

文章编号: 1004-7220(2020)05-0436-06

一种体外贴壁细胞应变加载装置的研制

崔路¹, 王鑫¹, 高丽兰¹, 张春秋¹, 张西正²

(1. 天津理工大学 天津市先进机电系统设计与智能控制重点实验室, 机电工程国家级实验教学示范中心, 天津 300384;
2. 军事科学院 系统工程研究院, 卫勤保障技术研究所, 天津 300161)

摘要:目的 开发一套新型的应变加载装置,用于贴壁细胞力学生物学研究。方法 该装置基于基底形变加载技术,采用可控制编程器驱动步进器,引起硅橡胶小室变形,实现多单元大变形的细胞加载;研制该装置,检测机械性能;建立硅橡胶小室的三维模型,利用有限元技术对硅橡胶小室进行仿真,分析该小室的应变场均匀性问题;采用该装置对骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)加载5%机械应变,频率0.5 Hz,2 h/d,持续5 d,并在倒置显微镜下观察细胞形态的变化。结果 所研制的适用于体外细胞加载装置可对3组细胞加载基底实现最大至50%机械单向应变;在10%应变范围内,硅橡胶小室底部的均匀应变场面积占比保持在50%以上,保证了细胞受力均匀;BMSCs形态发生明显变化,排列方向趋于垂直主应变加载方向。结论 该装置运行可靠,应变范围宽,频率可调,操作方便,可同时多组细胞培养基底进行应变加载,为细胞力学生物学研究提供了便利条件。

关键词:基底;加载装置;应变;细胞;力学生物学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.05.008

Development of Strain Loading Device for Adherent Cells *in vitro*

CUI Lu¹, WANG Xin¹, GAO Lilan¹, ZHANG Chunqiu¹, ZHANG Xizheng²

(1. National Demonstration Center for Experimental Mechanical and Electrical Engineering Education, Tianjin Key Laboratory for Advanced Mechatronic System Design and Intelligent Control, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; 2. Institute of Medical Support Technology, Academy of System Engineering, Academy of Military Science, Tianjin 300161, China)

Abstract: Objective To design a novel strain loading device for studying the mechanical biology of adherent cells. **Methods** Based on the technology of substrate deformation loading, the device adopted controllable stepper to cause deformation of the silastic chamber, so as to realize cell loading with multiple units and large strain. The device was developed to test its loading functions. The three-dimensional (3D) models of the silastic chamber were established to simulate the loaded chamber by the finite element technology, and uniformity of the strain field was analyzed. The device applied 5% strain to bone marrow stromal cells (BMSCs) with 0.5 Hz stretch frequency at 2 hours per day for 5 days, and an inverted phase contrast microscope was used to observe the morphology of BMSCs. **Results** The developed strain loading device for adherent cells *in vitro* could provide mechanical unidirectional strain up to 50% with three groups of cell loading substrates; within the 10% strain range, the area of uniform strain filed on the silastic chamber remained above 50%, which ensured that the cells

收稿日期:2019-07-07; 修回日期:2019-10-25

基金项目:国家自然科学基金项目(11672208, 31700812, 11572222),天津市自然科学基金项目(17JCYBJC41100, 18JCDJJC36100, 18JCYBJC95200)

通信作者:张春秋,教授,E-mail: 13012251281@126.com

were loaded evenly; the morphology of BMSCs was obviously altered, and the direction of arrangement tended to be perpendicular to the loading direction of principal strain. **Conclusions** The device shows the advantages of reliable operation, wide strain range, adjustable frequency and convenient operation. It can be used to load multiple cell culture substrates at the same time, which provides convenient conditions for the study of cell mechanobiology.

