

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.010 [http://www.crter.org]

张淑香, 陈彦田, 齐念民. 人脐带间充质干细胞半连续灌注培养: 灌注启动时间及灌注频率和灌注体积[J].
中国组织工程研究, 2013, 17(6):1004-1011.

人脐带间充质干细胞半连续灌注培养: 灌注启动时间及灌注频率和灌注体积*☆

张淑香, 陈彦田, 齐念民

上海交通大学药学院, 上海市 200240

文章亮点:

灌注启动时间为 48 h、频率为每天、体积比为 75% 的静态培养条件下, 稀释率较大, 细胞密度较大, 不仅葡萄糖和谷氨酰胺充足, 而且细胞所需的微量元素和未知的因子也充足, 满足了细胞生长的要求; 同时及时排除乳酸和氨等对细胞的影响, 提高了细胞的增殖数量。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 半连续灌注培养; 脐带; 间充质干细胞; 启动时间; 灌注频率; 灌注体积; 扩增; 代谢; 其他基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 人脐带间充质干细胞作为新的种子细胞来源, 如何迅速提高其增殖以满足临床所需的数量和质量, 是迫切需要解决的现实问题。

目的: 探讨不同的灌注启动时间、灌注频率和灌注体积对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响, 建立高密度培养的半连续灌注培养工艺。

方法: 培养传代人脐带间充质干细胞, 以批培养方式为参照, 半连续灌注培养分成 3 组。①灌注启动时间组: 批培养 24 h 和 48 h, 分别开始换液, 每 2 d 更换 75%。②灌注频率组: 批培养 48 h 开始换液, 频率分别为每 1, 2, 3 d, 换液体积比为 75%。③灌注体积组: 批培养 48 h 开始换液, 频率为每 2 d, 换液体积比分别为 25%, 50%, 75%, 100%。

结果与结论: 相对于其他培养条件, 灌注启动时间为 48 h、频率为每天、体积比为 75% 的静态培养条件下, 稀释率较大, 细胞密度较大, 葡萄糖比消耗速率和乳酸比生成速率较高, 谷氨酰胺比消耗速率较低, 氨比生成速率较高, 乳酸对葡萄糖的代谢系数较低, 谷氨酰胺的代谢系数较高。这表明稀释率大, 不仅葡萄糖和谷氨酰胺充足, 而且细胞所需的微量元素和未知的因子也充足, 满足了细胞生长的要求; 同时排除乳酸和氨等对细胞的影响, 去除条件培养基中某些因子对细胞的交互影响, 提高了细胞的增殖。

Semi-continuous perfusion culture process of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Initial time, perfusion frequency and perfusion volume

Zhang Shu-xiang, Chen Yan-tian, Qi Nian-min

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract

BACKGROUND: How to quickly improve the proliferation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a seed cell source is an urgent problem to meet the clinical requirement for the quantity and quality.

OBJECTIVE: To explore the effects of different initial time, frequencies and volumes of perfusion on the proliferation and metabolism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and to establish a semi-continuous perfusion culture technique with high cell density.

METHODS: Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells were cultured and passaged, the batch cultured cells were used as control. The semi-continuous perfusion cultured cells were divided into three groups.

张淑香☆, 女, 1976 年生, 山东省泰安市人, 汉族, 上海交通大学在站博士后, 主要从事组织工程种子细胞体外扩增与分化的研究。

zhangsx1976@
yahoo.com.cn

通讯作者: 陈彦田, 讲师, 上海交通大学药学院, 上海市 200240
ytchen@sjtu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)06-01004-08

收稿日期: 2012-03-21
修回日期: 2012-05-28
(20120321021/M · C)

Zhang Shu-xiang☆, Doctor,
School of Pharmacy, Shanghai
Jiao Tong University, Shanghai
200240, China
zhangsx1976@yahoo.com.cn

Corresponding author: Chen
Yan-tian, Lecturer, School of
Pharmacy, Shanghai Jiao Tong
University, Shanghai 200240,
China
ytchen@sjtu.edu.cn

Supported by: the China
Postdoctoral Science
Foundation, No.
2011M500780*

Received: 2012-03-21
Accepted: 2012-05-28

In the initial time group: the cells were batch cultured for 24 and 48 hours, respectively, and then the media was changed for 75% every 2 days. In the perfusion frequency group: the cells were batch cultured for 48 hours, after that, the media was changed every 1, 2 and 3 days, respectively, and 75% media was changed. In the perfusion volume group: the media was changed every 2 days after batch cultured for 48 hours, 25%, 50%, 75% and 100% media was changed.

