文章编号:1000-5404(2005)16-1663-04

论著

循环灌注式三维组织培养装置的设计及其性能测试

吕仁发[1],周 强[1],许建中[1],张劲松[1],赖忠良[2],杜合杰[2] ([1]第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆400038;[2]中国电子科技集团公司第四十四研究所,重庆400038)

提 要:目的 一种循环灌注式三维组织培养装置的设计并测试其性能。**方法** 设计、制造一套循环灌注式三维组织培养装置,然后测定其流量、恒温效果、无菌效果并进行工程化组织的初步培养观察。**结果** 循环灌注式三维组织培养装置可提供的循环流量为5.5~87.5 ml/min,流量恒定,培养室内温度可控制在36.5~37.5 ℃,昼夜温差小,系统连续运转7 d培养液中无细菌生长,初步培养结果表明,体外构建的组织工程骨在循环灌注式三维组织培养装置中可获得良好的培养效果。**结论** 循环灌注式三维组织培养装置可用于组织工程研究,也可为临床提供较大量的工程化组织,是一种较为理想的组织工程生物反应器。

关键词:组织工程;组织培养;生物反应器
中图法分类号:R318.6;R329.2 **文献标识码**:A

The design of a circulating-perfusion device for 3D engineered tissue cultured *in vitro* and test for its capability

LU Ren-fa[1], ZHOU Qiang[1], XU Jian-zhong[1], ZHANG Jin-song[1], LAI Zhong-liang[2], DU He-jie[2] ([1]Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, [2]No. 44 Research Institute of Chinese Electrotechnology Company, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a new device for culturing 3D engineered tissue *in vitro* and test its capability. **Methods** A new circulating-perfusion device was designed, and its functions were tested, including the flow rate, homoiothermy, sterility and the preliminary effect for culturing tissue-engineering bone. **Results** This device could provide a circular flow with flow rate ranging from 5.5 ml/min to 87.5 ml/min. Of this device, the temperature was invariable relatively and could be controlled. There were no germ grown in culture medium detected by means of bacteria cultivation. There were lots of refractive spindle cells and matrix in the pore of scaffold when tissue-engineering bone was cultured in this device for 2 weeks. ALP activities were higher than that of the control group at day 10 and 14 in culture ($P<0.05$). **Conclusion** It is an ideal engineering tissue culture device and can be used in laboratory and clinic.

Key words: tissue engineering; tissue culture; bioreactor

研究表明,静态培养的工程化组织存在明显的"空化"现象[1],其主要原因是传质障碍。解决这一问题的主要手段是在培养过程中应用生物反应器来改善传质状况。随着组织工程研究的不断深入,部分组织工程产品已接近临床应用。如何改善工程化组织在体外培养情况下的传质效率以提高工程化组织的质量并且提高产量以满足将来临床应用的需要成为组织工程发展对生物反应器提出的新要求。本课题设计制造了一种新型三维工程化组织培养装置(已获国家发明专利,专利号:ZL 02133402.1),可满足上述要求。

1 材料与方法

1.1 设计原理与结构

新型三维组织培养装置采用立方体柜式机箱,上半部与下半部由隔板隔开,当门关闭时,上半部完全处于密闭状态,利于恒温和保持箱体内清洁。机箱上半部内含小孵箱,小孵箱内置

基金项目:国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003AA205020),重庆市科学技术重点攻关项目(2004-21-3),西南医院科技创新基金资助项目(2002-4)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020), the Sci & Tech Project of Chongqing (2004-21-3) and the Research Foundation for Sci & Tech Innovation of Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002-4)

作者简介:吕仁发(1967-),男,湖北省随州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事骨组织工程方面的研究,现在解放军184医院骨科,鹰潭335000。电话:(023)65399053,E-mail:ytlrf@163.com
通讯作者:周 强,电话:(023)68765283

收稿日期:2005-01-30;**修回日期**:2005-06-24

培养室及氧合器。小孵箱上下为7个蠕动泵。箱体内及小孵箱内各置1紫外灯,可定时开启杀菌。箱体下部为恒温水浴和高压气瓶。机箱外正面上部为控制面板,可控制电机转速、照明、杀菌等。中部为活动门,由有机玻璃制成,便于对孵箱内的情况进行观察。整机共分为3个主要系统,即:循环灌注系统、气体交换系统和恒温系统(图1)。

