

100nm 葡聚糖磁性微球用于 CD34⁺细胞分选的初步研究

杨芸 张海洋 巫鼎娥 曹飞婷

常州伯仪生物科技有限公司, 江苏常州, 213149;

摘要: 目前市场主流分选 CD34⁺细胞产品的是以美天旎为代表的纳米级路线(10~50nm)和以 StemCell 为代表的微米级路线, 但前者存在磁场响应弱、需要配套专用分选柱耗材的局限, 后者因磁珠粒径较大, 易引起细胞损伤及非特异性吸附的风险。为突破现有技术的局限性, 本研究首先制备粒径 100nm~150nm 的葡聚糖磁性微球, 具有良好的磁场响应性与胶体稳定性, 通过磁珠界面修饰化学功能层, 共价偶联上抗人 CD34 单克隆抗体, 获得了 CD34⁺细胞分选磁珠, 分选效果与市售产品接近。综上所述, 本研究开发的 100 nm 纳米级 CD34 细胞分选磁珠, 既具有良好的磁场响应性, 可通过常规磁力架实现高效分选, 又因粒径适中, 对细胞的生理功能干扰以及表位占据影响较低, 实现了分选效率和细胞活性的高效平衡。该研究为 CD34⁺细胞的高效率分选提供了新型功能材料, 也为免疫磁珠的理性设计提供了新思路。

关键词: 细胞分选; 磁性微球; 免疫磁珠; CD34 细胞

DOI: 10.69979/3029-2808.26.02.063

引言

CD34⁺造血干/祖细胞具备高度自我更新和多向分化潜能, 在造血干细胞移植、再生医学及血液系统疾病治疗中具有重要应用价值。高效、高特异性分离 CD34⁺细胞是后续临床应用与机制研究的基础, 其核心挑战在于同时保障分选纯度、回收率及细胞活性, 并最大限度降低非特异性吸附对细胞功能的影响。传统的细胞流式分选虽然纯度高, 但分选速度和效率较低, 仅适用于基础科研, 难以满足规模化的临床分选需求。免疫磁珠分选技术凭借操作简便、分选快速、特异性强且对细胞损伤小等优势, 已成为 CD34⁺细胞分选的主流方法之一。目前市售分选磁珠主要分为两类: 50 nm 左右的小粒径纳米磁珠与微米级以上磁珠。前者虽占据细胞表位极少, 不激活细胞, 生物相容性较高, 但磁场响应性较弱, 必须依赖专用的分选设备或者耗材(如分选柱), 增加了操作复杂程度和成本; 后者虽磁响应迅速、抗体负载量高, 但存在细胞机械损伤与非特异性高的风险^[1-4]。因此, 开发一款生物相容性好、操作简单且可以实现规模化分选的 CD34 分选磁珠具有重要的科研和临床价值。

1 材料与方法

1.1 材料与原料

乙二醇; 二水合柠檬酸钠; 无水乙酸钠; FeCl₃·6H₂O; 葡聚糖(MW40000); 高碘酸钠; MES; PBS; 氢氧化

钠; 环氧氯丙烷; 碳酸氢钠; PAA5K; EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺); NHS(N-羟基琥珀酰亚胺); 硼氢化钠; 乙醇胺; 甘氨酸; 牛血清白蛋白(BSA), Tween-20, 以上试剂均为分析纯。Anti-Human CD34 mAb 和 FITC 标记 Anti-Human CD34 mAb 由常州鸿蒙生物有限公司提供。淋巴细胞分离液采购于碧云天生物科技有限公司。K562-CD34⁺细胞由本公司保存, 人血液样本由健康志愿者提供。

1.2 葡聚糖磁性纳米颗粒的合成

称取 0.5g FeCl₃·6H₂O、1.5g 乙酸钠、1g 二水合柠檬酸钠, 量取 20mL 乙二醇, 均加入水热反应釜中, 于 200℃ 反应 10h。反应结束后磁吸去除上清, 并用 95% 乙醇清洗, 冷冻干燥, 即可得到粒径为 100~150nm 的磁性纳米颗粒。称取 1g 葡聚糖和 100mg 磁性纳米颗粒加入 100 mL 去离子水, 低温搅拌过夜(N₂)。反应结束后磁性去除上清, 并用去离子水清洗。向磁珠中加入 100mL 0.1M 氢氧化钠溶液和 100 μL 环氧氯丙烷, 室温反应 6h。反应结束后磁性去除上清, 并用去离子水清洗和重悬磁性纳米颗粒, 得到葡聚糖磁性纳米颗粒溶液。

1.3 醛基界面的 CD34 细胞分选磁珠合成

用 0.1M MES 缓冲液(pH5.5)清洗葡聚糖磁性纳米颗粒溶液后, 加入 0.1M MES 溶液(pH5.5)和 NaIO₄(1 mg/mL)分散磁性微球, 于 25℃, 100 rpm 转速反应 1h。加入 50 μL 乙二醇, 继续反应 15min。磁吸去上清后,

