

生物反应器在构建组织工程产品中的应用研究

林 梅

(天津医药科学研究所,天津 300020)

[摘要] 目的:通过对4种生物反应器的介绍,分析不同生物反应器在细胞培养中的作用与用途。方法:观察不同生物反应器对细胞进行培养的结果。结果:不同类型的生物反应器及其机械性能、传质以及流体剪应力等对细胞培养组织的形态和功能产生的影响不同。结论:旋转壁式生物反应器更接近于三维悬浮生长和生物体的内部环境。将来的生物反应器将是集培养、控制、研究、生产于一体的智能化系统生命机器,也是生物反应器发展的最终目标。

[关键词] 组织工程;细胞培养;组织培养;生物反应器

[中图分类号] Q813.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-8868(2008)04-0032-03

Application and Research of Bioreactor in Developing Products of Tissue Engineering

LIN Mei

(Tianjin Graduate School of Medicine Science, Tianjin 300020, China)

Abstract Objective To analyze the effects and applications of 4 kinds of bioreactors on cell culture. **Methods** The results of different bioreactors for cell culture were observed. **Results** The bioreactors with different mechanical properties, mass transfer and fluid shear stress had different impacts on morphological and functional organizations. **Conclusion** Rotating bioreactor is more suitable for three-dimensional suspension growth and similar to organisms internal environment than the others. It is indicated that bioreactors will be integrated intelligent devices including culture, control, research, and production in the future. [Chinese Medical Equipment Journal, 2008, 29(4): 32-34]

Key words tissue engineering; cell culture; tissue culture; bioreactor

1 引言

组织工程学是研究开发能够修复、维持或改善损伤组织功能生物替代物的一门学科,是材料科学和移植技术领域发展的必然结果。其研究的关键是应用细胞生物学和工程学的原理及方法开发出具有生物活性的人工替代物,用于维持或恢复人体组织。种子细胞、支架材料和组织构建是组织工程的3大要素,其中种子细胞制取、培养、种植是研究的关键性步骤,因此研制出用于组织培养的生物反应器就成了组织工程的一个重要课题。由于只有在稳定的、与生物体内相似的体外环境中才有可能使培养的细胞或组织正常生长,才有可能得到与天然生物组织相似的体外人工组织,为解决人类组织及器官的再生提供可能,组织工程的出现为医学研究和发展开辟了新的领域。近几十年来,由于生物工程和组织工程学的发展,相应的生物反应器水平也在不断提高,用于构建组织工程产品的生物反应器已经愈发接近生物体内环境的培养条件,有利地支持了这些学科的研究。现已研制出多种不同用途、型号的生物反应器,其性能也在日趋完善。

2 生物反应器

根据组织培养的性质和用途,生物反应器的设计与应用有如下几种,其主要性能对比见表1。

2.1 膜式生物反应器

膜式生物反应器的主要原理是通过一个起传质作用的透析性膜进行气体交换。目前用于组织培养旋转式生物反

表1 4种生物反应器主要性能对比

种类	剪切力	传质能力	操作性 可控性	动物细胞可 培养性	组织的可 培养性	可提供的 培养方式	培养规模
膜式生物反应器	小	中等	较好	较强	强	贴壁、悬浮、微载体、三维支架材料、中空纤维管	一般
机械搅拌式生物反应器	大	强	差	一般	较差	贴壁、悬浮、微载体	大
气升式生物反应器	较大	强	差	一般	强	贴壁、悬浮、微载体	较大
旋转壁式生物反应器	很小	弱	好	强	强	悬浮、微载体、三维支架材料	小

器都是通过膜来进行气体交换的,这也说明膜反应器在组织工程领域中广泛的应用前景。它的优点是:气液交换分开,避免了反应器内气泡和流体剪应力的产生;细胞或组织留在反应器内,反应器连续灌注;采用膜包埋技术,这是比较温和的一种方法,对于培养容易受到剪应力破坏的动物细胞是很合适的。它的缺点在于膜的通透性,由于动物细胞对氧浓度要求不高,在反应器中大部分采用膜自由扩散式传质方式。但在高浓度培养时,膜供氧方式就不太合适。因此,膜式生物反应器较适合容易受到剪应力破坏的动物细胞的培养。Eftymion 和 Shuler^[1]研制的膜反应器,利用周期性截流的方式,使细胞交替与培养基和空气接触。这种技术将培养液内部对流和直接与空气相接触的优点相结合,从根本上消除了气液两相营养的传质限制。因此在膜生物反应器中,用脉冲流形成对流传递是一种重要和广泛的研究方法,也是目前膜反应器的研究重点。