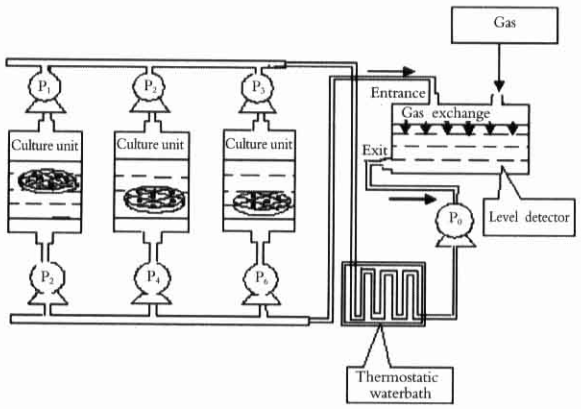


图1 系统结构

Fig 1 Systemic structure

1.1.1 循环灌注系统 该系统由3个培养室、7个蠕动泵和一系列连接管道组成。蠕动泵采用变频调速电机,可在较宽范围内进行速度调节,在规定时间内实现快速制动,且能满足长时间培养的要求。培养液在蠕动泵的驱动下由氧合器出口流出,经过培养室时与组织块进行物质交换,然后出培养室回到氧合器进行气体交换,如此循环往复。培养液循环过程中,泵P_0负责提供总驱动力及控制总流量,室前泵P_1、P_3、P_5与室后泵P_2、P_4、P_6配合分别为各培养室提供驱动力及分流量。

1.1.2 气体交换系统 该系统由氧合器、气体过滤器、气体流量表、高压气瓶和减压阀及连接管道组成。含5% CO_2的压缩空气经减压阀减压、气体过滤器过滤后进入氧合器与培养液进行气体交换,交换后的气体再经另一气体过滤器过滤后排出。

1.1.3 恒温系统 该系统由可调式恒温水浴及在其中绕行的循环管道组成。恒温水浴使用电加热和制冷系统,具有较高的工作效率和灵敏度,水浴中水温的波动范围在±0.1 ℃。培养液流经水浴中的循环管道时被加热或冷却,从而达到恒温目的。

1.2 系统性能测定

1.2.1 流量测定 分别测定每个蠕动泵在不同转速时10 min的总流量Q,然后由下列公式可得不同转速时的平均流量($\bar{Q}$)(ml/min):

$$\bar{Q}=\frac{Q}{10}$$

1.2.2 培养室内温度测定 在系统正常运转条件下,设定不同温度时,每日8:00,14:00,22:00分别用温度计测定培养室内温度,以观察恒温效果及温控情况。

1.2.3 细菌学检测 生物反应器置于无菌层流间中,在无菌条件下装配系统,氧合器中加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基400 ml,连续运转7 d,每天抽取10 ml培养液加入到BacT/ALERT SA血培养瓶(BioMerieux Inc, USA)中作细菌培养。

1.3 组织工程骨的初步培养观察

1.3.1 倒置显微镜观察 参照Stute等[2]的方法分离、扩增成年健康志愿者骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。取第3代MSC_s加入诱导培养液诱导培养5 d。消化收集已经诱导5 d的第3代细胞,以1×10^7/ml密度接种到脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)支架上,4 h后将构建的工程化组织块分成两组,实验组放入三维培养装置的培养室中,在氧合器中注入约400 ml诱导培养液,启动培养装置,在转速6 r/min,温度为37 ℃条件下进行组织培养,每5天半量更换培养液。对照组放入6孔板中放入CO_2孵箱中按常规方法培养,隔天更换培养液。分别在不同时相点取组织块进行倒置显微镜观察和碱性磷酸酶活性测定。