RESULTS AND CONCLUSION: The relatively higher values of dilution rate and cell density were acquired with the suitable monolayer culture of perfusion initial time at 48 hours of batch culture, and 75% (volume ratio) media exchanged every day. The higher values of glucose consumption rate, lactate formation rate and ammonia formation rate, and lower value of glutamine consumption rate were attained with higher metabolic coefficient of lactate/glucose and lower metabolic coefficient of ammonia/glutamine. It showed that with higher medium dilution, nutrients including glucose, glutamine, trace elements and other unknown factors were sufficiently supplied to meet the requirement of cell growth, and the negative effects of lactate and ammonium and the interaction effect of some factors in the culture media on the cells were relieved, leading to the enhanced proliferation of cells.

Key Words: stem cells; umbilical cord/umbilical cord blood stem cells; semi-continuous perfusion culture; umbilical cord; mesenchymal stem cells; initial time; perfusion frequency; perfusion volume; amplification; metabolism; other grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Zhang SX, Chen YT, Qi NM. Semi-continuous perfusion culture process of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Initial time, perfusion frequency and perfusion volume. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(6):1004-1011.

0 引言

间充质干细胞是来源于中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞,广泛存在于全身结缔组织和器官间质中。在体外培养扩增间充质干细胞,将它诱导分化为骨、软骨或肌肉、肌腱、心肌组织、真皮组织等,使之作为组织工程的种子细胞来修复各种病变和缺损组织,应用于创伤性疾病、烧伤及心肌疾患等疾病中^[1-2]。用于临床应用研究的间充质干细胞种类主要是骨髓间充质干细胞和脐带间充质干细胞。骨髓间充质干细胞的含量随供者年龄增加而明显减少,受病毒感染机会显著增加,而且获得骨髓的过程也会造成一定的二次损伤,显著限制了骨髓间充质干细胞的临床应用。相对而言,脐带间充质干细胞含量丰富、增殖潜能高、免疫原性低、支持造血功能强、取材方便,为细胞治疗和组织工程提供了新的种子细胞的来源^[3]。作为种子细胞,如何迅速提高其增殖、分化以满足临床上大面积骨质缺损、肌肉、神经等创伤修复所需的细胞数量,是迫切需要解决的现实问题。

半连续式灌注培养,又称为换液培养,是获得高细胞密度的一种操作方式,即定期取出部分培养液,然后补加新鲜的培养基继续进行培养。该培养方式操作简便,生产效率高,可长时期进行生产,反复收获细胞,使细胞密度一直保持在较高的水平。对于受传代限制要保持多向分化潜能的间充质干细胞而言,尤为适用。文章旨在探讨不同的灌注启动时间、灌注频率和灌注体积对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响,建立高密度培养的半连续灌注培养过程,为快速获得大量种子细胞提供实验和理论依据。

1 材料和方法

设计: 对比不同灌注启动时间、灌注频率和灌注体积对人脐带间充质干细胞扩增的影响。

时间及地点: 实验于2011年3至6月在上海交通大学药学院完成。

材料: 由江苏省干细胞工程技术研究中心提供健康产妇正常足月新生儿脐带(产妇知情同意),采集后4℃保存,6h内处理。

实验方法:

人脐带间充质干细胞的分离和原代培养: 见参考文献[4]。

人脐带间充质干细胞的传代培养^[3]: 已冻存在液氮罐内的第1代人脐带间充质干细胞经37℃水浴槽融化后快速移到培养皿中, 12 h后完全换液, 三四天后胰酶-EDTA混合液(Invitrogen, USA)消化, 按1:3或者1:4传代。细胞均使用添加体积分数为10%胎牛血清(Hyclone, USA)的 α -MEM培养基(Invitrogen, USA)于37℃、体积分数为5% CO₂培养箱中培养。选择10代以内的细胞用于后续实验。

人脐带间充质干细胞的批培养和半连续灌注培养: 细胞以2 500/cm²接种于孔板中, 每组3孔, 重复3次。不换液为批培养, 定期换液为半连续灌注培养, 具体实验方案见表1。定期取样, 进行细胞计数和培养液的生化参数检测。

表1 半连续灌注培养的实验设计

Table 1 Experiment design of semi-continuous perfusion culture

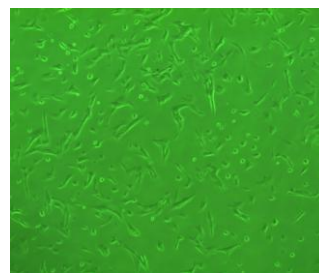
培养模式	启动时间	频率	换液体积比	No.
半连续灌注培养 (SEP)	24 h	每 2 d	75%	SEP-1
	48 h	每天	75%	SEP-2
		每 2 d	25%	SEP-3
			50%	SEP-4
			75%	SEP-5
			100%	SEP-6
		每 3 d	75%	SEP-7

以批培养方式为对照。

主要观察指标: ①细胞形态。②细胞计数: 胰酶-EDTA混合液消化后的细胞悬液, 用血清计数板(Hausser Scientific, USA)检测细胞密度。③生化参数: 上清液离心后用试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和氨的浓度。

