

# 人皮肤成纤维细胞在不同培养系统中的生长代谢特性

邓明安 周 燕 华 平 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)

关键词 组织工程 细胞培养 微载体 代谢

中图分类号 Q954 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0336-03

大面积烧伤病人及多种皮肤溃疡病人很难用自体皮肤移植来进行治疗。早期治疗方法采用尸体来源的皮肤移植,但由于来源有限、且有传播疾病的危险,因此应用组织工程技术构建生物活性人工皮肤已成为近十几年来在组织工程和创伤治疗领域的研究热点,目前已有几种人工皮肤成功地走向临床<sup>[1]</sup>。然而,在构建大面积皮肤组织过程中,如何大量制备皮肤种子细胞仍然是一大棘手的难题,成为人体皮肤组织工程迫切需要解决的技术关键。获得大量扩增的皮肤细胞,解决种子细胞的供应问题,是构建人工皮肤的一个关键。

文献中报道的皮肤细胞培养方法有静态培养、灌注反应器培养<sup>[2]</sup>等。静态培养贴壁细胞时,因可贴壁的表面积限制,细胞产量低,费时费力又不经济。灌注反应器培养的反应器结构复杂、操作难度大。微载体培养细胞有操作简单,可贴壁的表面积大,因此细胞产量大等优点。有人成功地用微载体培养人角质细胞<sup>[3]</sup>。但是微载体培养人皮肤成纤维细胞还没有报道。

本文对采用微载体的搅拌转瓶悬浮培养系统培养人皮肤成纤维细胞作了初步尝试,并从细胞形态学、细胞生长、细胞代谢等角度分析比较了人成纤维细胞在微载体搅拌转瓶培养系统和传统方瓶静态培养系统中的不同特性,旨在为进一步利用生物反应器大量扩增人皮肤成纤维细胞提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

皮肤取自小儿包皮。培养基是含有 10% 小牛血清, 100u/mL 青霉素和 100u/mL 链霉素的 Dulbecco 基础培养基(简称 DMEM)。中性蛋白酶和胶原酶购自美国 Sigma 公司。微载体(CT-3)由本实验室自制(用葡聚糖交联后包裹胶原蛋白制备而成)。葡萄糖浓度测定试剂盒和脲浓度测定试剂盒购自上海生物制品研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 人皮肤成纤维细胞分离** 参考文献[4]报道的方法,从人包皮组织分离,并进行传代培养。本研究所用的细胞都是第 4 代人皮肤成纤维细胞。

**1.2.2 微载体的预处理** 150mg 微载体(CT-3)用磷酸盐缓冲液(简称 PBS)浸泡过夜,然后转移到硅烷化的转瓶中,高温消毒。冷却后,倒去 PBS。然后加入 20mL 培养基。放入培养箱中以 30r/min 的转速搅拌过夜。

**1.2.3 方瓶静态培养** 细胞以  $5 \times 10^4$  cells/mL 的密度接种于  $28\text{cm}^2$  的方瓶中,培养过程中不更换培养基。

**1.2.4 转瓶微载体培养** 将预处理好的微载体转瓶取出,静置至微载体下沉,然后除去培养基,再加入 50mL 接种密度为  $5 \times 10^4$  cells/mL 的新鲜培养基,放入  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中以 30r/min 的转速进行培养。其中一组不换液,而另一组则换液培养。

**1.2.5 细胞贴壁率测定及贴壁动力学分析** 微载体培养的当天每隔 10min 取样,取无微载体的悬浮液,用血球计数板计数,确定微载体培养物中游离细胞的数目。微载体培养物中游离细胞减少的速率决定了细胞贴附于微载体的速率。游离细胞减少速率按以下公式计算:  $C_t = C_0 e^{-kt}$ ,  $C_t$  是时间为  $t$  时的游离细胞浓度,  $C_0$  是起始时游离细胞的浓度,  $k$  表示细胞贴壁速率<sup>[5]</sup>。此公式可转化为:  $-\ln(C_t/C_0) = kt$ 。

**1.2.6 细胞生长曲线测定** 每天从培养的转瓶中取出少量微载体培养物,用结晶紫染色,血球计数板计数,确定细胞数量。

**1.2.7 细胞代谢产物测定** 参考说明书,用试剂盒测定培养物中葡萄糖、乳酸和氨浓度。

## 2 结 果

### 2.1 细胞在微载体上的贴壁效率

细胞以  $5 \times 10^4$  cells/mL 接种于含有 3mg/mL 的微载体培养基中,转瓶培养。2h 以后培养基中几乎观测不出游离的

成纤维细胞 细胞在微载体上贴壁的速度非常快(  $k = 1.19 \times 10^{-2}/\text{min}$  ) 这与血管内皮细胞的贴壁速率相近(  $k = 0.92 \times 10^{-2} \}$  <sup>[5]</sup>。在倒置相差显微镜下的观察指出 ,细胞在微载体上分布均匀 ,贴壁状况好 ,表明微载体适合成纤维细胞的生长。

