

新型旋转壁式生物反应器内 三维组织工程骨的构建*

宋克东¹⁾ 刘天庆¹⁾** 李香琴¹⁾ 崔占峰²⁾ 葛丹¹⁾ 孙相玉¹⁾ 马学虎¹⁾

(¹⁾ 大连理工大学精细化工国家重点实验室, 干细胞与组织工程研究室, 大连 116024;

(²⁾ Department of Engineering Science, Oxford University, Parks Road, Oxford OX1 3PJ, UK)

摘要 利用微载体悬浮培养法将成骨细胞在旋转壁式生物反应器内进行大规模扩增, 并检测细胞的组织形态和生物功能. 然后以此作为种子细胞, 分别以 2×10^6 个/ml 和 1×10^6 个/ml 两种密度接种到支架材料上, 于旋转壁式生物反应器 (RWV) 内进行三维组织工程骨的构建. 并将所构建的骨组织分别进行倒置显微镜 (inverted microscope)、扫描电镜 (SEM)、碱性磷酸酶 (ALP)、矿化结构和 AO/EB 双重荧光染色等生物学性能检测, 以及对培养过程的营养物质代谢情况进行监控和分析. 结果表明, 在 RWV 中培养的骨组织生长良好, 分泌大量胶原纤维, 并有矿化基质和新骨样组织形成. 由上述结果可断定, 通过 RWV 内部流体对流所产生的应力刺激, 可提高成骨细胞碱性磷酸酶的活性表达, 并加速矿化结节的形成, 从而完成成骨细胞的快速增殖与分化以及工程化组织的三维构建.

关键词 组织工程骨, 成骨细胞, 生物反应器, 支架材料, 细胞培养

学科分类号 R782

由于自体骨嫁接和异体骨移植等传统治疗方法在治疗外伤、先天性骨缺损、骨瘤和其他骨科疾病上的局限性, 目前急需寻找一种新颖的方法来修复患病或受损的骨组织^[1,2]. 1995 年 Crane 等^[3] 系统提出了骨组织工程的概念、研究方法、研究现状和发展前景, 引起广大学者的关注. 骨组织工程用于骨缺损等的修复重建, 较传统的方法有显著的特点: a. 不受供体来源的限制; b. 避免了异体组织移植中免疫排斥反应; c. 人工生物材料的形状、大小可根据不同组织和实际需要而设计和塑形, 不受供体形状的限制. 骨组织工程的最终目的在于提供一种来源广泛、应用简便、疗效确定的理想的生物活性骨组织^[4].

来源于 SD 大鼠颅骨的成骨细胞是一种定型的骨原细胞并且来源丰富, 所以我们使用此种细胞作为三维构建组织工程骨的种子细胞. 近来, 我们已经成功地在旋转壁式生物反应器 (rotating wall vessel, RWV) 中利用微载体悬浮培养法对此种成骨细胞进行了大规模体外扩增^[5], 因此种子细胞的来源问题已得到解决. 传统静态的培养方法, 在营养物质向支架材料内部扩散和代谢产物排出方面, 都不能满足所接种细胞代谢速度的需要, 导致细胞生长和表型标记物的表达均受到抑制. 此外,

由于支架内营养物质和代谢产物浓度梯度的存在, 还导致细胞不均匀分布及骨诱导基质只分布在材料外表面等问题, 如果材料尺寸变大时此问题会变得更加尖锐^[6]. 因此, 我们通过旋转壁式生物反应器来实现材料内部营养物质传递速率的提高和代谢产物的及时排出, 同时利用流体对流产生的应力刺激, 来加速成骨细胞碱性磷酸酶表达和矿化结节的加速形成, 从而完成成骨细胞的快速增殖与分化以及工程化组织的三维构建.

旋转壁式生物反应器是 1992 年美国国家航空和航天管理局 (NASA) 为在地面上模拟微重力条件下细胞的生长而开发的一种新型细胞及组织培养装置^[7,8]. 在此种反应器内由于细胞所受剪切力极低, 而且细胞之间有三维联系的机会, 因而所培养的细胞功能更接近于自然细胞, 并且可形成更接近自然的组织. 本实验室利用此原理, 研制出一种新型的旋转壁式生物反应器. 与 NASA 的反应器相比较, 我们的 RWV 创新处或优异性包括: a. RWV

* 国家自然科学基金两个基地国际合作项目 (2002008) 和辽宁省科学技术基金资助项目 (20022140).

