

体外培养和冷冻保存对微囊化细胞生长和内皮抑素表达的影响 Effect of the *in vitro* Culture and Cryopreservation on the Growth of the Microencapsulated Recombinant Cell and Endostatin Production

张 英^{1,2}, 王 为¹, 吕国军^{1,2}, 于炜婷¹, 郭 昕¹, 雄 鹰¹, 马小军^{1*}

ZHANG Ying^{1,2}, WANG Wei¹, LÜ Guo-Jun^{1,2}, YU Wei-Ting, GUO Xin¹, XIONG Ying¹ 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 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

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

摘 要 微囊化基因工程细胞移植治疗肿瘤是一种新兴的肿瘤治疗方法, 如果将此技术应用到临床研究, 就需要制备大量的细胞活性良好、重组蛋白表达量高的生物微胶囊。体外培养和冷冻保存是生物微胶囊制备过程中两个重要的环节, 因此需要考察体外培养和冷冻保存对微囊化重组基因细胞生长和蛋白表达的影响。以重组 CHO 细胞为模型, 考察了体外培养时间和冷冻保存对微囊化细胞在动物体内生长和内皮抑素表达的影响及体外培养时间对微囊化细胞冷冻保存的影响。结果表明: 体外培养时间对微囊化细胞在动物体内生长、内皮抑素表达和微囊稳定性具有较大的影响, 体外不培养和培养 4d 的微囊化细胞在小鼠腹腔内生长良好、内皮抑素表达量高, 并且微囊稳定性好, 而体外培养 8d 的微囊化细胞在移植后的第 26 天破裂。体外培养时间对微囊化细胞冷冻保存也具有较大的影响, 体外培养 4d 和 8d 的微囊化细胞在液氮中冷冻保存 40d, 复苏后细胞生长良好、内皮抑素表达量高, 而冻存前未经过体外培养的微囊化细胞, 复苏后细胞几乎全部死亡。综上所述, 生物微胶囊在体外比较适宜的培养时间为 4d。并且冷冻保存对微囊化细胞在动物体内生长、内皮抑素表达和微囊稳定性没有显著的影响。

关键词 细胞移植, 体外培养时间, 冷冻保存, 重组 CHO 细胞, 内皮抑素

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0303-07

Abstract Microencapsulated recombinant cells technology is a novel approach to tumors therapy. It is necessary to prepare a plenty of the microcapsules with better cell viability and higher endostatin production in order to bring this technology into the clinic. The *in vitro* culture and cryopreservation are very important parameters in the preparation of microencapsulated cells. In this work, we studied the effect of the *in vitro* culture and cryopreservation on microencapsulated recombinant cells growth and endostatin production and the effect of the *in vitro* culture on the cryopreservation of microencapsulated recombinant cells. The results showed that the time of *in vitro* culture potently affected microencapsulated recombinant CHO cells growth *in vivo*, endostatin production and the microcapsule stability. The microcapsule kept intact after 36 days of implantation when the *in vitro*

Received: August 24 2006; Accepted: November 8 2006.

This work was supported by the grants from the National Basic Research Program of China (No. 2002CB713804 and 2005CB522702) and the National Natural Science Foundation of China (No. 20236040 and 30472102).

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

国家 973 攻关项目(No.2002CB713804, 2005CB522702)和国家自然科学基金(No.20236040, 30472102)资助

culture time was under 4 days. The thawed microencapsulated recombinant CHO cells had better cell growth and higher endostatin production after 40 days of cryopreservation when the *in vitro* culture time was 4 days and 8 days. Therefore, the best *in vitro* culture time was 4 days according to the results of the *in vivo* culture and cryopreservation and the cryopreservation did not affect microencapsulated recombinant CHO cells growth *in vivo*, endostatin production and the microcapsule stability.

