

研究论文

皮肤成纤维细胞制备微构组织的 聚团过程及数值模拟

梅 洋, 汤 强, 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: 微构组织的聚团尺寸影响其内部的细胞活性及体外构建大型工程化组织。采用转瓶系统, 考察了皮肤成纤维细胞 (human fibroblast, HF) 接种密度、微载体浓度和添加抗坏血酸磷酸酯盐 (L-ascorbic acid 2-phosphate, 简称 Vc) 对微构组织形成及聚团尺寸的影响, 并建立了微构组织聚团的数学模型。结果表明, 微构组织的聚团过程可分为迟滞期、突跃期和稳定期, 随着细胞接种密度、微载体浓度提高以及 Vc 的添加, 微构组织的平均聚团尺寸增大, 建立的数学模型能够模拟不同操作条件下微构组织形成的过程和聚团尺寸, 模拟结果与实测值基本相符, 为进一步调控微构组织聚团和大型工程化组织制备奠定基础。

关键词: 组织工程; 微构组织; 聚团; 数学模型

中图分类号: Q 81

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2009) 03-0702-08

Aggregation process and numerical simulation of microfabricated tissues by using human fibroblast

MEI Yang, TANG Qiang, ZHOU Yan, TAN Wensong

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science
and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The viability of cells and the fabrication of large-scale engineered tissue *in vitro* are influenced by the aggregation of microfabricated tissue. The effects of human fibroblast seeding density, microcarrier concentration and L-ascorbic acid 2-phosphate (Vc) on the formation and size of microfabricated tissue aggregates were investigated in spinner flask. A mathematical model was developed to simulate the relationship between operation parameters and aggregate size. The results showed that the process of aggregation had three phases: lag phase, logarithmic phase and static phase. The average aggregate size of microfabricated tissue increased with the increase of cell seeding density, microcarrier concentration and addition of Vc. Good agreement was found between experimental data and mathematical simulations. Furthermore, this model can lay the foundation for the modulation of aggregate size and larger-scale engineered tissue preparation.

Key words: tissue engineering; microfabricated tissue; aggregation; mathematical model

引 言

传统的组织构建方法通常是把细胞接种到三维

支架材料上, 通过体外培养, 形成与天然组织相似的工程化组织。但是, 在构建过程中, 当支架材料厚度或材料中细胞密度增加时, 营养物或代谢副产

2008-07-16 收到初稿, 2008-11-24 收到修改稿。

联系人: 周燕。第一作者: 梅洋 (1983—), 女, 硕士。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20576036, 20776044)。

Received date: 2008-07-16.

Corresponding author: ZHOU Yan. E-mail: zhouyan@ecust.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (20576036, 20776044).

物在材料中的传递受到限制,从而抑制细胞生长,造成构建组织的中心出现空化区或坏死区,难以满足临床需求^[1]。在前期的研究工作中提出了“微构-重塑技术”,即将细胞接种到直径为几百微米的支架(如微载体)上,通过调控体外培养条件,形成与天然组织相似的微构组织;再利用微构组织自发聚团能力,装配成大型功能化组织^[2]。该技术为体外构建大型工程化组织提供了新的方法。研究发现,在微构组织大量制备过程中微构组织会自发聚团^[3]。随着聚团尺寸的增加,营养物质和氧的传递受到限制^[4],因此需要对影响微构组织聚团尺寸的因素进行研究以调控聚团尺度。

近几十年来,国内外对仅由细胞构成的微组织的聚团以及细胞-微载体培养体系中的聚团开展了广泛的研究。Moyer等^[5]研究发现对于视网膜、肝脏和心脏微组织的聚团需保持细胞间一定的接触时间。细胞间的聚团与细胞表面的整合素、钙粘连素及胞外基质中的RGD序列等特异性结合位点有关^[6-7]。在细胞-微载体培养体系中,细胞接种密度、微载体浓度、搅拌速度及pH值等影响细胞与微载体贴附及细胞间的聚团^[8]。Fok等^[9]发现胚胎干细胞表面分子E-cadherin有利于细胞-玻璃微载体复合物的聚团形成。Goodwin等^[10]利用Cytodex-3微载体在旋转式生物反应器中培养CHK-21细胞,结果表明,低剪切水平更有利于CHK-21-微载体的聚团。

对于细胞或颗粒聚团模型的研究主要集中在流体力学对聚团动力学过程和聚团尺度的影响。Melis等^[11]建立的模型模拟了对流和扩散对直径小于Kolmogorov尺度的粒子的聚团速率常数的影响,结果表明,聚团速率常数随Peclet数的增大而增大。Muhitch等^[12]在其研究工作中提及了旋转壁生物反应器中牛角膜内皮细胞-Cytodex-3微载体聚团模型,对聚团的动力学过程和聚团尺度进行了估算,研究发现:单个球与聚团物之间的聚团速率常数最大,但是所建立的模型只能反映在特定的培养条件下细胞-微载体的聚团情况。Bueno等^[13]建立的波浪壁反应器中软骨细胞聚团动力学模型表明,由于提高了聚团动力学速度常数,加速了软骨细胞的聚团。Serra等^[14]基于粒数平衡方程建立了粒子聚团和聚团解离模型,研究发现,随着剪切力和粒子体积浓度增大,有效解离系数 B'_{eff} 增大,破坏了聚团和聚团解离的平衡,使聚团解离占主导。

