

淀粉微载体的制备及对 CHO-K1 细胞培养的初步应用

张磊^{1,2}, 李明生^{2,3}, 郑荣¹, 张健¹, 靳冬武¹, 马忠仁^{1,2}, 冯玉萍^{1,2*}

¹西北民族大学生命科学与工程学院; ²西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室;

³甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030

摘要:以普通市售马铃薯淀粉为原材料,在常温下利用 W/O 乳化方法制备了交联淀粉微球,并以二乙氨基乙基修饰了微球的表面电荷。同时研究了制备淀粉微球的制备工艺和改性工艺,成功制备了适合细胞培养用的淀粉微载体。利用扫描电镜(SEM)、红外(FT-IR)、X 射线衍射仪(XRD)对微球进行了表征。结果表明,最佳制备条件为:淀粉溶液浓度为 7%,搅拌速度为 500 rpm,交联剂用量为 8%,水油相体积比 1:6;微球表面修饰最佳条件为:加入微球质量 2 倍体积的 3.5 mol/L NaOH 溶液和 2.5 mol/L DEAE-HCl 溶液,60 °C 密闭反应 4 h。对比 Cytodex-1 微载体,培养 CHO-K1 细胞至 144 h 时,淀粉微载体表面细胞密度达到 1.8×10^6 cells/mL,且两者培养效果相似,表明了自制淀粉微载体是一种潜在的贴壁细胞培养用高分子材料。

关键词:马铃薯淀粉;淀粉微球;二乙氨基乙基;CHO-K1 细胞;细胞培养

中图分类号:Q813.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.3.017

Preparation of Starch Microcarriers and Its Application in CHO-K1 Cell Culture

ZHANG Lei^{1,2}, LI Ming-sheng^{2,3}, ZHENG Rong¹,

ZHANG Jian¹, JIN Dong-wu¹, MA Zhong-ren^{1,2}, FENG Yu-ping^{1,2*}

¹Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities; ²Key

Laboratory of Bioengineering & Biotechnology of State Ethnic Affair Commission, Northwest University for Nationalities;

³Engineering Technology Research Center for Animal Cell, Lanzhou 730030, China

Abstract: The cross-linked starch microsphere (PCSM) was synthesized from potato starch by W/O emulsion method at room temperature, while its surface charge was modified with 2-dimethylaminoethyl. Meanwhile, the preparation and modification processes were studied, and the suitable starch microcarrier was successfully made for cell cultivation. The microspheres were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectrum (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD). The results showed that the optimal parameters for the preparation were as follows: the starch solution concentration of 7%, the mixing speed of 500 RPM, the crosslinking agent dosage of 8%, and the oil/water volume proportion of 1:6. The optimal parameters for the modification process were found: 2 times the mass of microspheres in volume of 3.5 mol/L NaOH solution and 2.5 mol/L DEAE-HCl solution added, and then stirred at 60 °C for 4 h. Compared with Cytodex-1, after culturing CHO-K1 for 144 h, the cell density on the surface of starch microcarrier reached 1.8×10^6 cells/mL. The culturing effect remained similar for both microcarrier, suggesting that the homemade starch microcarrier is a kind of potential high polymer material for adherent cell culture.

Key words: potato starch; starch microspheres; 2-dimethylaminoethyl; CHO-K1 cells; cell culture

微载体是应用在细胞培养中的一类无毒性、非刚性、密度均一的高分子微球。细胞能够贴附在微载体表面进行悬浮培养,有利于细胞的大规模培养

和收集,是生物制药领域疫苗、重组药物蛋白、单克隆抗体、细胞因子等医用生物制品生产需要的生物材料^[1-5]。自 1967 年 Van Wezel 第一个用 DEAE-Sephadex A 50 作为贴壁细胞培养用微载体以来,研究报道的细胞培养用微载体已有十多种,包括天然高分子和聚合物高分子分子微载体^[6-9]。目前使用的商品化微载体如 GE 公司的 Cytodex 系列等,均为

收稿日期:2016-10-10 接受日期:2017-01-18

基金项目:甘肃省科技计划(1504WKCA094);科技部援助项目(KY201501005);兰州市人才创新创业项目(2014-RC-50)