Key words cell transplantation, *in vitro* culture, cryopreservation, recombinant CHO cell, endostatin

生物微胶囊技术是近十几年发展起来的一门新兴的、具有很大发展潜力的固定化技术,目前已在异体组织细胞移植^[1-3]、微生物和动植物细胞的大规模培养^[4,5]、药物控制释放^[6-8]、抗癌药物筛选^[9]等领域获得广泛的应用。生物微胶囊是将酶、辅酶、蛋白质等生物大分子或微生物、动植物细胞包封在一层由高分子材料形成的具有选择透过性的亲水性膜内,氧气、营养物质以及其它的小分子物质可以自由通过微胶囊膜进行物质传递,抗体等大分子物质则被排除在微囊膜外,从而达到免疫隔离的目的^[10]。目前对微囊化人工细胞的研究已取得了很大的进展,特别是伴随基因工程技术的发展,微囊化基因工程细胞移植成为目前研究的一个热点。2001年 Joki T 和 Read TA 采用微囊化细胞移植的方法治疗恶性肿瘤,取得了良好的治疗效果,开辟了一条新的肿瘤基因治疗的方法^[11,12]。但是研究中所需解决的问题还很多,如对微囊化基因工程细胞在治疗疾病中的有效性、安全性及可行性的评价,对微囊内细胞的生长和代谢规律的了解,微囊化细胞规模化制备及储存等问题。

随着微囊化细胞应用的研究进入临床研究阶段,微囊化细胞规模化制备和储存已经成为制约其广泛应用的重要问题。冷冻保存是一种良好的生物微胶囊储存方法^[13,14],但冷冻保存对细胞活性有一定损伤,这就需要微囊内的细胞具有较高的活性。同时在生物微胶囊制备过程中也会对细胞造成损伤,因此有必要对微囊化细胞进行体外培养,以恢复细胞活性,使其能更好地发挥治疗作用。本文着重研究微囊体外培养和冷冻保存对微囊化重组 CHO 细胞在动物腹腔内生长和内皮抑素表达的影响及微囊体外培养对冻存细胞活性的影响,为微囊化细胞规模化制备、培养及冷冻保存提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及试剂 表达人重组内皮抑素的中国仓鼠卵巢细胞(rCHO),由中科院上海细胞所藤怀宁博士惠赠。基础培养基为 DMEM/F12 培养液(美国,

Sigma 公司),添加 10% 的新生牛血清(北京三利生物制品厂),100u/mL 的青霉素、100 μ g/mL 的链霉素、5 μ g/mL 的嘌呤霉素(美国, Sigma 公司),海藻酸钠(Alginate)、聚赖氨酸(Poly-L-lysine)、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma 公司,DMSO 及其它试剂均为国产分析纯产品。

1.1.2 主要仪器 酶联免疫检测仪,倒置式显微镜,液氮罐,超低温冰箱,CO₂ 恒温培养箱,大功率高压脉冲微胶囊制备仪(本实验室研制)。

1.2 方法

1.2.1 微囊化重组 CHO 细胞的制备:收集对数生长期的重组 CHO 细胞与无菌的 1.5%(W/V)海藻酸钠溶液混合均匀,调整细胞密度为 2×10^6 cells/mL microcapsule。细胞悬液通过 0.4mm 针头压出,利用高压脉冲微胶囊制备仪滴入 0.1mol/L CaCl₂ 溶液中进行凝胶化反应,制备含有细胞的海藻酸钙凝胶珠。钙化 20min 后,海藻酸钙凝胶珠与适量的 0.05%(W/V)的聚赖氨酸溶液发生电解质络合反应以形成微胶囊膜。成膜后的海藻酸钙凝胶珠重悬于 0.15%(W/V)的海藻酸钠溶液中,中和其表面多余的正电荷。最后,用 55mmol/L 的柠檬酸钠溶液液化微囊内的海藻酸钙凝胶,形成液化的 APA 微胶囊^[15]。

1.2.2 微囊化重组 CHO 细胞体外培养:将微囊化重组 CHO 细胞分装于 24 孔板中,每孔分装 0.1mL 微胶囊,加入 DMEM/F12 培养液 2mL。微囊化细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。每 2 天采用 MTT 法测微囊内的活细胞密度,并换培养液和收集培养上清于 -20 $^{\circ}$ C 保存,每组 3 个重复。

1.2.3 微囊内活细胞密度测定:活细胞密度测量采用 MTT 法^[16],即利用 MTT 检测细胞活性间接反映活细胞密度。具体方法如下:在 24 孔板的每孔中加入 100 μ L 5mg/mL MTT 溶液,继续培养 24h,待结晶完全后将微囊筛出,用 1mL DMSO 将细胞形成的结晶充分溶解,吸取 200 μ L 溶解液加入 96 孔板中用酶联检测仪检测波长为 570nm 的光密度(OD)值(630nm 为参考波长)。根据吸光度值与细胞密度的标准曲