** 通讯联系人.

Tel: 0411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

收稿日期: 2004-06-07, 接受日期: 2004-06-30

中支架材料被固定在培养室的外筒壁上,在培养的过程中所要三维构建的骨组织与内外筒壁均不发生碰撞,而NASA反应器内的组织块则是悬浮培养的,将不可避免地发生碰撞,从而使内部培养的细胞或组织受到损伤。b. RWV可以有效提高营养物质的传递效率。c. 弥补了此类生物反应器须放在CO₂培养箱内操作的技术缺陷。d. 将培养箱内的气体经过滤灭菌后直接通入新鲜培养基,在很大程度上提高了溶解氧的效率,而NASA则是利用特殊管线的渗透功能来溶解氧而使得效率较低。本研究对静态、转瓶和旋转壁式生物反应器这3种不同培养环境中的支架材料上,以两种密度接种的成骨细胞的分化、增殖与黏附情况进行了对比分析,对所构建的骨组织分别进行了倒置显微镜、扫描电镜(SEM)、碱性磷酸酶(ALP)、矿化结构分析、AO/EB荧光染色和新骨生成的茜素红标记等生物学性能检测,并对培养过程的营养物质代谢情况进行了监控和分析。本研究目标旨在建立一种理想的体外三维构建组织工程骨的培养体系,为进一步建立人体组织工程骨在旋转壁式生物反应器中的大规模构建提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM培养基(Gibco公司),小牛血清(华美),D-葡萄糖(Gibco公司),胰蛋白酶(Gibco公司),Ⅱ型胶原酶(Gibco公司),Dulbecco-PBS缓冲盐溶液(自配),D-Hanks液(自配),葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司),乳酸、碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),AO/EB染料(Fluka公司),茜素红(天津市石英钟厂霸州化工分厂),苏木色精(上海化学试剂厂,进口分装),伊红(沈阳试剂三厂)。其他所有常规试剂均为分析纯。转瓶(Bellco, U.S.),扫描电镜(JEOL-JEM-1200EX, Japan),渗透压仪(VAPRO, U.S.),ANALYTECH-658半自动生化分析仪(Shanghai ANTAI Diagnostics Co., Ltd),CA-1309-1超净工作台(上海上净净化设备有限公司),倒置相差显微镜(IX70-131日本OLYMPUS OPTICAL CO., LTD),支架材料(动物衍生骨,四川大学华西医院修复重建研究室杨志明教授惠赠),旋转壁式生物反应器(RWV)(大连理工大学干细胞与组织工程研究室自制)。培养系统如图1所示。

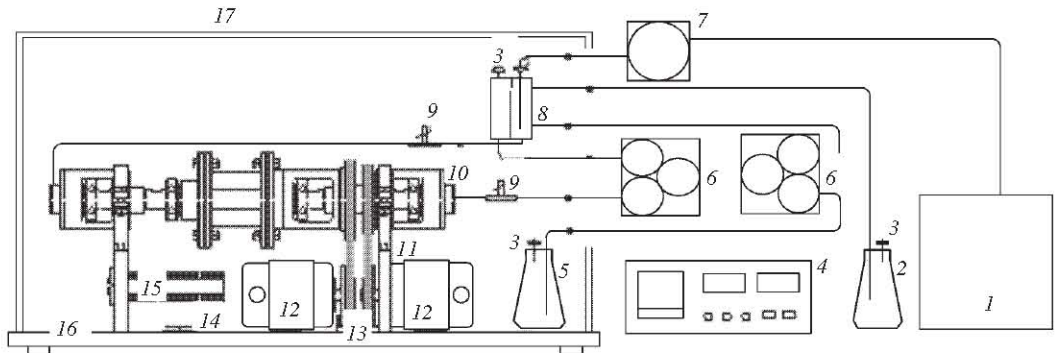


Fig. 1 Rotating wall vessel bioreactor (RWV) culture system

1: CO₂ incubator; 2: Waste liquid vessel; 3: Filter; 4: Control panel; 5: Fresh media vessel; 6: Peristaltic pump; 7: Air pump; 8: Oxygenator; 9: Triplet; 10: Reactor; 11: Carriage; 12: Adjustable motor; 13: Laser counter; 14: Fan; 15: Heater; 16: Under plate; 17: Outer garment.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 取出生2~3天的SD大鼠(大连医科大学动物试验中心),拉颈处死后投入盛有75%乙醇的容器内消毒3~5 min,置于消毒培养皿内。取颅盖骨,经0.25%的胰蛋白酶溶液和1 g/LⅡ型胶原酶溶液分别消化后,加入含有10%小牛血清的DMEM培养基调节细胞浓度为10⁶个/ml后

接种在T25培养瓶内。将培养瓶置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养^[9]。细胞长满瓶壁后,传代2次,即可使用。

1.2.2 支架材料预处理: 将支架材料(经灭菌处理并无菌包装)在无菌环境中切割成3 mm×8 mm×8 mm尺寸大小。在接种细胞之前,用75%乙醇溶液再次浸泡30 min灭菌并提高支架材料的吸水

性能,接着用 PBS 清洗 2 次后浸泡过夜以尽可能去除残存乙醇.使用前用含 10% 小牛血清的新鲜培养基浸泡 30 min.

1.2.3 成骨细胞检测

苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色:用丙酮固定 15 min,蒸馏水洗 1 次后入苏木精染液 10 min 染细胞核.入 0.5% 盐酸-70% 乙醇溶液 1 min,脱去胞质的着色.入碱性溶液碱化,使细胞核变成蓝色.蒸馏水洗 1 min,入伊红染液 1 min.梯度乙醇脱水,70%、90%、95% 乙醇各 1 min,100% (2 次) 各 2 min.用二甲苯透明两次,各 5 min.树胶封固^[9].

碱性磷酸酶 (ALP) 检测:用 Dulbecco-PBS 冲洗新鲜的培养标本,用冷丙酮 (95% 的酒精亦可) 固定 15~30 min.用蒸馏水冲洗数次,干燥.将标本放入孵育液中,置培养箱中 2~4 h.用蒸馏水冲洗.涂上 2% 的硝酸钙 2 min.涂上 2% 的硝酸钴 2 min.用蒸馏水洗.涂上 1% 硫化铵 (使用时即配) 2 min.用蒸馏水洗.自然干燥,用树胶封固后,进行观察.阳性反应呈黑色颗粒或块状沉淀^[10].

von Kossa 染色:培养皿内 PBS 冲 2 次,95% 乙醇固定 10 min,蒸馏水冲洗 3 次.2% 硝酸银内置暗处 1 h.蒸馏水洗 3 次,再流水冲 10 min.5% 硫代硫酸钠 (硫代硫酸钠 5 g,0.1 mol/L 氢氧化钠 0.2 ml,蒸馏水 100 ml) 还原 1 h.干燥,封片^[11,12].

