

接种方式对细胞在三维材料中接种率和分布的影响 Effects of Seeding Methods on Seeding Efficiency and Initial Cell Distribution in 3-D Scaffolds

丁春梅, 周 燕, 谭文松*

DING Chun-Mei, ZHOU Yan and TAN Wen-Song*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

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

摘 要 考察了静态和动态接种方式对成纤维细胞在胶原-壳聚糖支架材料中接种率和分布的影响。将人成纤维细胞制成细胞悬液, 分别采用静态接种、转瓶接种和灌注接种方式将细胞接入三维胶原-壳聚糖海绵。通过 MTT 法和切片 HE 染色分别考察细胞接种率及细胞在三维材料中的分布。实验结果表明, 在低的接种密度下静态接种有较高的接种率(88.9%), 但随着接种密度的增加接种率下降显著, 细胞结团且分布不均匀; 转瓶接种的接种率约为 60%, 细胞分布也不均匀; 灌注接种的接种率始终维持在 77% 以上, 能得到高的起始细胞密度, 且细胞分布均匀, 是一种理想的接种方式。细胞接种方式的优化为改善工程化组织的结构和功能、缩短体外构建时间奠定了基础。

关键词 组织工程 细胞接种 接种率 细胞分布

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0649-05

Abstract Cell seeding of three-dimensional scaffolds is the first step of the cultivation of engineered tissues. The cell seeding density and spatial distribution in a 3-D scaffold are critical to the morphogenetic development of an engineered tissue. In the present work, human fibroblasts were seeded to collagen-chitosan sponges by static seeding, stirred seeding and perfusion seeding. The effects of seeding conditions on the resulting seeding density, the seeding efficiency and the initial cell distribution were studied. The seeding efficiency was relatively high(88.9%) at low inoculation cell density, and decreased rapidly with the increasing of inoculation cell density in static seeding. Stirred seeding yielded the lowest seeding efficiency. Nonuniform initial cell distribution was observed in both static and stirred seeding. The perfusion seeding, which has a characteristic of high seeding efficiency(>77%), high initial cell density and uniform initial cell distribution in 3-D scaffolds, is the optimum method for cell seeding to 3-D scaffold.

Key words tissue engineering, cell seeding, seeding efficiency, cell distribution

细胞接种到三维支架材料上是体外构建工程组织的第一步。将细胞接种在具有一定孔隙率、孔径大小、孔间相通的支架材料上, 使细胞在模拟体内的化学、物理和生物学条

件下, 在三维支架材料中进行培养, 进而形成工程化组织。细胞接种对于支架材料中起始细胞量、细胞在支架内的立体分布以及随后的细胞增殖分化、迁移和组织形成等方面都有

Received: January 28, 2005; Accepted: March 21, 2005.

This work was supported by the grants from the State High-Tech R&D Program(No. 2001AA210641) and the State Key Basic Research Plan(No. G1999054309).

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

国家高技术研究发展计划项目(No. 2001AA210641) 和国家重点基础研究发展规划项目(No. G1999054309) 资助
© 中国生物工程学会生物反应器专业委员会 编辑部 http://journals.im.ac.cn

重要的影响^[1,2]。优化细胞接种方式和细胞接种条件对于体外成功构建组织是必需的。

传统的静态接种方式存在细胞分布不均匀、起始细胞量低和接种率低等缺点^[3,4,5],而且手工操作也限制了大规模工业化生产。近年来,各种动态接种方法逐渐得到发展,主要包括转瓶接种^[4,5,6]、搅动接种^[7]、灌注接种^[8,9]和过滤接种^[2]等。通过引入动态接种方法,增加悬浮的细胞和三维支架材料之间相对流动,使细胞与支架之间有更多的碰撞机会,从而提高细胞的接种效率和分布均匀程度。

由于使用的支架材料和细胞各不相同,很难评价文献报道的各种接种方式的优劣。本研究系统考察了静态接种、转瓶接种和灌注接种对成纤维细胞在胶原-壳聚糖海绵中起始密度、接种率和起始细胞分布的影响,选择合适的细胞接种方式,为体外构建工程化皮肤组织奠定良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养基和胰蛋白酶购自 Gibco 公司,新生牛血清(NBS)由实验室自制,MTT 购自上海化学试剂公司,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京建成生物工程公司。