线,即可计算出相应的活细胞密度。

1.2.4 微囊化重组 CHO 细胞体内培养:实验用昆明(KM)小鼠购自大连医科大学实验动物中心,小鼠体重为 20~25g。实验方法如下:微囊化重组 CHO 细胞用 0.9% 的 NaCl 洗三遍制成微胶囊悬液,再用 5mL 注射器移植到小鼠腹腔内,每只小鼠移植 0.2mL 微囊。在移植后的不同时间(4、8、12、18、26、36d)断颈处死小鼠,用 0.9% 的 NaCl 冲洗小鼠腹腔,回收清洗液。再用 0.9% 的 NaCl 清洗微囊三遍,将清洗干净的微囊接种到 24 孔培养板中,每孔接种 0.03mL 微囊。用 MTT 法测微囊内的活细胞密度,回收培养 1d 的培养液测内皮抑素的表达量。

1.2.5 微囊冻存和复温的方法:冻存液组成为 10% DMSO、80% DMEM/F12 培养液和 10% FBS,冻存液与微囊化重组 CHO 细胞按 4:1 的体积比混合,分装在 2mL 冻存管内。在 4℃ 冰箱内平衡 1h 使 DMSO 充分导入细胞,然后转移至冻存盒中,再将冻存盒放到超低温冰箱内使微囊从 4℃ 降到 -76℃。4h 后将冻存管投入 -196℃ 的液氮中保存。在液氮中冷冻保存 40d 后复苏微囊化细胞,在复温时将冻存管置于 39℃ 水浴锅中,沿同一方向晃动待完全融解后取出,微囊化细胞用培养液反复清洗 3 次后放入培养板中,在 37℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养^[17]。

1.2.6 内皮抑素浓度测定:内皮抑素浓度采用双抗体夹心 ELISA 法,试剂盒购自美国 R&D 公司,实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。应用酶联检测仪检测波长 450nm 下的光密度(OD)值(630nm 为参考波长),内皮抑素浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正比,根据吸光度值与内皮抑素浓度的标准曲线,即可求出样本中的内皮抑素浓度。

1.2.7 实验条件:

(1)在体外培养时间对微囊化重组 CHO 细胞体内生长和内皮抑素表达影响的实验中,生物微胶囊的粒径为 200μm 左右,微囊化细胞在体外培养 0d、4d 和 8d 后分别移植到小鼠腹腔。定时回收微胶囊,测微囊内的细胞密度和内皮抑素的表达量。

(2)在体外培养时间对微囊化重组 CHO 细胞冷冻保存影响的实验中,微囊化细胞分别在体外培养 0d、4d、8d 后于 -196℃ 的液氮中冷冻保存 40d,复苏的微囊化细胞分装到 24 孔板中,每孔 0.1mL 微胶囊并添加 2mL 培养液。每 2 天换培养液并收集培养液测内皮抑素表达量。

(3)在冷冻保存对微囊化重组 CHO 细胞体内生

长和内皮抑素表达影响的实验中,生物微胶囊的粒径为 200μm 左右,微囊化细胞在体外培养 4d 后于 -196℃ 的液氮中冷冻保存 40d,复苏后移植到小鼠腹腔。未经冻存的微囊化细胞在体外培养 4d 后移植到小鼠腹腔。定期回收微胶囊,测微囊内的细胞密度和内皮抑素的表达量。

