

旋转式三维细胞培养装置的研制**

赵灵犀¹, 丁皓^{1,2}, 徐萌¹, 尚昆², 沈力行^{1,2}

The development of device for rotary three-dimensional cells culture

Zhao Ling-xi¹, Ding Hao^{1,2}, Xu Meng¹, Shang Kun², Shen Li-xing^{1,2}

Abstract

BACKGROUND: It is widely used that vitro culturing endothelial cells to study atherosclerosis mechanism, and the key issues are if the monolayer endothelial cells could resist blood attack and how to achieve cells growth well-distributed.

OBJECTIVE: To develop a device that could supply a three-dimensional condition for cells to realize growth stick to elastic silicon chamber in order to improve growth uneven.

METHODS: It introduced structure and functions of the device from controlled unit, mechanical unit and cells culture unit, and then used it to carry out an umbilical vein endothelial cells culture experiment.

RESULTS AND CONCLUSION: Rotary three-dimensional cells culture device could provide condition for cells metabolism and growth sticking to elastic silicon chamber well-distributed.

Zhao LX, Ding H, Xu M, Shang K, Shen LX. The development of device for rotary three-dimensional cells culture. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(19): 3531-3533. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 内皮细胞体外培养形成的单层内皮细胞能否抵抗血流的冲击, 如何实现细胞均匀分布生长是实验中的常见问题。

目的: 针对背景问题, 研制一种细胞培养装置, 可提供细胞生长的三维环境, 实现细胞贴硅胶弹性腔管壁生长, 改善细胞的分布不均。

方法: 从控制单元、机械单元和细胞培养单元介绍了该装置的结构与功能, 并利用该装置进行一例脐静脉内皮细胞培养实验。

结果与结论: 旋转式三维细胞培养装置为细胞代谢提供了一定条件, 该装置培养的细胞能贴壁均匀, 生长良好。

关键词: 旋转培养; 内皮细胞; 细胞培养; 贴壁生长; 控制单元; 机械单元

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.19.026

赵灵犀, 丁皓, 徐萌, 尚昆, 沈力行. 旋转式三维细胞培养装置的研制[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19):3531-3533. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

细胞培养工程是一门在生化工程学科领域中迅速发展起来的新型工程学科, 根据细胞的特性可采用静态培养、旋转培养、悬浮培养、微载体培养、中空纤维培养以及灌注培养等方式^[1]。因此, 细胞培养工程具有生物技术、化学工程技术以及其他工程学科技术相结合的特色, 这门学科在基础研究和运用科学研究方面越来越受到广泛的关注^[2]。

血管内皮细胞除屏障功能外, 还合成分泌多种因子, 在凝血、抗凝血, 纤溶、抗纤溶, 调节细胞生长, 改变脂质代谢, 维持血管壁的完整性和管壁张力等方面起重要作用^[3], 其结构和功能异常在许多疾病, 尤其是在心血管疾病的发生、发展中起着重要作用。因此, 通过内皮细胞体外培养的方法探讨动脉粥样硬化形成的机制已经得到了广泛的应用。

内皮细胞培养研究中的一个关键问题是体外形成的单层内皮细胞能否抵抗血流的冲击^[4]。

一些实验结果显示, 层流剪切力可促进内皮细胞的生长^[5]。细胞静态培养是指细胞培养过程中免受血流动力学因素的影响^[6], 在此条件下, 细胞没有承受血流剪切力作用, 形成的单层细胞并不出现应力纤维, 其分裂增殖速度快, 细胞容易衰老, 在后续实验中难以耐受复杂的血流动力学环境而发生脱落。在细胞-支架复合物培养中, 旋转式生物反应器、灌注式生物反应器^[7]、基底膜拉伸式加载装置均可以提供适宜的机械刺激条件^[8], 对组织的形成起促进作用^[9]。

对于贴壁生长的细胞, 传统的细胞-支架复合物静态培养中, 由于重力因素, 易导致细胞聚集于载体外部或载体底部, 使支架中细胞生长分布不均、成活率不高^[10]。为此, Kleis等^[11]研制了圆柱形壁式生物反应器, 模拟微重力环境, 使细胞克服重力影响, 获得比普通重力环境中更高的培养密度。但是该反应器价格昂贵, 使用较繁琐。

针对这种情况, 作者课题组研制了一种旋转式三维细胞培养装置, 该装置改善了重力引起细胞分布不均的问题, 实现细胞在硅胶弹性

¹Institute of Biomechanics and Rehabilitative Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; ²Shanghai Medical Instrumentation College, Shanghai 200093, China

Zhao Ling-xi★, Studying for master's degree, Institute of Biomechanics and Rehabilitative Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China
lingxi_zhao@126.com

