

文章编号:1004-7220(2009)01-0015-06

## 采用灌注生物反应器构建的心肌组织中 氧分布的数值模拟

江 华, 周 燕, 谭文松

(华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** **目的** 建立灌注生物反应器和心肌组织构建物中流体流动及氧传递和反应的稳态数学模型。**方法** 以工程化心肌组织体外多通道灌注培养系统为研究对象,利用计算流体力学方法,通过商业软件来求解数学模型,并考察两种细胞密度下灌注速率对氧分布的影响。**结果** 通过多通道灌注生物反应器模仿毛细血管,能部分提高及改善支架材料内的氧浓度分布。在细胞密度较低时多通道灌注方式可以满足细胞生长的需要;但由于通道的数目较少以及形状简单,在细胞密度较高时,仍无法满足细胞对氧的需求。**结论** 该模型能够用于优化支架材料的几何尺寸以及灌注速率等流动参数。

**关键词:** 心肌组织工程; 生物反应器; 计算流体力学; 氧分布

**中图分类号:** R318.01 **文献标志码:** A

## Numerical simulation of oxygen distribution in a cardiac tissue constructed in a perfusion bioreactor

JIANG Hua, ZHOU Yan, TAN Wen-song (State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract: Objective** To develop a steady-state mathematical model for oxygen concentration profile in perfusion bioreactor and a cardiac tissue construct as a function of flow rate and cell density. **Method** The cardiac tissue construct was cultured in perfusion bioreactor using scaffold with parallel channel array. The mathematical model was solved by computational fluid dynamics (CFD) commercial software to investigate the effects of cell densities and flow rate on oxygen concentration profiles in the construct. **Result** The simulation results indicated that the parallel channel array could mimic the role of the capillary network to enhance mass transport and improve the oxygen distribution partially in the scaffold. Oxygen concentration could increase with the medium flow rate, which was enough for low cell density in construct. However, this method couldn't provide enough oxygen for high cell density due to the less number and simple formation of the channel. **Conclusions** The mathematical model could be used to optimize scaffold geometry and flow condition for constructing cardiac tissue in perfusion bioreactor.

**Key words:** Cardiac tissue engineering; Bioreactor; Computational fluid dynamics; Oxygen concentration

由冠心病引起的心肌梗死和心力衰竭,已成为威胁全世界人类健康的一大难题。近年来,尽管溶

栓、冠脉介入治疗、外科冠状动脉搭桥术和辅助性药物等的应用挽救了众多患者的生命,但这些治疗主

收稿日期:2008-09-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20576036、20776044)

作者简介:江华(1977-),男,研究方向:组织工程

通讯作者:谭文松, Tel: (021)64253394, E-mail: wstan@ecust.edu.cn

要针对缺血心肌,对于已经死亡的心肌缺乏治疗效果,心肌组织工程的提出为未来临床治疗提供了一种新的方法<sup>[1]</sup>。

目前体外构建工程化心肌组织大多在生物反应器系统中进行,主要包括搅拌式生物反应器、灌注式生物反应器、旋转式生物反应器等<sup>[2]</sup>。研究表明,在体外构建心肌组织过程中,一个最为关键的参数是材料中氧浓度的分布<sup>[3,4]</sup>。在体内,丰富的毛细血管网架起一个有效的传质通道,为细胞提供充足的氧和营养物。在体外,由于氧在培养基中的溶解度较低,培养基中的氧传向三维构建物时,存在液侧边界层的传质阻力和构建物内部的扩散阻力,这两种传质阻力的存在,导致构建物中氧的浓度远低于培养基中的浓度<sup>[5]</sup>。而心肌细胞氧消耗速率较高,因此,在心肌组织构建物中易形成局部氧限制区域,引起细胞死亡,出现坏死区<sup>[6,7]</sup>。为了减少氧的传质限制,本研究设计了一多通道支架材料,支架厚度2 mm,支架中含有多个直径为330 μm平行的圆柱通道,各通道壁与壁的间距为370 μm,以模拟体内毛细血管的功能,通过多通道灌注培养系统构建工程化心肌组织。