2 结果和讨论

2.1 体外培养时间对微囊化重组 CHO 细胞在动物体内生长和内皮抑素表达的影响

体外培养时间对微囊化重组 CHO 细胞在动物体内生长和内皮抑素表达的影响见图 1 和图 2,体外不培养和培养 4d 的微囊化细胞生长速度相似,细胞在第 18 天时长满微囊。细胞数在第 26 天时达到最大的 1.10×10^8 cells/mL microcapsule 和 1.13×10^8 cells/mL microcapsule,然后微囊内的细胞数保持稳定。体外培养 8d 的微囊化细胞生长速度较快,在第 8 天时细胞就长满了微囊,细胞密度在第 18 天时就达到 1.14×10^8 cells/mL microcapsule。从内皮抑素表达曲线看,体外培养 8d 的微囊化细胞在移植的前 8 天内皮抑素表达量高于体外不培养和培养 4d 的微囊化细胞,并且在移植的第 8 天内皮抑素表达量最大,为 351.6ng/mL。体外不培养和培养 4d 的微囊化细胞在移植的第 12 天内皮抑素表达量最大,然后内皮抑素表达保持稳定,表达量维持在 340ng/mL 左右。第 12 天后三种微胶囊内皮抑素表达量没有显著差别。体外培养时间对微囊的稳定性影响较大,体外培养 8d 的微胶囊在移植的第 26 天时大部分微囊已经破裂,而体外不培养和培养 4 天的微胶囊在第 36 天时微囊仍然保持完整。APA 微胶囊膜是由海藻酸阴离子和聚赖氨酸阳离子络合形成的聚电解质膜,而细胞培养液中含有许多带正电荷和负电荷的离子,APA 微胶囊处于细胞培养液的环境中,培养液中的阴离子与聚赖氨酸的正电荷作用,使微胶囊的聚电解质膜解体,因此随着培养时间的延长微囊膜的强度减弱。但是在微胶囊制备过程中细胞会受到一定的损伤,如果要恢复细胞活性体外培养又是必须的,因此需要优化体外培养时间使细胞能恢复生长活性同时又能保证微囊具有良好的稳定性。本实验结果显示,体外不培养或培养时间低于 4d 时细胞生长良好、内皮抑素表达量高,并且微胶囊具有良好的稳定性,在动物腹腔内移植 36d 依然保持完整。

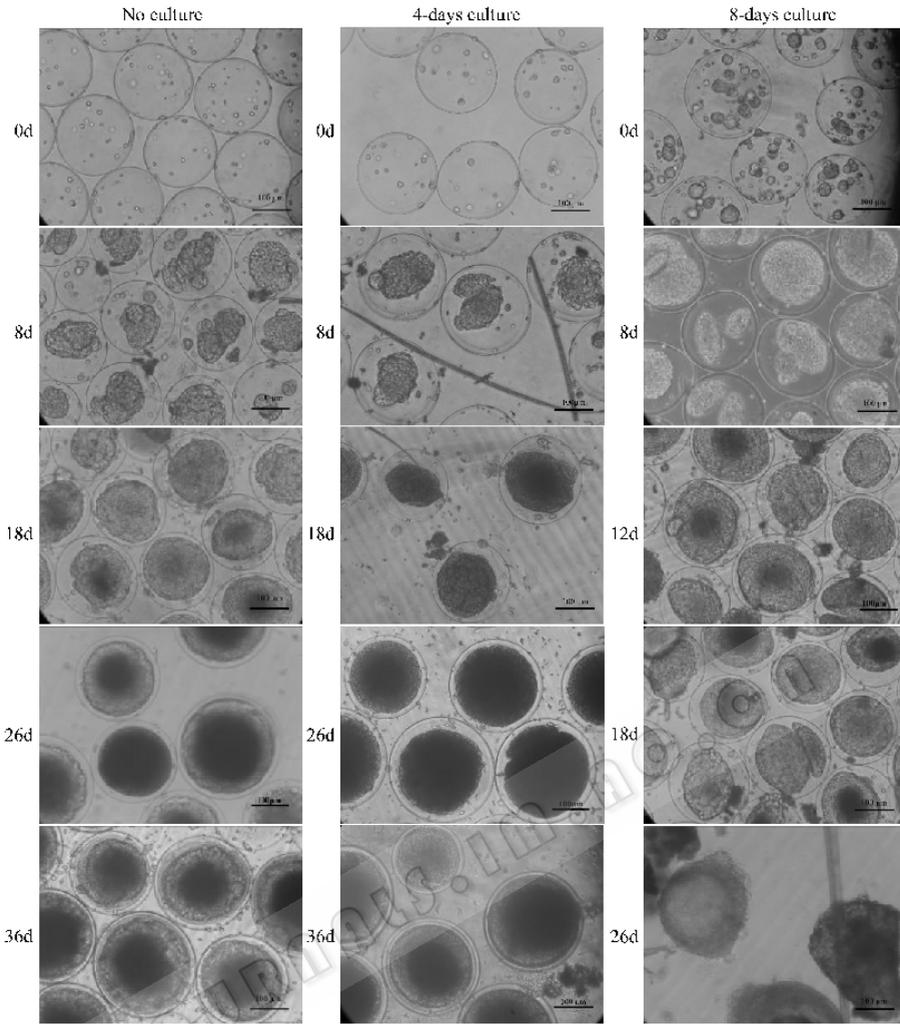


图 1 不同体外培养时间的微囊化重组 CHO 细胞在动物体内的生长状态

Fig.1 Morphology of the microencapsulated recombinant CHO cells with different *in vitro* culture time after *in vivo* culture
The microencapsulated recombinant CHO cells were photographed on various days (day 0, day 4, day 8, day 18, day 26 and day 36) after implantation. The times of *in vitro* culture were 0 days, 4 days and 8 days. Bars are 100 μ m.