2.2 机械搅拌式生物反应器

机械搅拌式生物反应器的主要原理是通过叶轮或搅拌器转动培养液,从而提高传质能力。它的优点是:确保了细胞培

收稿日期:2007-09-18 修回日期:2008-01-08

作者简介:林梅(1958-),女,浙江温州人,工程师,主要从事医疗分析仪器的管理与维修、细胞培养箱的动态培养方式方面的研究工作。

养的氧浓度和培养液养分的均衡。其缺点是:由于搅拌器转动产生的剪应力很大,易产生气泡,因此不适用于组织工程中细胞培养和组织培养。机械搅拌式生物反应器广泛应用于发酵工业和酶工业。Sheil 等^[2]人采用“双屏、提升式搅拌器”研制出美国的单层笼式通气搅拌器。徐小增等^[2]为搅拌器罩上一个带夹套的筒体,从而使培养液流动更平稳和规律。采用微孔透气器渗透供氧系统以及 Kamen 等^[3]人的带状螺旋桨,分别从通气装置和搅拌器方面进行了改进,克服了剪应力过大,易产生气泡等不利因素,使细胞培养取得了较好的效果。这也是机械搅拌式生物反应器目前研究的发展方向。

2.3 气升式生物反应器

气升式生物反应器的主要原理是在反应器底部设置一个气体喷嘴,从外部通入的空气或氧气以气泡形式从下部上升,在上升过程中达到气体交换的目的。它的优点是:有较好的传热、传质和混合特性,培养液的浓度也比较均匀,工作状况柔和,操作简单。其缺点是:操作弹性小,在低流速,特别是反应器高、反应器直径大、高密度微载体培养时,混合性能不佳。气升式生物反应器广泛适用于动植物细胞的培养研究和生产。Sucher 等采用加入慢速叶轮搅拌等手段,在一定程度上解决了低流速,特别是 $H/($ 反应器高度 $)/D$ (反应器直径)大、高密度微载体培养时混合性能不佳这一问题。欧阳平凯等^[4]改用分段气升管,更有利于氧的利用和培养液的混合。气流上升为微载体和组织块提供悬浮培养的可能,因此,气升式反应器将有可能取代目前广泛采用的生物体内移植方式进行组织培养。

2.4 旋转壁式生物反应器

旋转细胞培养系统(Rotating Cell Culture System, RCCS)是具有代表性的一种微重力反应器。它的原理是:培养液及培养物共处于2个同轴的内外圆筒之间,在步进电动机带动下一起绕水平轴作旋转运动;内、外圆筒可同时同向或反向旋转,转速既可相同也可不同;也可以选择内筒或外筒旋转时同时外筒或内筒固定,根据具体要求确定圆筒的旋转方式。圆筒刚开始转速较慢,随着培养体积的增大可动态的增加转速以抵抗细胞的沉降。内筒壁采用透气不透液的多孔疏水性半透膜,以提供 O_2 排出 CO_2 。这是一种由无气泡膜式扩散进行气体交换的水平式旋转细胞培养系统。反应器在动力系统的带动下,容器内培养液和培养物沿水平旋转,充满液体的圆柱形悬浮培养容器提供模拟微重力环境,具有高效、三维结构和独特的流体力学特点。它的优点是:绕水平轴旋转的旋转壁式生物反应器更接近于三维悬浮生长以及生物体内环境。由于反应器中流体随容器一起旋转,相互之间无相互运动,因此其剪应力趋近于0。旋转壁式生物反应器还具有使代谢产物及营养物质均匀分布的优点,可将破坏性应力降至最低,与此同时,该系统还能够提供强大、有意义、同属一个时期的生物信息,通过对这些生物信息(细胞与细胞之间、大分子之间的相互作用、细胞产物的动态分泌和表达等)的检测、观察和分析,有助于加深对细胞组织形成过程的深入理解。

总之,旋转壁式生物反应器具有微重力环境、低剪应力、高效物质传递、零顶空间等优点^[5-9]。在 RCCS 提供的模拟微

重力环境中,低剪应力、高效物质交换的条件下培养出的细胞在保持完整的信号传导和组织特异性代谢途径方面具有明显优势,所培养的细胞功能更接近于自然,为移植组织替代物的研究提供可能,从而获得用于移植的供体器官;还可用于细胞毒理学反应、放射生物学、肿瘤生成、胚胎形成的研究,以及生产抗体、干扰素和激素等许多生物制品^[10-14]。旋转壁式生物反应器的缺点是:难以在工业上放大,并且很少能在线供液。在实际操作中总有一些因素相互制约:传质效果需要加快转速使气液充分混合,但转速又受抵抗细胞沉降不与内外壁碰撞以及动物细胞脆弱性的限制;较高的溶氧度需要提高相应的氧分压,过高的氧分压又会导致抑制代谢物的移出和气泡的产生,同时也影响细胞的正常生长。

