation, the numbers of cells double by 1.24 and 1.76 times compared to the previous day, respectively. This research work provides a new method for the preparation of open connected macroporous alginate microspheres.

Keywords: open macroporous microspheres; alginate microspheres; three dimensional cell culture; methacrylated alginate; hepatocellular carcinoma cells