

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.001

## 利用海藻酸水凝胶构建仿肝板肝组织三维共培养模型\*

王高尚, 贾志栋, 李 阳, 彭 青, 高 毅<sup>△</sup>

(南方医科大学珠江医院肝胆二科/国家重点实验室器官衰竭协同创新中心/广东省人工器官与组织工程研究中心, 广州 510282)

**[摘要]** 目的 利用海藻酸水凝胶构建一种新的肝细胞三维共培养模型。方法 利用海藻酸钠、微流控芯片, 以及肝细胞 C3A 和脐静脉内皮细胞 EA.hy926 制备出海藻酸钠水凝胶微纤维, 实验组为仿肝板组, 同时制备出混合无序水凝胶微纤维作为对照组。利用活细胞双荧光标记验证微纤维内两种细胞排列结构, 将微纤维培养 1 周, 每天观察微纤维形态, 检测肝细胞活力及清蛋白 (Alb)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH-L)、 $\alpha 1$  抗胰蛋白酶 ( $\alpha 1$ AT)、凝血因子 VII (FVII)、谷胱甘肽 S 转移酶  $\alpha 1$  (GST $\alpha 1$ )、细胞色素 P450 氧化酶 1A2 (CYP1A2) 的水平。结果 仿肝板组水凝胶内 C3A 细胞在中间, 有 2~3 排, EA.hy926 细胞位于 C3A 细胞两侧, 呈现肝板结构排布; 对照组水凝胶内两种细胞则混杂在一起呈无序状态; 大约 3 d 肝组织条索形成; 两组水凝胶微纤维直径随时间变化差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 仿肝板组肝细胞活力在第 5 天达到最大值, 对照组在第 6 天达到最大值, 两组除第 1 天较接近外, 其余各天仿肝板组均高于对照组; 两组清蛋白分泌水平变化趋势基本相同, 在第 3 天达到最大值, 第 4 天开始下降; 仿肝板组 ALT、AST、LDH-L 在第 3 天下降到最小值, 第 4 天以后变化趋势和对照组相同; 两组  $\alpha 1$ AT 除第 5 天外其余各时间点比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两组 GST $\alpha 1$  分泌量随时间持续上升, 仿肝板组各时间点明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 仿肝板组 FVII 分泌量前 7 d 逐渐升高, 对照组于第 2 天持续下降, 仿肝板组第 3 天开始明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 对照组细胞内 CYP1A2 水平随时间变化不明显, 仿肝板组从第 4 天开始明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。结论 成功构建出一种仿肝板肝组织三维共培养模型, 肝细胞功能有望得到长时间维持。

**[关键词]** 海藻酸钠; 水凝胶; 微流体; 肝细胞; 肝板; 三维共培养**[中图分类号]** R318.14**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2305-04**Construction of 3D co-culture model of liver tissue mimicking hepatic plate constructed by alginate hydrogel\***Wang Gaoshang, Jia Zhidong, Li Yang, Peng Qing, Gao Yi<sup>△</sup>

(Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University/State Key Laboratory of Organ Failure Research/Co-Innovation Center for Organ Failure Research/Guangdong Provincial Research Center of Artificial Organ and Tissue Engineering, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct a new 3D co-culture model of hepatic cells. **Methods** The alginate hydrogel microfiber was prepared with sodium alginate, microfluidic chip, liver cell line C3A and human umbilical vein endothelial cell line EA.hy926. The experimental group was the mimick hepatic plate group (F), meanwhile the mixed disorderly hydrogel microfiber was prepared as the control group (H). The live cell double fluorescent labeling was used to verify the cell arrangement structure in the microfiber. Microfibers were cultured for 1 week, the microfiber morphologies were daily observed and the hepatocyte activity was measured, the albumin (Alb), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH-L),  $\alpha 1$  antitrypsin ( $\alpha 1$ AT), coagulation factor (FVII), glutathione S transferase alpha 1 (GST $\alpha 1$ ) and cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) contents in the cultures were detected. **Results** In the group, C3A cells in hydrogel arranged in two or three lines at the center, EA.hy926 cells located in the bilateral sides of C3A cells, showing the hepatic plate arrangement; in the group H, the two kinds of cells were mixed together in a state of disorder. The liver tissue cords were formed on 3 d. The hydrogel microfiber diameter of two groups showed little changes over time without statistical significance ( $P > 0.05$ ). The viability of hepatocytes reached a maximum on 5 d in the group F and on 6 d in group H, while the group F was higher than group H at each time point except on 1 d. The albumin secretion in the two groups showed basically same trend, and reached a maximum on 3 d, then began to decline on 4 d. The levels of ALT, AST and LDH-L in the group F were decreased to a minimum on 3 d, and then varied trend after 4 d was the same as the group H. The  $\alpha 1$ AT at each time point except on 5 d had statistically significant difference between the two groups ( $P < 0.05$ ); the GST $\alpha 1$  secretion amount was increased over time in both groups, which at each time point in the group F was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The FVII secretion amount in the group F was gradually increased before 7 d, while which in the control group continued to decline from 2 d, and which in the group F was significantly higher than that in the control group H from 3 d ( $P < 0.05$ ). The change of intracellular CYP1A2 content with time lapse was unobvious in the group H, while which from 4 d in the group F began to be significantly higher than that in the group H ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The three dimensional co-culture model of liver tissue mimicking hepatic plate is successfully constructed, in which the hepatocyte function is expected to be maintained for a long time.

**[Key words]** alginate; hydrogel; microfluidic; hepatocyte; hepatic plate; 3D co-culture

\* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助 (2012AA020505); 国家自然科学基金资助项目 (81470875); 广东省省级科技计划项目 (2014B020227002); 广东省省级科技计划项目 (2015B090903069); 广东省自然科学基金资助项目 (2014A030312013); 广东省省级科技计划项目 (2015B020229002); 广东省省级科技计划项目 (2013B091100001); 南方医科大学开发培育项目 (C1033042)。 作者简介: 王高尚 (1989-), 硕士, 主要从事生物人工肝、肝细胞三维培养研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: gaoyi6146@163.com。

目前肝移植是治疗肝衰竭的有效方法,然而世界各国的器官移植面临着严重的来源短缺问题<sup>[1]</sup>。为此,以实现肝脏功能修复、替代、重建为目标的人工肝技术和肝组织工程为肝衰竭治疗提供了新的选择<sup>[2-3]</sup>。本文通过结合肝组织工程与生物人工肝技术,模拟正常肝脏基本结构,提出仿肝板结构肝组织三维培养技术的研究。借助当前微流控、水凝胶、软光刻等技术,采用人源性肝细胞、内皮细胞共培养,构建出仿肝板样组织结构,以期提高体外肝细胞功能。同时,这种仿肝板结构三维培养的肝组织也有望成为药物开发和检测的有效评价工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要实验仪器设备、耗材** 微流控芯片(中国科学院上海微系统与信息技术研究所)、微量注射泵(美国 Harvard Apparatus)、电子分析天平(上海佑科仪器仪表有限公司)、CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Shel Lab)、磁力搅拌器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、培养板(美国 Corning)、玻底培养皿(无锡耐思生物科技有限公司)、倒置相差显微镜(CK-2,美国 Olympus)、激光共聚焦显微镜(美国 Olympus)、酶标仪(美国 BioTek)、全自动生化仪(美国 Aerosep)。

**1.1.2 主要试剂** 胎牛血清(美国 Gibco);胰蛋白酶、青链霉素(美国 Genview);磷酸盐缓冲液(PBS)购自吉诺生物医药技术有限公司;高糖 DMEM(美国 Hyclone);海藻酸钠、氯化钡、葡聚糖、牛血清清蛋白、氯化钠(美国 Sigma);HEPES(Life Technologies);Calcein-AM、Mito-Red、CCK-8(日本同仁化学研究所);人清蛋白酶免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 MyBioSource); $\alpha 1$  抗胰蛋白酶( $\alpha 1$ AT)ELISA 试剂盒(美国 abcam);谷胱甘肽 S 转移酶  $\alpha 1$ (GST $\alpha 1$ ) ELISA 试剂盒、凝血因子 VII (F VII) ELISA 试剂盒、细胞色素 P450 氧化酶 1A2 (CYP1A2) ELISA 试剂盒(加拿大 Biomatik)。

