

doi:10.3969/j.issn.1673-0364.2018.05.003

基于培养基压力控制的组织工程化生物膜动态培养系统的研究

赵艳媛 颜黄苹 陈延平 曾少军 殷皓

【摘要】 目的 研究压力大小可控的培养系统,以实现组织工程化生物膜的动态培养。方法 根据帕斯卡定律的基本原理,设计培养基压力的控制方法,建立由培养皿、蠕动泵、压力控制模块、主控器与检测模块等组成的组织工程化生物膜动态培养系统。结果 该系统可实现培养基于 0.12~19.76 mmHg 压力范围内的控制。结论 该系统为适宜压力范围内的生物膜培养提供所需的压力环境,为组织工程化生物膜动态培养技术提供新思路。

【关键词】 组织工程 生物膜培养 压力控制

【中图分类号】 R318.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-0364(2018)05-0250-04

Tissue Engineered Biofilm Dynamic Culture System Based on Medium Pressure Control ZHAO Yanyuan, YAN Huangping, CHEN Yanping, ZENG Shaojun, YIN Hao. School of Aerospace Engineering, Xiamen University, Xiamen 361102, China. Corresponding author: Yan Huangping (E-mail: hpyan@xmu.edu.cn).

【Abstract】 Objective To investigate the culture system that can control the culture pressure and realize the dynamic culture of tissue engineered biofilm. **Methods** According to the basic principle of Pascal's law, a control method of media pressure is designed, and a tissue engineered biofilm dynamic culture system is established. The system is composed of culture dish, peristaltic pump, pressure control module, main controller and detection module. **Results** This system can realize the pressure control of the culture with a pressure range of 0.12-19.76 mmHg. **Conclusion** This system provides the pressure environment of biofilm in suitable pressure range required for culture. It provides a new method for tissue engineered biofilm dynamic culture technology.

【Key words】 Tissue Engineering; Biofilm Culture; Pressure Control

组织工程技术主要采用细胞和生物材料共同构建与正常组织结构功能相近的复合物来修复缺损^[1]。生物膜的组织工程化研究是当前的热点方向之一。组织工程化生物膜研究的主要是生物体各器官中的膜结构,如组织工程化角膜、组织工程化黏膜、组织工程化滑膜等。

以往的组织工程化生物膜培养技术多为静态培养,由人工操作,易导致构建的组织工程化生物膜被污染。近年来,生物膜动态培养技术的研究不断深入。在组织工程化角膜研究方面,Tsai等^[2]以羊膜为载体,进行角膜上皮组织培养,患者移植后取得了较好的疗效。Fan等^[3]用贴膜培养法与时间梯度连续贴膜法,成功建立人生物膜内皮细胞系。王丹等^[4]用全

生物膜组织培养法成功得到纯度高、产量多的生物膜成纤维细胞。针对组织工程化黏膜的研究中,Rouabhia等^[5]以口腔上皮细胞和成纤维细胞为种子细胞成功构建黏膜,其上皮层分层良好,固有层也有大量的成纤维细胞聚集。Fukahori等^[6]利用组织工程化黏膜成功修复了比格犬的声带黏膜缺损。组织工程小肠黏膜下层已被应用于血管、膀胱壁、腹壁、肌壁及神经等多种组织的缺损修补^[7]。在组织工程化滑膜的研究中,李颖杰等^[8]构建了能模拟滑膜衬里层的多层结构细胞层。王丽平等^[9]采用组织块贴壁法成功分离培养了佐剂性关节炎兔成纤维样滑膜细胞。孙贵才等^[10]的研究证实,组织剪碎不加消化酶人工贴壁培养法进行鼠膝关节滑膜细胞体外培养,能培养出具有最强大活力的细胞。