* 通讯作者 E-mail: fyp@xbmu.edu.cn

进口产品,但是由于价格昂贵,限制了其应用。因此寻找廉价且易得的高分子原材料来制备新型微载体是一个研究方向。

淀粉是一种廉价易得、绿色的天然高分子材料,被广泛应用于食品、医药、纺织等行业,已成为最具发展潜力和应用前景的新型高分子材料之一。其淀粉微球是淀粉的一种衍生物,其外形规则,粒度大小均匀,具有良好的机械强度、可生物降解、无毒性等优点,已经作为靶向制剂的药物载体在医药卫生领域等获得了应用^[10-12]。但目前交联淀粉微球以环氧氯丙烷、N,N-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)等主要交联剂^[13-16],存在有毒性,交联过程繁杂,微球机械强度差,且需要升温至一定温度才可交联的缺点,这很大程度上影响了淀粉微球的应用前景。聚乙二醇二缩水甘油醚(PGDE)作为交联剂,可以通过分子内醚环与淀粉分子结构上的羟基、羧基的反应,可以制备出具有交联结构的淀粉微球,且毒性远远低于其他常用交联剂,是医用合格范围内的交联剂^[16]。由于交联淀粉微球表面为净电荷,因此制备得淀粉微球不能直接作为细胞培养用载体。通过偶联 DEAE(二乙氨基乙基,2-dimethylaminoethyl)使其淀粉微球带正电,有利于细胞吸附。

本文以普通市售马铃薯淀粉为原材料,采用聚乙二醇二缩水甘油醚(PGDE)作为交联剂,在常温下利用 W/O 乳化体系合成交联淀粉微球(PCSM),再用 DEAE 进行表面修饰。该微载体具有一定的刚性和韧性,粒径分布适中,能够对 CHO-K1 贴壁细胞进行良好的悬浮瓶培养,表明自制天然高分子淀粉微载体是一种具有潜在应用价值的贴壁细胞培养用微载体。

1 材料及仪器

马铃薯淀粉(普通市售)、机油(壳牌喜力 HX3)、聚乙二醇二缩水甘油醚(广州一夫化工有限责任公司),2-二乙氨基氯乙烷盐酸盐(Aladdin),吉姆萨染色液(Sigma),新生牛血清(民海生物),F-12 培养基(百灵生物),CHO-K1 细胞(ATCC),细胞消化用酶(Gibco),其余试剂均为分析纯,试验用水为去离子水。

JSM6460 型扫描电子显微镜(日本电子),VECTOR-22 型傅立叶变换红外光谱仪(日本岛津),D/max-2200pc 型 X 射线衍射仪(日本理学),IX51-FL 型生物倒置相差显微镜(奥林巴斯中国),双侧壁悬

浮瓶(美国 WHEATON);隔水式 CO₂ 培养箱(Thermo Fisher Scientific)。

2 实验方法

2.1 交联淀粉微球(PCSM)的制备

在 500 mL 烧杯中加入 100 mL 异辛烷、100 mL 机油,同时加入表面活性剂 2 g [m(Span-80):m(Tween-80) = 1:1],在常温下搅拌使充分溶解,成均一油相,待用。称取一定量的淀粉加入适量的去离子水中,加热至 90 °C 以上糊化得到淀粉溶液,同时加入适量 3 mol/L NaOH 溶液,调 pH 为 13 左右,充分混匀后,待冷却至室温缓慢加入到上述油相中,保持一定的搅拌速度,搅拌 30 min 形成均匀混合相,再加入一定量的聚乙二醇二缩水甘油醚,搅拌反应 5 h,静置,除去上层油层,下层交联聚合物依次用 2% OP-10、无水乙醇、去离子水洗涤 2~3 次,30% 乙醇 4 °C 保存。

2.2 淀粉微球成球率计算

交联淀粉微球经过洗净之后抽滤,80 °C 2 h 烘干,称量出干球的质量,计算成球率。

$$\text{成球率} = \frac{\text{烘干后淀粉微球的质量}}{\text{原材料淀粉的质量}}$$

2.3 结构表征

将交联淀粉微球干燥后喷金制样,用 JSM6460 型扫描电子显微镜观测微球形貌及表面形态,将马铃薯淀粉和交联淀粉微球、淀粉微载体 KBr 压片后使用 VECTOR-22 型傅立叶红外光谱仪进行红外光谱分析;淀粉、交联淀粉微球、淀粉微载体的 X 射线粉末衍射分析使用 D/max-2200pc 型 X 射线衍射仪(日本理学),试验条件:CuK α ,40 kV \times 40 mA,扫描速度 16°/min,采样宽度 0.02°。