1.2.4 支架材料的细胞接种:将成骨细胞分别制成 2×10^6 个/ml 和 1×10^6 个/ml 2 种密度的细胞悬液,分别将 2 种浓度的细胞悬液用 1 ml 的注射器逐滴地滴加到支架材料的表面并下渗.3 min 后将材料翻转,以同样的方式滴加到另一面.静置 10 min,将 2 种接种浓度的支架材料都放入 T-flask 中预培养 24 h 后,再移入 RWV 和 Spinner flask 中,并按浓度高低做好标记.

1.2.5 转瓶和旋转壁式生物反应器内三维组织工程骨的培养:将上述准备好的支架材料分别固定于 RWV 和 Spinner flask 中,每个培养容器内各装入 4 片支架.开始时将 Spinner flask 的转速调整在 20 r/min,6 h 后将转速增加至 25 r/min,启动 RWV 外部的温控、气控以及培养基的循环等装置,同时调整内外筒的转速均在 10 r/min.此后每天取样观察是否有细胞脱落.实验至第 14 天结束.两种培养方式都是每天部分换液及取样,离心后观察是否有细胞残片,上清液于 -20°C 冷冻保存,集中测定葡萄糖、乳酸和碱性磷酸酶的浓度.

1.2.6 扫描电镜观察:样品用 PBS 漂洗,2% 戊二醛固定 4 h,系列丙酮逐级脱水,乙酸异戊脂置换,临界点干燥,表面喷金,扫描电镜观察^[13].

1.2.7 AO/EB 双重荧光染色:10 mg 吖啶橙 (AO) 和 10 mg 溴化乙锭 (EB) 溶于 100 ml PBS (pH 4.8~6.0) 中,过滤,制成储存液并于 4°C 避光保存备用.按最初的细胞接种密度取适量储存液滴加于工程骨组织切片上,直接用盖玻片封片.荧光显微镜选用激发滤片 BG12 或 BV 等,阻断滤片用 515 nm 或 SP3^[14].

1.2.8 矿化结节染色:茜素红 (Alizarin Red S) 法染色.将所培养的骨组织用 PBS 冲洗 2 次,95% 乙醇固定 15 min,蒸馏水冲洗 3 次.入 0.1% 茜素红-Tris · HCl (pH 8.3) 染液, 37°C , 染色 30 min.蒸馏水冲洗,干燥,封片^[10].

1.2.9 葡萄糖、乳酸的测定:葡萄糖测定试剂盒-GOD-PAP 法,乳酸测定试剂盒,使用 ANALYTECH-658 半自动生化分析仪分析测定.

1.2.10 溶液 pH 值、渗透压的测定:用渗透压仪直接测定溶液渗透压,取 10 μl 溶液加入仪器中平衡 80 s 后读取渗透压值.

1.2.11 碱性磷酸酶 (ALP) 检测:三维构建过程的监控采用碱性磷酸酶测定试剂盒-终点法,使用 ANALYTECH-658 半自动生化分析仪分析测定.

1.2.12 实验中统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示.用 Origin7.0 软件进行处理.

2 结 果

2.1 成骨细胞形态与功能检测

本实验所使用的种子细胞为经由 RWV 大规模扩增的成骨细胞.图 2 所示,分别经 HE、ALP、von Kossa 和茜素红染色等组织和形态学鉴定证实,扩增出的细胞具有良好的分化增殖和体外成骨能力,适宜作为三维构建组织工程骨的种子细胞^[5].

2.2 倒置显微镜下观察

从图 3a, b 中可以发现,空白支架材料表面和壁孔边缘光滑.在 RWV 中,高密度细胞接种的材料表面和孔隙中有大量的基质,还有大量黄褐色或黑色颗粒状沉淀,呈现出明显的矿化结节;低密度细胞接种材料的表面和孔隙中亦可以发现黄褐色的基质沉淀,同时也呈现出明显的矿化结节现象,见图 3c, d. 图 3e, f 所示为静态培养下的支架材料,在材料的孔隙和表面成骨细胞聚集,并大量分泌胶原纤维,但并无明显的矿化基质生成.图 3g, h 所

示，在转瓶中构建的材料也可以发现成骨细胞聚集，并有胶原纤维生成，但和静态培养结果一致，都无明显的矿化基质生成。

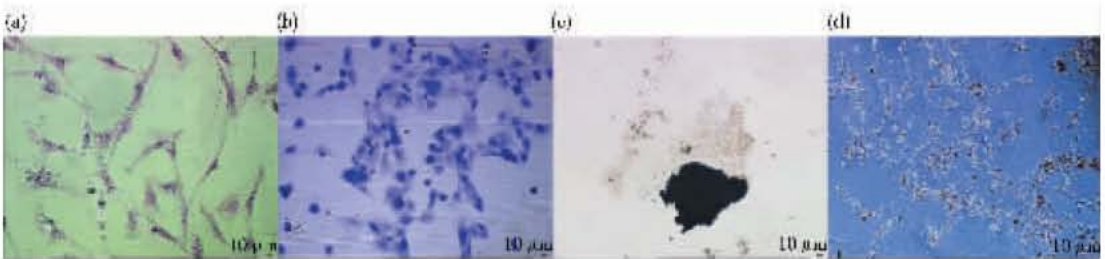


Fig. 2 HE staining, ALP and von Kossa assay of osteoblasts cultured in RWV
(a) HE staining (×100, Bright field); (b) ALP (×100, Bright field); (c) von Kossa (×100, Bright field); (d) Alizarin red S (×100, Differential interference).