2.2 微载体培养和方瓶培养的细胞生长代谢特性比较

在方瓶和微载体培养条件下 ,细胞形态几乎没有差别 ,这说明在方瓶体系下生长的细胞同样适合于微载体系统。

在方瓶和微载体培养条件下 ,细胞生长有差别( 图 1 ,表 1 )。不更换培养基进行方瓶培养的细胞比生长速率是 0.20/d 培养液的最大细胞密度是  $1.3 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ 。同样条件下用微载体进行培养时细胞比生长速率是 0.64/d 培养液的最大细胞密度是  $6.1 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ 。如果以更换培养基的方式进行细胞培养 ,培养液的最大细胞密度可以达到  $1.08 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ 。

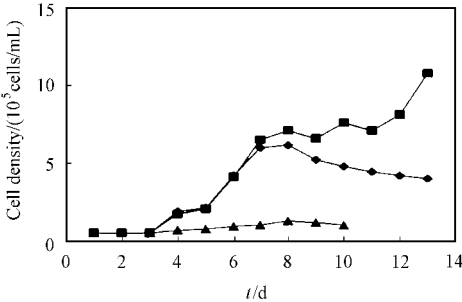


图 1 微载体培养与方瓶培养细胞的生长情况

Fig.1 Growth of cells on microcarrier culture and flask culture

- ◆ Microcarrier ( without replacing medium )
- Microcarrier ( replace medium )
- ▲ Flask ( without replacing medium )

两种培养条件下 ,葡萄糖消耗和乳酸生成也有差别( 图 2 图 3 ,表 1 )。方瓶培养时葡萄糖的消耗是 5.6mmol/L 左右 ,葡萄糖的比消耗速率为  $3.04\text{mmol}/10^9 \text{ cell/d}$ 。在微载体转瓶培养时 ,葡萄糖浓度的消耗是 13.3mmol/L ,比消耗速率是  $5.56\text{mmol}/10^9 \text{ cell/d}$ ( 图 2 )。方瓶培养时乳酸浓度增加 6.3mmol/L ,比生成速率为  $5.03\text{mmol}/10^9 \text{ cell/d}$  ,平均乳酸产率达 1.125。在微载体转瓶培养时 ,乳酸浓度增加 12.7mmol/L ,比生成速率为  $7.4\text{mmol}/10^9 \text{ cell/d}$  ,平均乳酸产率为 0.955( 图 3 )。这些结果说明微载体培养时细胞对葡萄糖代谢的能量利用率高。

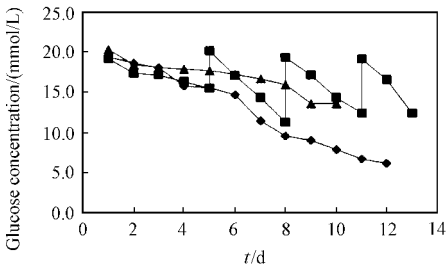


图 2 微载体培养与方瓶培养细胞的葡萄糖代谢情况

Fig.2 Glucose metabolism of cells on microcarrier culture and flask culture

The symbol is the same as Fig.1

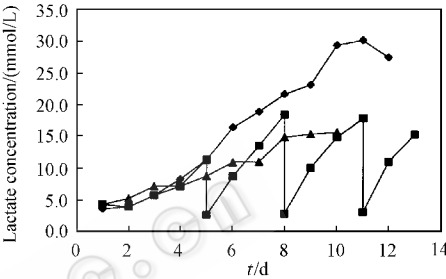


图 3 微载体培养与方瓶培养细胞的乳酸代谢情况

Fig.3 Lactate metabolism of cells on microcarrier culture and flask culture

The symbol is the same as Fig.1

两种培养条件下氨浓度增加没有明显的差别 ,都是 0.3mmol/L( 图 4 ,表 1 )。

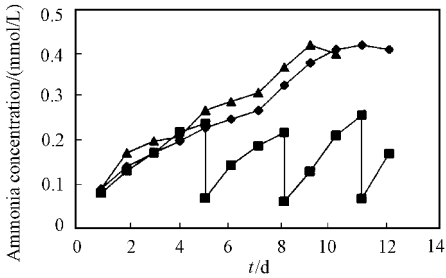


图 4 微载体培养与方瓶培养细胞的氨代谢情况

Fig.4 Ammonia metabolism of cells on microcarrier culture and flask culture

The symbol is the same as Fig.1

表 1 不同培养体系下细胞生长代谢的比较

Table 1 Comparison between different culture manners

	Cell density ( $10^5/\text{mL}$ )	Specific growth rate/ $\text{d}^{-1}$	Consumption Of glucose ( $\text{mmol/L}$ )	Lactate concentration ( $\text{mmol/L}$ )	$Y_{\text{lac/Glc}}$ ( $\text{mmol/mmol}$ )	Ammonia concentration ( $\text{mmol/L}$ )
Flask	1.3	0.26	5.6	6.3	1.125	0.3
Microcarrier ( without replacing medium )	6.1	0.64	13.3	12.7	0.955	0.3
Microcarrier ( replace medium )	10.8	0.67	—	—	—	—

