

一种可提高成纤维细胞在三维支架上种植效率和均匀性的简单方法

周娟,张其清*
(中国医学科学院/协和医科大学生物医学工程研究所,天津 300192)

[摘要] **目的:**尝试使用简单的动态种植方法来提高成纤维细胞在三维支架上的种植效率和均匀性,以更有效地构建组织工程皮肤。**方法:**成纤维细胞以下列方式在胶原海绵支架进行种植和培养:(1)振荡种植振荡培养;(2)振荡种植静止培养;(3)静止种植静止培养。定期取样品进行电镜、组织学检测及细胞计数分析。**结果:**细胞加入 24 h 后振荡种植样品比静止种植样品细胞在支架内分布更为均匀,同时振荡种植的样品细胞贴壁率 $[(56\pm 5)\%]$ 明显高于静止种植的样品细胞贴壁率 $[(31\pm 4)\%, P<0.01]$ 。振荡种植振荡培养的样品在培养过程中细胞脱离支架而死亡,因此放弃了这些样品的继续培养。振荡种植静止培养的样品和静止种植静止培养的样品细胞一直保持正常的伸展状态。在培养过程中细胞向支架内部的长入速度及支架中的活细胞总数振荡种植静止培养的样品一直高于静止种植静止培养的样品。**结论:**采取振荡种植的方式种植细胞可明显提高成纤维细胞在三维支架上种植的效率 and 分布均匀性。

[关键词] 成纤维细胞;振荡种植;静止种植;振荡培养;静止培养

[中图分类号] Q 813.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0101-04

A simple way to improve fibroblast seeding efficiency and uniformity in constructing 3-D dermal equivalent

ZHOU Juan,ZHANG Qi-qing* (Institute of Biomedical Engineering, Peking Union Medical College/Chinese Academy of Medical Sciences,Tianjin 300192, China)

[ABSTRACT] **Objective:**To explore a simple way to improve seeding efficiency and uniformity in constructing 3-D dermal equivalent, in order to effectively construct tissue engineered skin. **Methods:** Human dermal fibroblasts were added onto collagen sponge scaffolds and cultured in the following 3 ways: (1)oscillating seeding and oscillating culture (OO), (2)oscillating seeding and static culture (OS), and (3)static seeding and static culture (SS). Samples were obtained and subjected to light microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and quantitative cell number assay at planed times. **Results:** Oscillating seeding achieved more uniform spatial cell distribution within scaffolds as compared to static seeding. Moreover, fibroblast seeding efficiency was significantly higher in oscillating conditions $[(56\pm 5)\%]$ than in static conditions $[(31\pm 4)\%, P<0.01]$. Cells from OO samples died due to their breaking away from the dermal frame and were discarded. Cells from OS samples and SS samples remained a normal extension. The cell ingrowth and the cell number were both higher for OS samples than that for SS throughout the culture. **Conclusion:** These results suggest that, as compared to conventional static techniques, oscillating seeding of dermal fibroblasts on 3-D scaffolds can obviously improve seeding efficiency and uniformity.

[KEY WORDS] fibroblasts; oscillating seeding;static seeding; oscillating culture; static culture

[Acad J Sec Mil Med Univ,2006,27(1):101-104]

成纤维细胞在支架上的种植是利用组织工程技术构建人工皮肤的第一步,因此在人工皮肤构建中发挥着重要的作用。体外在不同材料上构建不同组织的研究已证实,所构建组织的匀质性与细胞在支架上最初分布的均匀性密切相关^[1]。另外,在构建自体移植组织时,为了更有效的利用供体组织,并减少从取材到移植所需要的时间,细胞种植应该达到尽可能高的种植效率。目前,在静止条件下把高密度细胞悬液加在支架表面(静止种植)是应用的较为普遍的一种细胞种植方式。但这种方法有细胞种植率低^[2]和细胞在支架内分布不均匀^[3,4]的缺点。

人们已尝试了各种方法来提高细胞种植的效率 and 均匀性,如灌注种植、搅拌瓶反应器种植等,虽然这些技术已被成功地应用于某些实验研究中,但在整个组织工程领域并未被广泛使用。这是由于在组织构建的过程中多种原因影响着组织的形成,因此构建不同的组织要求不同的种植培养条

件^[5]。另外,所报道的一些动态种植培养方法需要特定的昂贵的实验装置,因此具有一定的局限性。

本研究使用简单的动态种植的方法在三维支架上种植成纤维细胞并对种植效果进行了检测和分析。

1 材料和方法

1.1 真皮成纤维细胞的分离、培养、传代 取健康儿童环切包皮,4℃下用含 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 PBS 浸泡冲洗,去除皮下组织,PBS 漂洗,置于 0.25%中性蛋

[基金项目] 国家高技术研究发展计划/863 计划(2002AA326040). Supported by National High-tech R&D Program/863 Program (2002AA326040).