Key words: substrates; loading device; strain; cell; mechanobiology

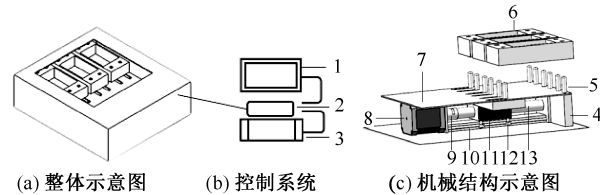
生物体内的细胞生长在复杂的三维基质结构中,外界力学作用通过基质传导至细胞各处,刺激细胞功能,进而影响组织生长和重建。力学刺激(如压力、拉力、剪切力等)在调节细胞行为中发挥重要作用,通过研究细胞的力学响应规律可以为疾病治疗提供参考^[1]。

目前,体外细胞加载的主要方式有流体剪切力加载^[2-3]、离心力加载^[4]、基底形变加载^[5-7]和真空负压加载^[8-10]。其中,基底形变加载方式适用于各种贴壁细胞的体外力学实验,是目前一种重要的实验装置。Leung等^[11]通过马达驱动的活塞-联动装置使附着在矩形硬蛋白基底上的细胞受到不同大小、周期的牵张力。经过不断改进,研究人员提出了多种基底加载方式。例如:美国Flexcell公司研发的细胞加载装置依托于基底膜形变技术,可进行精准实验研究,但其操作复杂,价格昂贵^[12-14]。Hector等^[15]借助LINMOT公司的高速线性执行器探究拉伸对创伤性脑损伤的影响,将原代大鼠脑内皮细胞种植在聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)块中,通过拉伸硅胶膜,使黏附在膜上的PDMS块受到牵张力。该装置虽然可以方便地调节应变大小,但是机器体积过大,实验耗品PDMS块制作过程复杂。Shao等^[16]为研究肌动蛋白在细胞拉伸过程中的行为实验,研制了一种细胞加载装置。该装置与显微成像技术相结合,可以实时观察活细胞在加载过程中的行为变化,但受显微平台的限制,所研究细胞的数量少。基于目前力学生物学研究需要细胞数量大、应变范围宽的实验需求,本文研制了一种新型体外贴壁细胞应变加载装置。

1 材料与方法

装置结构的基本原理为:细胞种植在硅橡胶制成的柔性硅橡胶小室内,置于固定桩上,由控制器控制步进电机,进而通过机械装置对小室腔内的细胞进行间接应变刺激(见图1)。加载过程中,需将机械部分

置于细胞培养箱内以保证细胞适宜的生长环境。



1-可编程控制器,2-驱动器,3-开关电源(24 V),4-铝材固定台,5-固定桩,6-硅橡胶小室,7-拉伸平台,8-步进器,9-弹性联轴器,10-基座及滑道,11-可移动端平台,12-滑轮,13-传动丝杆

图1 体外贴壁细胞应变加载装置结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of the strain loading device for adherent cells *in vitro* (a) Overall schematic diagram, (b) Control system, (c) Mechanical schematic diagram

1.1 控制系统设计及工作原理

模拟贴壁细胞机械应变加载的驱动方式为电驱动,即使用电机作为动力源。作为现代数字程序控制系统中的主要执行元件,步进器配合可编程控制器可广泛应用于各领域。本控制系统配合步进器可实现高可控性及高精度定位。此外,步进器还有其他电机不可比拟的特点:把电脉冲信号转变为角位移或线位移,配合驱动器的细分功能,可实现较小的进给量,定位准确,且只有周期误差,不累加。控制器可控制步进器执行往复、单向、定时、循环等动作。体外贴壁细胞应变加载装置的加载方向、位移、拉伸保持时间、运转速度、频率、循环次数等通过可控制编程器进行逐一设定,进而控制步进器的转速及位移进给量以控制应变频率及应变量。

1.2 机械系统结构设计

由于需要对硅橡胶小室施加机械牵张力,该装置需要将驱动源的旋转动作转化为直线动作。考虑到大应变范围的可行性及应变调节的难易性,选择丝杆传动,与步进器通过弹性联轴器相连。该结构可方便调节应变大小,精度高及维护方便。在可运动端平台底部设有两组滑轮与基座滑道相连,保

