

文章编号:1004-7220(2009)01-0039-05

采用生物反应器体外构建大面积组织的接种技术

何燕娜, 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** 采用培养袋生物反应器进行大面积支架材料细胞接种技术的研究。**方法** 以人体成纤维细胞和 PET 无纺布支架材料为模型, 考察水平摇床的转速和起始细胞悬液密度对细胞接种动力学、细胞接种率、支架中细胞密度以及细胞分布的影响。**结果** 在实验条件范围内, 成纤维细胞接种大面积 PET 支架材料的过程基本符合一级反应动力学; 低细胞悬液密度接种时, 接种率和支架中细胞密度随转速的增加而下降, 高细胞悬液密度接种时则反之; 细胞分布均匀度都随着转速的增加而下降, 起始细胞悬液密度对细胞分布影响较小。**结论** 采用培养袋生物反应器进行大面积支架材料的细胞接种是可行的, 研究结果为进一步优化适合大面积支架材料接种的方法奠定基础。

关键词: 组织工程; 生物反应器; 细胞接种

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A

Cell seeding for large-area tissue construction in bioreactor

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

Abstract: Objective To research on cell seeding for large-area tissue construction in a bag bioreactor. **Method** A tissue engineered 3-D model system was developed by using human fibroblasts and porous polyethylene terephthalate (PET) polymer scaffolds. The effects of shaking speed and initial cell concentration in suspension on cell seeding kinetic, cell seeding efficiency, initial seeding density and cell distribution within the scaffolds were studied. **Result** Under the experimental conditions, the process of human fibroblasts seeding to large-area PET generally followed the first order reaction kinetics. And at low initial cell concentration, the seeding efficiency and initial seeding density decreased with the increasing shaking speed, while at high initial cell concentration the results were reverse. The cell distributing uniformity all decreased with shaking speed increased for all different cell concentrations, but there was no significant difference in uniformity between different initial cell concentrations under the same shaking intensity. **Conclusions** The horizontal shake seeding method used in a bag bioreactor for large-area scaffold was approved feasible, which provides basic foundation for further optimizing cell seeding method for such large-area tissue construction.

Key words: Tissue engineering; Bioreactor; Cell seeding

细胞接种到支架材料上是体外构建工程化组织的第一步,也是关键的一步。细胞接种技术的优化是体外成功构建组织的关键^[1-4],决定了支架材料中起始细胞数量、起始细胞空间分布以及培养过程中

的细胞行为,包括细胞的增殖、分化和迁移,并最终影响工程化组织形成的质量。影响细胞接种过程的因素主要包括支架材料的特性、起始细胞悬液密度、接种时间及动力学因素,其中起始细胞悬液密度和

收稿日期:2008-09-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20576036、20776044)

作者简介:何燕娜(1982-),女,研究方向:组织工程

通讯作者:周燕, Tel: (021)64251570, E-mail: zhouyan@ecust.edu.cn

动力学因素是接种方法的研究重点。

研究表明,起始细胞悬液密度影响细胞接种动力学速度,在搅拌接种方式下,随着接种悬液中的细胞密度增加,细胞结团速度增加,并有利于细胞贴附到支架材料上,从而加快了细胞接种动力学速度^[2]。在过滤接种技术研究中,发现,支架材料中的起始接种密度随着起始细胞悬液密度的增加而增加,而细胞接种率随着起始细胞悬液密度的增加而下降,并由于高的细胞悬液密度使细胞脱离支架材料变得更为明显^[1]。因此,如何确定起始细胞悬液密度保证种子细胞的充分利用是研究接种技术中的一个重点。

动力学因素主要是流体流动的强度对细胞接种的影响,直接影响了细胞在支架材料上的贴附速度和脱附速度。高的流动速度可以提高细胞和支架材料之间的碰撞频率,同时也引起了细胞的脱附和剪切力的损伤^[3,5]。在转瓶中转速影响细胞接种过程,低转速时细胞主要贴附在支架的表面,转速较高时有利于细胞分布在整个支架内,但转速的提高使细胞接种率降低^[6]。因此,流体流动强度的增加并不都有利于细胞的接种。

目前有关文献报道的接种方法主要集中在小尺寸支架材料的研究,对大面积支架材料接种方法的研究报道甚少。但在皮肤组织或软骨组织的临床应用中需要大面积的皮肤产品及大尺寸的软骨组织进行移植,且随着组织工程的发展,需要将实验室规模的组织培养向大规模产品生产转化^[7,8]。此外,就起始细胞悬液密度和动力学因素对细胞接种过程的影响是否存在相互关联也鲜见报道。本研究以水平摇床摇动接种作为培养袋生物反应器大面积组织的接种方式,考察转速和起始细胞悬液密度对接种过程的影响,为进一步优化适合大面积支架材料接种的方法奠定基础,以满足大面积组织大规模产业化生产的需求。