[作者简介] 周娟,博士生. E-mail:zhoujuan427@sohu.com

* Corresponding author. E-mail:zhangqiq@xmu.edu.cn

白酶 (Dispase) 溶液中消化过夜。机械分离真皮和表皮, 将真皮组织剪碎后置于 0.25% 胶原酶 I 中, 37℃ 消化 0.5~1 h, 吹成细胞悬液。消毒筛网过滤, 离心, 计数。按 5×10^5 个/ cm^2 密度接种于 75 cm^2 的培养瓶中, 置于培养箱培养。当细胞融合达 80%~90% 时, 消化传代。

1.2 胶原海绵支架的制备 称取 428 g 本室制备的固含量为 1.4% 的胶原分散液, 加入 472 ml 0.2 mol/L 的醋酸溶液, 4℃ 下 300 r/min 搅拌 3 h, 加入 100 ml 0.6% (W/V) 壳聚糖 (95% 脱乙酰化), 4℃ 下 300 r/min 再搅拌 2 h。然后放入冷冻离心机, 4℃ 下 2 000 r/min 离心 20 min, 即得到均匀的胶原 (0.6%, W/V)-壳聚糖 (0.06%, W/V) 分散液。将每 8 ml 胶原分散液分别倒入 60 mm 塑料培养皿中, 真空冷冻干燥得到胶原海绵。室温下将干重 50 mg 的胶原浸泡于 20 ml 40% 的乙醇 [含 50 mmol/L 的 MES (2-吗啉乙烷磺酸)] 中 30 min, 然后将胶原浸泡在交联液中 [20 ml 的 40% 乙醇, 含 50 mmol/L 的 MES, 24 mmol/L 的 EDC (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺), 5 mmol/L 的 NHS (N-羟基丁二酰亚胺), 2% 硫酸软骨素], 室温下交联 4 h。将此支架在 0.1 mol/L 的 Na_2HPO_4 中清洗 1 h, 在 1 mol/L 的 NaCl 中清洗 2 h, 2 mol/L 的 NaCl 中清洗 1 d, 最后, 用双蒸水清洗 10 次, 冷冻干燥机中冻干。用打孔器制备直径为 16 mm 的圆片, 辐射灭菌。

1.3 细胞在支架上的种植和培养 将胶原海绵支架用 DMEM 培养液在 24 孔细胞培养板中预先浸泡 24 h, 然后吸净培养液。吸取 0.1 ml 浓度为 1.0×10^7 个细胞/ml 成纤维细胞悬液加入胶原海绵支架中, 将培养板密封并分为 3 组, 分别采取不同的方式进行种植和培养:

(1) 静态种植静态培养: 密封的培养板被转移到 37℃ 培养箱中, 24 h 加入 2 ml 培养基, 密封, 重新转移到 37℃ 培养箱中静置培养。

(2) 动态种植静态培养: 密封的培养板被转移到恒温旋转振荡器中 37℃, 40 r/min 振荡种植, 24 h 后加入培养基 2 ml, 密封, 然后转移到 37℃ 培养箱中静态培养。

(3) 动态种植动态培养: 动态种植样品加入 2 ml 培养基后仍置于旋转振荡器中, 37℃, 40 r/min 振荡培养。所有样品每 2 d 更换 1 次培养液。

1.4 组织学、形态学检测及细胞种植分析 分别于细胞加入支架后的 24 h、3 d、5 d、7 d 取样品进行电镜、组织学检测及细胞计数分析。

1.4.1 H-E 染色 样品用 F4G 0.1 固定液 (4 g 多聚甲醛, 0.1 ml 戊二醛, 100 ml 蒸馏水) 固定 4 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, H-E 染色。