2 结果

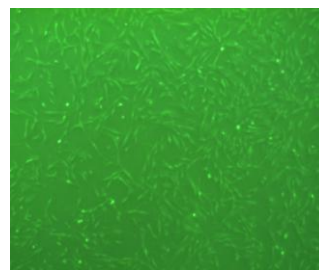
2.1 人脐带间充质干细胞的形态 光学显微镜观察结果表明, 对传代的人脐带间充质干细胞而言, 10 h时细胞基本已经贴壁, 大部分细胞已经伸展, 呈梭形或多角形, 少数呈圆形; 24 h时细胞已经完全贴壁, 并开始分裂; 96 h时细胞大小均匀, 有规则地平行排列或旋涡状排列, 成克隆样生长, 达到80%-90%融合, 见图1。



A: 10 h时细胞基本已经贴壁, 大部分细胞已经伸展, 呈梭形或多角形, 少数呈圆形



B: 24 h时细胞已经完全贴壁, 并开始分裂

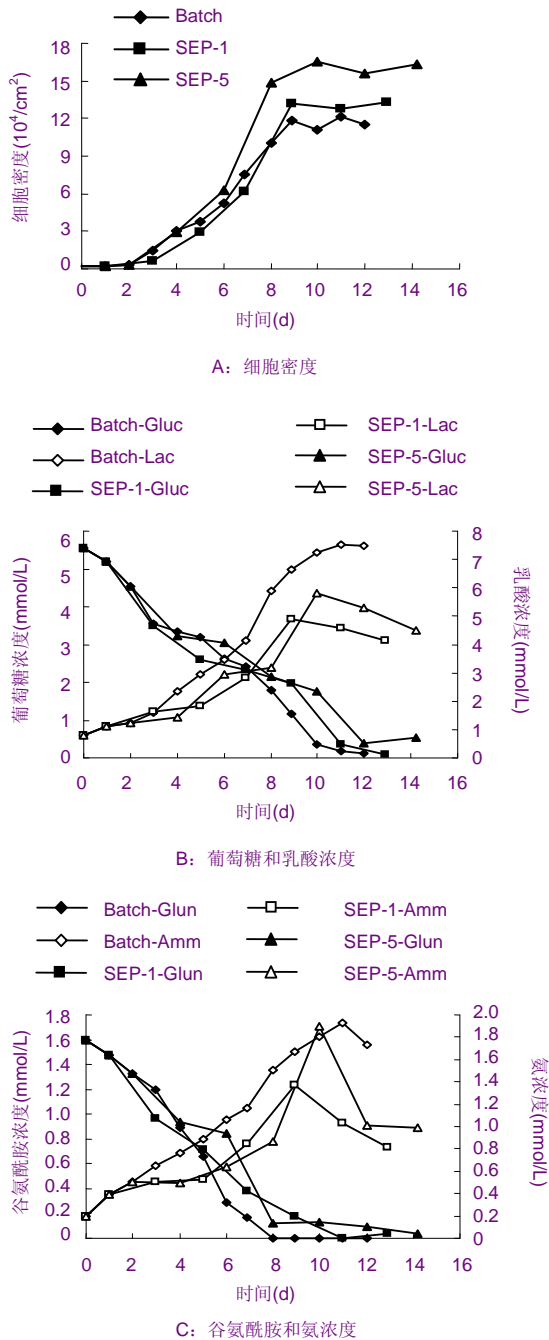


C: 96 h时细胞大小均匀, 有规则地平行排列或旋涡状排列, 成克隆样生长, 达到80%-90%融合

图1 第5代人脐带间充质干细胞的形态(x40)

Figure 1 Morphology of the fifth generation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (x40)

2.2 灌注启动时间对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响 与批培养相比, 换液提高了最大细胞密度, 降低了比生长速率, 增大了倍增时间, 见图2A, 表2。在培养初期, 细胞会自发分泌一些生长因子和营养因子, 批培养24 h时细胞密度较低, 此时换液不能及时弥补换液引起的这些因子的丢失, 从而后续的细胞生长低于批培养(第3-7天), 但培养后期随着细胞密度的增加, 批培养中营养物质耗尽和有毒副产物累积, 而换液模式使得细胞密度得以进一步提高。批培养48 h时细胞因子得到一定的累积, 延迟期结束, 细胞增殖开始, 此时换液不仅及时补充微量元素等营养物质, 而且去除有毒副产物, 使得细胞迅速进入对数生长期, 显著提高了细胞密度, 见图2A。后续的半连续灌注培养实验都以批培养48 h为灌注启动时间。



Batch:批培养; SEP:半连续灌注培养(SEP-1:批培养 24 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%; SEP-5: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%); Gluc: 葡萄糖; Lac: 乳酸; Glun: 谷氨酰胺; Amm: 氨。

注: 与批培养相比, 换液提高了最大细胞密度, 降低了培养液中的乳酸和氨浓度。

图2 灌注启动时间对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响

Figure 2 Effect of initial time on the proliferation and metabolism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