去离子水和 0.1M PBS 缓冲液洗涤, 最终用 0.1M PBS 缓冲液复溶, 得到醛基界面的磁珠。取 10 mg 醛基界面的磁珠, 用 0.1 M 碳酸氢钠缓冲液 (pH 8.0) 清洗并分散。加入 200 μ g Anti-Human CD34 mAb 混匀于 4 $^{\circ}$ C、80 rpm 转速避光孵育 2h。加入 2mg 硼氢化钠混匀反应 30min, 再加入 100 μ L 1 M 甘氨酸溶液和 1 mL 10mg/mL BSA 溶液, 室温孵育 1 h。反应结束后, 磁吸去除上清, 依次用 5 mL 0.1M PBST、2 mL 0.1M PBS (pH 7.4) 清洗, 最后用 1 mL 0.1M PBS (pH 7.4) 分散磁珠, 得到醛基界面的 CD34 细胞分选磁珠 (浓度 10 mg/mL)。

1.4 羧基界面的 CD34 细胞分选磁珠合成

将葡聚糖磁性纳米颗粒水溶液, 加入等体积氨水, 置于 25 $^{\circ}$ C、100 rpm 转速反应 3h 后, 磁吸去除上清, 去离子水清洗后, 0.1M MES 缓冲液洗涤并复溶, 加入 PAA5K、EDC 和 NHS, 置于 37 $^{\circ}$ C、80 rpm 转速孵育 3h 后。加入 50 μ L 乙醇胺, 继续反应 15min。磁吸去上清后, 去离子水清洗后, 0.1M PBS 缓冲液洗涤并复溶, 得到羧基界面的磁珠。取 10 mg 羧基化磁珠, 磁吸弃上清, 加入 1mg EDC 和 NHS 活化剂 (用 0.1M MES 缓冲液配制), 置于 25 $^{\circ}$ C、100 rpm 转速反应 0.5h 后, 磁吸去除上清, 0.1M MES 缓冲液清洗并重悬磁珠, 加入 200 μ g Anti-Human CD34 mAb, 置于 37 $^{\circ}$ C、100 rpm 转速反应 1h 后, 磁吸去除上清, 用 0.1M PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤后加入 1 M Tris 溶液, 室温孵育 2h。磁吸弃上清, 向磁珠中加入 1 mL 0.1M PBS 缓冲液 (pH 7.4) 清洗并分散磁珠, 得到羧基界面的 CD34 细胞分选磁珠 (10 mg/mL)。

1.5 表征方法

采用扫描电镜 (SEM) 测试样品的形貌; 傅里叶红外光谱仪 (FT-IR) 分析表面官能团; 振动样品磁强计 (VSM) 测量磁性能, 上述检测均委托科学指南针进行测试。

1.6 CD34⁺细胞分选效果的测试

按照淋巴细胞分离液产品说明书提取 PBMC 细胞。将 K562-CD34 阳性细胞和 PBMC 混合, 使得 K562-CD34 细胞的占比不超过 2%, 作为待分选细胞样本。取 0.5mg 醛基界面或羧基界面的 CD34⁺分选磁珠与待分选细胞样本于 2 $^{\circ}$ ~8 $^{\circ}$ C 孵育 30min。反应结束后, 放置于磁力架上进行分选: 收集磁吸上清后, 用 PBS 清洗磁珠, 收集洗杂液, 合并磁吸上清和洗杂液作为流穿组分; 再将磁珠撤离磁铁, 加入 PBS 重悬, 作为洗脱组分。分别将流穿组

分和洗脱组分加入 FITC 标记 Anti-Human CD34 mAb, 同时设置待分选细胞样本、K562-CD34 细胞、PBMC 对照组, 室温避光孵育 30min, 用 PBS 清洗后, 重悬细胞, 于流式分析仪 (品牌: 安捷伦; 型号: Novocyte 2060) 上检测 CD34⁺细胞纯度和活率。

2 结果

2.1 SEM 与 VSM 表征结果分析

磁性微球呈现微球状, 粒径在 100~150nm (图 1), 饱和磁场强度为 50emu/g, 远高于 20nm 纳米磁性微球 (10emu/g), 且矫顽力趋向于 0 (图 2), 表明该方法合成的磁性微球具有超顺磁性, 且工艺稳定, 为高效磁分离提供良好的磁学性能。