2.4 交联淀粉微球制备工艺

影响交联淀粉微球成球的关键因素,主要有淀粉溶液的浓度、交联剂用量、搅拌速度、油水相体积比等,因此采用 L₉(3⁴) 正交试验,进行单因素正交试验,选取其中对淀粉成球影响较明显的试验因素,具体如下:淀粉溶液浓度(A)、交联剂用量、(B)、搅拌速度(C)、油水相比(D)4 个水平,不考虑因素间交互作用。试验方案见表 1。

2.5 交联淀粉微球表面化学修饰

选取粒径在 100~250 μm 交联后抽干的淀粉微球 10 g,加入 20 mL 一定浓度的 NaOH 溶液,再加入 20 mL 一定浓度的 2-二乙氨基氯乙烷盐酸盐

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验方案
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment scheme

试验水平 Levels	试验因素 Experimental factors			
	A 淀粉浓度 Starch concentration (%)	B 交联剂用量 Linking-agent amount (%)	C 搅拌速度 Stirring speed (RPM)	D 油水相体积比 Volume ratio
1	7	6	300	2:1
2	8	8	500	4:1
3	9	10	700	6:1

(DEAE-HCl) 溶液,在搅拌状态下加热至 60 °C,反应一段时间,用纯水洗涤干净后,30% 酒精 4 °C 保存淀粉微载体 (DEAE-PCSM)。

2.6 改性条件对淀粉微球表面电荷的影响

细胞能够在微载体表面成功粘附并生长,主要是依靠二者间的电荷亲和力。微球表面的电荷密度

是影响电荷亲和力的主要因素。为了确定改性的最优工艺,试验设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验 (见表 2)。试验考察了 DEAE 浓度、NaOH 浓度、反应时间三个因素对微球表面电荷密度的影响,根据单因素试验结果确定了三个水平,采用测定表面电荷量评价表面改性条件。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验方案
Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment scheme

试验水平 Levels	试验因素 Experimental Factors			
	A DEAE 浓度 DEAE concentration (%)	B NaOH 浓度 NaOH concentration (%)	C 反应时间 Time (h)	D 空列 Vacant column
1	2	2.5	2	1
2	2.5	3.5	3	1
3	3	4.5	4	1

2.7 微球表面电荷测定^[17]

称取纯水洗净抽干的淀粉微载体 10 g,用 2.0 mol/L 的 NaCl 50 mL 浸洗,分别用 100 mL 0.1 mol/L 的 HCl,500 mL 0.0001 mol/L 的 HCl 洗涤,真空抽干,再用 100 mL 10% 的 Na_2SO_4 滤洗,用 SO_4^{2-} 置换 Cl^- ,收集滤液。最后,以 1 mL 5% 的 K_2CrO_4 为指示剂,用 0.05 mol/L 的 AgNO_3 滴定,测定 Cl^- 的用量。由滴定所得的 Cl^- 摩尔数除以载体的湿重,即得微球表面的电荷量 E (mmol/g)。

$$E = \frac{V \times C}{m}$$

其中, E 为微球表面电荷密度; V 为消耗 AgNO_3 的体积; C 为 AgNO_3 的浓度; m 为微球湿重。

2.8 微载体上细胞吉姆萨染色

在无菌条件下用移液枪吸取 1 mL 微载体培养液移入另一试样管中,离心微载体后弃掉上清,加入无钙镁 PBS 缓冲液洗涤 2 次,再加入适量的固定液 (PBS 缓冲液: 甲醇 = 1:1 混合液; 1 mL) 固定 2 min,静置弃去上清;再加新的甲醇 2 mL,摇匀后静置 10

min,弃掉甲醇。将吉姆萨原液稀释 10 倍,吸取 2 mL 加入试样管中,轻轻晃动静置 10 ~ 15 min,用纯净水冲洗微载体 5 次,吸取少量滴入凹玻片中,于倒置相差显微镜下观察拍照。