1.2 人皮肤成纤维细胞培养

参照文献^[10]报道的方法,从小儿包皮的真皮层分离获得成纤维细胞,并进行传代培养,培养基为含有 10% NBS 的 DMEM。构建人工真皮的细胞采用第 6~15 代人皮肤成纤维细胞。

1.3 壳聚糖-胶原海绵的制备

牛筋去筋膜、脂质制成肌腱粉末。将肌腱粉末浸泡于 0.1mol/L 的 HAc 溶液中,采用文献报道的酸处理法^[11]制得终浓度为 5.5mg/mL 的胶原-HAc 溶液。将一定量(占胶原干重 10%)事先配制好的 20mg/mL 壳聚糖(Sigma)溶液缓慢滴入胶原-HAc 溶液,混匀后真空脱泡。将所得溶液注入孔板,放入 -20℃ 冰箱冷冻过夜。真空冷冻干燥 24h 后,得到壳聚糖-胶原海绵。海绵经 EDAC 胶联,0.1mol/L Na₂HPO₄(pH9.1)清洗 1h,1mol/L NaCl 清洗 2h,2mol/L NaCl 清洗 1d 后,用双蒸水漂洗,最后冷冻干燥,切成 1.5mm 厚的支架材料经环氧乙烷灭菌待用。

该法制得的胶原壳聚糖海绵孔径在 150~300μm 之间,孔隙率为 88.6%±4.17%。

1.4 细胞悬液的制备

方瓶中长成汇合的人成纤维细胞经 0.25% 胰酶消化后,用含 10% NBS 的 DMEM 培养基制成一定浓度的细胞悬液。

1.5 细胞接种方法

1.5.1 静态接种(图 1A):取 500μL 细胞悬液点种在 7cm² 胶原海绵材料上,静置于 CO₂ 培养箱中,使细胞贴附。1.5h 后补加 1mL 培养基,3h 后接种结束。

1.5.2 转瓶接种(图 1B):将面积为 7cm² 的胶原海绵材料用针悬挂在转瓶内,加入 50mL 一定密度的细胞悬液,于 CO₂ 培养箱中以 40r/min 的速率搅拌 20h 进行接种。接种过程中,

0~4h 每隔 1h A~10h 每隔 2h,最后第 20h 分别从转瓶中取出 500μL 细胞悬液计数细胞密度。以细胞悬液密度与起始细胞悬液密度的比值(C/C_0)对时间作图,得到转瓶接种动力学曲线。

1.5.3 灌注接种(图 1C):1cm² 的胶原海绵用密封圈固定在自制的灌注式反应器中。一定密度的细胞悬液 2.5mL 由蠕动泵送入反应器,以 0.32cm/min 的速率流经支架材料并重新收集到储液瓶。经过 4 次这样的循环完成整个灌注接种过程。每次循环结束时取 200μL 细胞悬液计数细胞密度。以细胞悬液密度与起始细胞悬液密度的比值(C/C_0)对循环次数作图,得到灌注接种动力学曲线。

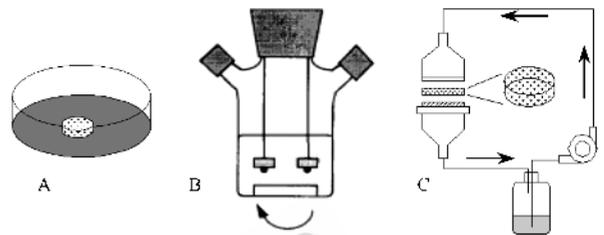


图 1 接种方法示意图

Fig. 1 Schematic diagram of three seeding methods

A: static seeding; B: stirred seeding; C: perfusion seeding.