1 材料与方法

1.1 人成纤维细胞的分离和培养

人成纤维细胞的分离参照 Parenteau 等^[9]报道的方法。取包皮环切术所获得的健康小儿包皮,从真皮层中分离获得成纤维细胞,并进行原代和传代培养,培养基为含有 10% 新生牛血清(实验室自制)

的 DMEM(GIBCO, USA)。实验中采用的是第 5 ~ 15 代成纤维细胞。

1.2 PET 无纺布预处理

PET 无纺布为针刺 PET(上海江桥无纺布厂),其中纤维密度为 90 g/m^2 ,孔隙率为 92%,平均孔径为 $180 \mu\text{m}$,厚度为 2 mm。将 PET 无纺布剪成 $11.5 \text{ cm} \times 9.5 \text{ cm}$,用去离子水冲洗多次后,放置 1% NaOH 溶液中加热 1 h,用去离子水冲洗干净后装入培养袋生物反应器, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温蒸汽灭菌 30 min。接种前,将 PET 用培养基浸泡过夜。

1.3 在生物反应器中的细胞接种

成纤维细胞在方瓶中长到 80% 汇合时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,用含 10% NBS 的 DMEM 培养基分别制得 50 ml 密度为 4.0×10^5 、 8.0×10^5 和 12.0×10^5 个/ml 的细胞悬液。培养袋生物反应器装置如图 1 所示,将不同密度的细胞悬液分别泵到装有 PET 无纺布支架的培养袋生物反应器中,然后置于水平摇床上接种 4 h,水平摇床的转速分别设置为 0、60、100 和 200 r/min。在接种过程中,间隔适当时间进行细胞悬液取样计数,同时将培养袋翻面放置。起始细胞悬液的密度设为 C_0 ,悬液中细胞密度为 C ,计算 C/C_0 。接种 4 h 后取样,采用 MTT 法测定接种后 PET 材料内的细胞密度,计算细胞接种率,细胞接种率(%) = (支架中总细胞数 / 起始细胞悬液的总细胞数) $\times 100$ 。

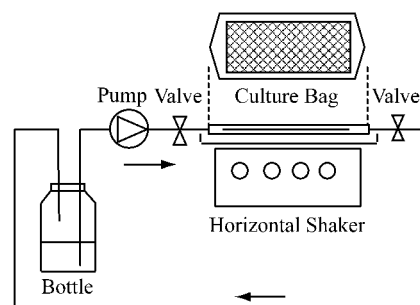


图1 培养袋生物反应器示意图

Fig.1 Schematic diagram of bag bioreactor

1.4 细胞在支架材料上分布均匀度的分析

接种 4 h 后,将细胞-支架材料复合物取出,以横轴和纵轴各 4 等份的方式把整个支架材料平均分成 16 份,采用 MTT 法分别检测细胞量,计算每份材料中的细胞密度 d_n 和整个支架材料的平均细胞密

度 \bar{d} 以及这组值的标准偏差 s , 按公式 $\text{uniformity}(\%) = (1 - s/\bar{d}) \times 100$ 计算细胞在支架材料上分布的均匀度^[10]。

1.5 MTT 法测定组织中的细胞量

细胞-材料复合物取样后加入培养基, 并以 1:10 (MTT 溶液: 培养基) 的体积比加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液。在培养箱中培养 4 h 后吸干反应液, 用 PBS 清洗, 加入 DMSO 溶液, 在 560 nm 下测定吸光值。利用标准曲线即可确定支架材料中的细胞量。

1.6 统计分析

实验值为经统计分析得到的平均值, 表示为平均值 \pm 标准差 ($n=3$)。T 检验分析对比组的差异, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 转速和起始细胞悬液密度对接种动力学的影响

当起始细胞悬液密度为 4.0×10^5 个/ml 时, 不同转速下悬液中的细胞密度均下降较快, 接种 90min 后悬液中细胞密度很低 (见图 2a)。起始细胞悬液密度为 8.0×10^5 个/ml 时, 随着水平摇床转速的增加, 悬液中细胞密度的下降速度逐渐减慢; 在细胞接种 4 h 后, 转速为 60 r/min 和 100 r/min 时悬液中几乎没有细胞, 转速提高到 200 r/min 时悬液中还剩 35% 的细胞 (见图 2b)。当起始细胞悬液密度为 12.0×10^5 个/ml 时, 不同转速下细胞接种动力学相似, 接种 4 h 后悬液中都剩下 40% 的细胞未贴附, 高于其他两种起始细胞悬液密度接种的结果 (见图 2c)。