1.4.2 中性红染色 样品用 PBS 冲洗 3 次, 加入中性红染液, 染色 10 min, 随后用含 0.000 08% 结晶紫-甲醛固定液固定 1 h, 70% 乙醇脱色, 光镜下观察。

1.4.3 细胞种植效率和增殖分析 样品用 PBS 冲洗, 去除未贴壁细胞, 然后用 0.25% 胰酶消化 10 min, 离心收集细胞计数。

1.4.4 样品的 SEM 观察 样品用 PBS pH 7.4 漂洗 2 次, 以去除培养液; 2.5% 戊二醛/PBS 固定 1 h; PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 1% OsO_4 固定 90 min; PBS 漂洗 2 次, 每次 10 min; 乙醇梯度脱水; 梯度乙醇干燥; 样品表面镀金后, 使用 HITACHI S-3500N 扫描电镜进行观察。

1.5 统计学处理 细胞计数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用双尾 t 检验。

2 结 果

2.1 细胞种植分析 细胞加入支架 24 h 后已经开始在支架内分布和伸展。但是静止种植的样品细胞在支架内分布不均匀, 有些区域细胞聚集形成了大量的细胞团块, 而有些区域则缺乏细胞 (图 1A)。相反, 振荡种植的样品细胞在整个支架内分布的更为均匀 (图 1B)。从细胞种植的效率来看, 振荡种植的样品细胞密度明显高于静止种植的样品。细胞加入支架 24 h 后振荡种植的样品细胞贴壁率为 (56%), 而静止种植的样品细胞贴壁率为 (31%), 两者比较有显著性差异 ($P < 0.001$, 表 1)。

表 1 成纤维细胞在支架上的贴壁及增殖

Tab 1 Cell numbers of fibroblast on 3-D scaffold from 24 h to 7 d post-inoculation

($\times 10^6$, $n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Time post-inoculating (t/d)			
	1	3	5	7
Oscillating seeding + oscillating culture	0.56±0.05	0.81±0.08	1.19±0.06	1.81±0.26
Static seeding + static culture	0.31±0.04**	0.40±0.05**	0.52±0.06**	0.71±0.08**

1×10^6 cells were seeded per matrix; ** $P < 0.001$ vs oscillating seeding + oscillating culture group

2.2 细胞形态学观察 在培养过程中振荡种植静止培养的样品 (图 2B) 和静止种植静止培养的样品细胞一直保持正常的伸展状态。但是振荡种植振荡培养的样品在培养 3 d 时有部分细胞形态发生了改变, 从正常的伸展状态开始变圆回缩, 并有细胞已脱离支架而死亡 (图 2A)。在培养 5 d 时此种样品中更多的细胞脱离支架而死亡, 经过 3 次重复实验, 出现同样的现象, 因此, 放弃了这些样品的继续培养。

2.3 细胞增殖分析 实验结果显示, 在培养过程中细胞计

数显示振荡种植静止培养的样品细胞数在培养 1~7 d 内一直明显高于静止种植静止培养的样品 (表 1), 在培养 7 d 时, 振荡种植静止培养的样品细胞数要比静止种植静止培养的样品细胞数高出 2 倍多。同时 H-E 染色结果显示, 在培养 7 d 时静止种植并且静止培养的样品支架内部只有少量的细胞 (图 3A), 而振荡种植静止培养的样品有大量细胞向支架内部长入 (图 3B)。

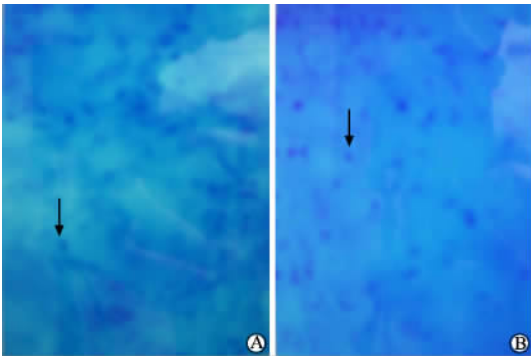


图 1 成纤维细胞加入胶原海绵支架 24 h 的中性红染色
Fig 1 Neutral red staining of collagen sponge scaffold
24 h after fibroblasts were inoculated(×400)