本文以皮肤成纤维细胞和转瓶培养系统为例,考察细胞接种密度、微载体浓度和抗坏血酸磷酸酯盐对微构组织聚团过程和聚团尺寸的影响,通过分析微构组织的聚团过程,借鉴Muhitch和Serra提出的聚团模型^[12,14],建立模拟不同操作参数条件下微构组织聚团过程和聚团尺寸的数学模型,以期认识微构组织聚团过程的特点和规律,实现在大规模制备微构组织过程中对微构组织聚团尺度的预测和调控,满足大尺寸组织构建及将来组织工程产品临床应用的需要。

1 材料与方法

1.1 实验材料

微载体Cytopore购自于Amersham Biosciences, 100 ml和500 ml转瓶为实验室自制。

1.2 皮肤成纤维细胞的分离和培养

将去除皮下组织的包皮剪成1 cm×1 cm的皮片后,用含青霉素(1000 U·ml⁻¹)和链霉素(1000 U·ml⁻¹)的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗3次,加入2.5 g·L⁻¹中性蛋白酶4℃消化18~24 h,分离表皮和真皮。取真皮部分,加入5.0 g·L⁻¹I型胶原酶,于37℃消化3~4 h,收集过滤后的细胞悬液,1000 r·min⁻¹离心5 min后,加入含10%新生牛血清(newborn bovine serum, NBS)的DMEM,置于常规的CO₂培养箱中培养,待细胞生长至80%~90%融合状态时,胰酶消化,按1:3或1:4比例进行传代培养。实验采用6~12代的细胞。

1.3 微构组织制备

采用微载体和转瓶培养系统进行微构组织制备。将400 mg Cytopore微载体在PBS中水化、膨胀,漂洗后转至经硅化后的500 ml转瓶,121℃灭菌,弃PBS,加一定量的DMEM培养基于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中预孵育过夜。弃孵育液,加入200 ml含HF的10%NBS的DMEM培养液,细胞接种密度为 2.0×10^5 cells·ml⁻¹,于培养箱内间歇搅拌(开3 min,停30 min,转速25 r·min⁻¹),贴附8 h后取样,并将转瓶搅拌方式改成连续搅拌(50 r·min⁻¹)。接种后0~4 d不换液,从第4 d起每2 d换液一次。每2 d取样计细胞数,每4 d取样进行微构组织聚团分析和羟脯氨酸的测定。

1.4 Cytopore 浓度对微构组织聚团的影响

将一定浓度 HF 分别加入含 0.50、2.0、4.0 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cytopore 微载体的 3 个 100 ml 转瓶中,使每毫克微载体上的细胞量达 $7.7 \times 10^4 \text{ cells}$ 。培养体积为 50 ml,培养方式同 1.3 节,每 2 d 取样进行微构组织聚团分析。实验重复 3 次,取平均值。

1.5 细胞密度对微构组织聚团的影响

将一定浓度 HF 加入含 2.0 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cytopore 微载体的 3 个 100 ml 转瓶中,使细胞接种密度分别为 1.0×10^5 、 2.0×10^5 、 $4.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。培养体积为 50 ml,培养方式同 1.3 节,每 2 d 取样进行微构组织聚团分析。实验重复 3 次,取平均值。

1.6 抗坏血酸磷酸酯盐对微构组织聚团的影响

在培养基中添加 Vc,使终浓度达 50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对照组未添加 Vc。Cytopore 浓度均为 2.0 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$,接种细胞密度均为 $2.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。培养体积为 50 ml,培养方式同 1.3 节,每 2 d 取样进行微构组织聚团分析。实验重复 3 次,取平均值。

1.7 验证实验

1.7.1 100 ml 转瓶验证实验 将一定浓度 HF 加入含 100 mg Cytopore 微载体的 100 ml 转瓶中,培养体积 50 ml,细胞接种密度为 $3.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$,培养方式同 1.3 节。每 2 d 取样进行微构组织聚团分析。实验重复 3 次,取平均值。

1.7.2 500 ml 转瓶验证实验 将一定浓度 HF 加入含 400 mg Cytopore 微载体的 500 ml 转瓶中,培养体积 200 ml,细胞接种密度为 $2.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。培养方式同 1.3 节。每 4 d 取样进行微构组织聚团分析。实验重复 3 次,取平均值。

1.8 分析检测方法

1.8.1 细胞计数 1.0 ml 样品经 PBS 漂洗后,加入含 0.10 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸的 0.10% 结晶紫染色液至终体积 1.0 ml,37℃ 孵育 5 h,血球计数板计细胞核数量。

1.8.2 等渗结晶紫染色 0.50 ml 样品经 PBS 漂洗后,加入含 0.10% 结晶紫的等渗染色液至终体积 1.0 ml,37℃ 孵育 2~3 h,将样品均匀平铺到培养皿上,在普通光学显微镜下观察微构组织聚团情况。

1.8.3 微构组织聚团分析 在显微镜下随机选取 12~15 个视野,分别计数每一视野下单个微载体数、小聚团物 ($2 \sim 5 \text{ beads} \cdot \text{aggregate}^{-1}$)、中聚