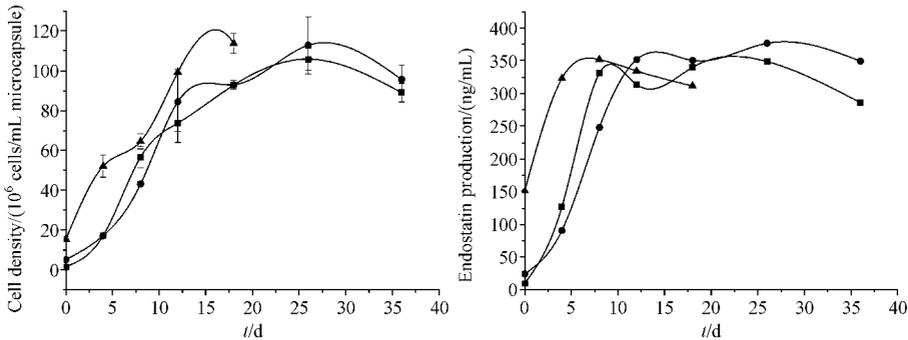


图 2 体外培养时间对微囊化重组 CHO 细胞在动物体内生长和内皮抑素表达的影响

Fig.2 The effect of the *in vitro* culture time on the growth of microencapsulated recombinant CHO cells and endostatin production
The microencapsulated CHO cells were retrieved from peritoneal cavities of mice on various days after implantation (day 0, day 4, day 8, day 18, day 26 and day 36) and the cell number within the microcapsule and endostatin production were measured. The culture time were 0 days (■), 4 days (●) and 8 days (▲). Results are presented as mean values of triplicates \pm SD.

2.2 体外培养时间对微囊化重组 CHO 细胞冻存后细胞生长和内皮抑素表达的影响

图 3 和图 4 显示体外培养时间对微囊化重组

CHO 细胞冻存后细胞生长和内皮抑素表达的影响, 当体外培养时间为 4d 和 8d 时冻存的微囊化细胞复苏后活性良好, 细胞复苏率为 94.6% 和 96.5%, 细