在本实验室前期的研究工作中,针对工程化软骨构建过程建立了支架材料内部的氧扩散传递及消耗模型,能够模拟三维支架材料内部的扩散阻力对氧浓度以及组织构建的影响<sup>[8]</sup>。但是在多通道灌注生物反应器中构建心肌组织,必须综合考察材料内部扩散阻力和液侧流体边界层阻力对物质传递的影响。因此,本研究以工程化心肌组织体外多通道灌注培养系统为研究对象,综合氧在材料内的扩散和反应方程以及材料外的对流扩散方程,利用计算流体力学方法,通过商业软件来求解数学模型,对不同灌注速率和不同细胞密度下反应器及心肌组织构建物中氧的分布进行预测,为优化组织工程生物反应器的设计和三维支架材料结构提供一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 几何模型与网格

图1所示为工程化心肌灌注培养反应器和支架材料的几何构型以及计算网格划分。液体培养基从灌注生物反应器的入口进入,经过平行的多通道后从出口排出。营养物以及氧组分在流动空间内通过

轴向对流及径向扩散方式传递,进入支架材料后则以轴向和径向的扩散方式传递并被细胞消耗;而代谢副产物则通过扩散方式从支架材料传递到通道后被流体带出反应器。构建物的厚度为2 mm,灌注通道直径为330 μm,各通道壁与壁间距为370 μm。

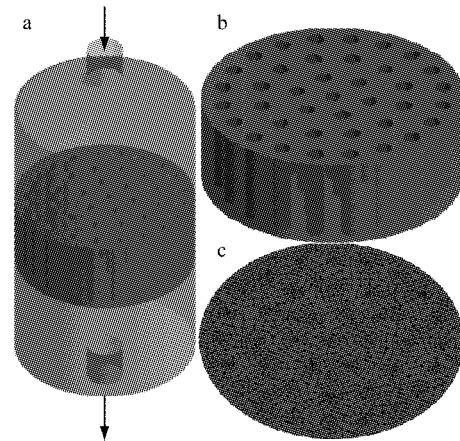


图1 灌注生物反应器(a)、支架材料几何构型(b)与截面网格(c)  
Fig.1 Schematic diagram of perfusion bioreactor(a), 3-D scaffold(b) and cross-section mesh(c)

### 1.2 控制方程

对于三维不可压缩牛顿流体,其N-S方程可以由下式表示:

$$\nabla \cdot \mathbf{V} = 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial \mathbf{V}}{\partial t} + \mathbf{V} \cdot \nabla \mathbf{V} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \frac{\mu}{\rho} \nabla^2 \mathbf{V} \quad (2)$$

式中: $\mathbf{V}$ 表示速度矢量; $p$ 为压力; $\mu$ 表示动力粘度; $\rho$ 为培养基密度。

氧在流动空间内的传递包含对流传递及扩散传递,可用如下公式(3)表示:

$$\frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} + \mathbf{V} \cdot \nabla C_{O_2} = \nabla \cdot D_{O_2} \nabla C_{O_2} \quad (3)$$

式中: $C_{O_2}$ 表示氧在培养基中的浓度; $D_{O_2}$ 则表示氧在培养基中的扩散系数。

氧在组织空间中的细胞消耗利用 Michaelis-Menten 动力学方程描述,结合氧在组织空间中的扩散传递,用下式表示:

$$\frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} = \nabla \cdot D_{\text{eff}} \nabla C_{O_2} - \frac{\mu_{\text{max}} C_{O_2}}{K_m + C_{O_2}} \rho_{\text{cell}} \quad (4)$$

式中: $D_{\text{eff}}$ 为氧在支架材料内的有效扩散系数; $\mu_{\text{max}}$ 为最大比消耗速率; $K_m$ 为 $\mu_{\text{max}}/2$ 时的氧浓度; $\rho_{\text{cell}}$ 为细

胞密度。

将上述不同区域氧的传递和反应方程与 N-S 方程组耦合求解即可得到灌注反应器内氧的分布。

### 1.3 模型参数

表 1 为模型中所使用的参数。

表 1 模型使用参数

Tab.1 Model parameters

Parameter	Value	Source
$\mu_{\max}/[\text{mol} \cdot (\text{个} \cdot \text{s})^{-1}]$	$2.5 \times 10^{-17}$	[9]
$K_m/(\text{mol} \cdot \text{m}^{-3})$	$6.875 \times 10^{-3}$	[9]
$\rho_{\text{cell}}/(\text{个} \cdot \text{m}^{-3})$	$2.7 \times 10^{13}, 1.0 \times 10^{14}$	This work
$D_{\text{eff}}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$2.0 \times 10^{-9}$	[6]
$D_{\text{O}_2}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$3.0 \times 10^{-9}$	[10]
$C_{\text{in}}/(\text{mol} \cdot \text{m}^{-3})$	0.211	[11]
$v_{\text{in}}/(\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$	0.0005, 0.0010 0.0015, 0.0020	This work