团物 ($6 \sim 15 \text{ beads} \cdot \text{aggregate}^{-1}$) 及大聚团物 ($\geq 16 \text{ beads} \cdot \text{aggregate}^{-1}$),计算各类聚团物所占的百分比;假定各类聚团物的平均聚团大小分别为 1.0、3.5、10.5、30 $\text{beads} \cdot \text{aggregate}^{-1}$,微构组织平均聚团尺寸近似等同于各类聚团物平均聚团大小的加权平均。

1.8.4 羟脯氨酸检测 微构组织中 HF 分泌沉积的胶原以羟脯氨酸量表征。羟脯氨酸则通过碱水解法测试试剂盒(南京建成生物工程公司)测定。

1.9 统计学处理

采用 SPSS13.0 进行统计学分析,所测数据用 $X \pm SD$ 表示。采用单因素方差分析法分析各组间的显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 微构组织的制备和聚团

在微构组织制备过程中,随着培养时间的延长,微构组织的聚团尺寸不断增加(图 1)。培养前 4 d [图 1 (a)] 聚团较少,以单个球为主;4~8 d 时单个球之间的结合开始形成 [图 1 (b)];培养至 12 d,聚团物的尺寸明显增大 [图 1 (c)];此后,由于细胞桥接和胞外基质沉积,聚团物尺寸不断增加并趋于稳定,聚团物中球与球之间的界限逐渐模糊 [图 1 (d)~(f)]。

由图 2 可见,微构组织制备过程中聚团分为 3 个阶段:第一阶段为迟滞期(第 0~8 d),以单个球和小聚团物为主,平均聚团尺寸在 2 $\text{beads} \cdot \text{aggregate}^{-1}$ 左右,说明小聚团物的形成以单个球之间的结合为主;第二阶段为突跃期(第 8~16 d),单个球所占的百分比持续下降,大聚团物迅速形成,平均聚团尺寸呈指数上升,聚团形成方式以单个球与聚团物及聚团物之间的结合为主;第三阶段为稳定期(第 16~24 d),各类聚团物所占的百分比基本不变。此外,随着细胞密度和胶原分泌量增加,微构组织平均聚团尺寸增加,因此,微构组织聚团与细胞生长和胶原分泌沉积密切相关。

2.2 操作条件对微构组织聚团的影响

培养过程中细胞接种密度越大,微构组织进入聚团突跃期和稳定期的时间越早,平均聚团尺寸越大 [图 3 (a)]。当接种密度为 1.0×10^5 、 2.0×10^5 、 $4.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,微构组织进入突跃期的时间分别为第 9、7 和 5 d;进入稳定期的时间分别为第 21、19 和 17 d;最大平均聚团尺寸分别