根据图 2 的动力学数据绘制 $-\ln(C/C_0) \sim t$, 得

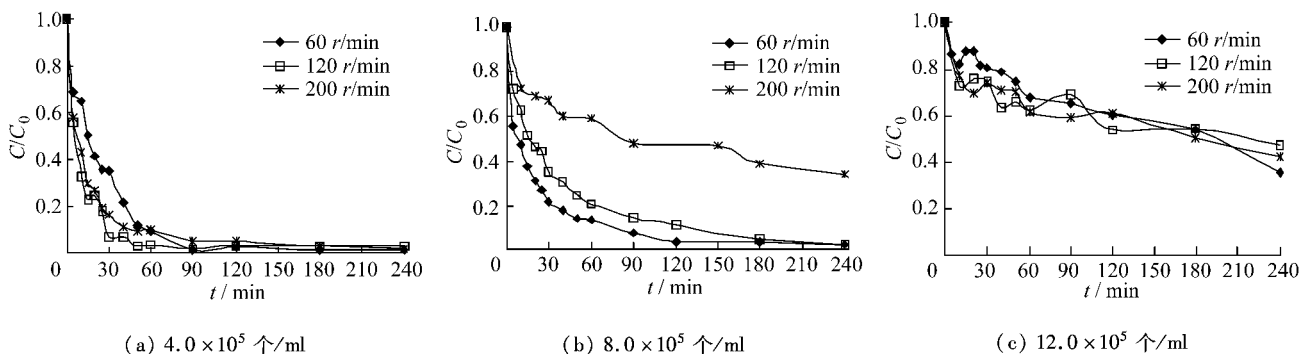


图2 不同转速和起始细胞悬液密度下的细胞接种动力学

Fig.2 Kinetics of horizontal shake seeding with three different shaking speeds and three different initial cell concentrations in suspension

到结果如图 3 所示。由图 3 可见, 成纤维细胞接种大面积 PET 支架材料的过程基本符合一级反应动力学, 其斜率为悬液中细胞密度减少的速度常数 k_{app} 。如表 1 所示, 在起始细胞悬液密度为 4.0×10^5 和 8.0×10^5 个/ml 时, 随着摇床转速的增加, k_{app} 值降低, 即细胞密度下降的速度减慢; 但当起始细胞悬液密度为 12.0×10^5 个/ml 时, 摇床转速对细胞在悬液中的密度下降速度影响不大, k_{app} 值非常接近, 且数值都比较小。另一方面, 同一转速下接种, 随着起始细胞悬液密度的增加, k_{app} 数值降低, 说明悬液中细胞密度下降的速度减慢。

表 1 转速和起始细胞悬液密度对细胞接种动力学常数的影响

Tab.1 Effects of shaking speed and initial cell concentration in suspension on cell seeding kinetic constants

| n $/(r \cdot \text{min}^{-1})$ | $C_0 / (\times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{ml}^{-1})$ | | |
|-------------------------------------|--|--------|--------|
| | 4.0 | 8.0 | 12.0 |
| 60 | 0.0393 | 0.0241 | 0.0037 |
| 100 | 0.0291 | 0.0176 | 0.0033 |
| 200 | 0.0229 | 0.0067 | 0.0035 |

2.2 转速和起始细胞悬液密度对接种率及支架中细胞密度的影响

从表 2 可以看到, 起始细胞悬液密度为 4.0×10^5 个/ml 时, 活性细胞的接种率和支架中的细胞密度随着摇床转速的增加而下降; 起始细胞悬液密度为 8.0×10^5 个/ml 和 12.0×10^5 个/ml 时, 活性细胞的接种率和支架中的细胞密度随着摇床转速的增加而增加。此外, 大面积支架材料摇床摇动接种中,