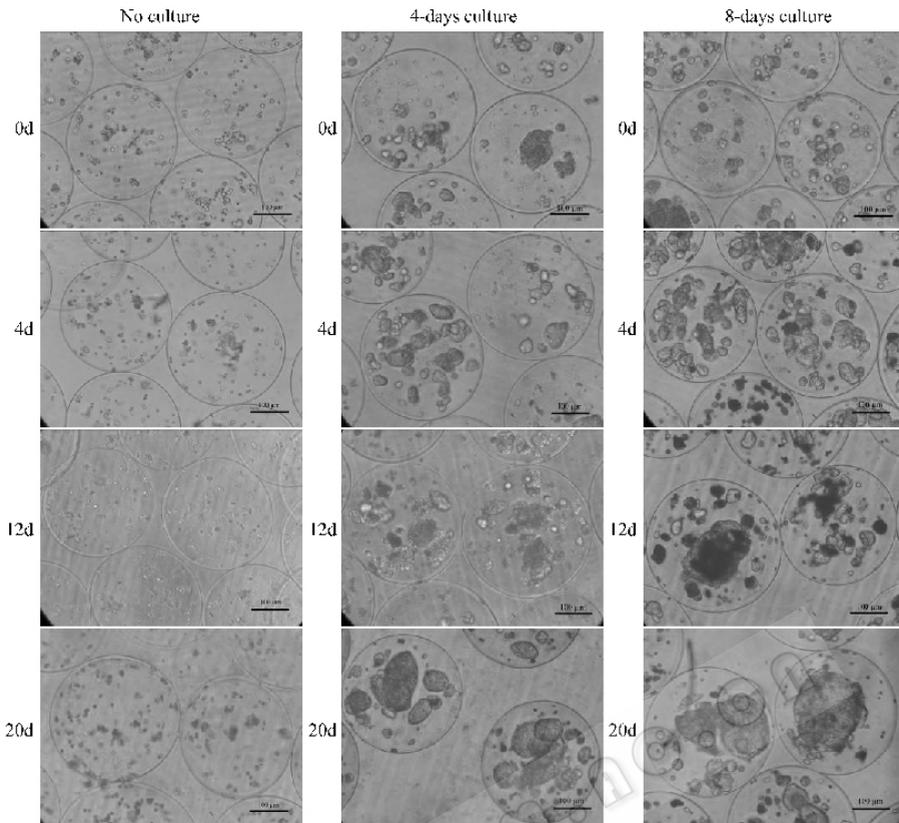


图 3 不同体外培养时间的微囊化重组 CHO 细胞冻存后的生长状态

Fig.3 Morphology of the microencapsulated recombinant CHO cells after cryopreservation

The recombinant CHO cells were photographed on various days (day 0 , day 4 , day 8 , day 18 , day 26 and day 36) after thaw. The *in vitro* culture time was 0 days , 4 days and 8 days. Bars are 100 μ m.

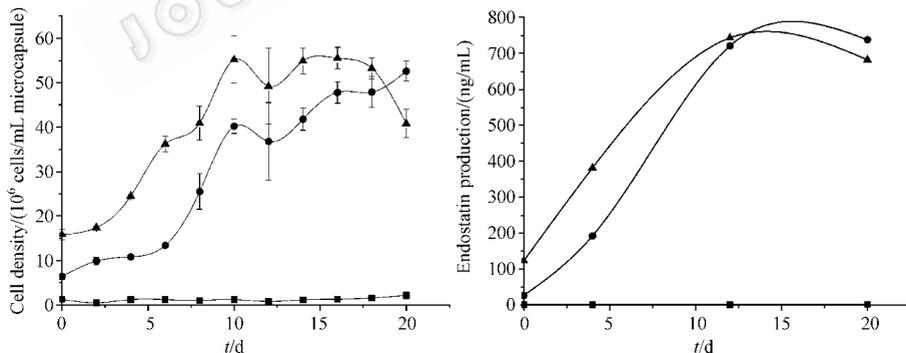


图 4 体外培养时间对微囊化重组 CHO 细胞冻存后细胞生长和内皮抑素表达的影响

Fig.4 The effect of *in vitro* culture time on microencapsulated recombinant CHO cells and endostatin production after cryopreservation

The microencapsulated CHO cells were cryopreserved after various days of *in vitro* culture , and then the microcapsules were thawed after 40 days of cryopreservation. The thawed microencapsulated cells were culture in a 24-well plate and the cell number within the microcapsules and endostatin production were measured. The *in vitro* culture time was 0 days (■) , 4 days (●) and 8 days (▲). Results are presented as mean values of triplicates \pm SD.

胞生长较快,在培养的第 20 天时细胞已长满大部分微囊。细胞生长曲线表明,在培养的前 10 天时细胞生长较快,然后细胞生长速度下降,微囊内的细胞数

趋于稳定,最大细胞密度分别为 5.26×10^7 cells/mL microcapsule 和 5.55×10^7 cells/mL microcapsule。体外不培养的生物微胶囊复苏后细胞几乎不生长,证明

细胞已经死亡。内皮抑素表达分析显示,体外培养时间为 4d 和 8d 时内皮抑素表达量相似。在培养的第 12 天左右内皮抑素表达量达到最高,然后内皮抑素表达趋于稳定,并维持在为 740ng/mL 左右。体外不培养的微囊复苏后在培养过程中内皮抑素表达量几乎为 0ng/mL,这也证明了细胞已经死亡。图 3 还显示,在 20d 的培养过程中三种微胶囊都保持完整没有破裂,这也证明了冷冻保存对微囊形态和强度没有影响。综上所述,冷冻保存是一种行之有效的微囊保存方法,但微囊制备后需要体外培养来恢复细胞的活性,综合细胞移植的数据体外培养时间为 4d 比较适宜。