**1.1.3 细胞** C3A 细胞株和 EA.hy926 细胞株均购自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。

### 1.2 方法

**1.2.1 微流控芯片设计制作与层流验证** 微流控芯片的制作工艺为传统软光刻和再铸模技术,制作材料为聚二甲基硅氧烷,后期通过合作方(中国科学院上海微系统与信息技术研究所)对芯片加工制作(图 1A)。将 7 个 8 mm 长度的 FEP 管(内径为 0.51 mm,外径为 1.59 mm),插入芯片注入口,再将 7 只

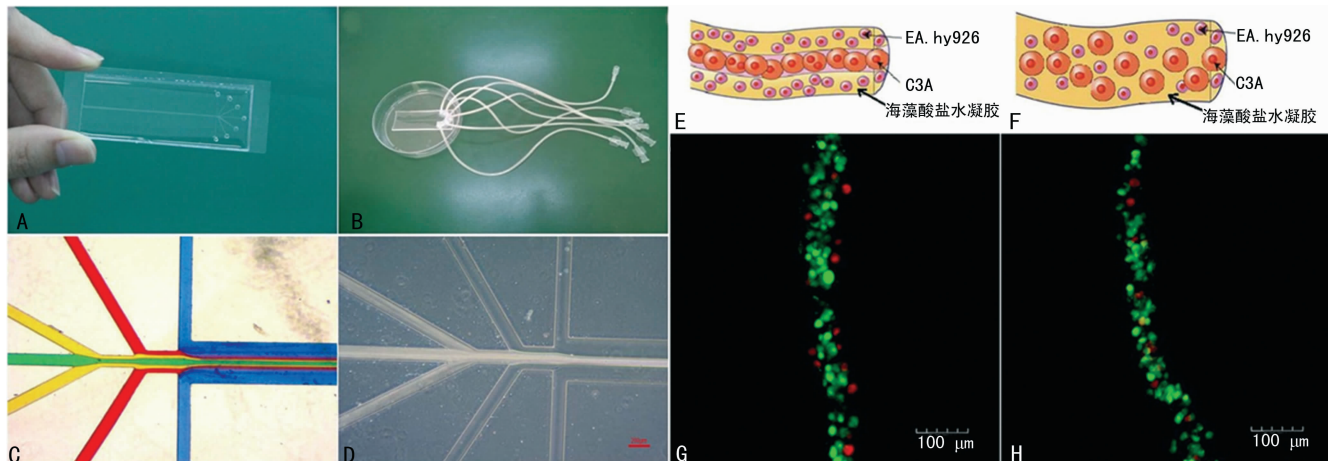
一次性静脉输液针的针头端剪去,与 FEP 管的另一端相接,接口处采用瓦克胶进行封闭固定,即完成芯片制作(图 1B)。前期通过探索各通道流速条件,采用不同颜色染料进行流体层流分析验证,镜下图像分析显示出 4 种液体的流速条件满足层流条件(图 1C),通入细胞和溶液后芯片内实际层流状态见图 1D)。

**1.2.2 主要溶液配制** 完全培养基(500 mL DMEM,10%胎牛血清,1%青链霉素)、海藻酸钠溶液[0.7% (w/v) 海藻酸钠,0.9% NaCl,1% BSA,10 mmol/L HEPES]、胶凝液(10%葡聚糖,20 mmol/L BaCl<sub>2</sub>,0.72% NaCl,10 mmol/L HEPES)、缓冲液(10%葡聚糖,0.9% NaCl,10 mmol/L HEPES)。