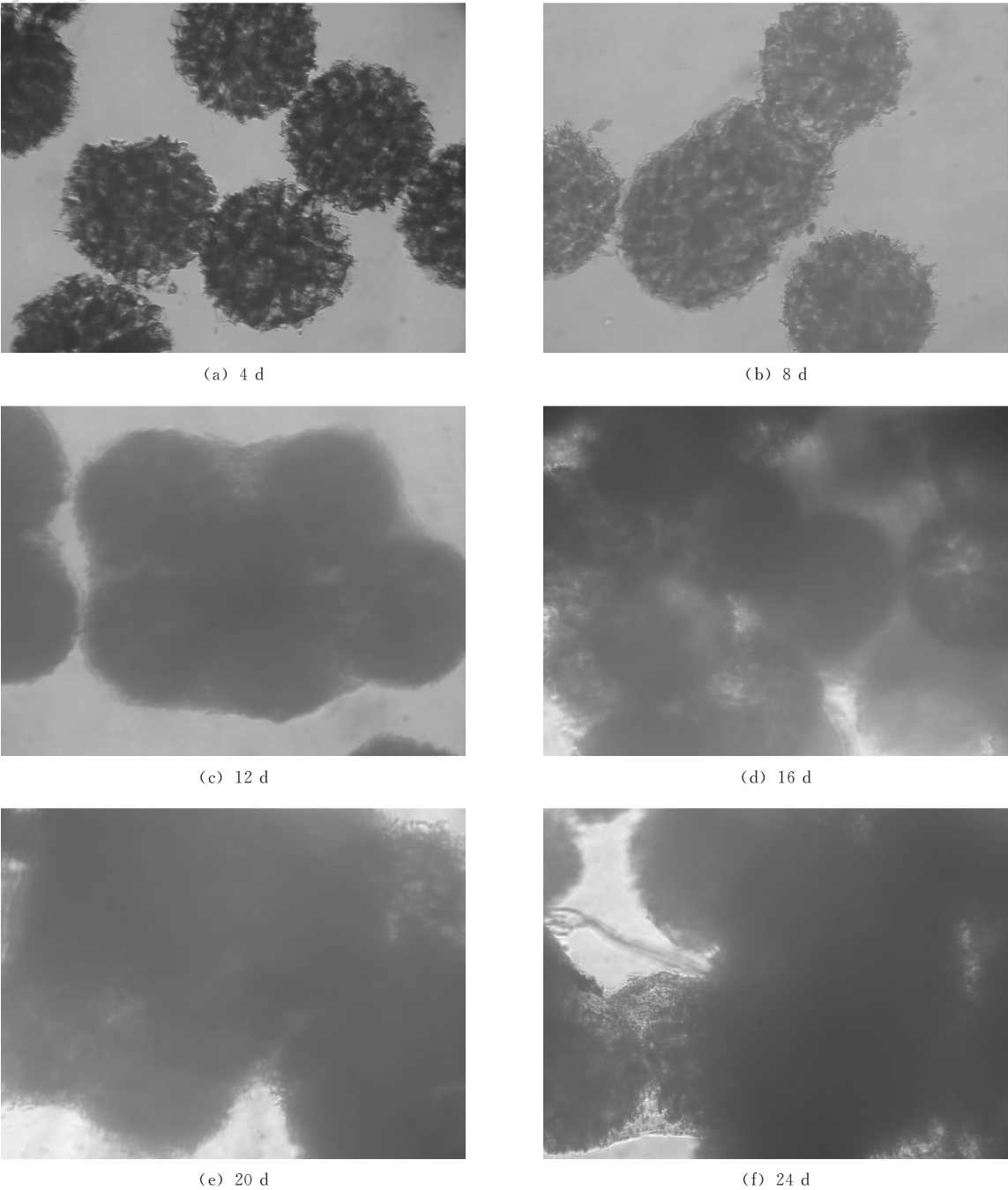


图 1 微构组织聚团的等渗结晶紫染色 (×100)

Fig.1 Micro-tissues stained with crystal violet (×100)

为 (11.66 ± 0.24) 、 (12.72 ± 0.17) 、 (14.61 ± 0.10) beads · aggregate⁻¹，各组间均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

随着微载体浓度的提高，微构组织平均聚团尺寸增大 [图 3 (b)]。当微载体浓度分别为 0.50、2.0、4.0 mg · ml⁻¹ 时，最大平均聚团尺寸分别为 (8.59 ± 0.51) 、 (12.55 ± 0.28) 、 (16.87 ± 1.27) beads · aggregate⁻¹，各组间均有显著性差异 (P

< 0.05)。虽然进入聚团突跃期的时间均为第 9 d，但是随着微载体浓度提高，微构组织进入聚团稳定期的时间延后，当微载体浓度为 4.0 mg · ml⁻¹ 时为第 21 d，微载体浓度为 2.0 mg · ml⁻¹ 时为第 19 d。

加入促胶原合成的 Vc 后，微构组织进入聚团突跃期和稳定期的时间提前，平均聚团尺寸增大，最大平均聚团尺寸为 (17.30 ± 0.03) beads ·

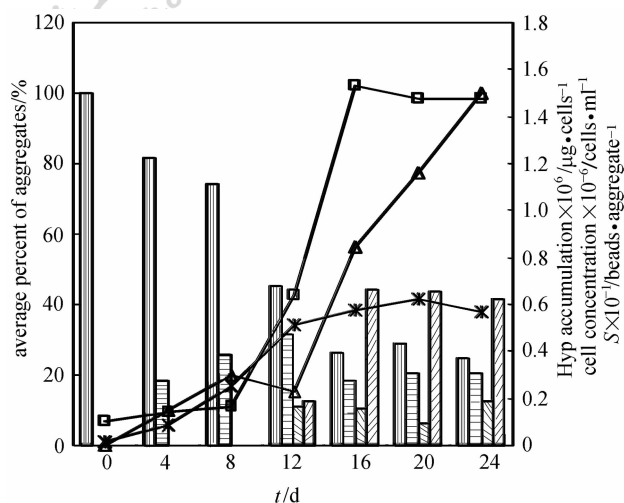


图 2 微构组织聚团、细胞生长和胶原沉积

Fig. 2 Aggregation of micro-tissues, HF cell growth and sedimentation of collagen

□ single microbeads; ■ 2—5 beads·aggregate⁻¹;
 ▨ 6—15 beads·aggregate⁻¹;
 ▩ ≥16 beads·aggregate⁻¹;
 △ Hyp accumulation; * cell concentration;
 □ average size of aggregate

aggregate⁻¹, 而对照组为 (13.35±0.27) beads·aggregate⁻¹ [图 3 (c)], 两者有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 微构组织聚团的数学模型

2.3.1 数学模型推导与求解 在微构组织制备过程中, 将微构组织分成单个球和聚团物, 微构组织平均聚团尺寸可表示为

$$S = \frac{N_0}{N_1 + N_A} = (n_1 + n_A)^{-1} \quad (1)$$

式中 S 为微构组织平均聚团尺寸, beads·aggregate⁻¹; N_1 表示单个球的数量, N_A 表示聚团物的数量, N_0 表示所有微载体的数量。其中

$$n_1 = N_1 / N_0 \quad (2)$$

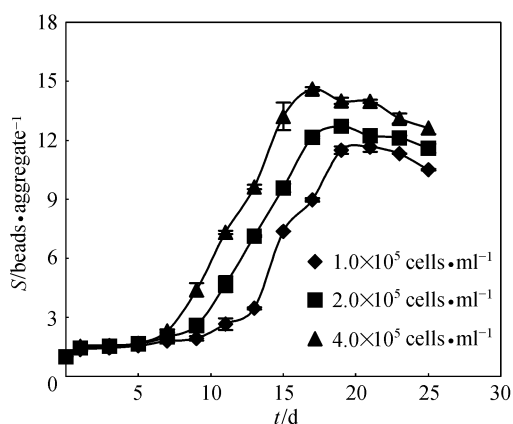
$$n_A = N_A / N_0 \quad (3)$$

假设培养体系中 n_1 的变化是由于单个球之间及单个球与聚团物之间的动态结合而造成的, n_A 的变化是因单个球之间及聚团物之间的结合而导致的, 则 n_1 和 n_A 的变化分别用式 (4) 和式 (5) 表示