## 2 结果

### 2.1 流场速度分布

图 2 为灌注反应器截面的流场速度分布和流线。如图 2(a) 所示,液体培养基在灌注反应器入口和出口处速度最大;从入口进入反应器后,因流动面积增大流速逐渐减速;在支架材料处,由于流通面积急剧减小,同时由细胞-支架材料形成的组织空间其内部流动阻力较大,故培养基只能在平行通道内加速,其中中心通道内流体速度最大,而远离中心的通道内流体速度要低于中心通道;培养基自通道内流出后再汇合聚集,然后自反应器出口处加速流出。由培养基灌注时所形成的流线可知(见图 2(b)),在反应器上部以及下部都存在流速相对缓慢的滞止区,由于该区域只存在分子扩散,没有对流传递效应,不利于培养液的更新以及代谢废物的快速排放,故在优化设计时应该考虑将反应器的实际形状修改为与实际流线相互吻合。

### 2.2 氧的传递及分布

采用附加标量方程与 N-S 方程耦合计算的方法模拟氧的传递,并在细胞-支架材料复合物中对氧传递方程添加源项以考虑细胞对氧组分的消耗,从而模拟氧组分在灌注反应器以及支架材料内的浓度分

布。分别考察在 4 种灌注速率下饱和溶氧的培养基在一次循环过程后,氧浓度在灌注反应器内以及支架材料中的分布,其中细胞密度采用较低的体外培养密度以及较高的生理细胞密度两种状况,研究不同状态下灌注反应器的适用性。

图 2 灌注反应器垂直截面速度分布(a)及流线(b)

Fig.2 Perfusion bioreactor velocity (a) and pathline (b) profile

当支架材料中细胞密度为  $2.7 \times 10^{13}$  个/ $\text{m}^3$  时,灌注入口速率  $v_{\text{in}}$  分别为 0.5 mm/s(a)、1 mm/s(b)、1.5 mm/s(c)、2 mm/s(d) 时氧在反应器及支架材料中垂直截面上的浓度分布见图 3。随着灌注速率的增加,支架材料内最低氧浓度从  $0.14 \text{ mol}/\text{m}^3$  升高到  $0.17 \text{ mol}/\text{m}^3$ ,因此,在支架材料中细胞密度较低时,采用上述灌注速率能保证支架材料内足够的氧供应细胞。灌注速率的提高对支架材料内氧浓度分布的均匀性有明显的改善,灌注速率较低时,低氧区域的体积较大,随着灌注速率的提高,低氧区域的体积逐渐减小。当入口灌注速率达到 2 mm/s 时,支架材料内氧浓度在该细胞密度下分布均匀性很好,但在通道的流动方向上处于流动上游的氧浓度明显高于下游,这可能是支架内细胞对氧的消耗所致。

当支架材料中细胞密度为  $1.0 \times 10^{14}$  个/ $\text{m}^3$  时,灌注入口速率  $v_{\text{in}}$  为 0.5 mm/s(a)、1 mm/s(b)、1.5 mm/s(c)、2 mm/s(d) 时的氧在垂直截面上的浓度分布见图 4。当入口灌注速率为 0.5 mm/s 时,支架

材料内氧浓度分布非常不均,最高氧浓度为饱和溶解氧  $0.21 \text{ mol/m}^3$ ,而最低氧浓度只有  $3.4 \text{ mmol/m}^3$ ,该区域处于严重的缺氧状态,且所占空间较大;随着灌注速率的提高,最低氧浓度提高,且低氧区域的体积减小,在  $2 \text{ mm/s}$  时最低氧浓度达到  $65 \text{ mmol/m}^3$ 。与低细胞密度相比,处于较高生理细胞密度时模拟结果显示最低氧浓度远低于前者,分布均匀性也相对较差。