**1.2.3 制备单细胞悬液** 常规单层培养 C3A 细胞和 EA.hy926 细胞,仿肝板组将消化获取的  $6 \times 10^7$  个 C3A 细胞和  $2 \times 10^7$  个 EA.hy926 细胞分别混悬于 2 mL 海藻酸钠溶液中,制备单细胞悬液,浓度分别为  $3 \times 10^7$  /mL 和  $1 \times 10^7$  /mL。对照组将获取的两种细胞混合均匀后混悬于 2 mL 海藻酸钠溶液中,制备单细胞悬液,总浓度为  $4 \times 10^7$  /mL。

**1.2.4 合成海藻酸钠水凝胶微纤维** 连接微量注射泵,固定芯片,将海藻酸钠 C3A 及 EA.hy926 细胞溶液、缓冲液及胶凝液通入芯片内。其中,先通入缓冲液(15  $\mu$ L/min),再通入海藻酸钠 C3A 细胞溶液(20  $\mu$ L/min)、海藻酸钠 EA.hy926 细胞溶液(10  $\mu$ L/min),最后通入胶凝液(58.3  $\mu$ L/min)。由于通入芯片内的液体流可达到层流状态,即肝细胞溶液在芯片主反应通道中间流动,内皮细胞溶液在肝细胞溶液两边分布,然后内皮细胞溶液外围是缓冲液,最外边的液体为胶凝液,肝细胞与内皮细胞呈现肝板结构样排布,最终形成包裹肝板结构的水凝胶(图 1E)。对照组中间通道通入 C3A 和 EA.hy926 混合细胞悬液,中间通道两侧通入海藻酸钠溶液,其余通道通入液体种类及各通道流速与仿肝板组均相同(图 1F)。同时测定末端水凝胶合成的速度约 5 m/min,约含  $6 \times 10^5$  个肝细胞。收集一定长度的水凝胶放入装有完全培养基的孔板中进行培养,每隔 24 h 换液。

**1.2.5 活细胞双荧光标记** 消化细胞前分别用 Calcein-AM 和 Mito-Red 标记 C3A 和 EA.hy926 细胞,合成水凝胶微纤维后在激光共聚焦显微镜下实时观察水凝胶内肝细胞和内皮细胞排布结果(图 1G、1H)。



A: 芯片实物图;B: 芯片组装图;C: 染料层流验证图;D: 仿肝板组细胞溶液实际层流图;E: 仿肝板组水凝胶示意图;F: 对照组水凝胶示意图;G: 仿肝板组双荧光验证图;H: 对照组双荧光验证图。

图 1 微流控芯片层流验证及两组水凝胶内双荧光验证图

**1.2.6 主要指标检测** (1)观察水凝胶微纤维大体形态并测量其直径;(2)CCK-8 检测肝细胞活力:收集 20 cm 长的水凝胶微纤维于 24 孔板,每天每孔加入 CCK-8 100  $\mu$ L,3 个复孔,在孵箱孵育 2 h 20 min 后于 450 nm 处测量吸光度(OD)值;(3)丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸盐脱氢酶(LDH)用全自动生化仪测定;清蛋白(Alb)、 $\alpha$ 1AT、GST $\alpha$ 1、FVII、CYP1A2 用 ELISA 试剂盒检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计学软件进行数据处理,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组样本数据采用重复测量的多因素方差分析,组内各时间点相互比较采用单因素方差分析,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 活细胞双荧光标记** 此荧光标记表明,通过该微流控芯片和相应的流速控制,可以制备出包裹肝板结构的水凝胶束。仿肝板组水凝胶束内包裹着 C3A 细胞和 EA.hy926 细胞,其中 C3A 细胞在中间,有 2~3 排,EA.hy926 细胞位于 C3A 细胞两侧,呈现肝板结构排布;对照组水凝胶束内 C3A 细胞和 EA.hy926 细胞则混杂在一起呈无序状态。