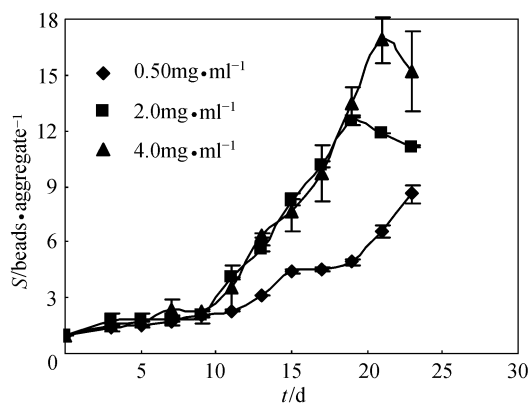
$$\frac{dn_1}{dt} = -2\eta_1 k_{11} n_1^2 - \eta_2 k_{1A} n_1 n_A \quad (4)$$

$$\frac{dn_A}{dt} = \eta_1 k_{11} n_1^2 - \eta_3 k_{AA} n_A^2 \quad (5)$$

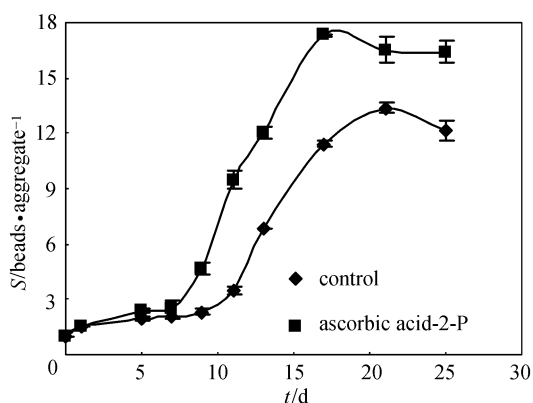
式中 k_{11} 、 k_{1A} 、 k_{AA} 分别表示单个球聚集、单个球



(a) cell seeding density



(b) microcarrier concentration



(c) ascorbic acid-2-P

图 3 操作参数对微构组织聚团的影响

Fig. 3 Effect of operation parameters on aggregation of micro-tissues

与聚团物聚集、聚团物间聚集的动力学常数, d^{-1} ; η_1 、 η_2 、 η_3 分别表示单个球聚集、单个球与聚团物聚集、聚团物间聚集发生的概率。

由图 2 可知, 微构组织聚团过程分为 3 个阶段。在迟滞期 ($0 \sim t_1$), S 在 2 beads·

aggregate⁻¹左右，因此此阶段聚团以单个球之间的结合为主，同时聚团物个数较少，单个球与聚团物及聚团物之间的聚集发生概率较小，因而设定： $\eta_1=1, \eta_2=0, \eta_3=0$ 。式（4）和式（5）可简化为

$$\frac{dn_1}{dt}=-2k_{11}n_1^2$$

(6)

$$\frac{dn_A}{dt}=k_{11}n_1^2$$

(7)

$$n_1=\frac{1}{2k_{11}t+1}$$

(8)

$$n_A=\frac{k_{11}t}{2k_{11}t+1}$$

(9)

代入式（1）得

$$S_1=2-\frac{1}{1+k_{11}t}$$

$(0\leq t\leq t_1)$

(10)

突跃期（ $t_1\sim t_2$ ）中，单个球的比例下降，大聚团物的比例上升，而小聚团物和中聚团物维持在一个相对稳定的水平（图 2）。因此认为，此阶段中 n_1

$$S_2=\frac{[2k_{11}t_1+1+k_{AA}k_{11}t_1(t-t_1)]^{k_{1A}/k_{AA}}}{(2k_{11}t_1+1)^{k_{1A}/k_{AA}-1}+(k_{11}t_1)[2k_{11}t_1+1+k_{AA}k_{11}t_1(t-t_1)]^{k_{1A}/k_{AA}-1}}$$

$(t_1\leq t\leq t_2)$

(15)

对于聚团稳定期（ $t>t_2$ ），各类聚团物所占的比例都保持在一个稳定的水平。由式（4）和式（5）可得

$$\frac{dn_1}{dt}=0$$

(16)

$$\frac{dn_A}{dt}=0$$

(17)

$$S_3=\frac{[2k_{11}t_1+1+k_{AA}k_{11}t_1(t_2-t_1)]^{k_{1A}/k_{AA}}}{(2k_{11}t_1+1)^{k_{1A}/k_{AA}-1}+(k_{11}t_1)[2k_{11}t_1+1+k_{AA}k_{11}t_1(t_2-t_1)]^{k_{1A}/k_{AA}-1}}$$

$(t\geq t_2)$

(20)

由图 3 得到不同操作条件下 t_1 和 t_2 值，通过 Matlab 软件把式（10）、式（15）和式（20）与图 3 中的实验数据进行曲线拟合，得到 k_{11} 、 k_{1A} 和 k_{AA} 值，如表 1 所示。