1.3.2 碱性磷酸酶活性测定 分别在接种后第5、7、10、14天各取4块工程化组织并分别放入10 ml离心管中,加入司徒镇强等[3]介绍的骨细胞消化液1 ml,置于37 ℃水浴中消化6 h,其间间隙性振摇使组织块完全被消化。将消化完全的混合液置于冰浴中,再用超声细胞破碎机处理5次,6 s/次,共30 s。然后1 000 r/min离心5 min,取上清液待用。按碱性磷酸酶试剂盒介绍的方法,取上述细胞裂解液50 μl按步骤加入a,b,c试剂,最后在紫外分光光度计下测定光吸收值A值。最后根据公式算出碱性磷酸酶比活性。

$$\text{碱性磷酸酶}\ (\text{金氏单位}/100\ \text{ml})=\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}}\times\frac{\text{标准管含酚的量}}{(0.1\times0.05\ \text{mg})}\times\frac{100\ \text{ml}}{0.05\ \text{ml}}$$

1.4 统计学方法

实验所得数据以$\bar{x}\pm s$表示,运用SPSS 10.0软件进行t检验。

2 结果

2.1 液体流量

每个蠕动泵在不同转速时的流量见表1。蠕动泵最大转速为100 r/min,流量(87.5±1.03) ml/min;最小转速为6 r/min,流量(5.5±0.09) ml/min。

表1 每个蠕动泵在不同转速时的流量[ml/min, ($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 1 The flow rate of each pump at different speed [ml/min, ($\bar{x}\pm s$)%]

	n	Rotation speed(r/min)						
		6	10	20	40	60	80	100
Flow	4	5.5±0.09	8±0.21	14±0.15	29±0.07	55±0.36	80±0.26	87.5±1.03

根据Goldstein等[4]提供的公式

$V_m=Q/\Phi\pi(D/2)^2$

$\tau_w=8\mu V_m/d$

(V_m:流体通过支架材料孔隙时的流速;Q:通过每个培养室的流量;Φ:支架材料的孔隙率;D:培养室直径;μ:流体粘度;d:支架材料孔径;τ_w:流体剪切力)

本系统在用脱钙骨基质作支架(Φ=70%;d=0.025 cm)、

含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 作培养液（$\mu = 0.89$）时所产生的剪切应力为 2.92 ~ 47.3 dyne/cm^2。

2.2　培养室内温度

当设定温度为 37 ℃时，培养室内温度波动范围在 36.4 ~ 37.5 ℃之间（表 2）。且当改变设定温度时，培养室内温度也随之发生相应改变，达到新的稳定温度的时间与流量有关，平均约 0.5 ~ 1 h。温度相对恒定，昼夜温差小（表 3）。

表 2　设定温度为 37 ℃时不同时间培养室内温度变化情况（℃，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Temperature changes of culture units at setting temperature 37 ℃（℃，$\bar{x} \pm s$）

Day	Time		
	08:00	14:00	22:00
1	36.9	37.4	36.8
2	36.7	37.1	36.9
3	36.4	37.5	36.5
4	37.1	37.5	37.2
5	37.1	36.9	36.8
6	36.5	37.3	36.5
7	36.8	37.4	36.7
Mean	36.8 ± 0.27	37.3 ± 0.22	36.77 ± 0.24

表 3　培养室内温度随设定温度变化情况（℃，$\bar{x} \pm s$）

Tab 3　Temperature changes in culture unit with setting temperature

	n	Setting temperature（℃）		
		35	37	39
Culture unit temperature	7	34.7 ± 0.29	36.95 ± 0.34	39.2 ± 0.30

2.3　无菌性能

培养液连续 7 d 培养无细菌生长。

2.4　组织工程骨的培养观察

体外构建的组织工程骨块在三维组织培养系统中培养 7 d 后取出进行倒置显微镜下观察，可见细胞在支架上生长良好，支架孔隙中见大量新生物形成（图 2）。表明培养系统所提供的培养环境适合细胞在支架中的定植和细胞外基质的驻留。