通过对这两种培养体系的比较研究发现,细胞在微载体培养条件下,生长更为旺盛,细胞产量显著提高,葡萄糖消耗和能量利用率也明显优于方瓶培养。

### 3 讨 论

通过微载体转瓶和静态方瓶对人皮肤成纤维细胞培养的生长代谢研究表明,细胞在微载体转瓶培养系统中不仅生长速率大,而且细胞产量高。利用微载体培养人皮肤成纤维细胞,由于细胞有更大的可贴壁表面,解决了方瓶培养下接触抑制的问题,从而可获得更大的细胞量。同时,微载体培养是一种悬浮培养的状态,细胞培养比方瓶静态培养下混合更均匀,每个细胞的生长状况均一,不会产生局部的副产物积累,因而细胞的生长速率快,获得的细胞量大。这进而说明了微载体培养是一种比传统的方瓶培养更为有效的技术。另外通过更换培养基,可消除营养物限制或副产物抑制,从而更进一步提高细胞生长密度及其扩增倍数。

我们也比较了两种细胞培养方法所获得的细胞形态,两种培养方法的细胞外形几乎没有区别,证明微载体转瓶培养的剪切力对细胞形态没有影响。

葡萄糖代谢的情况与文献[6]报道一致,这说明细胞在微载体培养系统中有更多消耗的葡萄糖进入三羧酸循环,细胞代谢的能量利用率显著提高。因此应用微载体悬浮培养

系统体外大量扩增原代细胞是解决组织工程中种子细胞制备的一种可行而有效的方法。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Nerem R M. Tissue engineering in USA. *Med & Biol Eng & Comput*, 1992, **30**:CE8 ~ CE12
- [2] Craig R. Halberstadt, Robert Hardin, Kelly Bezverkov. The *in vitro* growth of a three-dimensional human dermal replacement using a single-pass perfusion system. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**(8):740 ~ 760
- [3] Voigt M, Schauer M, Schaefer D J. Culture epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to reconstitute the epidermis in full-thickness wounds. *Tissue Eng*, 1999, **5**(6):563 ~ 572
- [4] Nancy L. Parenteau, Patrick Bilbo, Cynthia J. M. Nolte. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology*, 1992, **9**:163 ~ 171
- [5] Y-C Ng, Berry J M, Butler M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **50**(6):627 ~ 635
- [6] ZHANG L(张立), SHEN H(沈红), ZHANG Y X(张元兴). Growth and metabolism of hybridoma cells cultured in flask and spinner bottles. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(3):373 ~ 376

## Growth and Metabolism of Human Skin Fibroblasts Cultured on Microcarriers

DENG Ming-An ZHOU Yan HUA Ping TAN Wen-Song\*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237, China)

**Abstract** Human foreskin fibroblasts were cultured *in vitro* on microcarriers in spinners and traditional static flasks. The cultured cells obtained with these approaches were compared in cell shape, cell growth, cell production, and the metabolisms of glucose, lactate, and ammonium. The cells from microcarrier cultures through medium exchange were 8 times more than those from traditional static flasks. It was found that the specific growth rate and specific glucose consumption rate in microcarrier spinner cultures were  $0.64/d^{-1}$  and  $5.56\text{mmol}/10^9\text{cell}/d$ , respectively, higher than those in static flask cultures. However, the average lactate yield on glucose consumption in spinner cultures was only  $0.955\text{mmol}/\text{mmol}$ , lower than that in static flask cultures,  $1.125\text{mmol}/\text{mmol}$ . This indicated that the energy metabolism in spinner cultures was significantly more efficient than that in static flasks. The experimental results from this work suggest that the microcarrier culture system is a suitable way to expand the seeding cells for tissue engineering, due to its ideal cultivation environment provided.

**Key words** tissue engineering, cell culture, microcarrier, metabolism

Received: November 21, 2000

This work was supported by Grant from the State "863" High Technology Programme(10-09-05-04) and the State "973" Key Basic Research and Development Plan.

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64253394; Fax: 86-21-64250948; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>