表 1 不同操作参数下 k_{11} 、 k_{1A} 、 k_{AA} 、 t_1 和 t_2 的值

Table 1 Value of k_{11} , k_{1A} , k_{AA} , t_1 and t_2 under different operation parameters								
$C_0\times 10^{-4}$ /cells·ml ⁻¹	ρ /mg·ml ⁻¹	C_{Vc} /μmol·L ⁻¹	k_{11} /d ⁻¹	k_{1A} /d ⁻¹	k_{AA} /d ⁻¹	t_1 /d	t_2 /d	
10.0	2.0	0	0.40	1.43	0.94	9	21	
20.0	2.0	0	0.61	1.51	1.08	7	19	
40.0	2.0	0	0.63	1.56	1.65	5	17	
3.84	0.5	0	0.35	0.70	0.46	9	—	
15.4	2.0	0	0.53	1.50	1.01	9	19	
30.8	4.0	0	0.82	1.57	1.14	9	21	
20.0	2.0	0	0.60	1.51	1.09	7	19	
20.0	2.0	50.0	1.62	1.87	1.45	5	17	

由表 1 可知，随着细胞接种密度和微载体浓度

的减少主要是由于单个球与聚团物的结合而造成的，故设定 $\eta_1=0, \eta_2=1$ 。由于单个球与聚团物的结合不改变 n_A ，同时忽略单个球间的结合对 n_A 的影响，故 n_A 的减少是由聚团物之间的结合引起，设定 $\eta_1=0, \eta_3=1$ 。式（4）和式（5）可简化为

$$\frac{dn_1}{dt}=-k_{1A}n_1n_A$$

(11)

$$\frac{dn_A}{dt}=-k_{AA}n_A^2$$

(12)

令 $n_1(t_1)=\frac{1}{2k_{11}t_1+1}$ ， $n_A(t_1)=\frac{k_{11}t_1}{2k_{11}t_1+1}$ ，解微分方程得

$$n_A=\frac{k_{11}t_1}{2k_{11}t_1+1+k_{AA}k_{11}t_1(t-t_1)}$$

(13)

$$n_1=\frac{n_A^{k_{1A}/k_{AA}}(2k_{11}t_1+1)^{k_{1A}/k_{AA}-1}}{(k_{11}t_1)^{k_{1A}/k_{AA}}}$$

(14)

代入式（1）得

$$n_A=\frac{k_{11}t_1}{2k_{11}t_1+1+k_{AA}k_{11}t_1(t_2-t_1)}$$

(18)

$$n_1=\frac{n_A^{k_{1A}/k_{AA}}(2k_{11}t_1+1)^{k_{1A}/k_{AA}-1}}{(k_{11}t_1)^{k_{1A}/k_{AA}}}$$

(19)

代入式（1）可得

提高以及 Vc 的添加， k_{11} 、 k_{1A} 和 k_{AA} 随之增大，即单个球之间、单个球与聚团物之间以及聚团物之间的聚团速度加快，可能是由于单个球或聚团物之间的碰撞概率、细胞间桥联形成概率及聚团稳定性增加的结果^[14-18]。同时， t_1 和 t_2 随细胞接种密度的增加及 Vc 的添加而减小，说明聚团进入突跃期和稳定期的时间提前，但 t_2 和 t_1 的差值维持不变，即突跃期的时长不随之改变。此外，在操作参数一定时， $k_{1A}>k_{AA}>k_{11}$ ，表明单个球与聚团物之间的聚合能力最强，单个球之间的聚合能力最弱。考虑到细胞接种密度实质上影响了单位微载体上平均载荷的细胞数，因此， k_{11} 、 k_{1A} 、 k_{AA} 、 t_1 和 t_2 与细胞接种密度、微载体浓度及 Vc 浓度的关系可表示为

$$k_{11}=f_1(C_0/\rho)+g_1(\rho)+h_1(C_{Vc})+C_1$$

(21)

$$k_{1A}=f_2(C_0/\rho)+g_2(\rho)+h_2(C_{Vc})+C_2$$

(22)

$$k_{AA}=f_3(C_0/\rho)+g_3(\rho)+h_3(C_{Vc})+C_3$$

(23)

$$t_1=f_4(C_0/\rho)+g_4(\rho)+h_4(C_{Vc})+C_4$$

(24)

$t_2 = f_5(C_0/\rho) + g_5(\rho) + h_5(C_{Vc}) + C_5$ (25)

式中 C_0/ρ 为单位微载体上的细胞接种密度, $\text{cells} \cdot \text{mg}^{-1}$; $f_n(C_0/\rho)$ ($n=1, 2, 3, 4, 5$) 表示变量为 C_0/ρ 的函数; ρ 为微载体浓度, $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; $g_n(\rho)$ ($n=1, 2, 3, 4, 5$) 表示变量为 ρ 的函数; C_{Vc} 为抗坏血酸磷酸酯盐浓度, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $h_n(C_{Vc})$ ($n=1, 2, 3, 4, 5$) 表示变量为 C_{Vc} 的函数; C_1 、 C_2 、 C_3 是常数, d^{-1} ; C_4 、 C_5 是常数, d 。