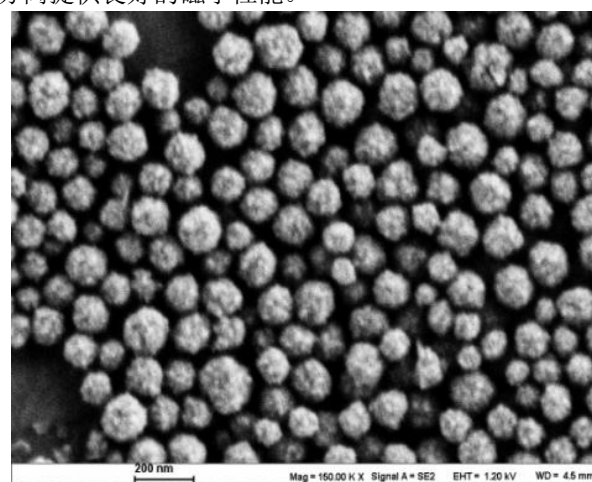


图 1: 磁性微球的扫描电镜表征

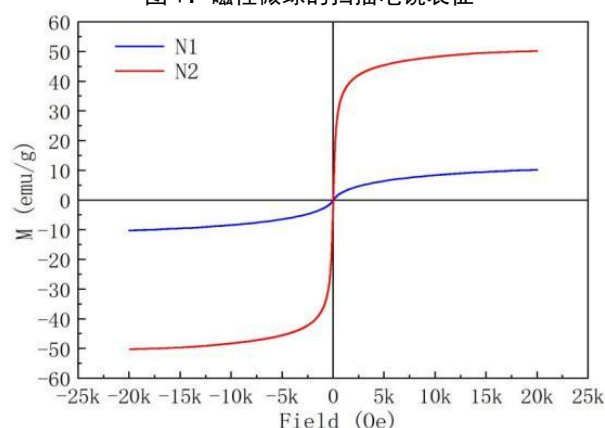


图 2: 20nm (N1) 和 100nm (N2) 磁性微球的 VSM 表征

2.2 红外光谱 (FT-IR) 结果分析

根据图 3 (a) 可知, 葡聚糖磁性纳米颗粒在 3400 cm^{-1} 有羟基 (-OH) 的伸缩振动峰, 2925 cm^{-1} 饱和 C-H 键的伸缩振动峰, 1027 cm^{-1} 醚键 (C-O-C) 与醇羟基 (C-O) 的伸缩振动峰, 在 400~700 cm^{-1} 有 Fe-O 的伸缩振

动峰,表明葡聚糖成功包覆到磁性微球表面;图3(b)显示醛基界面的磁珠在 1635cm^{-1} 有明显吸收峰,证明醛基和葡聚糖的羟基存在氢键作用力,表面醛基已成功修饰到葡聚糖磁性微球表面;图3(c)显示在 1635cm^{-1} 吸收峰更明显,证明羧基与葡聚糖的羟基也存在氢键作用力,且作用力更强。此外在 3418cm^{-1} 的吸收峰更显著,表明了磁珠表面修饰的羧基后,也增加羟基的总量。

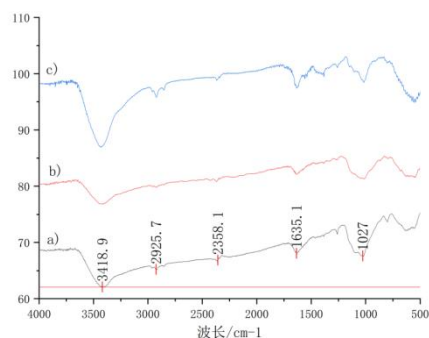
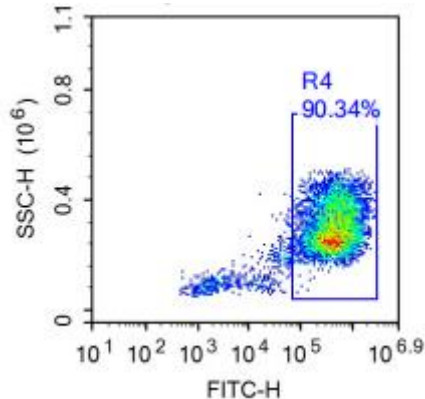


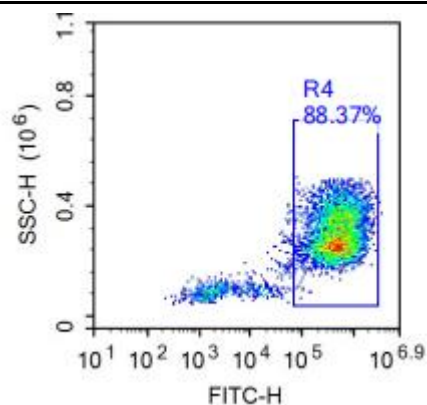
图3 红外光谱图结果:(a)葡聚糖磁性纳米颗粒,(b)醛基界面的磁珠,(c)羧基界面的磁珠