1.6 接种率的检测

接种细胞量的确定:接种细胞悬液用 PBS 适当稀释后,采用血球计数法计数,乘以接种悬液体积得到接种细胞量。取 3 次计数平均值。

材料中实际细胞量的确定:接种结束时用 MTT 法^[12]检测细胞。材料复合物中细胞线粒体脱氢酶活性,根据标准曲线确定三维材料中的细胞量。取 3 组数据的平均值。

接种率 = 材料中实际细胞量/接种细胞量 × 100%。

1.7 组织学染色检测细胞在三维材料内的分布

取接种后的细胞材料复合物沿与材料表面垂直的方向制成 10μm 厚的冷冻切片,切片经 H&E 染色后观察细胞在三维材料内的分布。

2 结果

2.1 接种方式对成纤维细胞在三维材料中接种率的影响

将成纤维细胞分别以静态接种、转瓶接种和灌注接种的方式接种到三维胶原海绵材料中,接种率随接种细胞密度的变化如图 2 所示。在静态接种条件下,接种率随着细胞接种密度的增加逐渐下降,从 88.9%±9.8% 下降到 72.7%±5.2%。在实验的接种密度范围内转瓶接种方式的接种率维持在 60% 左右,灌注接种能获得较高的接种率,且随着细胞接种密度的增加,接种率虽有下降,但始终保持在 77% 以上,三维材料中的细胞量最高达到 2.29×10⁶ cells/cm²。因此,灌注接种在接种率上优于静态接种和转瓶接种,在高的接种密度下灌注接种的优势更为显著,可以达到较高的材料起始细胞密度。

2.2 动态接种动力学研究

转瓶接种动力学曲线及接种过程中培养液的 LDH 含量

变化如图 3 所示。可以看到细胞悬液中的细胞密度在前 3h 内下降很快,随后缓慢减少,到 20h 时下降到起始的 1.0%。但根据 MTT 的检测结果,在三维材料中实际接种率仅为 60%,说明有近 40% 的细胞在接种过程中损失。细胞在损伤

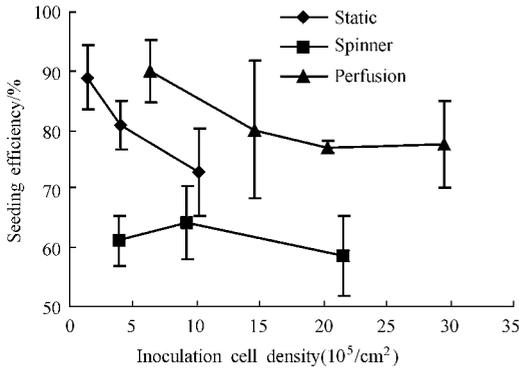


图 2 细胞接种密度对接种率的影响

Fig. 2 Effects of inoculation cell density on seeding efficiency

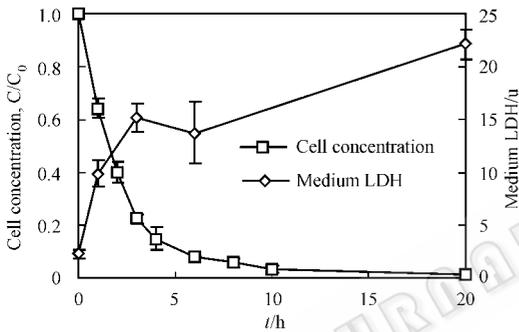


图 3 转瓶接种动力学

Fig. 3 Kinetics of stirred seeding

或死亡时胞内的 LDH 会被释放,因此培养基中 LDH 的含量可以反映接种过程中细胞损伤和死亡的情况。分析培养基中 LDH 含量变化可以发现,LDH 的含量在前 3h 迅速上升,随后缓慢增加直至接种结束。这说明前 3h 细胞悬液密度的快速下降部分是由于细胞死亡导致的,而非细胞贴附到了胶原材料上。

灌注接种动力学曲线如图 4 所示。在实验所选的细胞密度范围内,接种细胞悬液密度对细胞贴附动力学没有显著影响。随着循环次数的增加,悬液中细胞密度逐渐降低,细胞在三维材料中的接种率逐渐增大。通过 4 个循环后,77% 以上的细胞被截留在三维材料内。