证可运动端平台平稳性。

1.3 基底膜改善方案

在研制体外贴壁细胞应变加载装置的过程中,为改善弹性基底膜加载方案,本文自行研制硅橡胶小室,并经等离子清洗机表面改性处理,改善细胞贴壁性能(见图2)。小室经浇注成纵向距离26.8 mm、横向距离40 mm、高度15 mm的培养内腔,可对1 072 mm²面积的细胞进行机械应变加载。该项技术成熟稳定,可制成任意面积的硅橡胶小室。小室可高温高压消毒灭菌,细胞接种于小室培养腔内,待贴壁生长良好即可放于不锈钢固定桩上,探究细胞对机械应变刺激的影响。

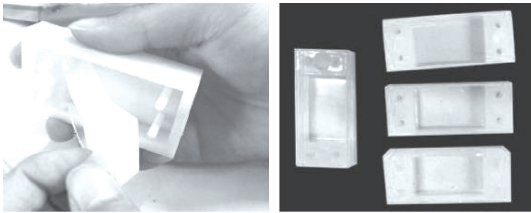


图2 硅橡胶模具及小室

Fig.2 Silastic mold and chamber

该小室由医用硅橡胶液制成,在小室内腔接种细胞,改善了矩形基底膜拉伸方式造成的营养液浪费问题。采用不锈钢固定桩固定,弃用常用的上下压板压紧装置,简化了操作步骤。固定桩固定在铝材固定台上,通过螺钉压紧与基座相连。在可移动平台上另设一组固定台及固定桩,保证小室内各点运动同步,应变均匀。该固定方案可同时加载3组细胞实验,固定台的平行移动为附着在硅橡胶小室腔内的细胞提供应变刺激。此外,硅橡胶小室内腔底部光洁透明,在应变加载实验中,可随时取下置于显微镜下观察细胞贴壁生长情况。

1.4 骨髓间充质干细胞提取与培养

取6周龄清洁级雄性SD大鼠,体质量为80~100 g。抽取10%水合氯醛0.2 mL腹腔注射麻醉大鼠后拉颈处死,用75%酒精浸泡大鼠双下肢5 min,无菌条件下分理出大鼠双侧的股骨和胫骨,将离体的骨干放入灭菌PBS缓冲液中冲洗后转入含10%胎牛血清的低糖型DMEM培养基的培养皿中。剪去两侧干骺端,暴露骨髓腔,用无菌注射器抽取5 mL含10%胎牛血清的低糖型DMEM培养基反复冲洗骨髓腔,直至骨髓腔内所有骨髓液冲净。反复

吹打骨髓冲洗液制成单细胞悬液,将此悬液接种于25 cm²塑料培养瓶中,置于37 ℃、5% CO₂细胞培养箱内培养,24 h可见细胞贴壁,此时首次换液(培养液为15%胎牛血清IMDM),然后每3 d换液1次(培养液为10%胎牛血清IMDM)。

2 结果

2.1 设计结果

本文构建了一套新型的体外贴壁细胞应变加载装置(见图3)。

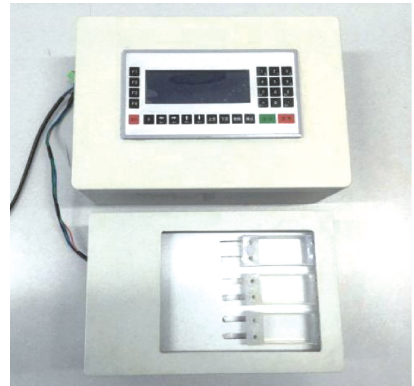


图3 体外贴壁细胞应变加载装置实物图

Fig.3 Pictures of the strain loading device for adherent cells *in vitro*

2.2 系统稳定性测试

2.2.1 系统参数测定 本装置设计了两种硅橡胶小室以完善频率区间。改良后小室的固定孔平行于硅橡胶小室长轴方向并置于两侧,此种改良方式在保证培养面积不变的前提下,进行较小的伸缩量加载即可得到较大的应变率(见图4)。在同一应变率下,频率区间得到明显改善,弥补了该装置无较广频率范围的缺陷(见表1)。