2.3 不同化学修饰功能层对 CD34 细胞分选效果的影响

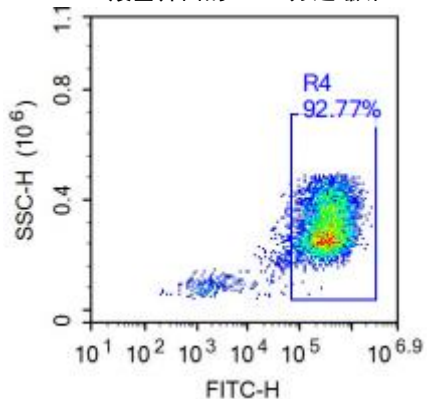
采用 PBMC 作为阴性细胞样本,向其中添加 2% K562-CD34 细胞进行分选实验,流式检测结果显示醛基界面的 CD34 细胞分选磁珠、羧基界面的 CD34 细胞分选磁珠以及市售同类产品均可以有效分选出 K562-CD34 细胞,纯度从起始的 2.06%提高至 90.34%和 88.37%,细胞活率均超过 95%,与市售进口同类产品分选效果一致,表明 Anti-Human CD34 mAb 成功偶联至磁珠表面,且抗体功能未受明显影响,可以特异性识别 K562-CD34 细胞表面的 CD34 胞外区域,同时对 PBMC 的非特异性吸附很低,满足应用需求。



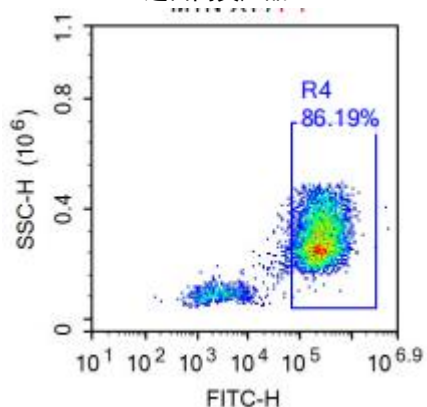
(a) 醛基界面的 CD34 分选磁珠



(b) 羧基界面的 CD34 分选磁珠



(c) 进口同类产品 (M)



(d) 国产同类产品 (G)

图(4) 细胞分选结果

3 讨论

本研究聚焦于粒径调控与界面功能化修饰,将磁珠粒径调控在 $100\sim 150\text{nm}$,旨在实现以下目标:保证磁珠具有磁场响应性与胶体稳定性,通过普通磁力架完成磁珠富集;同时相对于微米级别的磁珠,显著降低细胞表位占有率,降低对下游细胞实验的干扰影响。在此基础上,进一步探讨不同化学功能层修饰对细胞分选效果的影响,为高性能磁珠的开发提供技术支撑。2种化学基团修饰的 CD34^+ 分选磁珠均能有效分选出靶细胞,纯度

均较高,接近市售同类产品水平。醛基功能化修饰的CD34⁺分选磁珠的分选纯度高于羧基界面修饰的CD34⁺分选磁珠,该差异主要由于两者的化学偶联机制、表面电荷特性以及反应条件差异相关。针对该体系仍存在一定程度的非特异性吸附等问题,后期可以通过针对性的工艺优化(如PEG修饰,表面电荷控制等)进一步改善。

综上所述,本研究通过粒径优化与官能团差异化设计,成功制备出100nm级葡聚糖分选磁珠。该磁珠在理化性能上实现了磁响应性、生物相容性与偶联稳定性的协同提升,在应用中展现出高纯度、高活性的潜力,为CD34⁺阳性细胞的高效分选提供了多元化解决方案,也为免疫磁珠的结构设计和性能优化提供了性能的技术思路。

参考文献

- [1]Zoran Ivanovic. Hematopoietic stem cells in research and clinical applications:The “CD34 issue” [J].World Journal of Stem Cells,2010,2(2):18-23.
- [2]Kimura T,Minamiguchi H,Wang J, et al.Impaired stem cell function of CD34⁺ cells selected by two different immunomagnetic beads systems [J].Leukemia,2004,18(3):566-574.
- [3]Ueda, H.,Agatsuma, K., Kajikawa, K., Furuse, M., et al. Design and Test of Filter of High Gradient Magnetic Separation System for Trapping Immunoglobulin in Serum[J]. IEEE Transactions on Applied Superconductivity, 2009,19(3): 2157-2161.
- [4]Sutermaster BA, Darling EM. Considerations for high-yield, high-throughput cell enrichment: fluorescence versus magnetic sorting[J]. Sci Rep, 2019,9:227.

作者简介: 杨芸; 1988.09; 女; 汉; 江苏; 硕士; 中级; 微球开发。

课题: 基于细胞与基因治疗的纳米级细胞分选磁珠开发, 编号: CJ20241052