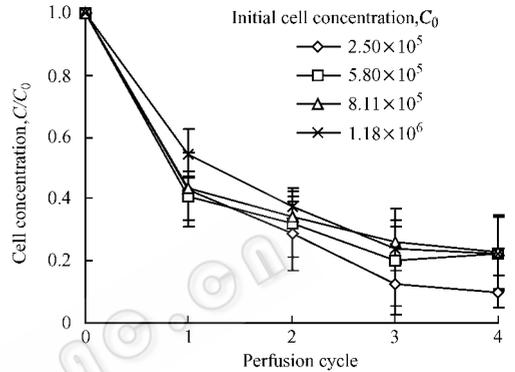


图 4 灌注接种动力学曲线

Fig. 4 Kinetics of perfusion seeding

2.3 接种方式对成纤维细胞在三维材料中起始分布的影响

接种方式对细胞在材料内的分布有重要影响。图 5 是接种结束后对细胞材料复合物进行 MTT 分析的结果。由于活细胞线粒体内琥珀酸脱氢酶可将淡黄色的 MTT 还原成不溶于水的紫蓝色甲斐沉淀,因此通过紫蓝色的分布可以知道

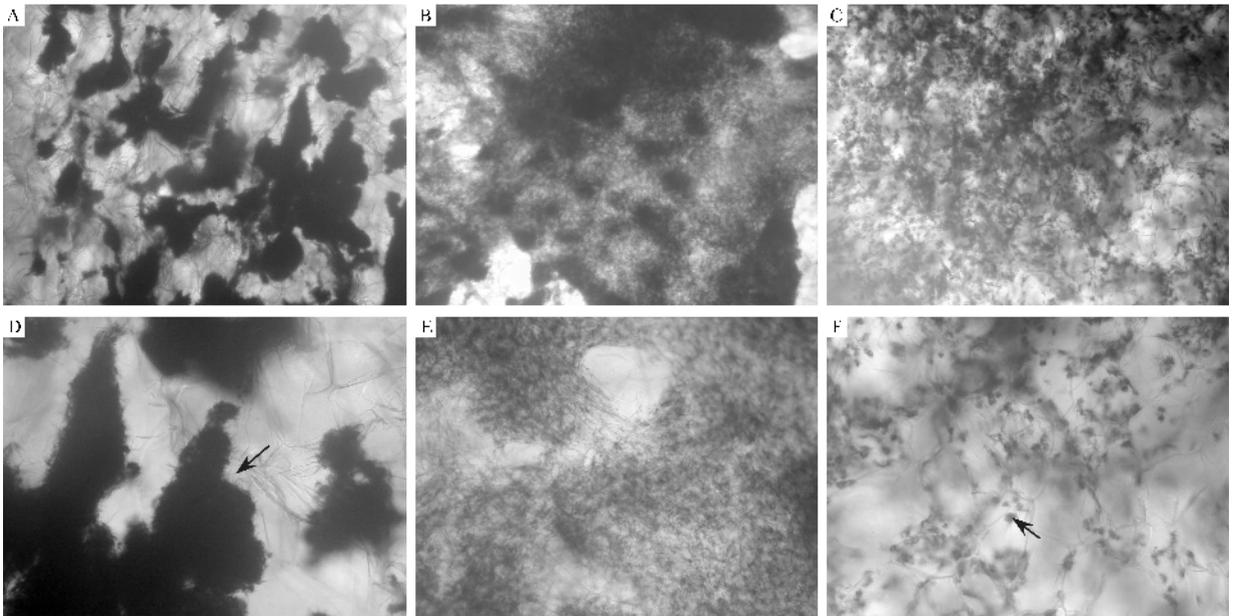


图 5 静态接种(A, D)、转瓶接种(B, E)和灌注接种(C, F)后细胞材料复合物的 MTT 分析照片

Fig. 5 Light micrographs of the cell seeded constructs after incubation with MTT salt (A, B, C; × 40; D, E, F; × 100)