A: Static seeding; B: Oscillating seeding

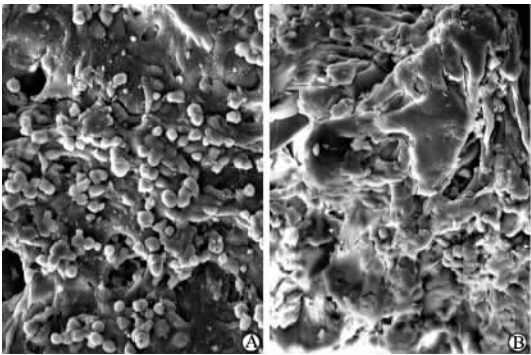


图 2 成纤维细胞加入胶原支架第 3 天的扫描电镜图
Fig 2 Cell morphology on scaffolds 3 d after
fibroblasts were inoculated(×500)
A: Samples of oscillating seeding and oscillating culture; B: Samples
of oscillating seeding and static culture

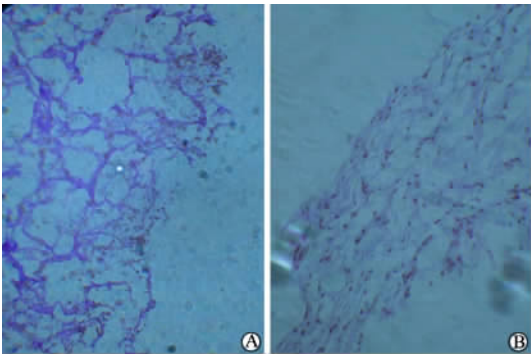


图 3 成纤维细胞加入胶原海绵支架第 7 天的 H-E 染色
Fig 3 Cell ingrowth on scaffolds 7 d after
fibroblasts were inoculated (×100)

A: Samples of static seeding and static culture; B: Samples of oscillating seeding and static culture

3 讨 论

在利用组织工程技术构建人工皮肤时,细胞种植时成纤维细胞在支架上的均匀分布将为形成具有均匀性的组织提

供基础。同时较高的细胞种植效率可以减少在构建自体移植组织时从取材到移植所需要的时间,并更有效的利用供体组织。

采用静止种植方法导致的细胞种植率低^[2]和细胞在支架内分布不均匀^[3,4]的问题不仅在皮肤组织中出现,在组织工程的其他领域同样在着类似的问题。因此为了提高细胞种植的效率 and 均匀性,人们已尝试了各种方法。已有报道灌注条件下可以提高关节软骨细胞的种植效率,并促进关节基质的形成^[6]。而当在聚羟基乳酸无纺网中种植细胞时在搅拌瓶反应器中种植可获得更多的贴壁细胞,同一项研究表明,通过细胞在三维支架空隙中的流动种植使得细胞在支架中的分布比静止种植具有更高的均匀性^[2]。虽然这些技术已被成功地应用于某些实验研究中,但在整个组织工程领域这些技术并未被广泛使用。这是由于在组织构建的过程中多种原因如温度、pH、氧气、细胞数量等影响着组织的形成。同时动物细胞、组织种类的多样性,使得细胞培养材料、培养环境千差万别,因此构建不同的组织要求不同的种植培养条件^[5]。而且,已报道的一些动态种植培养方法由于需要特定的昂贵的实验装置而限制了这些方法的广泛应用。本研究尝试用一种简单的动态种植的方法——用空气恒温振荡器振荡种植的方法种植成纤维细胞,并对细胞在三维支架上种植的效率 and 均匀性进行检测和分析。

将成纤维细胞以振荡方式种植到胶原海绵支架上,然后分别在恒温振荡器或细胞培养箱中进行种植或培养。虽然恒温振荡器和细胞培养箱内的环境条件如湿度水平、O₂ 和 CO₂ 水平等有所不同,但在实验过程中细胞在支架上的种植和培养是在封闭的条件下进行的,更换培养基的液时间间隔相同,相对来说,培养板内细胞生长的环境如湿度水平、O₂ 和 CO₂ 水平等没有明显的不同,因此细胞的生长并未受到明显的影响,这已通过预实验进行了证实。