2.9 淀粉微载体对 CHO-K1 细胞悬浮瓶培养

选取表面电荷量与 Cytodex-1 接近的淀粉微载体,称取 2 g (湿重) 淀粉微载体和 Cytodex-1 高压灭菌后,分别加入到 175 mL 双侧壁悬浮瓶中,再接入 20 mL 3.0×10^5 cells/mL CHO-K1 细胞悬液,混匀后补充含有 10% 新生牛血清的 F12 营养液至 50 mL。最后置于 37 °C,35 rpm 进行培养。24 h 时抽取 2 mL 微球进行染色和计数并补液至 100 mL,之后每隔 24 h 半量换液并染色和计数,连续培养至 168 h,并绘制细胞生长曲线。

3 结果与分析

3.1 制备工艺条件对交联淀粉微球成球率的影响

结果表明当淀粉溶液浓度为 7%,搅拌速度为 500 rpm,交联剂聚乙二醇二缩水甘油醚用量为 8%,

水油相比 1:6 时,制备出的淀粉微球成球率最高。

粗糙,结构较为致密,而从图(b)可以看出交联马铃薯淀粉微球是半透明状态,球形规整。

3.2 交联淀粉微球的形貌

由图 1(a)可知淀粉微球形态圆整成球形,表面

表 3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results

试验号 Test Number	试验因素 Experimental Factors				试验指标 Index
	A 淀粉浓度 Starch Concentration (%)	B 交联剂用量 Linking-agent Amount (%)	C 搅拌速度 Stirring Speed (RPM)	D 油水相体积比 Volume Ratio	成球率 Granulation Rate (%)
1	1(7%)	1(6)	1(300)	1(2)	82
2	1(7%)	2(8)	2(500)	2(4)	93
3	1(7%)	3(10)	3(700)	3(6)	86
4	2(8%)	1(6)	2(500)	3(6)	85
5	2(8%)	2(8)	3(700)	1(2)	86
6	2(8%)	3(10)	1(300)	2(4)	84
7	3(9%)	1(6)	3(700)	2(4)	80
8	3(9%)	2(8)	1(300)	3(6)	90
9	3(4%)	3(10)	2(500)	1(2)	84
K1	87	82.3	85.3	84	N = 4
K2	85	89.7	87.3	85.7	df = 3
K3	84.7	84.7	84	87	
R	2.3	7.4	3.3	3	

主次顺序: B > C > D > A 最优组合: A1B2C2D3

注:结果为三次平行试验的平均值,且无明显偏差。

Note: Values are given as mean from triplicate determinations, and no obvious deviation.

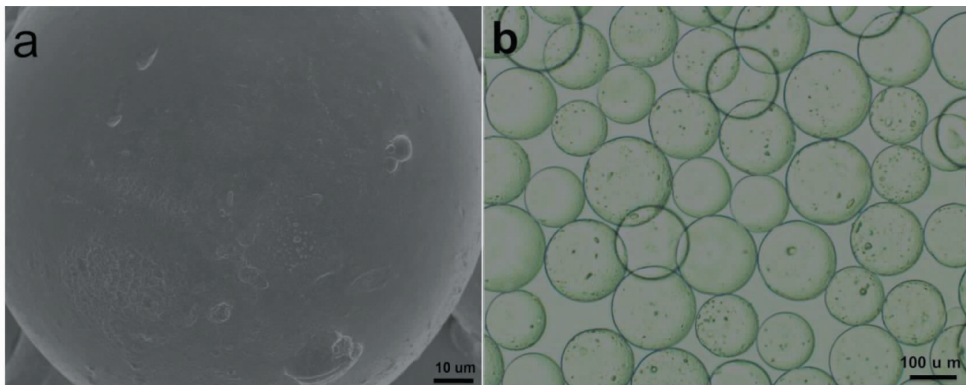


图 1 淀粉微球的扫描电镜图(a)及倒置显微镜下的形貌图(b)

Fig. 1 Morphology of pCSM by SEM(a) and inverted microscope(b)

3.3 粒径分布结果

任意选取 3 组正交试验组,通过显微镜 10 × 镜下照相,再通过 Nano Measure 测量后,得到下表数据:经过筛分后的自制微球的湿球粒径分布最为集中的区域为 198 ~ 278 μm,而进口 Cytodex-1 微载体湿球的粒径分布最为集中的区域是 100 ~ 250 μm。

两者略有差异,但范围较小。微球粒径的大小,可以通过搅拌速度和油水相体积比来控制,两者数值越高,则微球粒径越小。因此,后续在对 CHO-K1 细胞的培养中,也筛分选取粒径与 Cytodex-1 相近的微球,这样有利于细胞的贴壁培养。