Correspondence to: Ding Hao, Doctor, Associate professor, Master's supervisor, Institute of Biomechanics and Rehabilitative Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; Shanghai Medical Instrumentation College, Shanghai 200093, China
dinghao@21cn.com

Supported by: microinvasive Inspirational Innovation Fund, Institute of Biomechanics and Rehabilitative Engineering, University of Shanghai for Science and Technology*

Received: 2010-11-28
Accepted: 2011-03-16

¹上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海市200093; ²上海医疗器械高等专科学校, 上海市200093

赵灵犀★, 女, 1986年生, 重庆市人, 汉族, 上海理工大学在读硕士, 主要从事生物力学研究。
lingxi_zhao@126.com

通讯作者: 丁皓, 博士, 副教授, 硕士生导师。上海医疗器械高等专科学校, 上海市200093
dinghaoy@21cn.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)19-03531-03

收稿日期: 2010-11-28
修回日期: 2011-03-16 (20100928020/D·W)

腔管壁内均匀贴壁生长。该装置价格便宜, 操作简单, 改善细胞聚集效果良好。

1 装置设计

整个装置由控制单元、机械单元和细胞培养单元三部分组成, 见图1, 2。控制单元主要由微处理器、驱动电路和显示面板组成; 机械单元由步进电机、直线导轨和滑动支架组成; 细胞培养单元包括硅胶弹性腔、连轴器等。机械单元和细胞培养单元置于培养箱中, 培养箱以保温罩覆盖。

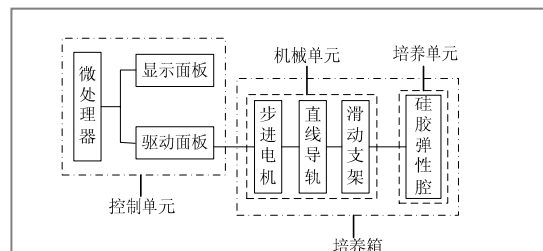
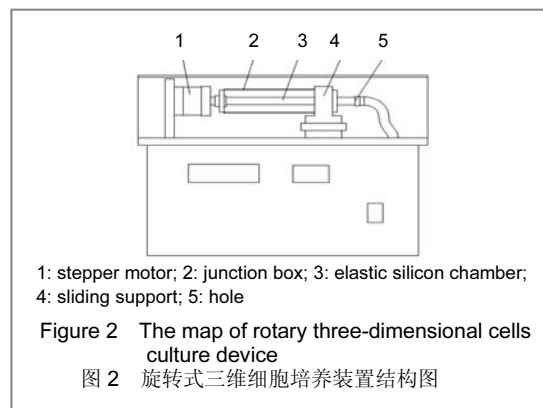


Figure 1 Block diagram of the rotary three-dimensional cells culture device
图1 旋转式三维细胞培养装置结构框图



1: stepper motor; 2: junction box; 3: elastic silicon chamber; 4: sliding support; 5: hole
Figure 2 The map of rotary three-dimensional cells culture device
图2 旋转式三维细胞培养装置结构图

1.1 控制单元 控制单元实现电机的控制和温度的控制。

电机控制: 微处理器按预设的参数向电机发放驱动信号, 控制电机转动。电机转速在0~3 r/min, 20档可调。

温度控制: 温度控制系统主要由电源、控制器、加热器、散热器、保温罩等组成。培养箱温度控制在(37.0±1.0) °C, 恒温后温度波动不大于0.2 °C。微处理器按预设的参数驱动电加热器工作。电加热器产生足够的热量, 使细胞培养单元达到细胞能正常生长所需要的温度范围。本装置设置了主加热系统和辅助加热系统。

1.2 机械单元 机械单元执行的功能就是使细胞培养单元作旋转运动。步进电机通过连轴器与滑动支架中心轴相连, 在微处理器的控制

下电机带动连轴器中心轴产生周期性旋转运动。滑动支架通过滑槽与直线导轨相连, 可自由调节滑动支架与电机之间的距离以适应不同长度的硅胶弹性腔, 滑动支架可由螺母定位。

1.3 细胞培养单元 硅胶弹性腔固定于连轴器的两端, 随同轴一起运动。实验前将消毒好的硅胶弹性腔固定于连轴器两端, 然后将细胞、微载体和细胞培养基通过连轴器一端的通孔注入硅胶弹性腔中, 通孔可外接导管通入二氧化碳气体, 以保持硅胶弹性腔中5%二氧化碳浓度, 见图3。

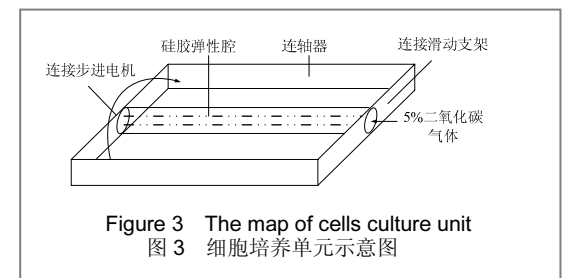


Figure 3 The map of cells culture unit
图3 细胞培养单元示意图

2 实验

2.1 实验器材 旋转式三维细胞培养装置, 无菌脐带, M199培养液, 20% PBS, 胶原酶(0.1%), 胰蛋白酶(0.125%和0.25%), EDTA(0.02%)。