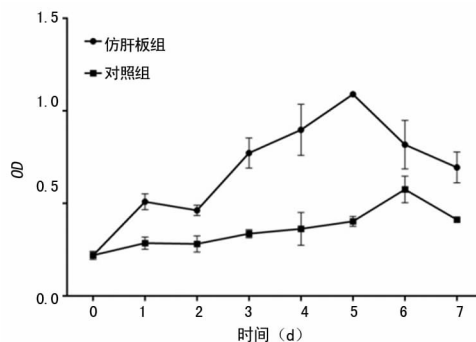
**表 1 两组水凝胶微纤维直径随时间变化统计表** ( $\bar{x} \pm s, n=20, \mu\text{m}$ )

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
仿肝板组	101.9 $\pm$ 6.5	101.9 $\pm$ 3.8	102.4 $\pm$ 4.2	103.4 $\pm$ 4.1	102.1 $\pm$ 4.6
对照组	100.3 $\pm$ 1.9	102.8 $\pm$ 4.5	101.3 $\pm$ 4.1	101.4 $\pm$ 3.4	100.7 $\pm$ 2.9

**2.2 微纤维形态观察与直径测量** 水凝胶刚合成时内部细胞比较松散,大约 3 d 细胞逐渐接触融合形成肝组织条索,每天测量水凝胶微纤维直径(表 1)发现两组直径随时间变化不大,微纤维直径约 100  $\mu\text{m}$ ,两组各时间点之间及各组各时间点之

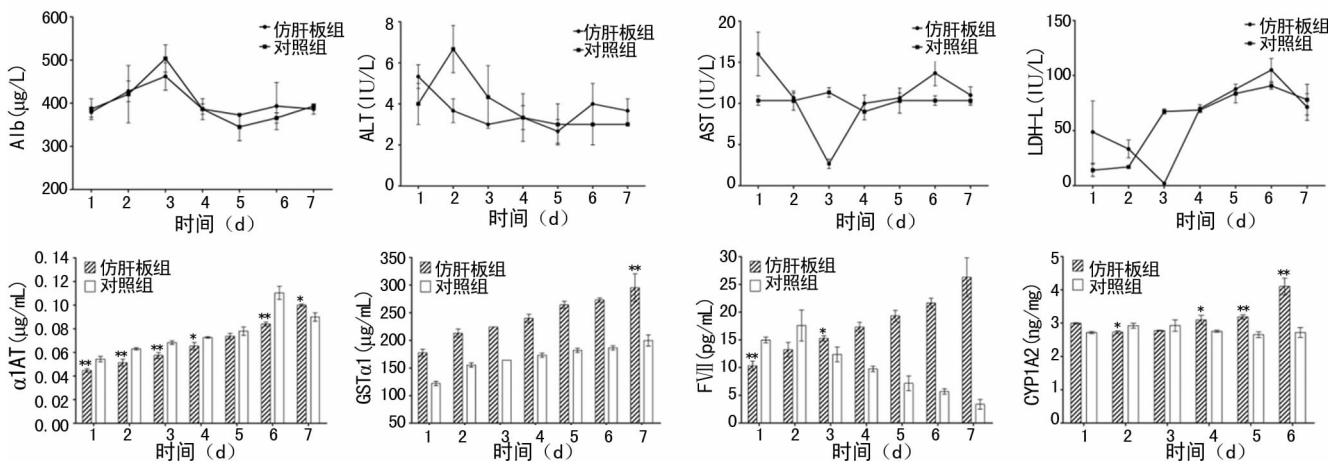
间比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.3 肝细胞活力** 仿肝板组在第 5 天达到最大值,对照组在第 6 天达到最大值,两组肝细胞活力除第 1 天较接近外,其余各天仿肝板组均高于对照组(图 2)。



**图 2 两组肝细胞活力随时间变化图**

**2.4 肝细胞功能测定** 两组清蛋白分泌水平变化趋势基本相同,在第 3 天达到最大值,第 4 天开始下降并维持一定水平;仿肝板组 ALT、AST、LDH-L 在第 3 天下降到最小值,第 4 天以后变化趋势和对照组基本相同;两组  $\alpha$ 1AT 前 6 d 逐渐升高,仿肝板组第 7 天继续上升,而对照组开始下降,两组  $\alpha$ 1AT 除第 5 天外其余各时间点比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ );两组 GST $\alpha$ 1 分泌量随时间持续上升,仿肝板组各时间点均高于对照组,两组各时间点比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );仿肝板组 FVII 分泌量前 7 d 逐渐升高,对照组于第 2 天达最大值后持续下降,除第 2 天外其余时间点比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );对照组细胞内 CYP1A2 水平随时间变化不明显,仿肝板组从第 4 天开始明显高于对照组( $P<0.05$ ),见图 3。