3.4 改性条件对淀粉微球表面电荷的影响

正交试验结果表明,三个因素对微球表面电荷密度影响的顺序为 DEAE 浓度 > NaOH 浓度 > 反应

时间。因此,改性表面电荷修饰的最佳工艺条件是加入微球质量 2 倍体积 3.5 mol/L NaOH 溶液与 2 倍体积 3 mol/L DEAE-HCl 溶液,60 °C 密闭反应 4 h。

表 4 粒径分布

Table 4 Particle size distribution

粒径范围 Particle Size Range(μm)	平均粒径 Average Particle Size(μm)	比例 Proportion(%)
152-182	167.75	8.23%
182-198	190.25	11.21%
198-215	208.55	15.77%
215-233	222.25	14.59%
233-278	256.75	36.67%
279-298	285.25	4.57%
298-327	318.25	8.96%

表 5 正交试验结果

Table 5 Orthogonal test results

试验号 No.	试验因素 Experimental Factors				试验指标 Index
	A DEAE 浓度 DEAE concentration(%)	B NaOH NaOH concentration(%)	C 反应时间 Time(h)	D 空列 Vacant column	表面电荷量 Surface charge (mmol/g)
1	1(2)	1(2.5)	1(2)	1	0.019
2	1(2)	2(3.5)	2(3)	2	0.035
3	1(2)	3(4.5)	3(4)	3	0.037
4	2(2.5)	1(2.5)	2(3)	3	0.021
5	2(2.5)	2(3.5)	3(4)	1	0.051
6	2(2.5)	3(4.5)	1(2)	2	0.047
7	3(3)	1(2.5)	3(4)	2	0.056
8	3(3)	2(3.5)	1(2)	3	0.067
9	3(3)	3(4.5)	2(3)	1	0.061
K1	0.030	0.032	0.044	0.043	N = 4
K2	0.040	0.051	0.039	0.046	df = 3
K3	0.061	0.048	0.048	0.042	
R	0.031	0.019	0.009	0.002	

主次顺序:A > B > C > D 最优组合: A₃B₂C₃

注:结果为三次平行试验的平均值,且无明显偏差。

Note: Values were given as mean from triplicate determinations, and no obvious deviation.

一般来说,电荷量越高,越有利于电荷吸附,但是也会对细胞产生不良影响,商品化 Cytodex-1 的表面电荷量约为 0.05 mmol/g。因此选取 2.5 mol/L DEAE-HCl 和 3.5 mol/L NaOH 溶液表面修饰后的微球进行悬浮瓶培养 CHO-K1 细胞。

3.5 FTIR 和 XRD 分析

图 2(a) 表明,PCSM 与豌豆淀粉 3431 cm⁻¹、1106 cm⁻¹ 左右处出现强而宽的-OH 伸缩振动吸收带,说明交联反应前后都存在-OH,且生成的交联淀粉微球在 3431 cm⁻¹ 附近要比淀粉较峰变窄了,这是 O-H 伸缩振动吸收峰引起的。2913、1011 cm⁻¹ 处的

吸收峰分别归属于淀粉葡萄糖单元中的 C-H 伸缩振动和 C-O-C 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动,交联前后吸收峰未发生明显变化。

图 2(b)中分别为马铃薯淀粉、交联淀粉微球、淀粉微载体的 XRD 图谱。马铃薯淀粉在 2θ 为 5.5° 、 17.8° 、 22.1° 附近存在明显的特征衍射峰^[18]。

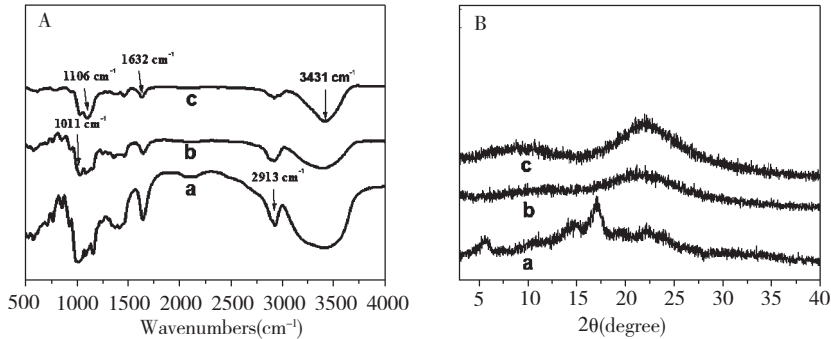


图 2 马铃薯淀粉 (a)、交联淀粉微球 (b)、偶联 DEAE 淀粉微球 (c) 的红外光谱图 (A) 及 XRD 图谱 (B)
Fig. 2 FTIR spectra (A) and X-ray diffraction spectra (B) of potato starch (a), PCSM (b) and DEAE-PCSM (c)