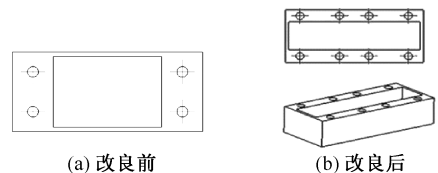


图4 硅橡胶小室模型对比

Fig.4 Comparison of the silastic chamber (a) Before modification, (b) After modification

此外,本装置可利用数字示波器精确测定不同应变下的加载频率。步进器的运转方向由给定脉冲方向确定,故通过探究脉冲方向的变化规律即可

测出相应的频率。表2所示为10%应变下控制器所设定的峰值速度(v)与实际拉伸频率(f)之间的对应关系,倍率可通过控制器调节,从而实现不同拉伸频率的拉伸需求。与表1对比可知,通过数字示波器可精确测定相应的应变率下不同的拉伸频率,且拉伸频率的设定精度高,可满足对拉伸频率有精确要求的实验。

表1 硅橡胶小室改良前后不同机械应变伸缩量对应的频率区间

Tab.1 Frequency interval under different mechanical strain expansion and contraction before/after modification of the silastic chamber

应变/%	改良前		改良后	
	伸长量/	频率区间/	伸长量/	频率区间/
	mm	Hz	mm	Hz
2	1.10	0~3.0	0.46	0~4.5
5	2.75	0~1.7	1.15	0~3.0
10	5.50	0~1.1	2.30	0~2.0
15	8.25	0~0.9	3.45	0~1.6
20	11.00	0~0.5	4.60	0~1.4
30	16.50	0~0.4	6.90	0~1.0
50	27.50	0~0.3	11.50	0~0.5

表2 10%应变下频率对比

Tab.2 Frequency comparison at 10% strain

速度/ ($\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$)	倍率/ %	频率/Hz	速度/ ($\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$)	倍率/ %	频率/Hz
100	50	0.151	500	50	0.510
	100	0.303		100	0.758
	150	0.454		150	0.962
200	50	0.270	1000	50	0.741
	100	0.454		100	1.120
	150	0.667		150	1.100
300	50	0.368			
	100	0.610			
	150	0.806			

2.2.2 体外贴壁细胞应变加载装置稳定性测试

将3组硅橡胶小室分别放至3组固定桩上固定,运

行各种有效范围内的位移、频率、时间,检测体外贴壁细胞应变加载装置运行的稳定性能。装置运行结果显示,整个测试过程中拉伸丝杠、可移动端平台没有发生偏斜,3组硅橡胶小室平行被拉伸至指定位置。硅橡胶小室和不锈钢固定桩在加载过程中没有发生松动和断裂现象。因此,本装置结构稳定,运行平稳,精确可靠。

2.3 硅橡胶小室基底应变场的均匀性分析

对于一般的弹性基底材料,若在水平方向施加拉力,它在拉伸垂直方向上必然有一个收缩的趋势。因此,若对小室进行应变加载实验,必定会造成基底轴向收缩,引起应变场的改变。已有研究对矩形弹性基底膜的应力、应变进行详细的分析^[17],本文通过Mooney-Rivlin超弹性有限元模型分析硅橡胶小室在加载过程中的应变分布规律。通过Image J软件对其进行面积分析,其中间区域均匀应变场1%~10%的面积占比分别为77.1%、75.3%、68.1%、59.8%、54.3%、56.3%、53.1%、53.3%、54.2%、59.4%。由此可知,在10%应变范围内,硅橡胶小室底部的均匀应变场面积占比保持在50%以上(见图5)。因此,在细胞加载实验中,建议采取小室底部中间50%范围内的细胞作为分析样本,而弃用其他应变与中间区域不相符的部分。