换液降低了培养液中的乳酸和氨的浓度, 见图2B, 2C, 提高了葡萄糖比消耗速率和乳酸比生成速率、谷氨酰胺比消耗速率和氨比生成速率, 降低了乳酸对葡萄糖

的代谢系数, 说明葡萄糖较大地进入三羧酸循环, 降低了乳酸生成, 得到有效的利用。培养后期细胞的增殖有限, 营养物质消耗主要用于胞外基质的分泌, 这使得培养后期的乳酸和氨的浓度显著降低, 尤其是氨对谷氨酰胺的代谢系数, 见表2。

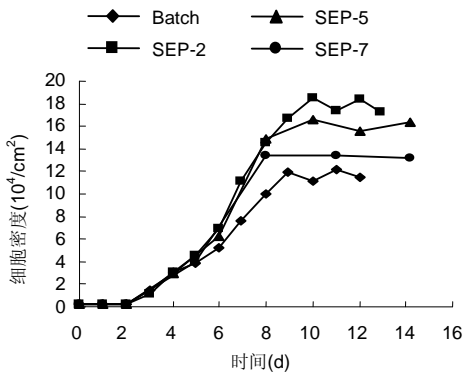
表2 灌注启动时间对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响

Table 2 Effect of initial time on the proliferation and metabolism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

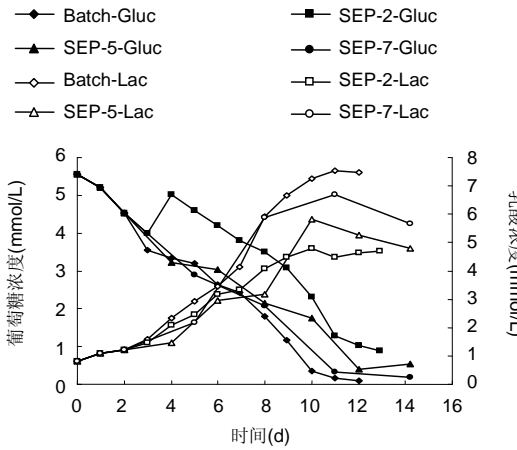
参数	批培养 (对照)	SEP-1	SEP-5
最大细胞密度(10 ⁴ /cm ²)	12.19	13.34	16.58
对数生长期的平均比生长速率(d ⁻¹)	0.55	0.52	0.52
倍增时间(h)	30.2	32.0	32.0
葡萄糖代谢			
葡萄糖最终浓度(mmol/L)	0.1	0.09	0.54
乳酸最终浓度(mmol/L)	7.47	4.14	4.51
对数生长期的平均葡萄糖比消耗速率 [mmol/(10 ⁹ cells-d)]	13.54	18.61	18.29
对数生长期的平均乳酸比生成速率 [mmol/(10 ⁹ cells-d)]	11.37	10.32	9.30
乳酸对葡萄糖的代谢系数(mmol/mmol)	1.22	0.67	0.8
谷氨酰胺代谢			
谷氨酰胺最终浓度(mmol/L)	0	0.03	0.04
氨最终浓度(mmol/L)	1.73	0.82	0.98
对数生长期的平均谷氨酰胺比消耗速率 [mmol/(10 ⁹ cells-d)]	3.84	6.13	5.75
对数生长期的平均氨比生成速率 [mmol/(10 ⁹ cells-d)]	2.96	7.99	2.89
氨对谷氨酰胺的代谢系数(mmol/mmol)	0.96	0.54	0.62

注: SEP-1:批培养 24 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%; SEP-5: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%。

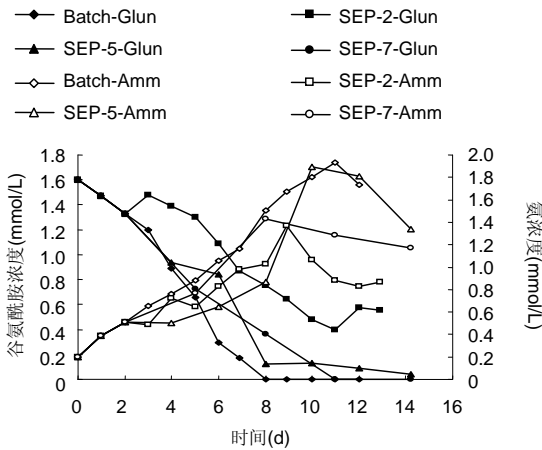
2.3 灌注频率对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响 灌注频率越大, 获得的最大细胞密度越大, 而比生长速率越小, 见图3A, 表3。人脐带间充质干细胞较高的灌注频率引起培养液中较高的葡萄糖浓度和较低的乳酸浓度, 见图3B。葡萄糖消耗速率和乳酸生成速率基本高于批培养。由于葡萄糖浓度充足, 尽管乳酸对葡萄糖的代谢系数比批培养小, 但仍有40%–50%的葡萄糖通过糖酵解途径生成乳酸, 见表3。较高的灌注频率下, 培养液中的谷氨酰胺浓度较高, 氨浓度较低, 见图3C。批培养的培养后期谷氨酰胺耗尽, 氨浓度接近于 2 mmol/L。对于半连续灌注培养, 灌注频率越低, 其培养模式更接近于批培养, 其培养后期无法满足较高细胞密度对营养物质的需求, 造成残留的谷氨酰胺浓度为零或接近零。与葡萄糖代谢类似谷氨酰胺的代谢速率基本高于批培养, 而氨对谷氨酰胺的代谢系数较低, 见表3。