通过 Matlab 软件分别拟合 k_{11} 、 k_{1A} 、 k_{AA} 、 t_1 和 t_2 与 C_0 、 ρ 和 C_{Vc} 之间的关系, 得到

$k_{11} = 0.16\ln(C_0/10^4\rho) + 0.32e^{0.24\rho} + 0.02C_{Vc} - 0.32$ (26)

$k_{1A} = 0.09\ln(C_0/10^4\rho) + 0.44\ln\rho + 7.20 \times 10^{-3}C_{Vc} + 0.94$ (27)

$k_{AA} = 0.76e^{0.04(C_0/10^4\rho)} + 0.34\ln\rho + 7.20 \times 10^{-3}C_{Vc} - 0.33$ (28)

$t_1 = -2.93\ln(C_0/10^4\rho) - 0.04C_{Vc} + 13.78$ (29)

$t_2 = -2.93\ln(C_0/10^4\rho) + \rho - 0.04C_{Vc} + 24.09$ (30)

代入式 (10)、式 (15)、式 (20) 得 C_0 、 ρ 和 C_{Vc} 与 S 的关系, 以此计算在不同的操作条件下微构组织的聚团尺寸随时间的变化。

2.3.2 数学模型的验证 在 100 ml 和 500 ml 的转瓶中分别进行微构组织的制备, 考察微构组织的聚团情况, 并根据模型计算 k_{11} 、 k_{1A} 、 k_{AA} 、 t_1 、 t_2 和 S 值, 结果见表 2 和图 4。模型能够很好地反映聚团过程的 3 个阶段, 并预测过程中微构组织尺寸的变化, 模型计算值与实验测量值之间无显著性差异 ($P>0.05$)。在 100 ml 转瓶内, 模拟值与实验值较吻合; 而在 500 ml 转瓶体系中, 在聚团突跃期后期模拟值与实验值之间略有波动。这是因为, 模型模拟的是 100 ml 转瓶中微构组织聚团情况, 同时没有考虑流体运动对聚团的影响。在转速和搅拌桨叶尺寸相同的条件下, 500 ml 转瓶较 100 ml 转瓶的直径增大, 体系中流体的平均流动速度减慢, 造成平均剪切力减小, 剪切力对聚团的破坏作用减小, 聚团尺寸增大^[10,13-14,19]。因此, 在聚团突跃期后期模拟值与实验值相比数值增大。

3 结 论

在成纤维细胞和转瓶培养体系中研究微构组织聚团的特点和操作条件对微构组织聚团的影响, 建立了模拟成纤维细胞接种密度、微载体浓度和 Vc 与微构组织聚团过程及聚团尺寸关系的数学模型,

表 2 操作参数和通过曲线拟合公式得出的验证实验中的各参数值

Table 2 Operation parameters and parameters result from curve fitting equations

V /ml	$C_0 \times 10^{-4}$ /cells · ml ⁻¹	ρ /mg · ml ⁻¹	C_{Vc} /μmol · L ⁻¹	k_{11} /d ⁻¹	k_{1A} /d ⁻¹	k_{AA} /d ⁻¹	t_1 /d	t_2 /d
100	30.0	2.0	0	0.63	1.48	1.33	5.84	18.2
500	20.0	2.0	0	0.57	1.46	1.08	7.03	19.3

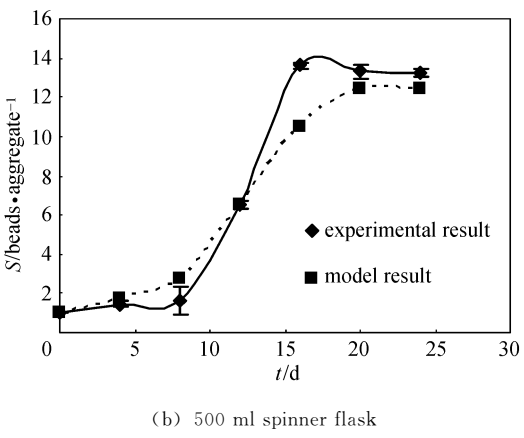
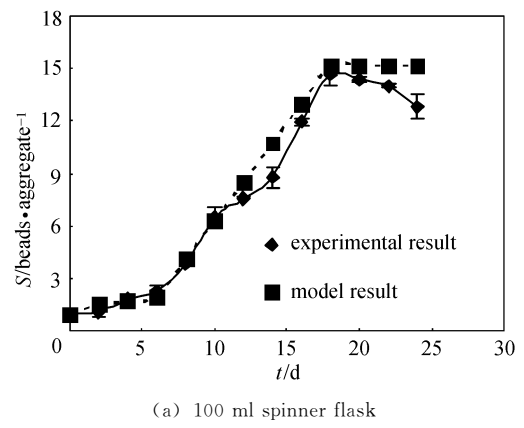


图 4 验证实验获得的聚团尺寸随时间的变化曲线与模型计算值的比较

Fig. 4 Experimental and model results of micro-tissue aggregation

结论如下。

(1) 在微构组织制备过程中, 随着培养时间的延长, 微构组织的聚团尺寸增加, 其聚团过程可分为迟滞期、突跃期和稳定期。

(2) 细胞接种密度、微载体浓度及 Vc 的添加影响微构组织聚团过程和聚团尺寸。随着细胞接种密度增大, 微构组织进入聚团突跃期和稳定期的时间点提早, 平均聚团尺寸增大; 微载体浓度的提高对微构组织进入聚团突跃期的时间影响较小, 平均聚团尺寸增大; 添加 Vc , 有利于聚团的形成, 平