活细胞在材料中的分布情况。在接种密度为 $(1.43 \pm 0.41) \times 10^6$ cells/cm² 的情况下,静态接种得到的细胞材料复合物中,材料表面分布着大小不一的块状紫蓝色物质(图 5D 中箭头所指),并有部分表面未呈现紫蓝色(图 5A, D),说明细胞在材料表面分布不均匀且细胞结团现象严重,造成局部细胞密集而局部又没有细胞。转瓶接种后紫蓝色均匀地覆盖着整个材料表面(图 5B, E),说明材料表面已完全被细胞所占据。灌注接种后同样可以看到细胞分散良好(图 5F 中箭头所指),没有出现细胞结团(图 5C, F)。与灌注接种相比,转瓶接种后材料表面多层细胞紧密排列,几乎将多孔材料的表面完全覆盖,这样不利于营养物的传递,会给后期培养造成影响。

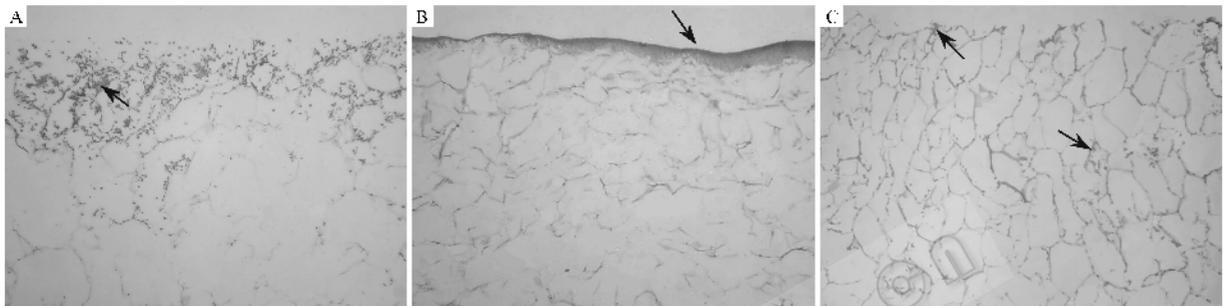


图 6 接种结束后细胞材料复合物的切片 HE 染色($\times 40$)

Fig. 6 Histological cross sections of cell seeded constructs from H&E stain($\times 40$)

A: static seeding; B: spinner flask seeding; C: perfusion seeding.

3 讨论

体外构建工程化组织,首先要将细胞接种到预制的三维材料中,其接种要求:高的接种率,使供体细胞得到最大利用,高的动力学速度,缩短贴壁依赖和剪切敏感的细胞处于悬浮状态的时间,贴壁细胞高密度和均匀的分布,以加快组织再生的速度和提高组织的均一性。

静态接种由于操作简单是最常见的接种方式,但静态接种普遍存在着接种率低、细胞分布不均匀的缺点。从本实验可以看到,由于静态接种时细胞悬液静置于材料表面,个别细胞随着液体向材料内部扩散而进入材料,这种被动的向内运动是有限的,大多数细胞在重力作用下堆积在材料表面,导致材料表面有大量细胞贴附,内部则几乎没有细胞。另外由于静态接种时接种悬液体积通常只有几百微升,要得到高的接种密度,只有提高接种悬液的密度,而高的细胞悬液密度容易导致细胞结团,造成孔隙堵塞,影响细胞进入材料内部,而且由于材料表面的细胞结合位点有限,很多细胞仅是松散地停留在表面,当加入培养基时,这部分细胞极易离开材料进入培养基,因此接种率随着接种密度的增加而降低。

转瓶接种是最早开发的动态接种方式。转瓶中的机械搅拌能使细胞悬液混合均匀,不易出现细胞结团现象,同时由于细胞与材料间碰撞机会增加,可以使更多的细胞接种到材料上,而且搅拌在细胞和材料之间提供了相对速度,使细胞能够进入材料内部。Kim^[7]等人在构建平滑肌组织时,采用