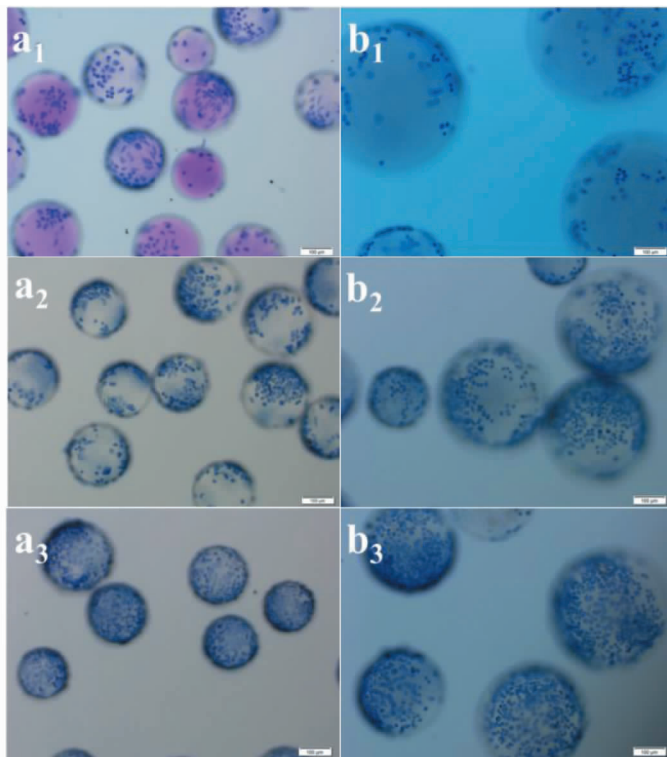


图 3 CHO-K1 细胞在不同微载体上不同培养时间 (24 h、72 h、120 h) 吉姆萨染色效果图 (标尺为 $100\mu\text{m}$) (a) Cytodex-1 微载体; (b) 淀粉微载体

Fig. 3 CHO-K1 cells observed with an inverted light microscope after different culture time (24h, 72h, 120h) of cultivation by Giemsa staining (Scale is $100\mu\text{m}$) (a) Cytodex-1; (b) DEAE-PCSM

3.6 淀粉微载体 CHO-K1 细胞悬浮瓶培养

细胞内的嗜酸性颗粒易与酸性染料伊红结合而

而交联淀粉微球在 22.1° 附近的衍射峰强度明显降低,其余特征峰消失,已基本呈现非晶态的衍射曲线特征,这是由于交联过程破坏了分子链的规整性,交联过程抑制了淀粉分子的结晶能力,已基本处于无序的非晶态^[8]。

被染成粉红色,主要因为嗜酸性颗粒本质属于碱性蛋白质,是一种嗜酸性物质;而细胞核蛋白和淋巴细

胞胞浆呈酸性,是一种嗜碱性物质,当它与吉姆萨染液中的碱性染料美蓝或天青结合而被染成紫蓝色。从图 3 可知,CHO-K1 细胞在淀粉微载体上贴壁良好,细胞被染成紫蓝色,说明淀粉微载体与 CHO-K1 细胞的生物相容性好;同样 Cytodex-1 上的 CHO-K1 细胞也被染成紫蓝色,贴壁情况也很好。再由图 3 (a) 可已看出,淀粉微载体上的 CHO-K1 细胞成纤维细胞样,细胞圆润饱满,与对照组 Cytodex-1 微载体上 CHO-K1 相比,细胞形态几乎一致,结构正常,说明淀粉微载体对 CHO-K1 细胞的增殖生长无明显的影响。同时从图 4 可知,CHO-K1 细胞在淀粉微载体和 Cytodex-1 微载体上的生长趋势基本上一致,24 h 时 CHO-K1 细胞的在淀粉微载体上贴壁情况比 Cytodex-1 稍低,且此时 CHO-K1 细胞已经开始增殖生长,96 h ~ 144 h 期间,CHO-K1 细胞生长增殖速率很快,144 h 时达到最高,细胞密度为 1.8×10^6 cells/ml;而 cytodex-1 微载体在 144 h 时 CHO-K1 细胞也达到最高值,为 2.01×10^6 cells/mL,在两种微载体上细胞生长趋势相似。综合可知,淀粉微载