这些动态培养技术的培养条件难以控制,导致

作者单位:361102 福建省厦门市 厦门大学航空航天学院。

通讯作者:颜黄苹(E-mail:hpyan@xmu.edu.cn)。

生物膜形态、质量难以标准化,且固定条件下培养的生物膜无法满足临床个性化治疗的需求。研究发现,培养皿中培养基的压力与生物膜的培养具有密切联系^[11-15]。陆晓娜等^[14]设计了可为软骨组织提供循环可控动态力学刺激的组织工程培养仪;陶蒙设计开发的仪器可通过旋转培养轴来改变力学环境,以实现角膜的动态培养^[15]。但这些调整压力的方式较为复杂,不易操作,且有污染培养基的可能。因此,我们尝试设计一种组织工程化生物膜动态培养系统,通过控制培养皿中培养基的压力,来为生物膜组织工程培养提供可控的动态力学环境,以适合不同患者对生物膜的需求。

1 培养基压力控制原理

研究表明,力学环境对于组织工程化生物膜的培养有重要影响,一定的力学刺激可促进细胞的增殖与迁移,有利于生物膜组织的修复^[11-15]。

由帕斯卡定律可知,液体中任一点压力为 $F = \rho g V$ (式 1)^[16]。其中, F 为液体中任一点的压力; ρ 为液体密度; g 为重力常数; V 为液体总体积。

在一圆柱形容器中,设两处连通口,进液口 s_0 和出液口 s_1 (图 1)。经推算,该容器中任一点压力为 $F = \rho g h s + \rho g v_0 t (s_0 - s_1)$ (式 2)。其中, h 为容器高度; s 为容器底面积; s_0 为容器进液口截面积; s_1 为容器出液口截面积; v_0 为液体流速; t 为单位时间。

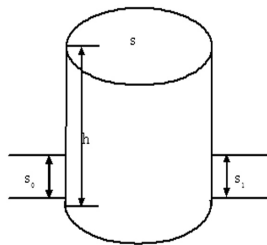


图 1 容器结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of culture dish structure

由式(2)可知,容器内任一点的压力与进液口截面积和出液口截面积之差成正比,控制进液口截面积或出液口截面积即可改变其压力值。因此,本文据此原理设计一种基于培养基压力控制的组织工程化生物膜动态培养系统。

2 基于培养基压力控制的组织工程化生物膜动态培养系统

我们提出的基于培养基压力控制的组织工程化生物膜动态培养系统,主要由培养皿、蠕动泵、压力控制模块、主控器与检测模块等组成(图 2)。组织工

程化生物膜放置于培养皿内,蠕动泵启动后,培养基充满培养皿并在培养过程中不断循环;通过主控器设置生物膜组织培养的时间、培养基压力值,然后系统开始运行,监测模块实时采集培养基的压力值数据,将数据传输至主控器,主控器根据压力值数据进行判断,命令压力控制模块相应地调整培养基的压力值;以上过程循环进行,直至培养结束。

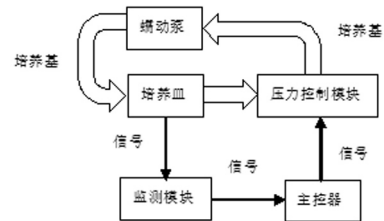
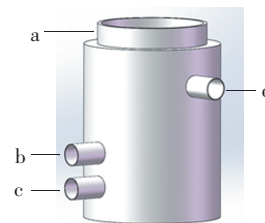


图 2 系统结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of system structure

2.1 培养皿

培养皿作为生物膜组织细胞生长增殖最直接的环境,培养基在此循环,提供细胞生长所需营养。传统的培养皿为圆盘状培养皿或瓶状培养皿^[17-18],固定组织操作不便,培养基不能循环,无法检测培养基压力。因此,本研究设计了一种新型的培养皿(图 3),是空心圆柱形器皿,为培养基存储与循环的主要空间,在培养皿壁上开 3 个通孔,分别作为进液口、出液口及监测口。生物膜组织放置于固定平台,用带有橡胶圈的卡扣式圆环固定,当培养基充满培养皿时便与之接触,并随培养皿内培养基体积的变化鼓起或收缩。监测模块中的压力传感器通过监测口接触培养皿内的培养基,监测其压力值。该培养皿密封性好,操作简单,可有效防止材料污染,便于观察生物膜培养状态及压力检测与控制。