A: 细胞密度



B: 葡萄糖和乳酸浓度



C: 谷氨酰胺和氨浓度

Batch:批培养; SEP: 半连续灌注培养(SEP-2:批培养 48 h 开始换液, 每天更换 75%; SEP-5: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%; SEP-7:批培养 48 h 开始换液, 每 3 d 更换 75%); Gluc: 葡萄糖; Lac: 乳酸; Glun: 谷氨酰胺; Amm: 氨。

注: 灌注频率越大, 获得的最大细胞密度越大。较高的灌注频率引起培养液中较高的葡萄糖浓度和较低的乳酸浓度。较高的灌注频率下, 培养液中的谷氨酰胺浓度较高, 氨浓度较低。

图3 灌注频率对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响

Figure 3 Effect of the perfusion frequency on the proliferation and metabolism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

表3 灌注频率对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响

Table 3 Effect of perfusion frequency on the proliferation and metabolism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

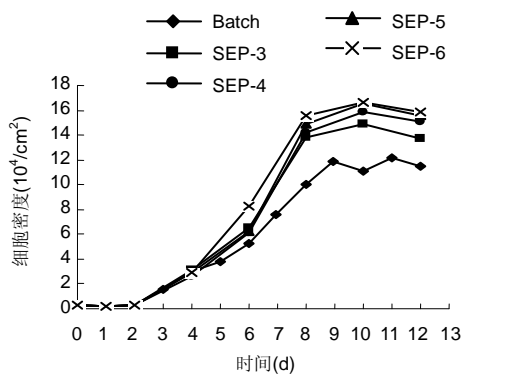
参数	批培养 (对照)	SEP-7	SEP-5	SEP-2
扩增				
最大细胞密度($10^4/cm^2$)	12.19	13.40	16.58	18.52
对数生长期的平均比生长速率(d^{-1})	0.55	0.66	0.52	0.53
倍增时间(h)	30.2	25.2	32.0	31.4
葡萄糖代谢				
葡萄糖最终浓度(mmol/L)	0.1	0.18	0.54	0.89
乳酸最终浓度(mmol/L)	7.47	5.65	4.51	4.71
对数生长期的平均葡萄糖比消耗速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	13.54	18.65	18.29	21.42
对数生长期的平均乳酸比生成速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	11.37	13.59	9.30	19.96
乳酸对葡萄糖的代谢系数(mmol/mmol)	1.22	0.99	0.8	1.07
谷氨酰胺代谢				
谷氨酰胺最终浓度(mmol/L)	0	0	0.04	0.56
氨最终浓度(mmol/L)	1.73	1.17	0.98	0.87
对数生长期的平均谷氨酰胺比消耗速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	3.84	6.34	5.75	3.60
对数生长期的平均氨比生成速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	2.96	4.37	2.89	6.46
氨对谷氨酰胺的代谢系数(mmol/mmol)	0.96	0.73	0.62	0.91

注: SEP-2:批培养 48 h 开始换液, 每天更换 75%; SEP-5: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%; SEP-7:批培养 48 h 开始换液, 每 3 d 更换 75%。

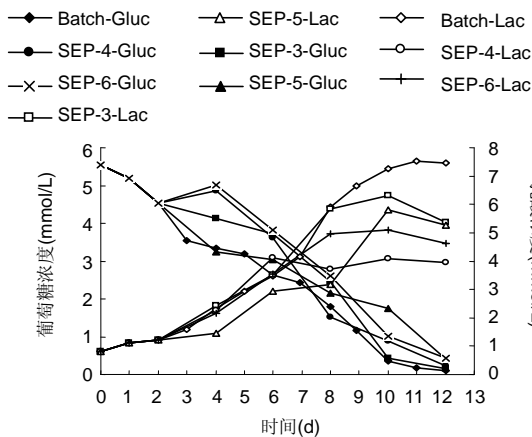
2.4 灌注体积对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响 灌注体积越大, 获得的最大细胞密度越大, 但随着灌注体积的增大, 细胞密度增加的幅度减少; 比生长速率和倍增时间基本没变化, 见图4A、表4。