2.3 冷冻保存对微囊化重组 CHO 细胞动物体内生长和内皮抑素表达的影响

冷冻保存对微囊化重组 CHO 细胞移植后细胞生长和内皮抑素表达的影响见图 5 和图 6。结果显示,经过冻存的生物微胶囊移植后细胞活性良好,细胞生长速度比未冻存的微胶囊稍慢,在移植的第 18 天时细胞长满微囊。微囊内细胞数在第 26 天时达到最大的 1.07×10^8 cells/mL microcapsule,并且随着时间的延长细胞数保持稳定。未经冻存微囊在第 26 天时细胞数达到 1.13×10^8 cells/mL microcapsule,与冻存微囊没有显著差别。两种微囊在移植的第 36 天形态良好、没有破裂,证明冷冻保存对微囊的强度没有影响。从内皮抑素表达曲线可以看出,冻存微囊与未冻存微囊内皮抑素表达量没有显著差别,在移植的第 12 天内皮抑素表达量达到最大,此后内皮抑素表达量保持在一个稳定的水平,表达量为 350ng/mL 左右。经过冻存的微胶囊移植后需要恢复细胞活性,因此在移植的初期细胞生长较慢。待细胞活性恢复后细胞生长速度加快,内皮抑素表达量升高。细胞长满微胶囊后两种微胶囊内的细胞

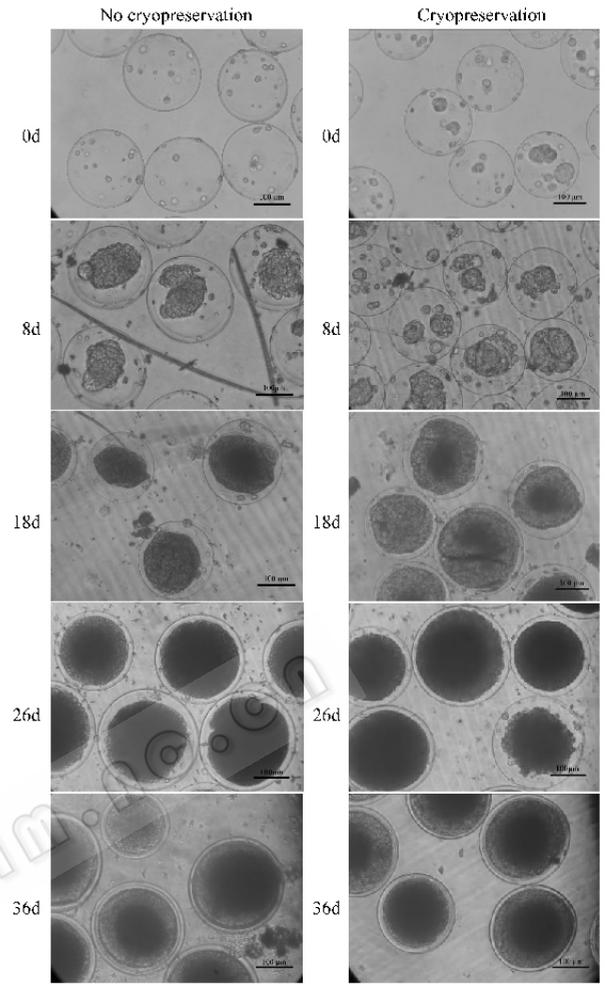


图 5 冻存与不冻存的微囊化重组 CHO 细胞在动物体内的生长状态

Fig.5 Images of the *in vivo* growth profile of microencapsulated recombinant CHO cells by cryopreservation or not (10 ×). The microencapsulated CHO cells were thawed after 16 days of cryopreservation and implanted into peritoneal cavities of mice. The morphology of microcapsules was photographed on various days (day 0, day 4, day 8, day 18, day 26 and day 36) after implantation. Bars are 100 μm.

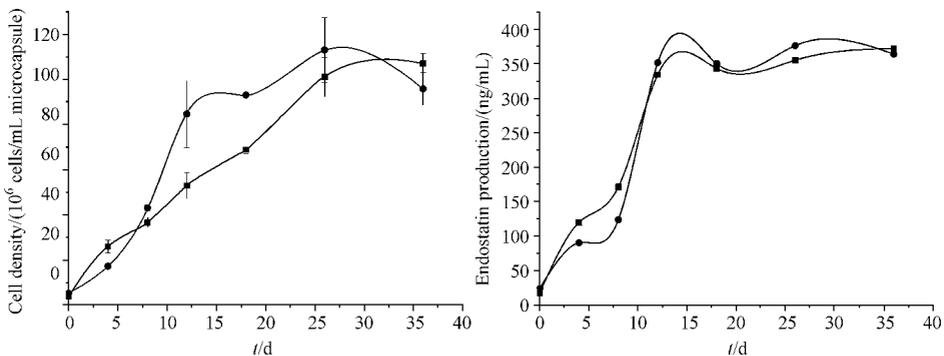


图 6 冷冻保存对微囊化重组 CHO 细胞生长和内皮抑素表达的影响

The effect of cryopreservation on the *in vivo* growth of microencapsulated recombinant CHO cells (A) and endostatin production (B). The microencapsulated CHO cells were thawed after 16 days of cryopreservation and implanted into peritoneal cavities of mice. The cell number within microcapsules and the potential of endostatin secretion were measured. The microcapsules were cryopreservation (■) and no cryopreservation (●). Results are presented as mean values of triplicates ± SD.