a: 固定平台; b: 监测口; c: 出液口; d: 进液口

a: fixed platform; b: monitoring port; c: liquid outlet; d: liquid inlet

图 3 培养皿结构图

Fig. 3 Setup of culture dish

2.2 蠕动泵与压力控制模块

蠕动泵为驱使培养基流动与循环的装置,培养基被隔离在泵管中,可快速更换泵管与消毒,避免发生污染,并可保持培养基流速。

我们利用压力控制模块,保持培养皿进液口截

面积 s_0 不变,通过改变出液口截面积 s_1 以控制培养皿内培养基压力。其中,液体密度 ρ 与重力加速度 g 为常数。培养基压力控制模块位于培养皿出液口处,用于控制培养基压力。该压力控制模块中使用步进电机驱动两挡板挤压出液口连接软管,改变软管的截面积,即出液口截面积,从而控制培养皿内培养基的压力;而电机的动作由主控器发送至电机驱动器的命令决定。

2.3 主控器与监测模块

生物膜动态培养系统主控器为 STM32F103 单片机,外接触摸屏作为用户操作界面。监测模块使用 SM5852-008 压力传感器,经培养皿检测口与培养基接触获得压力值。可在操作界面设置生物膜组织培养的时间与培养基压力值,控制器根据监测模块传来的数据进行判断,发送指令至压力控制模块,压力控制模块执行相应的操作,以保证生物膜的动态培养。

该培养系统软件部分的主流程为初始化、设置、运行、结束 4 个步骤。系统初始化后,可设置生物膜组织培养的时间、培养基压力值,系统开始运行(图 4),结合(式 3)算法使系统自动运行直至结束。

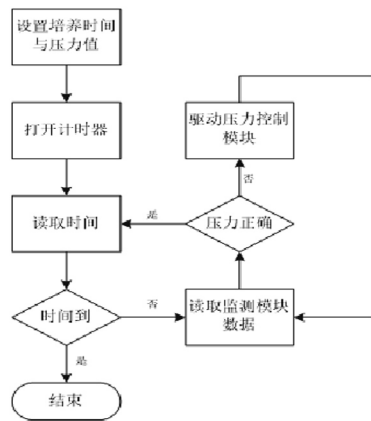


图 4 系统运行程序流程图

Fig. 4 Flow chart of system running program

$$y = 20.18 - \frac{135.48}{1 + e^{\frac{x+21.89}{-11.28}}} \quad (式 3)$$

3 实验与测试

运行该基于培养基压力控制的组织工程化生物膜动态培养系统,主控器驱动压力控制模块逐步改变出液口截面积,检测模块读取相应的培养基压力值,可获得出液口截面积与培养基压力值的关系曲线(图 5)。

重复实验并进行曲线拟合后可得出液口截面积与培养基压力值 S 曲线拟合曲线(图 5),其关系式

即(式 3)。

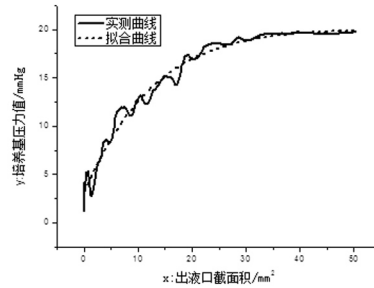


图 5 实测出液口截面积与培养基压力值关系曲线及其 S 曲线拟合曲线

Fig. 5 Relation curve between the output area and the pressure value. Solid line for measured curve and dashed line for S curve fitting curve

在该系统运行过程中,主控器根据设定的压力值通过(式 3)算法可迅速将压力值调整至设定值附近,再通过运行程序流程图细调便可使培养基压力值达到设定值。

结果显示,本研究提出的基于培养基压力控制的组织工程化生物膜动态培养系统,可控制培养基压力范围为 0.12~19.76 mmHg,并可使其保持在某一固定值。一般地,正常眼压为 10~21 mmHg^[19],正常颅内压为 7~11 mmHg^[20],该系统可满足在此压力环境下生物膜的培养要求。

4 结论

本研究提出的基于培养基压力控制的组织工程化生物膜动态培养系统,包括培养皿、蠕动泵、压力控制模块、主控器与检测模块等部分,可实现培养基压力在 0.12~19.76 mmHg 范围内的控制,可提供此压力范围内生物膜培养所需的压力环境。与传统的生物膜培养系统相比,该系统使培养更具可控性,标准化,使培养的生物膜可适应不同患者的需求,有利于进一步的临床治疗与研究。对于该系统的研究,下一步应投入实际的生物膜培养实验,研究生物膜的培养状况,进一步完善该系统。