旋转壁式生物反应器是美国航空航天局为在地面上模拟微重力条件下细胞的生长而开发出的一种新型细胞及组织培养装置^[15-19],可作为细胞工程和组织工程实验室较为理想的生物反应器,是目前世界贴壁和悬浮细胞培养的最新装置,也是组织工程领域中应用最广泛的一种。理想的低剪应力为高密度培养细胞、大体积的组织等提供了必要的条件。陶祖莱在此基础上设计的在线供气供液空心旋转圆盘式生物反应器比较具有代表性,它克服了此类反应器只能在线供气而不能在线供液的不足。Kleis^[17]等研制了绕垂直轴旋转的生物反应器。宋克东^[18]等研制出一种新型旋转壁式生物反应器,其优点是:反应器中支架材料被固定在培养室的外壁上,在培养的过程中所需三维构建的骨组织与内外壁筒壁均不发生碰撞,可以有效地提高营养物质的传递效率,提高溶解氧的效率。

3 展望

组织工程化生物反应器研究和发展的最终目的是实现自动控制模拟体内环境的体外环境和细胞生长的生物过程,实现生命组织特征及生命机器。因此,在包括皮肤、骨骼、血管及肝脏等缺损或失去功能的组织、器官的修复领域中有非常广阔的应用前景。随着组织工程学的发展,组织培养生物反应器也将得到逐步的完善,并向着自动化、多功能化、高效率 and 多样化发展。生物反应器内环境必须更接近于生物体内环境,这就要求对生物反应器内部温度、pH 值及气体分压等参数要进行精确的控制。因此,要针对多种物理因素(磁场、电场、应力场等)对组织细胞的影响进行研究,生物反应器也必须开发出新的附加装置以适应这些要求。如秦廷武和杨志明研制的复合三维细胞培养装置中就添加了可产生磁场的电磁线圈这种附加装置。不同细胞的生存环境不同,反应器应根据细胞的生长特点进行设计。如悬浮细胞不需要支架,贴壁细胞需要支架;有的细胞需要力,有的则不需要;有的需要脉动力,而有的需要恒力。力可分为拉力、压力和剪应力,因此,反应器发展的趋势应该是设计出专用反应器或形成某个系列,配置相应的附件,不同细胞只需更换相应的部件即可。目前,组织工程正迅速地向着产业化迈进。在美国,目前已形成价值 40 亿美元的产业,并以每年 25% 的速度递增,培育出的骨骼、软骨、血管、皮肤以及神经组织正在应用于体内实验。将来的生物反应器将是集培养、控制、研究、生产于一体的智能化系统生命机器,这也是生物反应器发展的最终目标。

[参考文献]

- [1] Efthymiou G S, Shuler M L. Elimination of diffusional limitation in a membrane entrapped cell reactor [J]. *Biotechnol and Bioeng*, 1999, (62): 183-192.
- [2] 王斯靖, 陈因良, 俞俊裳. CellCul-20A 反应器的丝间液体交换速率及氧传递模型 [J]. *生物工程学报*, 1993, 9(4): 372-378.
- [3] Kamen A A, Charaie C, Andre G, *et al.* design parameters and performance of a surface baffled helical ribbon impeller bioreactor for the culture of shear sensitive cells [J]. *Chemical Engineering Science*, 1992, 47(9): 2 375-2 380.
- [4] 欧阳平凯, 陆永明, 肖民耕, 等. 气升式生物反应器的混合性能研究 [J]. *生物工程进展*, 1992, 12(5): 9-13.
- [5] Hammond T G, Hammond J M. Optimized suspension culture the rotating-wall vessel [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, (218): 12-25.
- [6] Mitteregger R, Vogt G, Rossmann E, *et al.* Rotary cell culture system (RCCS): a new method for cultivating hepatocytes on micro-carriers [J]. *Int J Artif Organs* 1999, 22(12): 816-822.
- [7] Unsworth B R, Lelkes P I. Growing tissues in microgravity [J]. *Nat Med*, 1998(4): 901-907.
- [8] Khaoustov V L, Darlington G J, Soriano H E, *et al.* Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35(9): 501-509.
- [9] Khaoustov V I, Rysin D, Pellis N R, *et al.* Microarray analysis of genes differentially expressed in HepG2 cells cultured in simulated microgravity: preliminary report [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, 37(2): 84-88.
- [10] Unsworth B R, Lelkes P I. Growing tissues in microgravity [J]. *Nat Med*, 1998, (4): 901-907.
- [11] Khaoustov V L, Darlington G J, Soriano H E, *et al.* Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35(9): 501-509.
- [12] Ingram M, Techy G B, Saroufeem R, *et al.* Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, 33(6): 459-466.
- [13] Licato L L, Prieto V G, Grimm E A. A novel preclinical model of human malignant melanoma utilizing bioreactor rotating-wall vessels [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, 37(3): 121-126.
- [14] Dabos K J, Nelson L J, Bradnock T J, *et al.* The simulated microgravity environment maintains key metabolic functions and promotes aggregation of primary porcine hepatocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, (2): 119-130.
- [15] Schwarz R P, Goodwin T J, Wolf D A. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels; an application of simulated microgravity [J]. *J Tissue Cult Method*, 1992, (14): 51-58.
- [16] Jessup J M, Goodwin T J, Spaulding G. Prospects for use of microgravity-based bioreactors to study three-dimensional host-tumor interactions in human neoplasia [J]. *J Cell Biochem*, 1993, (51): 290-300.
- [17] Kleis S J, Schreck S A. Viscous pump bioreactor [J]. *Biotechnol and Bioeng*, 1990, (36): 771-777.
- [18] 宋克东, 刘天庆. 新型旋转壁式生物反应器内三维组织工程骨的构建 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(11): 996-1 005.