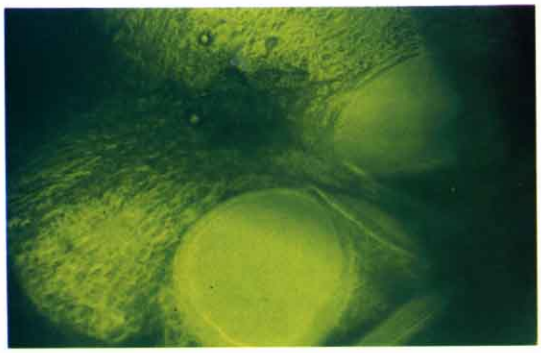


图 2　组织工程骨块在三维组织培养系统中培养 1 周时，支架孔隙中可见大量梭形细胞和基质构成的新生物　（倒置显微镜 ×100）

Fig 2　Tissue-engineering bone cultured in 3D tissue culture system for 1 week showed lots of refractive spindle cells and matrix in the pores of scaffold　（Invert microscope ×100）

2.5　组织工程骨的碱性磷酸酶（ALP）活性

分别在接种后 5、7、10、14 d 测定组织工程骨块的 ALP 活性（表 4）。从培养第 7 天开始在工程化组织培养系统中培养的组织块的 ALP 活性明显高于静态培养组（$P < 0.05$）。

表 4　两种培养条件下不同时期的 ALP 活性（$\bar{x} \pm s$）

Tab 4　ALP activity of MSCs-DBM complex cutured in different condition at different time

Group	n	Days in culture			
		5	7	10	14
Experimental group	4	6.22 ± 0.26	10.47 ± 0.43	17.60 ± 1.13	19.44 ± 1.14
Control group	4	7.32 ± 0.12	9.12 ± 0.04	9.61 ± 0.02	10.15 ± 0.082
t		−7.705	6.24	14.15	16.186
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3　讨论

目前已投入使用的生物反应器主要有搅拌瓶式、膜式、旋转壁式和灌注式等几种，其中膜式生物反应器主要用于细胞培养，搅拌瓶式生物反应器由于在搅拌过程中产生了不利于细胞的、过大的剪切应力，因而很少应用。旋转壁式生物反应器克服了剪切应力的不利影响，但组织块的大小却受到限制，直径大于 1 cm 的组织块难于在反应器中悬浮[5,6]。灌注式生物反应器通过泵加压的方式使培养液直接经组织块中央通过，大大提高了传质效率，因而是目前最为常用的一种生物反应器。本系统采用最先进的灌注式传质方式，不仅使传质效率得到提高，而且极大地减小了流体剪切应力。从组织工程骨的培养结果看，本系统在传质效率、流体剪切应力、细胞和基质的留驻 3 个相互矛盾的方面实现了较好的平衡。

流体剪切力对于细胞的作用具有双重性：大的剪切力对细胞具有破坏作用，而较小的剪切力对细胞生长及功能表达具有促进作用[7,8]。Botchwey 等[9]在研究成骨细胞对剪切应力的反应时发现剪切力在 3.9 dyne/cm^{2}时，种子细胞容易与微载体贴附，并且维持成骨细胞在体外的表型，明显增加碱性磷酸酶的表达。本系统在用脱钙骨基质作支架、含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 作培养液，在不同流量时所产生的剪切应力为 2.92 ~ 47.3 dyne/cm^2。使用者在运用不同的支架材料和不同的培养液来培养不同的组织细胞时可根据需要对系统的工作参数进行调整。

本设计三维组织培养系统经连续 7 d 试运行，流量、温度等均可随意精确控制，机械性能稳定，未出现任何异常情况。细菌学检测的结果表明在严格无菌操作和遵守本培养系统操作规程的前提下使用本系统是安全的。同时，本系统共设 3 个培养室，可根据需要选择使用。最多

可一次培养出约150 cm^3组织,因而既可供实验室研究之用,也可为临床提供较大量的工程化组织。

参考文献:

[1] Fuchs J R, Pomerantseva I, Ochoa E R, *et al*. Fetal tissue engineering: *in vitro* analysis of muscle constructs[J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(9): 1348-1353.

[2] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, *et al*. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use[J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1212-1225.

[3] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版西安公司, 2004. 161-162.

[4] Goldstein A S, Juarez T M, Helmke C D, *et al*. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds[J]. Biomaterials, 2001, 22(11): 1279-1288.