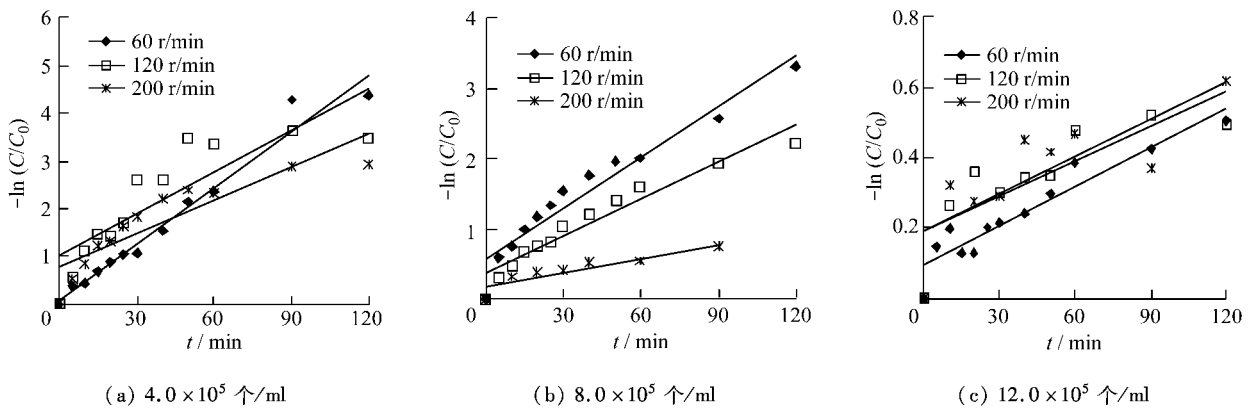


图3 不同转速和起始细胞悬液密度下的一级反应接种动力学

Fig.3 First order reaction kinetics for horizontal shake seeding with three different shaking speeds and three different initial cell concentrations in suspension

同一转速下支架材料中的初始接种密度随着起始细胞悬液密度的增加而增加,但是活性细胞接种率的变化规律不一样。转速为60 r/min时,活性细胞的

接种率随着起始细胞悬液密度的增加而减少,而转速为200 r/min时,活性细胞的接种率随着起始细胞悬液密度的增加而增加。

表2 转速和起始细胞悬液密度对细胞接种率和支架中细胞密度的影响

Tab.2 Seeding efficiency and initial seeding density in matrix after horizontal shake seeding

| n $/(r \cdot \min^{-1})$ | $C_0 / (\times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{ml}^{-1})$ | | | | | |
|-------------------------------|--|--|------------|--|------------|--|
| | 4.0 | | 8.0 | | 12.0 | |
| | A/% | B/ $(\times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-3})$ | A/% | B/ $(\times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-3})$ | A/% | B/ $(\times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-3})$ |
| 60 | 35.0 ± 0.6 | 3.2 ± 0.1 | 21.5 ± 2.0 | 3.9 ± 0.3 | 15.9 ± 0.1 | 4.4 ± 0.0 |
| 100 | 28.0 ± 2.0 | 2.6 ± 0.2 | 23.0 ± 0.1 | 4.2 ± 0.0 | 24.0 ± 2.0 | 6.7 ± 0.6 |
| 200 | 26.0 ± 2.0 | 2.4 ± 0.2 | 26.8 ± 2.0 | 4.9 ± 0.4 | 39.0 ± 0.6 | 10.7 ± 0.3 |

A: Live cell seeding efficiency; B: Initial cell density in the scaffold.

2.3 转速和起始细胞悬液密度对细胞在支架材料中起始分布的影响

从图4可以看到,在同一起始细胞悬液密度下,细胞在支架材料中分布的均匀度都随着摇床转速的增加而有所下降。对于相同的转速,起始细胞悬液密度为 4.0×10^5 个/ml和 8.0×10^5 个/ml两种情况的细胞分布均匀度比较相似,分别为60 r/min下的89.8%和87.2%,100 r/min下的80.7%和82.1%以及200 r/min下的72.5%和72.8%;起始细胞悬液密度为 12.0×10^5 个/ml时,相同转速下的细胞分布均匀度都要比其他两种情况下低。

3 讨论

目前三维支架材料常用的细胞接种方法包括转

瓶搅拌接种、离心接种、搅动接种和灌注接种等,但支架材料尺寸的范围在 $0.02 \sim 2 \text{ cm}^3$,对于大面积支架材料的接种方法研究报道甚少。Halberstadt等^[11]在构建人工真皮组织时将尺寸为 $10.16 \text{ cm} \times 15.24 \text{ cm}$ 的PGA/PLA支架材料置入一培养袋系统,然后放在滚瓶机上进行滚动接种,但具体的过程未见数据公布。为了保证大面积工程组织构建的质量,需要对大面积工程组织构建的方式进行研究。

工程化组织体外构建接种过程的评价包括3个主要指标:接种率、支架中的起始细胞密度和分布。高的接种率保证供体细胞的最大利用率,并在接种细胞量相同的情况下,提高支架材料中的细胞量;高的起始细胞密度有利于支架中细胞与细胞间的相互作用,能够增强组织的结构稳定性和生物化学活性;