◀◀上接第 31 页◀◀

可以区分有意识和无意识状态, 还可通过(额)肌电活动反映镇静程度和疼痛反应, 体现了麻醉深度监测中应用多种方法进行综合分析的趋势(如脑电分析结合肌电)。

3 讨论

麻醉深度的监测方法较多, 目前临床应用最多的是双谱指数及听觉诱发电位 AAI 指数, 各种方法都有其优点和局限性。听觉诱发电位可快速反映患者意识消失和恢复情况, 预测体动反应和术中知晓, 不受神经肌肉阻滞剂的影响, 但不适用于听觉通路损伤的患者。脑电双谱指数虽然能较灵敏地反映麻醉深度, 但存在对不同麻醉药物、麻醉方法反映不同的缺点, 使之不能成为一种独立应用于临床麻醉监测的完善技术。复杂度和熵都属于非线性动力学分析方法, 可提取麻醉深度变化信息, 具有广阔的应用前景, 但目前尚未在临床中得到广泛应用和推广, 其优越性和影响因素尚需进一步研究⁹。

由于麻醉可由不同的机制产生, 所以采用多维参数较由单一的参数来表征在麻醉过程中大脑状态的变化更可靠。采用多种方法, 多参数联合监测麻醉深度可能是实现准确监测麻醉深度的途径¹⁰。

理想的麻醉深度监护仪必须满足以下条件: (1) 准确监测麻醉深度, 并与临床镇静表现出较好的相关性; (2) 数据正确可靠, 具备较高的时间分辨率; (3) 对所有的麻醉药能够用共同的尺度范围进行麻醉分级; (4) 为临床医师提供决定性的帮助; (5) 抗电磁干扰能力强; (6) 经济实用。要达到这个目标, 需要进一步研究和完善麻醉深度检测分析方法, 还要利用多种相关的医学信号, 从而得到一个较为全面的综合指标。

[参考文献]

- [1] 王涛, 孟尽海. 脑干听觉诱发电位在麻醉深度监测中的应用 [J]. *宁夏医学院学报*, 2006, 28(1): 80-81.
- [2] ZHENILO V M, BYCHKOV A A. Computer analysis of components of general anesthesia [J]. *Anesteziol Reanimatol*, 2001(3): 6-8.
- [3] 杨涛, 彭书峻, 曹铭辉, 等. 手术患者体感诱发电位脑电双频指数与异丙酚血药浓度异氟醚呼气末浓度的关系 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2005, 25(6): 460-461.
- [4] 乐建威, 莫国民, 林敏. 麻醉镇静深度的脑电双谱指数监护技术 [J]. *中国医疗器械杂志*, 2005, 29(5): 321-324.
- [5] Gan T J. Use of the bispectral index to monitor anaesthesia [J]. *Hosp Med*, 2002, 63(2): 68-69.
- [6] ZHANG X S, ROB J R. EEG Complexity as a measure of depth of anesthesia for Patients [J]. *IEEE Trans on Biomed Eng*, 2001, 48(12): 1 424-1 433.
- [7] 徐进, 郑崇勋, 和卫星. 基于脑电复杂度分析的麻醉深度监测研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(1): 45-48.
- [8] 徐进, 郑崇勋, 和卫星. 基于脑电近似熵分析的麻醉深度监测研究 [J]. *航天医学与医学工程*, 2004, 17(3): 205-209.
- [9] 吴东宇, 蔡荆, 尹岭, 等. 近似熵和复杂度分析在麻醉深度监测中的应用 [J]. *解放军医学杂志*, 2005, 30(12): 1 098-1 099.
- [10] JELEAZCOV C, SCHNEIDER G, DAUDERER M, *et al.* The discriminant power of simultaneous monitoring of spontaneous electroencephalogram and evoked potentials as a predictor of different clinical states of general anesthesia [J]. *Anesth Analg*, 2006, 103(4): 894-901.