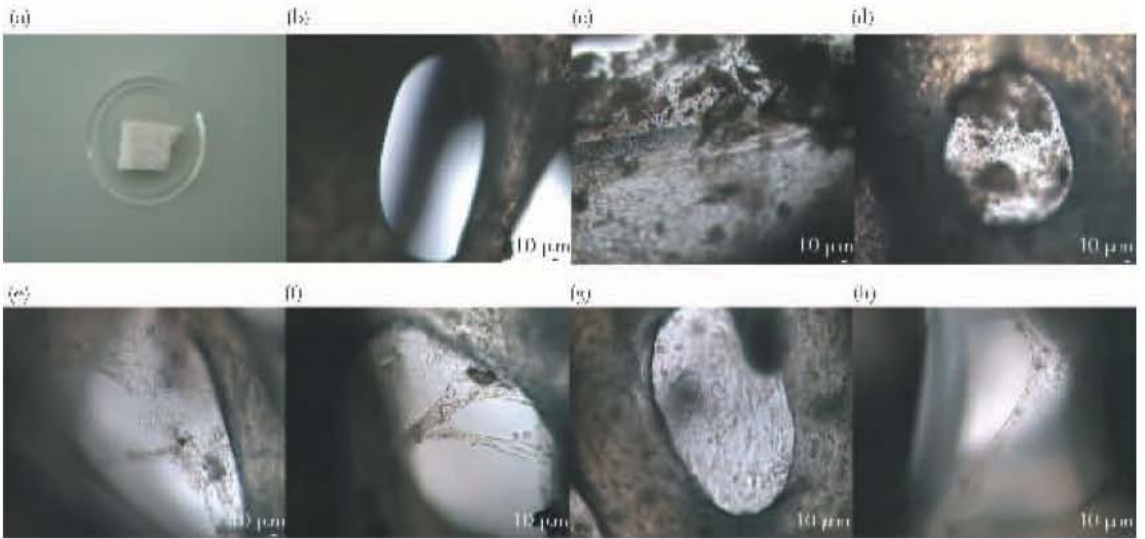


Fig. 3 Inverted microscope pictures of scaffolds seeded with different cell density of osteoblasts (After three weeks)
(a) The full view of Vacant scaffold (×100). (b) The pore view of Vacant scaffold (×100). (c, d) Inoculated with high and low density of osteoblasts in RWV (×100). (e, f) Inoculated with high and low density of osteoblasts in T-flasks (×100). (g, h) Inoculated with high and low density of osteoblasts in Spinner flask (×100).

2.3 扫描电镜观察

如图 4a, b 可见 RWV 中所构建支架材料的表面整合有大量成骨细胞，胞体呈不规则的梭形、球形或多角形，并以多个细小的突起伸入到材料孔隙中，形成一种牢固的锚状结构。在支架材料的表面和间隙中可见细胞分泌大量的细胞外基质，基质中充满着束状胶原蛋白纤维，这些胶原蛋白纤维排列极不规则；成骨细胞位于束状排列的胶原基质中，孔隙中可见大量的新生骨样组织，同时胞体表面及细胞间有颗粒状钙盐结晶沉积，局部材料上细胞呈

团簇状，周围有网状胶原附着。而 Spinner flask 和 T-flasks 培养的支架材料孔壁上也有成骨细胞黏附，但只见少量的胶原蛋白纤维（图 4c, d, e, f），尚未显示有明显的钙盐沉积迹象。观察结果表明：在 RWV 中整合的成骨细胞已在支架材料表面成活并贴壁生长，细胞已明显分泌胞外基质，合成胶原纤维并有大量钙化结节生成，相对比于其他 2 种培养方式，RWV 可以提供最佳的三维体外构建环境，同时该支架材料亦表现出较好的生物相容性。