[5] Radin S, Ducheyne P, Ayyaswamy P S, *et al*. Surface transformation of bioactive glass in bioreactors simulating microgravity conditions. Part I: experimental study[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 75(3): 369-378.

[6] Gao H, Ayyaswamy P S, Ducheyne P, *et al*. Surface transformation of bioactive glass in bioreactors simulating microgravity conditions. Part II: numerical simulations[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 75(3): 379-385.

[7] 谭文松,戴干策,陈宏志, 等. 生物反应器中杂交瘤细胞的物理破损[J]. 华东理工大学学报, 1996, 22(3):276-282.

[8] Saini S, Wick T M. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(2): 510-521.

[9] Botchwey E A, Pollack S R, Levine E M, *et al*. Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system[J]. J Biomed Mater Res, 2001, 55(2): 242-253.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)16-1666-01

手助腹腔镜脾切除门奇静脉断流术22例报告

Hand-assisted laparoscopic splenectomy with Porta-azygos disconnection: a report of 22 cases

王细文,梁 平,李洪艳 (第三军医大学新桥医院普通外科,重庆 400037)

自腹腔镜脾切除术(laparoscopic splenectomy, LS)应用于临床以来,以其手术损伤小、痛苦轻和恢复快,很快引起临床医生的注意。但是由于LS操作难度大和手术器械要求较高,故还没有在临床普遍应用。手助腹腔镜手术(hand-assisted laparoscopic surgery, HALS)是近年兴起的一种新型腹腔镜手术方式[1,2]。2001年11月以来我们进行了手助腹腔镜脾切除门奇静脉断流术22例均获得成功。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组22例病人,男15例,女7例。年龄28~72岁,平均48.6岁。均为肝硬化并食道胃底静脉曲张破裂出血及脾亢。共出血37次。肝功能Child A级10例,B级12例。8例术前无腹水,14例术前有中等腹水,经治疗后2例无术前腹水,12例仍有少量腹水。术前CT均提示肝硬化影像。脾脏肿大,B超提示脾脏轻度肿大3例,中度肿大8例,巨脾(长径大于20 cm)11例。血小板计数$(4\sim64)\times10^9$/L,平均3.37×10^9/L。

1.2 术前准备

术前护肝治疗1~2周,纠正低白蛋白至35 g/L以上。消除腹水。静脉注射Vit K。

1.3 手术操作步骤

患者头高足低,手术操作时,左季肋区垫高,向右侧斜位30°,必要时改为右侧卧位,腹腔镜套管位于脐左上缘,首先于脐左上缘穿刺建立气腹,穿孔置入30°腹腔镜,探查腹腔。于左侧腋中线、肋缘下3~5 cm置入12 mm套管,作超声刀操作孔。然后经剑突下上腹正中作6 cm长切口,逐层切开进入腹腔,该切口作Handport手助装置安装位置。术者左手套上Handport的袖套后开始HALS手术。首先在伸入腹腔的左手协助下,用超声刀切割分离脾结肠、脾膈、脾胃等韧带,最后显露脾门,用手指将脾门血管周围的粘连组织分离。至此将脾脏完全游离。从左肋下12 mm套管中置入直线切割缝合器(美国强生公司EndoGIA),根据脾蒂情况选用合适长度的直线切割缝合器,夹闭脾蒂血管,击发后离断脾蒂。如有脾蒂残端小出血点可用钛夹夹闭。超声止血刀分离切割胃底后的血管至贲门处食道。将塑料袋从手助装置切口置入腹腔,将脾脏置入袋中。将脾脏挤压成碎片后从手助切口取出。

取脾后从手助切口直视下利用超声止血刀分离切割胃小弯区小网膜曲张的血管,至胃左动静脉处,用直线切割缝合器将胃左动静脉闭合切断;再用超声止血刀切割胃左动脉以上的血管,包括高位食管支静脉,至此门奇静脉断流结束。

检查无渗血后冲洗腹腔,吸净腹腔积液。经左肋下穿刺孔

(下转1673页)

作者简介:王细文(1964-),男,湖北省鄂州市人,博士,副教授,主要从事胆管癌的生物学治疗方面的研究。电话:(023)68755232

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2004-12-27