增殖活性和内皮抑素表达特性相同,因此细胞数和内皮抑素表达量接近。综上所述,冷冻保存对微囊化细胞生长、内皮抑素表达和微囊稳定性没有明显的影响,经过冷冻保存的生物微胶囊移植后细胞生长良好、内皮抑素表达量高。

生物微胶囊在制备过程中会对细胞活性造成一定的伤害,因此需要在体外培养一段时间来恢复细胞的活性,以满足体内移植和体外冷冻保存的需求。冷冻保存是微囊化细胞唯一的储存方法,冷冻保存对细胞活性和微囊稳定性的影响也需要系统地考察。本实验结果显示,微囊化细胞冻存前应在体外进行短期培养,适宜的培养时间为4天,微囊内的细胞不仅活性良好而且内皮抑素表达量高。冷冻保存对微囊化重组基因细胞活性和微囊稳定性影响较小,经过冻存的微囊化细胞在动物体内可以生长和表达内皮抑素。

REFERENCES(参考文献)

- [1] O'shea GM, Sun AM. Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. *Journal of American Diabetes Association*, 1986, **35**(8):943 - 946.
- [2] Sun YL, Ma XJ, Zhou DB, et al. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgous monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppressant. *The Journal of Clinical Investigation*, 1996, **98**:1417 - 1422.
- [3] Hortelano G, Al-Hendy A, Oforu 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.
- [4] Mei LH(梅乐和), Yang JL(杨建丽), Zhong CL(钟春龙), et al. Cultivation of *Brevibacterium flavum* in new microcapsule system and production of glutamic acid. *Journal of Zhejiang University(浙江大学学报)*, 2005, **9**:1400 - 1403.
- [5] Posillico EG. Microencapsulation technology for large-scale antibody production. *Bio/Technology*, 1986, **4**:114 - 117.
- [6] Hari PR, Thomas C, Chandra PS. Chitosan/Calcium alginate beads for oral delivery of insulin. *Journal of Applied Polymer Science*, 1996, **59**:1795 - 1801.
- [7] Sezer AD, Akbuga J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. *J Microencapsul*, 1999, **16**(6):687 - 696.
- [8] Feng P, Wang YN, Ma JB, et al. Study on materials of oral delivery system for peptide and its controlled-release. I. Controlled release of insulin from its chitosan-alginate microcapsule. *Ion exchange and adsorption*, 1999, **15**(1):64 - 70.
- [9] Zhang XL, Wang W, Yu WT, et al. Development of an *in vitro* multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**:1289 - 1296.
- [10] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 1980, **210**:908 - 909.
- [11] Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, et al. Local endostatin treatment of gliomas by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**:29 - 34.
- [12] Joki T, Machluf M, Atala A, et al. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**:35 - 39.
- [13] Tian L(田磊), Gao YH(高宇红), Li YL(李雁凌), et al. Method of cryopreservation APA microencapsulated 3T3 cells. *Acad J PLA Postgrad Med Sch(军医进修学院学报)*, 2006, **27**(3):225 - 227.
- [14] Yu CH(于聪慧), Wei YH(魏玉华), Leng XS(冷希圣), et al. Morphology, structure and function of long-term cryopreserved microencapsulated hepatocytes and their treatment in acute liver failure in rats. *Chin J Exp Surg(中华实验外科杂志)*, 1999, **16**(5):414 - 416.
- [15] Ma XJ, Vacek I, Sun A. Generation of alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1994, **22**:43 - 69.
- [16] Zhou J(周晶), Zhang Y(张英), Wang W(王为), et al. The Effect of glutamine on the growth, metabolism and endostatin production of microencapsulated rCHO cells. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2006, **22**(1):162 - 166.
- [17] Read TA, Stensvaag V, Vindenes H, et al. Cells encapsulated in alginate: a potential system for delivery of recombinant proteins to malignant brain tumours. *Int J Devl Neuroscience*, 1999, **17**:653 - 663.