灌注体积越大, 培养液中残留的葡萄糖浓度越大, 残留的乳酸浓度也略降, 见图4B。灌注体积增大, 葡萄糖代谢速率增大, 乳酸对葡萄糖的代谢系数也略增。对数生长期的乳酸对葡萄糖的代谢系数大于培养后期, 见表4, 说明对数生长期葡萄糖主要生成乳酸, 而培养后期葡萄糖消耗主要用于胞外基质的生成和分泌。类似地, 随着灌注体积的增大, 培养液中谷氨酰胺的残留浓度越大, 氨浓度略降, 见图4C。

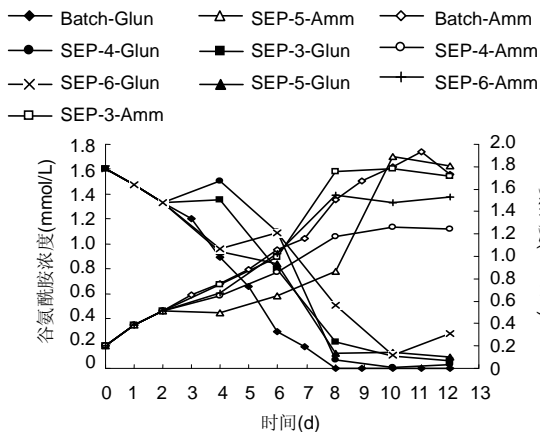
培养结束时, 除了最大换液体积外, 其他半连续灌注培养的谷氨酰胺浓度接近于0。对数生长期, 氨浓度不断增大; 培养后期, 氨浓度基本不变, 说明整个培养阶段, 氨一直在生成。



A: 细胞密度



B: 葡萄糖和乳酸浓度



C: 谷氨酰胺和氨浓度

Batch: 批培养; SEP: 半连续灌注培养(SEP-3: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 25%; SEP-4: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 50%; SEP-5: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%; SEP-6: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 100%); Gluc: 葡萄糖; Lac: 乳酸; Glun: 谷氨酰胺; Amm: 氨。

注: 灌注体积越大, 获得的最终细胞密度越大, 但随着灌注体积的增大, 细胞密度增加的幅度减少。灌注体积越大, 培养液中残留的葡萄糖浓度越大, 残留的乳酸浓度略降。随着灌注体积的增大, 培养液中谷氨酰胺的残留浓度越大, 氨浓度略降。

图 4 灌注体积对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响

Figure 4 Effect of perfusion volume on the proliferation and metabolism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

表 4 灌注体积对人脐带间充质干细胞扩增和代谢的影响

Table 4 Effect of perfusion volume on the proliferation and metabolism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

参数	批培养 (对照)	SEP-3	SEP-4	SEP-5	SEP-6
最大细胞密度($10^4/cm^2$)	12.19	14.90	15.82	16.58	16.61
对数生长期的平均比生长速率(d^{-1})	0.55	0.50	0.51	0.52	0.52
倍增时间(h)	30.2	33.3	32.6	32.0	32.0
葡萄糖代谢					
葡萄糖最终浓度(mmol/L)	0.1	0.16	0.23	0.39	0.42
乳酸最终浓度(mmol/L)	7.47	5.35	3.96	5.28	4.63
对数生长期的平均葡萄糖比消耗速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	13.54	7.41	6.99	18.29	8.97
对数生长期的平均乳酸比生成速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	11.37	12.43	13.74	9.30	17.37
乳酸对葡萄糖的代谢系数(mmol/mmol)	1.22	0.98	0.77	0.82	1.12
谷氨酰胺代谢					
谷氨酰胺最终浓度(mmol/L)	0	0.06	0.03	0.09	0.28
氨最终浓度(mmol/L)	1.73	1.71	1.24	1.81	1.53
对数生长期的平均谷氨酰胺比消耗速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	3.84	10.11	19.82	5.75	4.91
对数生长期的平均氨比生成速率[$mmol/(10^9 cells \cdot d)$]	2.96	3.21	3.25	2.89	5.15
氨对谷氨酰胺的代谢系数(mmol/mmol)	0.96	0.36	0.21	0.80	1.04

*. 培养时间为 12 d, 不同于之前 15 d 的培养时间; SEP-3: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 25%; SEP-4: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 50%; SEP-5: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%; SEP-6: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 100%。

3 讨论

组织工程种子细胞的质量和数量是组织工程组织应用于临床的重要因素。人脐带间充质干细胞作为一种新型的种子来源, 如何快速获得大量的细胞, 并保证有效的质量, 需要从体外培养的影响因素入手, 确定适宜的培养条件和参数。

细胞培养基一般以葡萄糖为碳源, 氨基酸为氮源, 并添加维生素等细胞生长必需成分。细胞代谢葡萄糖产生乳酸或丙酮酸和二氧化碳, 代谢谷氨酰胺产生丙氨酸和氨。乳酸和氨除了自身浓度对细胞的浓度依赖型毒害外, 还影响pH值, 从而影响细胞代谢的酶活力, 最终影响细胞生长^[5-6]。控制培养系统中营养物质及代谢产物的方法是采用灌注培养工艺, 通过不断的补充新鲜培养基, 排出代谢产物, 控制有害代谢产物的积累。间充质干细胞体外培养的生长曲线包括延迟期、对数生长期和