响。

为了进一步考察材料内部细胞的分布情况,取接种细胞后的材料进行冷冻切片和 HE 染色,结果如图 6 所示。从图中可以发现,静态接种后细胞高密度地聚集在接种一侧的材料表面(图 6A 中箭头所指),材料内部区域几乎没有细胞分布。转瓶接种后细胞也是集中在材料表面,造成表面被厚厚的一层细胞所覆盖(图 6B 中箭头所指),而内部细胞很少。采用灌注接种方式不但材料的表面有细胞均匀的分布,而且材料内部的多孔表面也均匀地分布着细胞(见图 6C 中箭头处),因此细胞在整个三维材料内立体分布均匀。

转瓶接种法将细胞接种到 PGA 材料中,其细胞密度比静态接种高出一个数量级,细胞分布也更为均匀,但是接种率却只有 $(4 \pm 1)\%$ 。Vunjak-Novakovic^[3]等人研究了软骨细胞接种到 PGA 材料上的转瓶接种动力学并建立了简单的接种模型。他们根据接种动力学曲线认为转瓶中所有的细胞在 1d 时间内都接种到了材料上,但是没有检测接种结束时材料中的实际细胞量,也没有数据说明转瓶接种对细胞分布的影响。从本实验的结果可以看到,转瓶接种并不能有效地将细胞接种到材料内部,在接种率方面转瓶接种低于静态接种,种子细胞损失严重。在转瓶接种过程中出现的细胞明显损伤或死亡可能是由于转瓶的转子与转瓶底部直接接触磨损细胞导致的。

灌注接种过程中,细胞悬液直接流经多孔材料的内部孔隙,细胞可以到达材料内部,并在惯性作用、拦截作用、重力沉降和范德华力的作用下停留在孔表面。通过多次循环,细胞与材料间接触机会增加,大大提高了接种率。Kim^[4]和 Radisic^[9]分别在肝细胞体外培养和心脏组织工程构建中运用了灌注接种方式,使用的支架材料分别为 PGA 和 Ultrafoam[®]并得到了高的细胞代谢活性和高的细胞密度,前者对于细胞分布没有提供有力的数据,后者得到了均匀的细胞分布。在本实验中,使用胶原海绵为支架材料,由灌注接种得到了高的起始密度、高的接种率和均匀的细胞分布,这对工程化组织形成正常结构和功能,缩短体外构建时间将起到重要的作用。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Martin I , Wendt D , Heberer M . The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* , 2004 , **22** (2) 80 - 86
- [2] Li Y , Ma T , Kniss DA *et al.* Effects of filtration seeding on cell density , spatial distribution , and proliferation in nonwoven fibrous matrices. *Biotechnology Progress* , 2001 , **17** 935 - 944
- [3] Vunjak-Novakovic G , Obradovic B , Martin I *et al.* Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnology Progress* , 1998 , **14** :193 - 202
- [4] Kim SS , Sundback CA , Kaihara S *et al.* Dynamic seeding and *in vitro* culture of hepatocytes in a flow perfusion system. *Tissue Engineering* , 2000 , **6** (1) 39 - 44
- [5] Burg KL , Holder WD , Culbertson CR *et al.* Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* , 2000 , **51** 642 - 649
- [6] Carrier RL , Papadaki M , Rupnick M *et al.* Cardiac tissue engineering : cell seeding , cultivation parameters , and tissue construct characterization. *Biotechnology Bioengineering* , 1999 , **64** 580 - 589
- [7] Kim BS , Putnam AJ , Kulik TJ *et al.* Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnology Bioengineering* , 1998 , **57** 46 - 54
- [8] Glowacki J , Mizuno S , Greenberger JS . Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture. *Cell Transplantation* , 1998 , **7** 319 - 326
- [9] Radisic M , Euloth M , Yang Liming *et al.* High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnology Bioengineering* , 2003 , **82** 403 - 414
- [10] Parenteau NL , Bilbo P , Nolte CJ *et al.* The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* , 1992 , **9** (1-3) :163 - 171
- [11] Pek YS , Spector M , Yannas IV *et al.* Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. *Biomaterials* , 2004 , **25** (3) 473 - 482
- [12] Ciapetti G , Cenni E , Pratelli L *et al.* *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MIT assay. *Biomaterials* , 1993 , **14** (5) : 359 - 364