由图5可见,当灌注速率为  $2 \text{ mm/s}$ 、支架材料中细胞密度为  $1.0 \times 10^{14} \text{ 个/m}^3$  时,沿流动方向支架材料上截面的氧浓度明显高于下截面的氧浓度,且分布均匀性也优于下截面,这主要是由于材料内细胞对氧的消耗使氧浓度下降,传质推动能力降低所导致的。虽然灌注速率增加有利于提高最低氧浓度,促进组织工程材料内氧浓度的均匀性,但在较高的生理细胞密度下,其改进效果并不明显。

图3 不同灌注速率下氧的分布( $\rho_{\text{cell}} = 2.7 \times 10^{13} \text{ 个/m}^3$ )

Fig.3 Oxygen concentration profiles with different perfusion velocities ( $\rho_{\text{cell}} = 2.7 \times 10^{13} \text{ 个/m}^3$ )

图4 不同灌注速率下氧的分布( $\rho_{\text{cell}} = 1.0 \times 10^{14} \text{ 个/m}^3$ )

Fig.4 Oxygen concentration profiles with different perfusion velocities ( $\rho_{\text{cell}} = 1.0 \times 10^{14} \text{ 个/m}^3$ )

### 3 讨论

目前体外构建工程化心肌组织大多采用生物反应器进行。在搅拌式反应器和旋转式反应器中,虽然流体流动降低了培养基中物质的浓度梯度,但三维支架材料中物质传递主要以扩散方式进行,构建的组织厚度只局限在毫米级范围,在组织内部易形

成坏死区<sup>[2,7]</sup>。而在灌注式生物反应器中,由于培养基能够直接流经多孔材料内部孔隙,有效改善材料内部的传质,同时对细胞施加了一定的剪切力,促进细胞生长并改善组织的均匀性,增加了工程化组织构建的厚度,对细胞的表型和分化起到一定的调控作用<sup>[6,12]</sup>。但研究也表明,在灌注培养中,提高培养基的灌注速率,虽有利于多孔支架材料内物质传

图5 沿灌注方向上下截面的氧分布 ( $v=2\text{ mm/s}$ ,  $\rho_{\text{cell}}=1.0 \times 10^{14}\text{ 个/m}^3$ )  
Fig.5 Oxygen concentration profiles in top cross-section(a) and bottom cross-section(b) with flow direction

递,刺激细胞生长,但流体流动产生的高剪切力会造成支架材料内部细胞的损伤、接种的细胞流出材料、细胞分泌的胞外基质无法沉积在支架材料上、支架材料机械性破碎等等<sup>[13,14]</sup>。因此,需要优化培养基的灌注速率以满足细胞生长和组织构建的需求。

本研究以工程化心肌组织体外多通道灌注培养系统为研究对象,通过在支架材料内设计多个灌注通道模仿体内毛细血管,提高传质能力,改善支架材料内的氧浓度分布。模拟结果表明,当支架材料中细胞密度为  $2.7 \times 10^{13}\text{ 个/m}^3$  时,在实验设置的流速范围内,支架材料内最低氧浓度为  $0.14\text{ mol/m}^3$ 。当支架中细胞密度提高到  $1.0 \times 10^{14}\text{ 个/m}^3$ 、灌注速率为  $0.5\text{ mm/s}$  到  $2\text{ mm/s}$  时,支架材料中最低氧浓度为  $3.4\text{ mmol/m}^3$  至  $65\text{ mmol/m}^3$ ,且该低氧区域分布的空间较大。Radisic 等<sup>[7]</sup>在研究中将生理密度的心肌细胞接种到支架材料中静止培养 16 d 后发现,细胞主要靠近支架材料外表面生长,在支架材料中距表面  $0 \sim 500\ \mu\text{m}$  处的细胞活性为  $60\%$ ,  $500 \sim 1000\ \mu\text{m}$  处的细胞活性为  $30\% \sim 40\%$ ,大于  $1\text{ mm}$  处的细胞活性只有  $5\% \sim 15\%$ ,而与此相对应的氧浓度分别  $0.176\text{ mol/m}^3 \sim 0.117\text{ mol/m}^3$ 、 $0.117 \sim 0.074\text{ mol/m}^3$  和小于  $0.074\text{ mol/m}^3$ 。可见在本研究设计的多通道灌注培养系统中,当细胞密度较低时,多通道灌注可以满足细胞生长和组织构建的需要,且通道的存在可以避免灌注时的高流体剪切力。