结果显示,振荡种植的效率明显高于静止种植的效率,振荡种植静止培养的样品中细胞数一直明显高于静止种植静止培养的样品,表明细胞增殖状态良好。种植效率的区别可能是因为静止和振荡状态下细胞氧气和营养物质供应量的不同造成的。在静止状态下,氧气和营养物质的供应是依靠扩散进行的;而在振荡条件下氧气和营养物质的供应可同时依靠扩散和对流进行,因此更为有效。所以在振荡条件下,由于细胞获得了更多的氧气和营养物质,细胞活性更高,种植效率也更高^[7]。另外振荡所产生的机械动力也可能促进了细胞的均匀分散,因此有更多的细胞可以贴附于支架上,进而提高了细胞的贴壁率。同时振荡种植比静止种植使得细胞在支架内的分布更加均匀。振荡条件下支架各部位的细胞密度没有明显区别。而静止状态下在支架表层的细胞密度明显高于其他部位,并且支架内部的某些区域并没有细胞存在。静态种植细胞的不均匀分布有可能是由于重力作用以及细胞的活动造成的。振荡种植振荡培养的样品在培养过程中出现的细胞从支架上脱落可能是由于成纤维细胞本身的生长特性造成的,因为成纤维细胞在体内接受机械压力及流体剪切力的机会较少,所以不适应体外振荡培养。而振荡条件下振荡产生的机械力可能有助于细胞部分克服

重力作用而能够更均匀的分布。

虽然本方法所得细胞种植效率(56%)与其他动态种植方法(71%~87%)^[6,8]相比较低,然而本方法所用空气恒温振荡器为实验室常规仪器,易于应用,并且与静态种植相比可以显著提高种植效率和均匀性。本方法是否适用于其他支架材料或种子细胞的实验研究尚需进一步探讨。

[参考文献]

[1] Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. Engineering three-dimensional bone tissue *in vitro* using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51: 376-382.

[2] Li Y, Ma T, Kniss DA, et al. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices[J]. Biotechnol Prog, 2001, 17: 935-944.

[3] 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: 380-390.

[4] Xie Y, Yang ST, Kniss DA. Three-dimensional cell-scaffold constructs promote efficient gene transfection: implications for cell-based gene therapy[J]. Tissue Eng, 2001, 7: 585-598.

[5] Carrier RL, Rupnick M, Langer R, et al. Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle[J]. Tissue Eng, 2002, 8: 175-188.

[6] Wendt D, Marsano A, Jakob M, et al. Oscillating perfusion of cell suspensions through three dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 84: 205-214.

[7] Ratcliffe A, Niklason LE. Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 961: 210-215.

[8] Xiao YL, Riesle J, Van Blitterswijk CA. Static and dynamic fibroblast seeding and cultivation in porous PEO/PBT scaffolds [J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10: 773-777.

[收稿日期] 2005-10-31

[修回日期] 2005-12-06

[本文编辑] 尹 茶

Glutamate receptors within the nucleus of solitary tract contribute to pancreatic secretion stimulated by intraduodenal hypertonic saline

Liao Z, Li ZS, Lu Y, Wang WZ (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] It is well known that central transmission of vago-vagal reflex within the nucleus of solitary tract (NST) plays an important role in the regulation of gastrointestinal functions. The present study was designed to assess the role of NST glutamate receptor mechanism in pancreatic secretion evoked by intraduodenal hypertonic saline (HS) in anesthetized rats. Intraduodenal infusion of HS significantly ($P<0.01$) stimulated pancreatic protein output (from 2.60 ± 0.09 to 4.18 ± 0.24 mg/15 min). Bilaterally microinjected L-glutamate (5 nmol) into the medial nucleus of solitary tract (mNST) produced a significant increase of pancreatic protein secretion (from 2.65 ± 0.12 to 4.80 ± 0.34 mg/15 min, $P<0.01$). Bilateral injection of glutamate receptor antagonist kynurenic acid (KYN, 5 nmol) into the mNST completely abolished the increase of pancreatic protein output stimulated by intraduodenal HS (from 4.28 ± 0.21 to 2.83 ± 0.19 mg/15 min). Either NMDA receptor antagonist dl-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, 1.5 nmol) or AMPA/Kainate receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 1.5 nmol) injected into the mNST markedly attenuated ($P<0.05$) the pancreatic protein secretion stimulated by intraduodenal HS. In conclusion, these findings showed that blockade of the NST glutamate receptors, including NMDA and AMPA/Kainate receptors antagonized pancreatic secretion evoked by intraduodenal osmolality factor, and suggested that glutamate receptor mechanism within the NST contributed to the central regulation of pancreatic secretion.

[Auton Neurosci, 2005, 120: 62-67]