无菌器械: 止血钳, 针头, 眼科剪, 200目滤网, 50 mL离心管, 皿式培养瓶, 小三角瓶, 10 mL、20 mL注射器管, 无菌药碗。

2.2 操作过程 环氧乙烷消毒细胞培养单元硅胶弹性腔6 h。保温罩覆盖区及保温罩用体积分数75%的乙醇擦拭, 并置于紫外灯照射下24 h。

取长度约20 cm新生儿无菌脐带于4 °C PBS中, 先用PBS冲洗脐带表面至无血色, 后用注射器针头插入脐静脉用PBS冲洗; 将脐带两端钳夹, 用注射器针头向脐静脉中打入胶原酶(0.1%)和胰蛋白酶(0.125%)至充盈, 在37 °C环境中消化10 min, 期间轻轻挤压脐带使酶溶液充分接触血管内壁, 消化5 min取少量消化液于显微镜下观察, 如发现已分散成细胞团或单个细胞, 用PBS冲洗脐静脉, 一并将消化液收集到小三角瓶中; 采用200目滤网滤掉悬液中的组织块, 将消化液收集于50 mL无菌离心管中, 4 °C环境下低速离心(800~1 000 r/min)5 min; 弃上清, 吹打悬浮再次离心5 min, 将沉淀(即细胞)加M199培养液并铺于皿式培养瓶中, 置于37 °C 体积分数5% CO₂饱和湿度培养箱中

培养, 24 h后更换培养液后每隔1 d换液1次。倒置显微镜观察鉴定为内皮细胞^[12], 融合率达到70%~80%^[13], 加入0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA消化20 min, 按照1:2传代培养, 取三四代用于装置培养实验^[14]。

设定旋转式三维细胞培养装置转速0.15 r/min, 装置预热至37 °C。将硅胶弹性腔固定于连轴器两端, 用注射器将内皮细胞、微载体和细胞培养基注入硅胶弹性腔中, 直到充满整个管腔, 然后把连轴器安装在滑动支架上并用螺钉固定支架, 使其夹紧连轴器, 通孔通入体积分数5%二氧化碳气体, 盖好保温罩。

3 结果

采用该装置旋转培养6 h后, 静态培养24 h, 使细胞完全舒展, 然后将硅胶弹性腔取出, 用2.5%戊二醛固定10 min, 经PBS清洗后再用甲苯胺蓝染色。显微镜观察硅胶弹性腔切片中细胞的形态和排列情况, 见图4, 内皮细胞分布较均匀, 大部分贴硅胶弹性腔管壁生长。

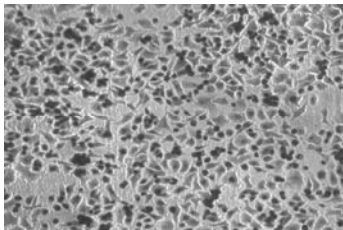


Figure 4 Cells shape in elastic silicon chamber 6 h (×200)
图4 硅胶弹性腔中的细胞形态 6 h (×200)

4 结论

内皮细胞在三维与二维培养体系中的生物学行为存在显著差异^[15], 三维培养体系中内皮细胞的生长更类似于体内生长。旋转式细胞培养是一种优于静态培养的新培养技术, 目前已运用该技术开展了造血干细胞、软骨细胞等的体外培养研究^[13]。本文中旋转式三维细胞培养装置能够提供适宜细胞生长、代谢的环境, 实验结束后对细胞的固定可靠, 记录的细胞图像清晰真实。

该装置与静态培养方式培养的内皮细胞之间的差异需要进一步的实验分析; 为了产生微重力环境, 该装置的转速仍需通过对照实验探讨^[16], 该方法培养的内皮细胞是否能够耐受血流动力学环境以及能够承受的极限应力条件还要通过进一步的实验研究; 该装置与在体血管的应力环境差异较大, 下一步研究计划改进该装置模拟血流流动血管剪切应力培养环境, 且能实时采集控制剪切应力。