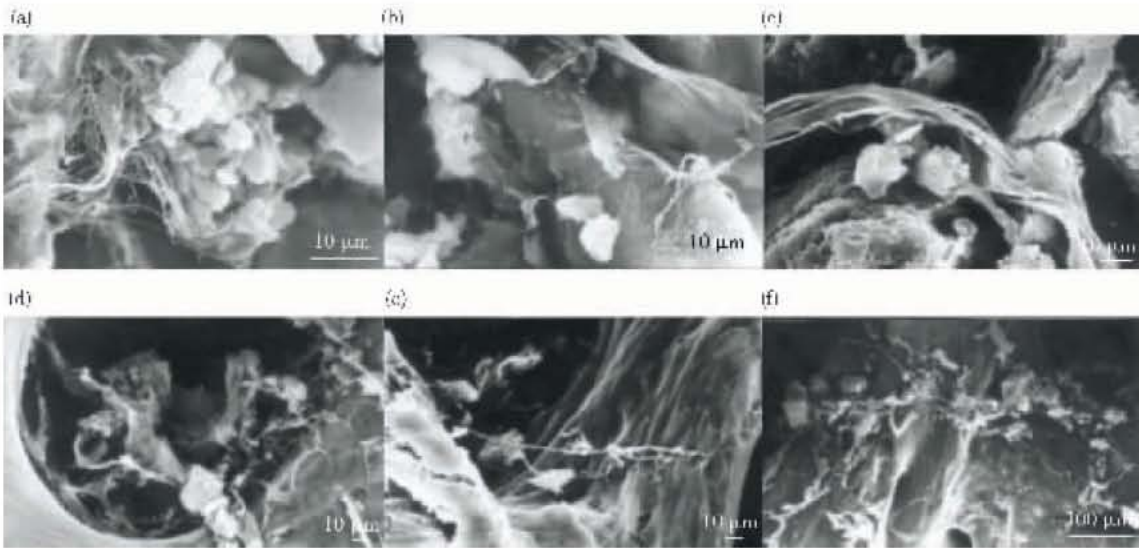


Fig. 4 SEM micrographs of scaffolds cultured with different osteoblasts density in different culture fashions (Three weeks)
(a, b) Inoculated with high and low density of osteoblasts in RWV (×100). (c, d) Inoculated with high and low density of osteoblasts in T-flasks (×100). (e, f) Inoculated with high and low density of osteoblasts in Spinner flask (×100).

2.4 AO/EB 双重荧光染色

在荧光显微镜下，正常细胞因为核膜未受损伤，显示 AO 的颜色，呈绿色荧光，而死细胞（包括坏死和凋亡细胞）由于核膜、细胞膜受损，正常时不能透过膜的 EB 入核，显示橘红色荧光^[14]。图 5 所示，以 2 种密度接种经由 RWV 三维构建的材料均在孔隙中显示有高密度且活力旺盛的成骨细

胞存在。但在其他 2 种培养方式中，由细胞周围所散发的微弱的橘红色荧光可以发现，均不同程度地显示出成骨细胞有早期凋亡的迹象。通过对比可以发现，在 RWV 三维环境中的种子细胞保持了良好的生物活性，而在其他 2 种方式中分别由于传质或养分传递等方面的不足使得种子细胞均不同程度地出现了早期凋亡的迹象。

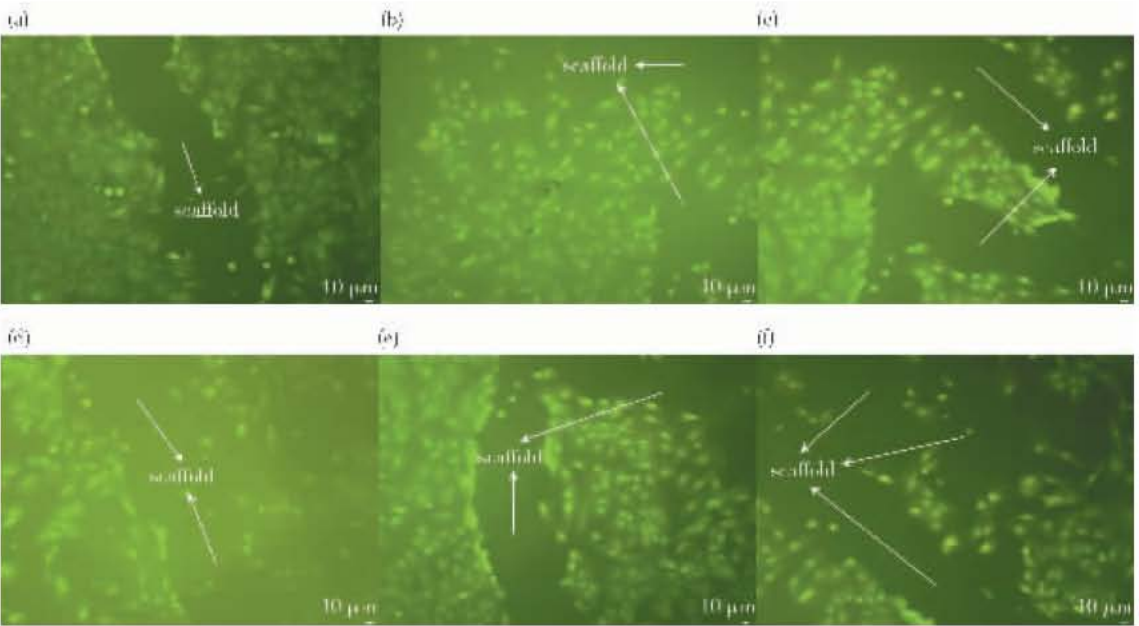


Fig. 5 Fluorescent images of osteoblasts double stained with AO and EB showing adhesion and growth of the cells onto the scaffolds in different culture fashions
(a, b) Inoculated with high and low density of osteoblasts in RWV (×100). (c, d) Inoculated with high and low density of osteoblasts in T-flasks (×100). (e, f) Inoculated with high and low density of osteoblasts in Spinner flask (×100), after one week.

2.5 钙化结节茜素红染色

茜素红为钙特异性的染料, 常用于显示新骨组织形成和钙化反应^[15]. 与正常条件下培养的成骨细胞一样, 整合于支架材料内并在 RWV 内培养的成骨细胞, 其胞外基质经茜素红染色后, 也发现大量不规则的红色钙颗粒沉积于材料的表面和孔隙内. 而与支架材料整合经由 Spinner flask 和 T-flasks 培养的成骨细胞, 其胞外基质经茜素红染色后却只能发现极少量的红色钙颗粒沉积. 比较这 3 种培养方式: 光镜下以 10×10 网格为标准, 随机选取不

重复、不重叠的 8 个视野进行矿化结节计数发现, 经由 RWV 在支架材料上培养的成骨细胞形成的矿化结节体积大, 数量多, 同时其形成也早于其他 2 组 ($P < 0.01$, 图 6), 这表明在 RWV 内三维构建组织工程骨不仅不影响成骨细胞胞外基质的矿化能力, 而且在流体流动所产生的适宜应力刺激下还可以加速矿化结节的形成. 同时, 图 6 表明所接种的成骨细胞中钙含量丰富, 可以为新骨生成提供充足的钙源.