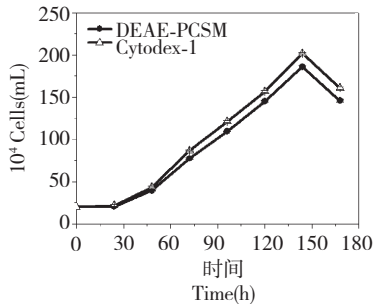


图 4 CHO-K1 细胞在淀粉和 Cytodex-1 微载体上的生长曲线在悬浮瓶培养

Fig. 4 Growth curve of CHO-K1 cells of on DEAE-PCSM and Cytodex 1 microcarriers in spinners culture

体很好的支持了 CHO-K1 细胞的增殖生长。

4 结论

本研究在常温下利用 W/O 乳化体系合成交联淀粉微球,再偶联 DEAE 制备了淀粉微载体,该微载体具有一定的刚性,能高压灭菌,且粒径分布适中。其最佳制备条件为:淀粉溶液浓度为 7%,搅拌速度为 500 rpm,交联剂用量为 8%,水油相体积比 1:6;微球表面修饰最佳条件为:加入微球质量 2 倍体积的 3.5 mol/L NaOH 溶液和 2.5 mol/L DEAE-HCl 溶液,60 °C 密闭反应 4h。通过悬浮瓶培养,对比 Cytodex-1 微载体,培养 CHO-K1 至 144 h 时,淀粉微载体表面细胞密度达到 1.8×10^6 cells/mL,表明该自

制微载体能够对 CHO-K1 贴壁细胞进行良好的培养,且两者培养效果相似,因此淀粉微载体是一种具有潜在价值的贴壁细胞培养用高分子载体。

参考文献

- Rodrigues ME, Costa AR, Fernandes P, et al. Evaluation of macroporous and microporous carriers for CHO-K1 cell growth and monoclonal antibody production. *J Microbiol Biotechnol*, 2013, 23:1308-1321.
- Costa AR, Withers J, Rodrigues ME, et al. The impact of microcarrier culture optimization on the glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Springer Plus*, 2013, 2:25.
- Ting S, Chen A, Reuveny S, et al. An intermittent rocking platform for integrated expansion and differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes in suspended microcarrier cultures. *Stem Cell Res*, 2014, 13:202-213.
- Stich S, Ibold Y, Abbas A, et al. Continuous cultivation of human hamstring tenocytes on microcarriers in a spinner flask bioreactor system. *Biotechnol Progr*, 2014, 30:142-151.
- Park Y, Chen Y, Ordovas L, et al. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells on microcarriers. *J Biotechnol*, 2014, 174:39-48.
- van Wezel AL. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers inhomogeneous culture. *Nature*, 1967, 216:64-65.
- Paris MS, Eaton DL, Sempolinski DE, et al. A gelatin microcarrier for cell-culture in vitro. *J Tissue Culture Assoc*, 1983, 19:262.
- Reuveny S, Mizrahi A, Kotler M, et al. Factors affecting cell-attachment, spreading, and growth on derivatized microcarriers. I. Establishment of working system and effect of the type of the amino-charged groups. *Biotechnol Bioeng*, 1983, 25:469-480.
- Gumusderelioglu M, Cakmak S, Timucin HO, et al. Thermo-sensitive PHEMA microcarriers: ATRP synthesis characterization, and usability in cellcultures. *J Biomater Sci Polym*, 2013, 24:2110-2125.
- Da Fonseca CO, Landeiro JA, Clark SS, et al. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. *Surg Neurol*, 2006, 65(1):2-8.
- Suzuki M, Nagata K, Masunaga S, et al. Biodistribution of 10B in a rat liver tumor model following intra-arterial administration of sodium borocaptate (BSH)/degradable starch microsphere (DSM) emulsion. *Appl Radiat Isotopes*, 2004, 61:933-937.