由于血管内皮细胞的结构和功能异常在心血管疾病的发生、发展中起着重要作用, 所以体外培养的血管内皮细胞是研究粥样硬化发生机制的良好实验模型。旋

转式三维细胞培养装置为体外培养内皮细胞提供了便利的工具, 为体外研究动脉粥样硬化等心血管疾病提供了可能性。

5 参考文献

- [1] Tan YJ, Yuan XG, Rui JB, et al. Hangtian Yixue yu Yixue Gongcheng. 2002;15(5):383-386. 谭映军, 袁修干, 芮嘉白, 等. 细胞培养装置及其研究进展[J]. 航天医学与医学工程. 2002;15(5): 383-386.
- [2] Lin M. Yiliao Weisheng Zhuangbei. 2008;29(4):32-34. 林梅. 生物反应器在构建组织工程产品中的应用研究[J]. 医疗卫生装备. 2008;29(4):32-34.
- [3] Zhang JH, Ding YQ, Zhou J. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi. 1997;13(1):55-56. 张进华, 丁彦青, 周军. 人主动脉内皮细胞培养方法[J]. 细胞与分子免疫学杂志. 1997;13(1):55-56.
- [4] Jiang GW, Sun JH, Li MY, et al. Jiepouxue Zazhi. 1997;20(3):257-261. 江国伟, 孙继虎, 郇鸣阳, 等. 应力培养对血管内皮细胞形态结构的影响[J]. 解剖学杂志. 1997;20(3):257-261.
- [5] Han ZZ, Kong H. Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi. 2008;25(3):717. 韩昭昭, 孔桦. 动力学因素在组织工程血管构建中的作用及其研究进展[J]. 生物医学工程学报. 2008;25(3):717.
- [6] Mu YM. Guowai Yixue Yaoxue Fence. 2004;31(6):361-365. 穆亚妹. 血管内皮细胞体外培养方法的研究进展[J]. 国外医学药学分册. 2004;31(6):361-365.
- [7] Liu Y, Wang LT, Xu YW, et al. Zhongguo minzu Minjian Yiyao. 2010; 2:15-16, 19. 刘涌, 王丽婷, 徐耀威, 等. 组织工程生物反应器的研究进展[J]. 中国民族民间医药. 2010;2: 15-16, 19.
- [8] Zhang XY, Sun YD, Yuan X, et al. Shandong Daxue Xuebao. 2010;48(10):25-28. 张晓燕, 孙玉德, 袁晓, 等. 体外培养细胞拉伸加载装置的研制[J]. 山东大学学报. 2010;48(10):25-28.
- [9] Zhang YL, Qin TW, Yang ZM. Shengwu Yixue Gongcheng Yanjiu. 2008;27(4):248-250. 张玉龙, 秦廷武, 杨志明. 一种改进型动态应变三维细胞培养装置的研究[J]. 生物医学工程研究. 2008;27(4):248-250.
- [10] Liu CT. Jiefangjun Yixue Zazhi. 2010;35(11):1290-1292. 刘长庭. 模拟微重力对血管内皮细胞影响的研究进展[J]. 解放军医学杂志. 2010;35(11):1290-1292.
- [11] Begley CM, Kleis SJ. The fluid dynamic and shear environment in the NASA/JSC rotating-wall perfused-vessel bioreactor. Biotechnol Bioeng. 2000;70(1):32-40.
- [12] Bai CY, Hou LL, Pang QH, et al. Shengwu Jishu Tongxun. 2010;2:26. 白春雨, 侯玲玲, 庞全海, 等. 内皮祖细胞的分离培养与鉴定[J]. 生物技术通报. 2010;2:26.
- [13] Liu Y, Liu TQ, Fan XB, et al. Gaoxiao Huaxue Gongcheng Xuebao. 2008;22(3):471-477. 刘洋, 刘天庆, 范秀波, 等. 旋转壁式生物反应器中微囊化骨髓间充质干细胞支持造血干/祖细胞的体外扩增[J]. 高校化学工程学报. 2008;22(3):471-477.
- [14] Chi XY, Xu JQ, Gao WW. Ludong Daxue Xuebao. 2011;27(1):55-57. 迟晓艳, 徐金青, 高文武. 兔主动脉血管内皮细胞的分离与体外培养[J]. 鲁东大学学报. 2011;27(1):55-57.
- [15] Tang JQ, Zhang S, Lin JY, et al. Fujian Yike Daxue Xuebao. 2007;41(5):476-478. 唐坚清, 张声, 林建银, 等. 血管内皮细胞体外三维培养方法的比较[J]. 福建医科大学学报. 2007;41(5):476-478.
- [16] Zhong P, Huang H, Yang CK, et al. Hangtian Yixue yu Yixue Gongcheng. 2008;21(1):61-65. 钟鹏, 黄华, 杨承凯, 等. 旋转式组织工程生物反应器检测控制及驱动系统[J]. 航天医学与医学工程. 2008;21(1):61-65.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 上海理工大学医疗器械与食品学院微创新基金, 课题名称: 三维内皮细胞培养装置研制与实验。

致谢: 感谢复旦大学附属中山医院心血管病研究所提供的新生儿脐带以及细胞培养过程中的技术支持和便利的工作环境。

利益冲突: 课题不涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。