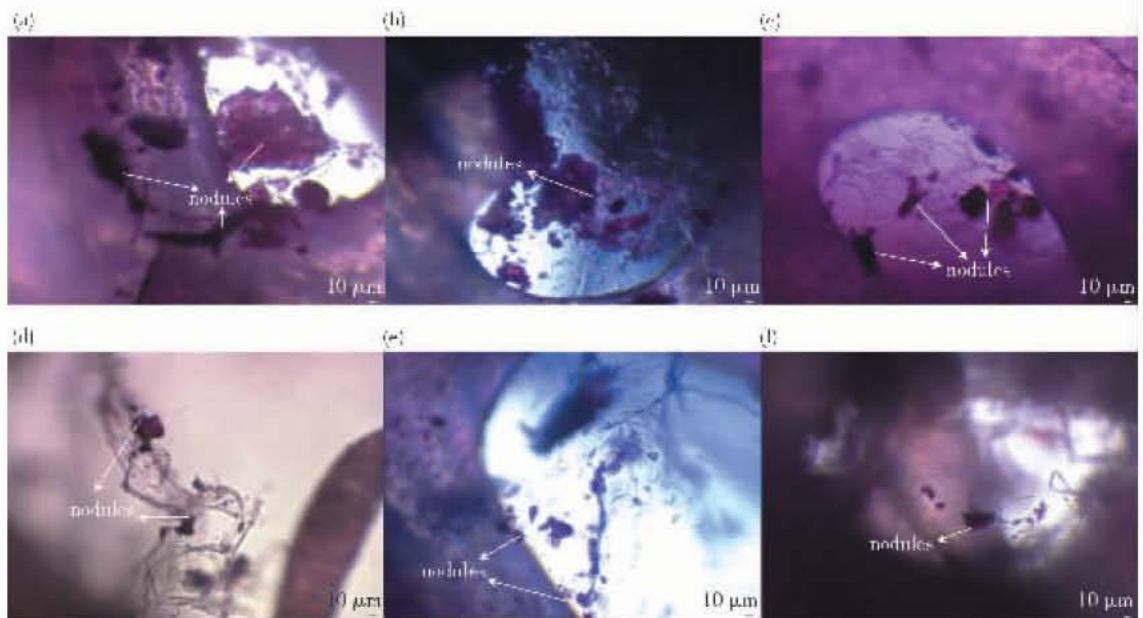


Fig. 6 Inverted microscope pictures of osteoblasts stained with alizarin red S showing mineralized nodules of the cells onto the scaffolds in different culture fashions

(a, b) Inoculated with high and low density of osteoblasts in RWV ($\times 100$). (c, d) Inoculated with high and low density of osteoblasts in T-flasks ($\times 100$). (e, f) Inoculated with high and low density of osteoblasts in Spinner flask ($\times 100$), after three weeks.

2.6 营养物质代谢

横向比较 3 种构建体系中的营养物质和代谢产物的含量 (图 7), 则会发现: 在葡萄糖的比较中, 因 RWV 构建体系中支架内的细胞活性最高, 新陈代谢最旺盛, 而使得其营养物质被快速消耗掉, 故其浓度最低; 而 Spinner flask 中细胞的生命活动最微弱, 导致其营养物质消耗最少, 故含量最高. 对乳酸进行比较: 在 RWV 接种的最初阶段, 由于成骨细胞在内部流体应力的刺激下代谢活动快速增加, 导致乳酸的含量不断升高, 但是随着 RWV 内

部培养基的内外循环和部分更换, 而细胞的代谢产物如乳酸、氨等也通过此循环和更替被进一步稀释, 乳酸的含量便相对趋于平稳; 而 Spinner flask 中乳酸的含量也因为相同的原因含量最低. T-flasks 构建体系因在获得营养、物质交换和代谢产物排出等多方面都存在不足和缺陷, 其乳酸含量也随着时间的增加而相对较高. 由于 RWV 所具有的极佳的物质循环方式, 使得营养物质可以参与有效的循环并得到充分的利用, 代谢产物及时地排出, 成骨细胞在该构建体系中表现出良好的增殖能力.