\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , 两组同时间比较。

**图 3 仿肝板组与对照组肝细胞功能指标随时间变化图**

**3 讨论**

体内肝细胞是处于一种三维环境中,细胞间相互作用有助于调节细胞的生长和功能分化<sup>[4]</sup>。体外肝细胞培养面临的一个重大问题是如何最大程度达到体内肝细胞的功能水平,体外单层培养的肝细胞极性快速丢失,肝细胞功能迅速变差<sup>[5]</sup>。基于仿生学思维,国内外众多学者、研究机构开始探讨如何模拟重建肝细胞在肝脏内的三维培养模式,以实现肝细胞在体外高质量、高密度、长时间功能维持的目标<sup>[6]</sup>。为此,构建出多种肝细胞三维培养和共培养模型,如三明治夹心培养<sup>[7]</sup>、球形聚集培养<sup>[8]</sup>、微囊包裹培养<sup>[9]</sup>、多层堆叠式培养<sup>[10]</sup>、细胞支架

相关培养<sup>[11]</sup>、微流控芯片培养<sup>[12]</sup>、3D 生物打印<sup>[13]</sup>等。海藻酸钠是一种从棕色海藻细胞壁中提取的碳水化合物聚合物,具有生物相容性。海藻酸钠与二价阳离子如钙离子、钡离子等在凝胶化过程中,形成多孔基质。海藻酸钠水凝胶的机械性能可以通过一些物理因素,如交联密度,交联剂类型,海藻酸钠分子量分布和黏度,化学修饰来调整。海藻酸钠水凝胶孔隙也可以调整到只容许小分子如气体、葡萄糖、清蛋白透过,不容许大分子如 IgG 透过。海藻酸钠的生物相容性,为细胞包被提供了一个水合基质,贴壁细胞不能在海藻酸钠表面吸附和扩展,从而限制细胞与海藻酸钠水凝胶之间的生物学相互作用<sup>[14]</sup>。正是由

于海藻酸钠水凝胶优良的生物相容性,能够隔断免疫反应,众多学者利用其进行细胞移植研究<sup>[15-17]</sup>及生物人工肝反应器<sup>[18]</sup>研究。

本文利用海藻酸钠及微流控、软光刻等先进技术,采用人源性肝细胞 C3A 和内皮细胞 EA.hy926 共培养,通过前期摸索微流控条件成功构建出仿肝板样组织结构。同时对其进行了短期的肝细胞功能检测。Alb 基本由肝脏分泌,反映肝细胞合成功能。转氨酶属细胞内功能酶,肝细胞坏死或肝细胞膜通透性改变时,酶进入血液中,致使血清酶水平增加,成为肝细胞损伤的标志酶,ALT 和 AST 是其中最重要的两种。仿肝板组 Alb 分泌量第 3 天达峰值,而 ALT、AST、LDH-L 第 3 天达低值,从侧面印证了镜下肝组织条索约于第 3 天形成。 $\alpha$ 1AT 主要在肝脏合成,是血清中最主要蛋白酶抑制剂,FⅦ合成减少是肝细胞蛋白质合成功能减退的早期诊断指标。CYP1A2 属于肝细胞解毒功能 I 相酶,是 CYP450 家族中最重要的种类之一<sup>[19]</sup>,GST $\alpha$ 1 属于肝细胞解毒功能 II 相酶<sup>[20]</sup>。虽然两组  $\alpha$ 1AT 分泌量每天比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但仿肝板组第 7 天继续上升,而对照组开始下降;FⅦ分泌量对照组前 2 d 均高于仿肝板组,但从第 3 天开始下降,而仿肝板组则继续上升,提示仿肝板组肝细胞蛋白合成功能一周内逐渐增强。GST $\alpha$ 1 分泌量仿肝板组每天均高于对照组;仿肝板组 CYP1A2 逐渐升高,而对照组变化不明显,说明仿肝板组肝细胞代谢解毒功能一周内逐渐增强。综合分析,和对照组相比,仿肝板组在多个肝功能指标上初步显示出优势,说明仿肝板肝组织三维共培养能够提高体外培养肝细胞功能。下一步将延长观测时间,增加其他三维共培养及普通平板共培养作为对照组,进一步证明仿肝板肝组织共培养的优越性。