均聚团尺寸增大。

(3) 建立的数学模型能够模拟不同操作条件下微构组织形成的聚团尺寸和进入聚团突跃期及稳定期的时间, 模拟结果与实测值基本相符。

符 号 说 明

C_{vc} —— V_c 浓度, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

C_0 ——细胞接种密度, $\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$

C_1, C_2, C_3 ——常数, d^{-1}

C_4, C_5 ——常数, d

k_{AA} ——聚团物之间聚集的动力学常数, d^{-1}

k_{1A} ——单个球与聚团物聚集的动力学常数, d^{-1}

k_{11} ——单个球聚集的动力学常数, d^{-1}

N_A ——聚团物的数量

N_0 ——所有微载体的数量

N_1 ——单个球的数量

n_A ——所有微载体中聚团物所占的百分比, %

n_1 ——所有微载体中单个球所占的百分比, %

S ——微构组织平均聚团尺寸, $\text{beads} \cdot \text{aggregate}^{-1}$

t ——时间, d

t_1 ——进入聚团突跃期的时间, d

t_2 ——进入聚团稳定期的时间, d

V ——转瓶规格(容积), ml

η_1 ——单个球聚集发生的概率

η_2 ——单个球与聚团物聚集发生的概率

η_3 ——聚团物之间聚集发生的概率

ρ ——微载体浓度, $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

References

- [1] Harrison B S, Eberli D, Lee S J, Atala A, Yoo J J. Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. *Biomaterials*, 2007, **28**: 4628-4634
- [2] Jiang Hua (江华), Tang Qiang (汤强), Zhou Yan (周燕), Tan Wensong (谭文松). Experimental research and CFD modeling of micro-tissue assembly method. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2007, **58** (3): 709-714
- [3] Tang Qiang (汤强), Zhou Yan (周燕), Chen Fei (陈飞), Tan Wensong (谭文松). Preparing engineered tissues *in vitro* by macroporous microcarriers. *Chin. J. Biotech.* (生物工程学报), 2008, **24**: 74-82
- [4] Muschler G F, Nakamoto C, Griffith L G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J. Bone. Joint. Surg. Am.*, 2004, **86**: 1541-1558
- [5] Moyer W A, Steinberg M S. Do rates of intercellular adhesion measure the cell affinities reflected in cell-sorting and tissue-spreading configurations? *Dev. Biol.*, 1976,

52: 246-262

- [6] Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J. Cell. Physiol.*, 2004, **199**: 174-180
- [7] Gigout A, Jolicoeur M, Buschmann M D. Low calcium levels in serum-free media maintain chondrocyte phenotype in monolayer culture and reduce chondrocyte aggregation in suspension culture. *Osteoarthritis. Cartilage.*, 2005, **13**: 1012-1024
- [8] Ng Y C, Berry J M, Butler M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **50**: 627-635
- [9] Fok E Y L, Zandstra P W. Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem Cells*, 2005, **23**: 1333-1342
- [10] Goodwin T J, Prewett T L, Wolf D A. Reduced shear stress: a major component in the ability of mammalian tissues to form three-dimensional assemblies in simulated microgravity. *J. Cell. Biochem.*, 1993, **51**: 301-311
- [11] Melis S, Verduyn M, Storti G, Morbidelli M. Effect of fluid motion on the aggregation of small particles subject to interaction forces. *AIChE J.*, 1999, **45**: 1383-1393
- [12] Muhitch J W, O'Connor K C, Blake D A, Lakes D J, Rosenzweig N, Spaulding G F. Characterization of aggregation and protein expression of bovine corneal endothelial cells as microcarrier cultures in a rotating-wall vessel. *Cytotechnology*, 2000, **32**: 253-263
- [13] Bueno E M, Bilgen B, Carrier R L, Barabino G A. Increased rate of chondrocyte aggregation in a wavy-walled bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, **88**: 767-777
- [14] Serra T, Casamitjana X. Effect of the shear and volume fraction on the aggregation and breakup of particles. *AIChE J.*, 1998, **44**: 1724-1730
- [15] Cherry R S, Papoutsakis E T. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess Eng.*, 1986, **1**: 29-41
- [16] Moreira J L, Cruz P E, Santana P C, Aunins J G. Formation and disruption of animal cell aggregates in stirred vessels: mechanisms and kinetic studies. *Chem. Eng. Sci.*, 1995, **50**: 2747-2764
- [17] Miyauchi S, Furukawa K S, Umez Y, Ozeki Y, Ushida T, Tateishi T. Novel bone graft model using bead-cell sheets composed of tricalcium phosphate beads and bone marrow cells. *Mater. Sci. Eng.*, 2004, **24**: 875-879
- [18] Pula G, Schuh K, Nakayama K, Nakayama K I, Walter U, Poole A W. PKC δ regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood*, 2006, **108**: 4035-4044
- [19] Wu J, Graham L J, Mehidi N N. Estimation of agitator flow shear rate. *AIChE J.*, 2006, **52**: 2323-2332