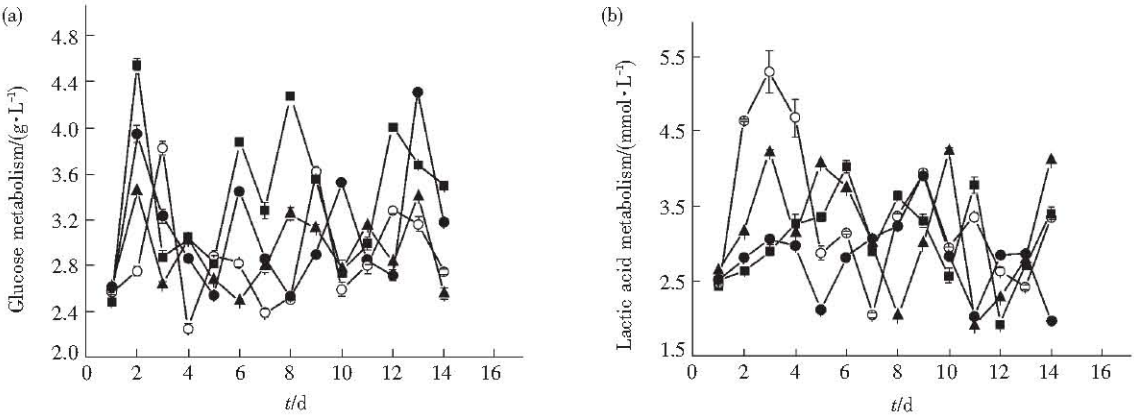


Fig. 7 Metabolism of glucose and lactic acid in different culture fashions

(a) Glucose; (b) Lactic acid. ●—●: Static-low; ▲—▲: Static-high; ■—■: Spinner flask; ○—○: RWV.

2.7 pH 值与渗透压

动物细胞及组织在体外培养, 必须具备适宜的条件. 其中包括营养物质、O₂ 和 CO₂ 的比例、渗透压、pH 值、温度和湿度等. 因此渗透压和 pH 值, 也是生物反应器内大规模扩增培养细胞和三维构建组织工程产品所必须考虑的重要影响因素.

从图 8a 可以看出, 在组织工程骨的培养过程中, 转瓶和 T-型瓶中培养基的 pH 值基本集中在 7.3~7.6 之间, 且随着培养基的部分更换而产生上下浮动. 而在 RWV 中, 由于最初所生成的代谢产物如氨等大量聚集, 使得其 pH 值亦呈现上升趋势, 但在培养的中后期, 由于 RWV 中培养基的内外循环, 可以将培养体系所产生的代谢产物及时排出培养室, 从而使得 pH 值基本稳定在 7.7 左右.

有研究表明, 细胞贴壁的最优 pH 较其生长时的最优 pH 低很多, 因此在 RWV 中三维构建工程化组织也要求实现从接种到培养阶段的 pH 值持续上升^[16,17].

大多数体外培养的动物细胞对渗透压有一定的耐受性, 但幅度不宜变化过大. 因此在不同的培养体系中, 渗透压是否会随着培养条件的改变而发生大幅度的变化, 也是我们所要重点考虑的问题. 如图 7b 所示, 不同方式培养条件下培养基的渗透压变化幅度很小. 这表明在 RWV 中, 培养基的渗透压值不会随着培养过程中培养基的部分更换和内外循环而发生较大的变化, 表现出该培养体系的稳定性.

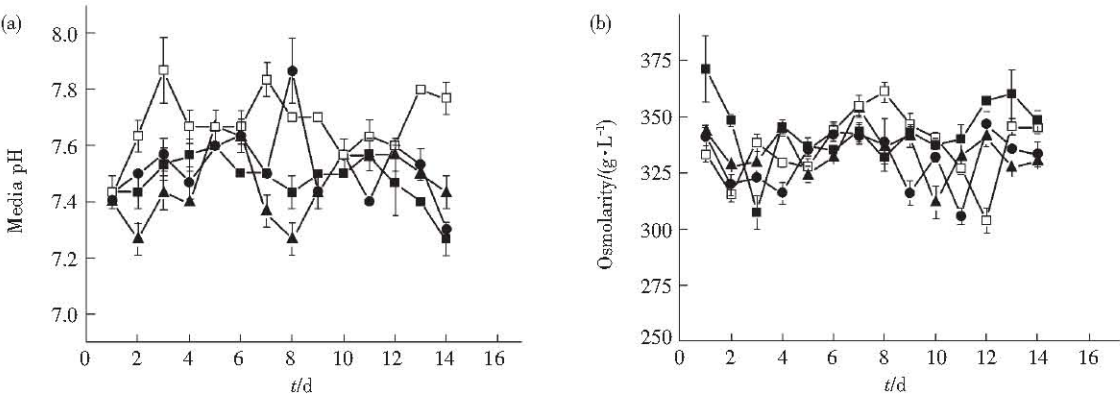


Fig. 8 Comparison of media's pH and osmolarity in different culture fashions

(a) pH value; (b) Osmolarity. ●—●: Static-low; ▲—▲: Static-high; ■—■: Spinner flask; □—□: RWV.

2.8 碱性磷酸酶检测

碱性磷酸酶是成骨细胞分化成熟的重要标志之一^[18], 是描述成骨细胞必不可少的参数. 它能够水解葡萄糖单磷酸盐, 形成不溶性的磷酸三钙并不断去除结晶毒物焦磷酸, 使骨质中的晶核不断生长钙化, 所以 ALP 可以反应成骨细胞合成 I 型胶原及形成骨基质的能力, 是成骨细胞典型的标志酶. 如图 9 所示, 在 RWV 和 T-flasks 内培养组织工程骨构建物的初期, 构建物内成骨细胞 ALP 的表达均呈明显的升高趋势, 至培养中期其 ALP 的含量开始下降并开始生成矿化结节^[19], 这表明成骨细胞的增殖活动稳定后, 即转为以分泌细胞外骨基质为主. 但在 Spinner flask 中, 构建物中成骨细胞分泌的 ALP 含量却一直较低. 这和实验所观察到的不同培养方式中细胞在支架材料上黏附并分泌胞外基质和形成矿化结节的情况相符合.