2.4 骨髓间充质干细胞加载实验

利用该体外贴壁细胞应变加载装置,对硅橡胶小室腔内的骨髓间充质干细胞进行加载,施加5%机械应变刺激,频率为0.5 Hz,2 h/d,共持续5 d。加载结束后置于显微镜下采集细胞图像。结果表明,加载前细胞接种于小室腔内,贴壁良好,细胞无序排列;加载5 d后,细胞成扁平状,排列方向趋向于垂直细胞主应变加载方向,与文献[18-20]中的结果具有很好的一致性(见图6)。

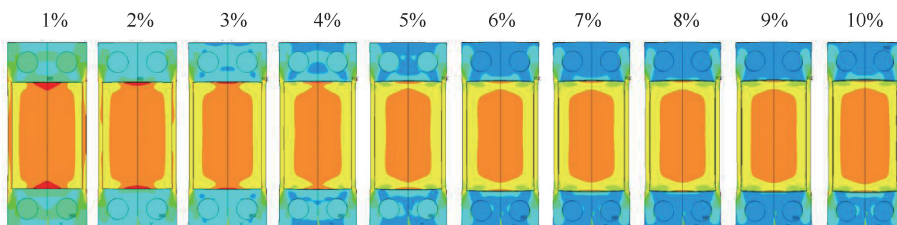


图5 拉伸方向硅橡胶小室应变分布(1%~10%)

Fig.5 Strain distributions of the silastic chamber in long axis direction

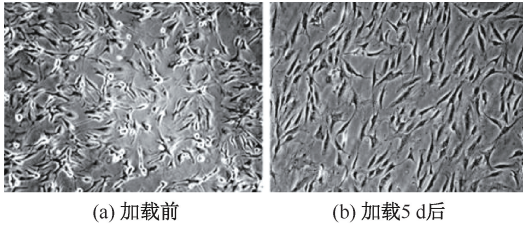


图6 骨髓间充质干细胞加载结果

Fig.6 Loading results of bone marrow stromal cells

(a) Before loading, (b) After 5-day loading

3 讨论与结论

随着研究机械力对细胞影响的深入,大量的体外细胞加载装置被研发出来用于实验。以基底形变加载技术为基础,通过对弹性基底膜进行加载,间接地把力施加给附着在膜上的细胞,这种加力方式是目前主流的加载方法。美国 Flexcell 公司的细胞加载装置目前应用较为广泛,但其操作复杂,实验成本昂贵,对于进行简单细胞拉伸加载实验的研究人员而言,投入过大。国内的体外细胞加载装置一般通过控制执行单元对二维弹性基底膜施加轴向的静态力或循环力进行加载。本文开发了一套新型应变加载装置,采用三维弹性小室,通过基底进行应变加载,频率、时间可控,操作方便,有望在更多的生物实验室被推广和采用。

另外,本装置也可对细胞施加压缩力,把细胞种植在处于拉伸状态的硅橡胶小室中,使小室进行保持-恢复-保持的循环运动,进而对细胞施加压缩力。本装置采用电机丝杆的形式实现往返运动,可对硅橡胶小室中的细胞进行最大至 50% 拉压刺激。本研究的局限性如下:在实验中,控制系统采用了市面上的可控制编程器控制,虽简化了操作,但无法达到较广的频率范围。因此,本课题组正在开发新型的体外贴壁细胞应变加载装置,采用直线电机控制系统,预期达到 0~20 Hz 应变频率。

参考文献:

[1] GIULITTI S, ZAMBON A, MICHIELIN F, *et al.* Mechnotransduction through substrates engineering and microfluidic devices [J]. *Curr Opin Chem Eng*, 2016(11): 67-70.
[2] 张迎, 丁皓, 杨乾, 等. 体外血管内皮细胞培养装置中弹性基底的应力研究[J]. *医用生物力学*, 2018, 33(4): 354-359.