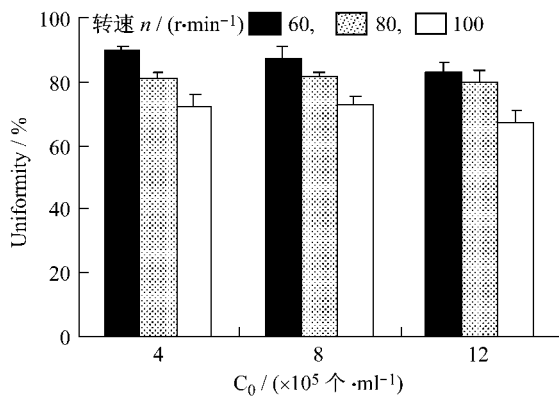


图4 转速和起始细胞悬液密度对细胞在支架材料中分布均匀度的影响

Fig.4 Cell distribution uniformity in matrix after horizontal shake seeding with three different shaking speeds and three different initial cell concentrations in suspension

均匀的细胞分布可以避免在支架材料中局部地区细胞过度生长或生长不足,有利于提高构建组织形态的均一性^[2,12,13]。

在本实验室前期的工作中设计和研制了培养袋生物反应器,通过在培养袋生物反应器中对静止接种、水平摇床接种、竖直摇床接种和灌注接种这4种接种方式的比较研究,发现水平摇床接种是大面积组织体外构建中一种较适合的接种方式。为达到大面积三维支架材料的细胞接种高接种率、高起始密度、高动力学速度和均匀的细胞空间分布等要求,还需对水平摇床接种方式进行深入研究。在接种过程中,影响细胞接种过程的因素主要包括支架材料的特性、起始细胞悬液密度、接种时间及接种过程中的动力学因素,这些因素直接影响到细胞的接种动力学、接种率、起始接种密度及细胞在支架材料中的起始分布。

在细胞接种到支架材料的过程中,细胞贴附到支架材料的纤维表面通常被认为是配体和受体相互作用的过程,该过程包括两步:①是将配体运送到足以靠近受体的区域,②是配体和受体之间相互结合。①与碰撞概率有关,②与接触时间有关^[3,14]。随着摇床转速的增加,一方面细胞和支架材料纤维的碰撞概率增加,另一方面细胞和支架材料纤维的接触时间变短,细胞从纤维上脱落而使细胞脱离速度增加^[3,15,16]。

在大面积支架材料接种过程中,当起始细胞悬

液密度较低时,随着摇床转速的增加,虽然细胞和支架材料的碰撞几率增加,但是同时细胞和支架材料的接触时间变短,即细胞脱离支架材料的速度增加,使 k_{app} 值减小。当起始细胞悬液密度较高时,摇床转速的增加,虽然细胞脱离支架的速度增加,但是高细胞密度导致的高碰撞几率使细胞结团速度增加,并有利于细胞贴附到支架材料上,从而加快了细胞接种动力学速度^[2],一定程度上抵消了脱离速度增加带来的影响,从而对接种动力学速度影响不大。在同一转速下,随着起始细胞悬液密度的增加,接种动力学速度减慢。这是由于细胞接种到材料中时,首先细胞结合到支架材料表面的受体区域,随着细胞悬液的搅动,结合在表面的细胞在流体力学的带动和撞击下,逐渐接种入支架材料的内部^[3,17]。当细胞悬液密度增加时,支架表面的受体区域竞争激烈,致使接种动力学速度减慢。

组织体外构建的过程包括支架材料的细胞接种和接种后细胞-材料复合物的培养,本研究设计的生物反应器可以将细胞接种和组织培养相结合,不但有利于提高细胞的利用率,达到细胞在支架材料中的均匀分布,而且减少操作的复杂性和染菌几率。通过研究生物反应器操作参数对细胞接种过程的影响,为将来采用生物反应器规模化生产工程化组织奠定基础。

参考文献:

- [1] Li Y, Ma T, Kniss DA, et al. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in non-woven fibrous matrices [J]. *Biotechnol Prog*, 2001, 17(5): 935-944.
- [2] Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, et al. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering [J]. *Biotechnol Prog*, 1998, 14(2):193-202.
- [3] Ouyang AL, Yang ST. Effects of mixing intensity on cell seeding and proliferation in three-dimensional fibrous matrices [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 96(2):371-380.
- [4] Kim SS, Sundback CA, Kaihara S, et al. Dynamic seeding and in vitro culture of hepatocytes in a flow perfusion system [J]. *Tissue Eng*, 2000, 6(1):39-44.
- [5] Ding CM, Zhou Y, He YN, et al. Perfusion seeding of collagen-chitosan sponges for dermal tissue engineering [J]. *Process Biochem*, 2008, 43:287-296.

(下转第58页)