生长稳定期。由于间充质干细胞是贴壁细胞, 所以单层培养条件下, 当细胞长满单层培养的有限空间时, 细胞生长因接触抑制、生长空间缺乏而缓慢或者停止, 然后胞外基质分泌增强, 表现在随着培养的进行, 尤其培养后期, 胰酶消化后有较多粘膜出现。间充质干细胞体外培养条件和参数对细胞的扩增、生长、分化、表面抗原特性有着重要影响^[7]。

文章通过考察半连续灌注培养(或换液培养)的培养参数对细胞生长代谢的影响, 得出: 人脐带间充质干细胞在生长延迟期(约48 h)内消耗葡萄糖和谷氨酰胺等营养物质, 自我合成和分泌一些后续生长所需的营养因子和生长因子, 过早的灌注会造成这些生长所需因子的丢失, 延长生长延迟期, 进而影响后续生长。48 h时细胞已经完全适应培养环境, 此时的培养液中葡萄糖和谷氨酰胺充足, 乳酸和氨浓度均低于1 mmol/L, 而且自身分泌的因子较充足, 是启动灌注的适宜时间。文献报道, 5 mmol/L的乳酸浓度对间充质干细胞生长影响不大^[5]。段小军等^[8]通过研究种植密度、首次换液时间对人骨髓间充质干细胞原代培养时间的影响, 得出原代培养的适宜培养条件为(1-3)×10⁵/cm²细胞密度、48 h换液。李德华等^[9]观察换液频率对人脐静脉间充质干细胞增殖生长的影响, 得出启动时间为24 h、频率为每天的换液培养条件下, 细胞增殖最快, 生长状态最好, 但培养14 d后达到的细胞密度相同。

实验中灌注频率和灌注体积越大, 获得的细胞密度越大, 最大细胞密度为18.52×10⁴/cm², 比接种密度提高了73倍, 是批培养的1.5倍; 对数生长期的比生长速率在0.5-0.6 d⁻¹范围内, 倍增时间为25-30 h。灌注频率和灌注体积越大, 葡萄糖供给越充足, 乳酸浓度越低, 葡萄糖比消耗速率和乳酸比生成速率也越高, 乳酸对葡萄糖的代谢系数越大, 说明在较高的灌注频率和体积下, 葡萄糖充足, 使得葡萄糖较多地生成乳酸, 葡萄糖的利用率有所降低。类似地, 灌注频率和灌注体积越大, 谷氨酰胺供给充足, 氨浓度越低, 谷氨酰胺比消耗速率越低, 氨比生成速率越高, 氨对谷氨酰胺的代谢系数越大, 说明除了谷氨酰胺之外, 其他氨基酸的消耗增大, 提高了氨的生成。在静态单层培养条件下, 由于贴壁面积的有限性, 造成人脐带间充质干细胞的生长空间有限。另外人脐带间充质干细胞的传代次数有限, 当单层培养的细胞贴满后产生接触抑制, 会停止生长, 进行胞外基质的分泌。较大的灌注频率和体积下, 不仅葡萄糖

和谷氨酰胺充足, 而且细胞所需的微量元素和未知的因子也充足, 满足了细胞生长的要求; 同时排除乳酸和氨等对细胞的不良影响, 使得细胞处于较新鲜的培养液中, 及时去除条件培养基中某些因子对细胞的交互影响, 减缓了胞外基质的分泌, 提高了细胞的扩增。因此, 静态半连续灌注培养条件下扩增人脐带间充质干细胞的适宜条件是批培养48 h启动灌注, 每天更换培养液体积的75%。

灌注培养中细胞和营养物质的物料衡算公式如(1)-(2)。

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - k_d - Df)X_v \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_f - S) - q_s \cdot X_v \quad (2)$$

其中, X_v 为活细胞密度(10⁹ L⁻¹); t , 培养时间(d); μ , 比生长速率(d⁻¹); D , 稀释率(d⁻¹); f , 细胞流失率, 无因次, 介于0-1之间; $1-f$, 细胞截留效率, 无因次; S , 培养液中营养物质浓度。(mmol/L); S_f , 补加液中营养物质浓度, mmol/L; q_s , 营养物质比消耗速率[mmol/(10⁹ cells · d)]。实验条件下根据公式(1)和(2)得出的计算结果, 见表5。