ZHANG Y, DING H, YANG Q, *et al.* Stress analysis on elastic substrate of *in vitro* endothelial cell culture device [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(4): 354-359.
[3] 陈学忠, 侍才洪, 李瑞欣, 等. 新型动态载荷与循环灌注生物反应器系统的设计[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(5): 441-447.
CHEN XZ, SHI CH, LI RX, *et al.* Design of a new dynamic load and circulating-perfusion bioreactor system [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(5): 441-447.
[4] LEE DH, PARK JC, SUH H. Effect of centrifugal force cellular activity of osteoblastic MC3T2E1 cell *in vitro* [J]. *Yinsei Med J*, 2001, 42(4): 405-410.
[5] 梅翀, 黄岂平, 夏俊培, 等. 细胞培养基基底单轴拉伸装置的研制[J]. *生物技术通报*, 2008(2): 77-79.
[6] 胥春, 范震, 郝轶, 等. 一种新型机械应变细胞加载装置的研制[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(6): 534-539.
XU C, FAN Z, HAO Y, *et al.* Development of a novel stretch strain cell loading unit [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(6): 534-539.
[7] 杨乾, 丁皓, 兰海莲, 等. 一种血管张应力体外加载装置的实验研究[J]. *医用生物力学*, 2016, 31(2): 107-111.
YANG Q, DING H, LAN HL, *et al.* Experimental study on an *in vitro* vascular tensile stress loading device [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(2): 107-111.
[8] 刘若正. 一种新型细胞压力加载系统的研制及压力对 BMSCs 生物学特性与软骨向分化影响的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013.
[9] WU MH, WANG HY, TAI CH, *et al.* Development of perfusion-based microbioreactor platform capable of providing tunable dynamic compressive loading to 3-D cell culture construct: Demonstration study of the effect of compressive stimulations on articular chondrocyte functions [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2013(176): 86-96.
[10] HENSTOCK JR, ROTHERHAM M, ROSE JB, *et al.* Cyclic hydrostatic pressure stimulates enhanced bone development in the foetal chick femur *in vitro* [J]. *Bone*, 2013, 53(2): 468-477.
[11] LEUNG DYM, GLAGOV S, MATHEWS MB. A new *in vitro* system for studying cell response for mechanical stimulation: Different effects of cyclic stretching and agitation on smooth muscle cell biosynthesis [J]. *Exp Cell Res*, 1977, 109(2): 285-298.
[12] 白明海, 吴汉江. 体外培养细胞机械加力装置研究进展[J]. *国外医学口腔医学分册*, 2004, 31(5): 331-334.
[13] TANG L, LIN Z, LI YM. Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts *in vitro* [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2006, 344(1): 122-128.
[14] 周敏, 闻娟, 李煌. Flexcell 系统加载周期性张应变对不同细胞增殖凋亡活性的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 13

- (15): 2535-2539.
- [15] HECTOR RH, ELVIS C, CLAUDIA EL, *et al.* Characterization of uniaxial high-speed stretch as an *in vitro* model of mild traumatic brain injury on the blood-brain barrier [J]. *Neurosci Lett*, 2018(672): 123-129.
- [16] SHAO Y, TAN XY, NOVITSKI R, *et al.* Uniaxial cell stretching device for live-cell imaging of mechanosensitive cellular functions [J]. *Rev Sci Instrum*, 2013, 84(11): 1-8.
- [17] 陈效. 单轴拉伸装置中硅胶膜的应力分析及静态拉伸对 ECV-304 细胞形态的影响[D]. 重庆: 重庆大学, 2008.
- [18] 杨祯瑾, 胡海琨, 潘洁, 等. 机械张应力刺激对成牙骨质细胞功能活性的影响[J]. *现代口腔医学杂志*, 2015, 29(6): 321-324.
- [19] 程鸣佳, 储颀婷, 沈刚, 等. 不同加载时间周期性张应力对大鼠颅底软骨细胞的影响[J]. *上海口腔医学*, 2018, 27(4): 337-341.
- [20] ZHANG W, KONG CW, TONG MH, *et al.* Maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) in 3D collagen matrix: Effects of niche cell supplementation and mechanical stimulation [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017(49): 204-217.