参考文献

- [1] 曹德君,徐梁,刘伟,等.可吸收生物材料聚羟基乙酸与滑膜细胞共同构建组织工程化腱鞘[J].中国组织工程研究,2007,11(40):8030-8033.
- [2] Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells [J]. N Eng J Med,2000,343(2):86-93.
- [3] Fan T, Zhao J, Ma X, et al. Establishment of a continuous untransfected human corneal endothelial cell line and its biocompatibility to denuded amniotic membrane [J]. Mol Vis,2011,17

(下转第 257 页)

(上接第 252 页)

(54-55):469-480.

- [4] 王丹,张秋华,李彦,等.兔眼角膜成纤维细胞原代培养[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(4):142-143.
- [5] Rouabhia M, Allaire P. Gingival mucosa regeneration in athymic mice using *in vitro* engineered human oral mucosa [J]. Biomaterials, 2010,31(22):5798-5804.
- [6] Fukahori M, Chitose S, Sato K, et al. Regeneration of vocal fold mucosa using tissue-engineered structures with oral mucosal cells [J]. PLoS One, 2016,11(1):e0146-e0151.
- [7] 苏琰,张长青,曾炳芳.小肠粘膜下层修复组织缺损的应用研究[J].国外医学骨学科分册,2004,25(1):43-45.
- [8] 李颖杰.细胞层组织工程模拟构建颞下颌关节滑膜的实验研究[D].武汉:武汉大学,2014.
- [9] 王丽平,刘琴,陈芳,等.佐剂性关节炎模型兔成纤维样滑膜细胞的培养[J].中国组织工程研究,2017,21(12):1872-1876.
- [10] 孙贵才,徐轶尔,谢晶日,等.四种不同处理方法体外培养大鼠滑膜细胞[J].中国组织工程研究,2012,16(7):1193-1196.
- [11] 张春秋,李可,高丽兰,等.软骨组织工程构建中的生物力学[J].力学进展,2018,48:410-437.
- [12] 刁颖敏.组织工程瓣的拉伸试验及力学参数的选取[J].力学季刊,2004,25(1):140-144.

- [13] 李晓娜,王晓君,贺瑞,等.力学刺激对角膜成纤维细胞碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J].医用生物力学,2012,27(1):72-76.
- [14] 陆晓娜,徐奕昊,王欢,等.一种可提供循环可控的动态力学刺激的组织工程动态培养仪[J/CD].中华损伤与修复杂志(电子版), 2017,12(6):421-424.
- [15] 陶蒙.组织工程角膜动态培养及透明度检测仪器开发与实验论证[D].杭州:杭州电子科技大学,2015.
- [16] 曹连民,王忠涛,黄利民,等.基于帕斯卡原理的支架初撑力增压装置[J].煤矿安全,2017,48(1):109-112.
- [17] Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, et al. Optimizing microbiological controls of corneal organ culture media [J]. J Fr Ophtalmol, 2003, 26(8):792-800.
- [18] Schonfelder J, Valtink M, Knels L, et al. Quality assessment of corneal storage media and their components [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2014,252(1):77-82.
- [19] 徐渊,赵炜,杜红俊,等.正常视力人群眼压和角膜中央厚度的关系[J].国际眼科杂志,2007,7(4):1034-1035.
- [20] 张言,刘玉冰,薛彦柏,等.颅内压和颅内温度监护仪研制及实验研究[J].中国医疗器械杂志,2017,41(2):107-109.

(收稿日期:2018年8月25日;修回日期:2018年9月30日)

撤稿声明

本刊于 2017 年第 6 期发表的题为《基质血管片段促进脂肪移植后再血管化的机制研究进展》的综述[第 349~353 页,doi:10.3969/j.issn.1673-0364.2017.06.014,文章编号:1673-0364(2017)06-0349-05],因作者要求,予以撤稿。

本刊编辑部
2018 年 10 月