表5 静态单层培养条件下的参数计算

Table 5 Parameter calculation of static monolayer cultures

参数	SEP-3	SEP-7	SEP-4	SEP-5	SEP-6	SEP-2
频率(every)	2 d	3 d	2 d	2 d	2 d	1 d
体积	1/4	3/4	2/4	3/4	4/4	3/4
稀释率(d ⁻¹)	1/8	1/4	1/4	3/8	1/2 (4/8)	3/4 (6/8)
平均比生长速率(d ⁻¹)	0.50	0.66	0.51	0.52	0.52	0.53
			D < μ		D ≈ μ	D > μ
最大细胞密度 (10 ⁴ cells/cm ²)	14.90	13.40	15.82	16.58	16.61	18.52
平均葡萄糖比消耗速率 [mmol/(10 ⁹ cells·d)]	7.41	18.65	6.99	18.29	8.97	21.42
培养液中营养物质浓度 S(mmol/L)	0.16	0.18	0.23	0.39	0.42	0.89
补加液中营养物质浓度 (S _f =5.56 mmol/L)			ds/dt < 0 (以葡萄糖为例)			

SEP-2:批培养 48 h 开始换液, 每天更换 75%; SEP-3:批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 25%; SEP-4:批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 50%; SEP-5: 批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 75%; SEP-6:批培养 48 h 开始换液, 每 2 d 更换 100%; SEP-7:批培养 48 h 开始换液, 每 3 d 更换 75%。

实验在静态单层条件下进行, 细胞一旦贴壁, 就不会脱落, 可以实现细胞的100%截留, 即 $f=0$, 加上细胞没有死亡, 因此公式(1)变为 $\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v$, 细胞呈指数生长,

此时稀释率大小不会影响细胞生长, 只要补加营养物质充足, 贴壁空间存在, 细胞会无限制生长。实验中营养物质充足, 细胞最终长满整个单层贴壁空间, 因接触抑制而停止生长。以葡萄糖为例, 由于细胞不断生长, 所以葡萄糖不断被消耗, 没有达到平衡。在这种情况下, 若贴壁空间无限, 细胞最终会因为营养物质缺乏而停止生长。

然而在动态培养条件下, 比如微载体搅拌培养, 细胞不可能完全截留, 而且细胞在搅拌下会有部分脱离微载体, 进入培养液呈悬浮状态, 进而重新贴壁、死亡或者随培养液丢弃, 所以 $0 < f < 1$, 使得在补加培养成分浓度已定条件下细胞密度最终达到稳定, 不会无限制生长, 此时达到细胞和营养物质在内的系统的稳定。

对于脐带间充质干细胞在生物反应器中的三维微载体培养, 如果不断加入新鲜微载体, 提供细胞贴附的面积, 同时以一定比例取出细胞贴附的微载体, 就会不断获得细胞, 并且由于培养条件恒定, 提供的细胞质量也均一, 从而在质量和数量上满足临床应用的要求。

基金资助: 中国博士后基金面上项目资助(2011M500780)。

作者贡献: 实验设计、实施、资料收集和成文由第一作者完成, 实验评估由全部作者完成, 第二、三作者审校并对文章负责。

利益冲突: 课题未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。

伦理要求: 由江苏省干细胞工程技术研究中心提供健康产妇正常足月新生儿脐带, 产妇和家属同意用于科学研究。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Mezey E. The therapeutic potential of bone marrow-derived stromal cells. *J Cell Biochem.* 2011;112(10):2683-2687.
- [2] Lee RH, Oh JY, Choi H. Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair. *J Cell Biochem.* 2011 Nov;112(11):3073-3078.
- [3] Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes I, et al. Umbilical cord as a mesenchymal stem cell source for treating joint pathologies. *World J Orthop.* 2011;2(6):43-50.
- [4] Li M, Li WW, Yang B, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2011; 15(40): 7475-7479. 李敏, 李巍巍, 杨兵, 等. 循环灌注接种方法在人脐带间充质干细胞骨组织工程中的应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(40): 7475-7479.
- [5] Chen T, Zhou Y, Tan WS. Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(6): 573-586.
- [6] Zhang F, Sheng W, Wang XL, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009; 13(1): 21-26. 张芳, 盛望, 王小利, 等. 葡萄糖对人脐带间充质干细胞生长与代谢的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(1): 21-26.
- [7] Hu JB, Jiang DD, Zhou Y, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2007;11(42): 8473-8477. 胡静波, 蒋丹丹, 周燕, 等. 换液频率对骨髓间充质干细胞生物学特性的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(42): 8473-8477.
- [8] Duan XJ, Yang L, Lin YS, et al. *Xi'nan Guofang Yiyao.* 2004; 14(2): 137-140. 段小军, 杨柳, 林炎水, 等. 种植密度、换液时间对人间充质干细胞原代培养时间的影响[J]. *西南国防医药*, 2004, 14(2): 137-140.
- [9] Li DH, Shan W, Zhang HF, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2007;11(20):3864-3867. 李德华, 单伟, 张海峰, 等. 人脐静脉间充质干细胞原代培养换液频率与细胞增殖生长的关系[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(20): 3864-3867.