综上所述,本文成功构建出一种仿肝板肝组织三维共培养模型,肝细胞功能有望得到长时间维持,为体外研究肝细胞提供了一种新的方法。此模型还可以作为肝细胞药物毒性反应模型,有望成为药物开发和检测的有效评价工具。

## 参考文献

- [1] Dutkowski P, Linecker M, Deoliveira ML, et al. Challenges to liver transplantation and strategies to improve outcomes[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(2):307-323.
- [2] Lee SY, Kim HJ, Choi D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation[J]. *Int J stem cells*, 2015, 8(1):36-47.
- [3] Ordovás L, Park Y, Verfaillie CM. Stem cells and liver engineering[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(7):1094-1107.
- [4] Kang YB, Rawat S, Cirillo J, et al. Layered long-term coculture of hepatocytes and endothelial cells on a transwell membrane; toward engineering the liver sinusoid[J]. *Biofabrication*, 2013, 5(4):045008.
- [5] Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, et al. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype; cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells [J]. *FASEB J*, 1999, 13(14):1883-1900.
- [6] Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(8):1315-1530.
- [7] Murray JW, Han D, Wolkoff AW. Hepatocytes maintain greater fluorescent bile acid accumulation and greater sensitivity to drug-induced cell death in three-dimensional matrix culture[J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(12):e12198.
- [8] Xia L, Hong X, Sakban RB, et al. Cytochrome P450 induction response in tethered spheroids as a three-dimensional human hepatocyte in vitro model [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(2):320-329.
- [9] Jitraruch S, Dhawan A, Hughes RD, et al. Alginate microencapsulated hepatocytes optimised for transplantation in acute liver failure[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):e113609.
- [10] Kim K, Utoh R, Ohashi K, et al. Fabrication of functional 3D hepatic tissues with polarized hepatocytes by stacking endothelial cell sheets in vitro [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9(10):2102.
- [11] Shang Y, Tamai M, Ishii R, et al. Hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells [J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117(1):99-106.
- [12] Verneti LA, Senutovitch N, Boltz R, et al. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(1):101-114.
- [13] Lee JW, Choi YJ, Yong WJ, et al. Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering[J]. *Biofabrication*, 2016, 8(1):015007.
- [14] Jang J, Seol YJ, Kim HJ, et al. Effects of alginate hydrogel cross-linking density on mechanical and biological behaviors for tissue engineering[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2014, 37(1):69-77.
- [15] De Vos P, Faas MM, Strand B, et al. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(32):5603-5617.
- [16] Gimi B, Nemani KV. Advances in alginate gel microencapsulation of therapeutic cells[J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2013, 41(6):469-481.
- [17] Capone SH, Dufresne M, Rechel M, et al. Impact of alginate composition; from bead mechanical properties to encapsulated HepG2/C3A cell activities for in vivo implantation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e62032.
- [18] Figaro S, Pereira U, Rada H, et al. Development and validation of a bioartificial liver device with fluidized bed bioreactors hosting alginate-encapsulated hepatocyte spheroids[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2015(8):1335-1338.
- [19] Olsen L, Oostenbrink C, Jørgensen FS. Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 86:61-71.
- [20] Esmaili-Rad A, Khanjani S, Vaziri H, et al. Gene expression pattern of some classes of cytochrome P-450 and glutathione S-transferase enzymes in differentiated hepatocytes-like cells from menstrual blood stem cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(5):530-538.