由于通道的数目较少以及形状的简单,在细胞密度较高时,仍然无法满足细胞对氧的需求。

由 CFD 模拟结果(图 3、4、5)还可知,由于在组织培养过程中细胞消耗氧,导致沿流动方向在灌注通道内氧浓度逐渐下降,进而使支架材料内氧浓度更低。由细胞生长动力学可知,随着氧浓度的下降,细胞生长及扩增速率也会随之降低<sup>[9]</sup>。故处于流动下游区域的细胞扩增相对缓慢,长时间培养后将造成整个支架材料内沿流动方向上出现细胞分布不均。特别是当培养后期细胞密度较高时,培养基中物质的浓度梯度会更显著,极端情况下导致细胞死亡,组织构建的均匀性就难以满足。因此,在灌注生物反应器操作过程中如果周期性改变培养基灌注方向,有可能避免细胞在流动方向上的分布不均匀性。

本研究所建立的包含灌注生物反应器内流体流动及氧传递和反应的三维稳态数学模型,能更深入直观地理解在组织工程反应器和支架材料内部氧浓度的分布,通过数值实验能够快速预测灌注反应器以及支架材料的几何结构与尺寸是否合理,判定培养时的灌注速率能否满足细胞扩增及生长的需要,为生物反应器的优化和操作条件的确定提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Zimmermann WH, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering for replacement therapy[J]. Heart Fail Rev, 2003, 8: 259-269.
- [2] Vunjak-Novakovic G, Radisic M, Obradovic B. Cardiac tissue engineering: effects of bioreactor flow environment on tissue constructs[J]. J Chem Technol Biotechnol, 2006, 81: 485-490.
- [3] Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters and tissue construct characterization [J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 64: 580-589.
- [4] Papadaki M, Bursac N, Langer R, et al. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural and electrophysiological studies[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280: 168-178.
- [5] Martina Y, Vermette P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances [J]. Biomaterials, 2005, 26: 7481-7503.
- [6] Carrier RL, Rupnick M, Langer R, et al. Perfusion im-

- proves tissue architecture of engineered cardiac muscle [J]. *Tissue Eng*, 2002, 8: 175-188.
- [7] Radisic M, Malda J, Epping E, *et al.* Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(2): 332-343.
- [8] 江华,周燕,谭文松. 三维支架材料中软骨细胞生长过程的数值模拟[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(1): 177-181.
- [9] Casey TM, Arthur PG. Hibernation in noncontracting mammalian cardiomyocytes [J]. *Circulation*, 2000, 102: 3124-3129.
- [10] Haselgrove JC, Shapiro IM, Silverton SF. Computer modeling of the oxygen supply and demand of cells of the avian growth cartilage [J]. *Am J Physiol*, 1993, 265: 497-506.
- [11] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, *et al.* Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14683-14688.
- [12] Radisic M, Yang LM, Boublik J, *et al.* Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286: 507-516.
- [13] Davisson T, Sah RL, Ratcliffe A. Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures [J]. *Tissue Eng*, 2002, 8: 807-816.
- [14] Cioffi M, Boschetti F, Raimondi MT, *et al.* Modeling evaluation of the fluid-dynamic microenvironment in tissue-engineered constructs: a micro-CT based model [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93: 500-510.

(上接第 14 页)

- [10] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(2): 80-86.
- [11] Porter B, Zauel R, Stockman H, *et al.* 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor [J]. *J Biomech*, 2005, 38(3):543-549.
- [12] Chung CA, Chen CW, Chen CP, *et al.* Enhancement of cell growth in tissue-engineering constructs under direct perfusion: Modeling and simulation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(6):1603-1616.
- [13] Pierre J, Oddou C. Engineered bone culture in a perfusion bioreactor: a 2D computational study of stationary mass and momentum transport [J]. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, 2007, 10(6):429-438.
- [14] Chung CA, Chen CP, Lin TH, *et al.* A compact computational model for cell construct development in perfusion culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(6):1535-1541.
- [15] Kreke MR, Goldstein AS. Hydrodynamic shear stimulates osteocalcin expression but not proliferation of bone marrow stem cells [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(5-6):780-788.
- [16] Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses [J]. *J Biomech*, 1994, 27(3):339-360.
- [17] Burg KJ, Delnomdedieu M, Beiler RJ, *et al.* Application of magnetic resonance microscopy to tissue engineering: a polylactide model [J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61(3): 380-390.