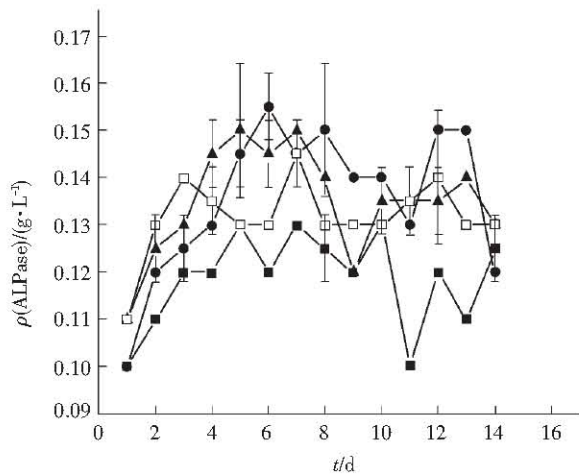


Fig. 9 Comparison of osteoblast's alkaline phosphatase activity in different culture fashions

●—●: Static-low; ▲—▲: Static-high; ■—■: Spinner flask;
□—□: RWV.

3 讨 论

本研究对不同构建体系中 SD 大鼠成骨细胞黏附支架材料的整合性能及细胞新陈代谢情况进行了比较. 通过对扫描电镜 (SEM)、碱性磷酸酶 (ALP)、矿化结构和 AO/EB 双重荧光染色等生物学性能检测, 以及对培养过程中营养物质代谢情况进行了监控和分析后发现, 在 RWV 中培养的以 2 种密度接种所构建出的骨组织生长良好, 分泌大量胶原纤维, 并有矿化基质和新骨样组织形成. 通过

RWV 内部流体对流所产生的应力刺激, 可提高成骨细胞碱性磷酸酶的活性表达, 并加速矿化结节的形成, 从而完成成骨细胞的快速增殖与分化以及工程化组织的三维构建.

本实验所采用的生物衍生骨支架材料具有良好的天然网状孔隙结构、细胞和组织相容性等特点, 其结构和组成符合生理要求并有利于成骨细胞黏附生长、增殖和分化, 为营养成分的渗透和血管化提供充足的内部空间和表面积, 细胞/支架结构物有利于钙质沉积从而发挥良好的传导成骨作用并最终形成功能性骨组织^[20]. 3 种构建体系中的成骨程度不同, 其成骨能力依次为 RWV > T-flasks > Spinner flask, 可以发现 RWV 能够提供最佳的三维生长和构建环境来刺激工程化组织的快速形成, 这与 Obradovic 和 Vunjak-Novakovic 等^[21-23] 在 RWV 中培养软骨和心肌组织的结论相似. 本研究的结果进一步证实, 成骨细胞在支架材料表面仍可保持其 ALP 活性及成骨能力. 这是因为 RWV 内整个培养室由电机驱动沿水平轴旋转, 细胞/支架材料复合体随容器一起旋转且不与室壁及他物相撞, 而且在整个培养系统中无机械推进器、气泡或搅拌器, 使破坏性应力减到最小, 同时 RWV 内液体的流动为层流, 而且是动态的, 因此与其他 2 种体系相比, RWV 培养的复合体具有更为活跃充足的营养物质和氧代谢, 其内部对流产生的流体力学刺激能够明显增加细胞增殖, 刺激细胞 DNA 的合成.

Botchwey 等^[24] 在 RWV 中利用微载体支架培养成骨细胞系 MC3T3 细胞, 可以保持成骨性细胞显型, 并且可增加细胞碱性磷酸酶表达和基质矿化. 接着他们又在该反应器中三维培养人成骨细胞, 并且对支架内的流体流动和水力培养期间的整联蛋白的早期表达进行了研究, 发现在此种培养条件下, 支架材料内部的成骨细胞伸展良好, 并且保持成骨细胞显型^[25]. Granet 等^[26] 在旋转壁式生物反应器中利用微载体悬浮培养成骨性细胞, 发现产生的细胞-载体复合物类似体内的骨结构, 有利于细胞增殖和分化. Saris 等^[27] 的研究表明, 外部流体力学刺激能够明显增加细胞增殖, 刺激细胞 DNA 的合成. 因为液体流动时产生的流体剪切力能对成骨细胞提供适当的机械应力刺激而促进其增殖, 使得 DNA 合成和总蛋白产物合成增加并通过 PGE2 途径将力学刺激转递到细胞内发挥调节作用, 同时表明 RWV 可以为三维组织的体外构建提供适宜的机械应力刺激和优良的培养环境.

本研究表明了骨组织工程化的现实可行性, 并为临床上解决骨缺损建立了一种多学科交叉的方法。

参 考 文 献

- Ren L, Tsuru K, Hayakawa S, *et al.* Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2002, **23** (24): 4765 ~ 4773
- Susan L, Ishaug-Riley, Crane-Kruger G M, *et al.* Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 2003, **19** (15): 1405 ~ 1412
- Crane G M, Ishaug S L, Mikos A G, *et al.* Bone tissue engineering. *Nat Med*, 1995, **12** (1): 1322 ~ 1324
- Vacanti C A, Vacanti J P. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cells transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *J Clin Plast Surg*, 1994, **21** (3): 445 ~ 451
- 宋克东, 刘天庆, 崔占锋, 等. 成骨细胞在旋转壁式生物反应器内的大规模扩增. 见: 邱天爽主编. 大连理工大学生物医学工程学术论文集, 第1卷. 大连: 大连理工大学出版社, 2003. 47 ~ 54
Song K D, Liu T Q, Cui Z F, *et al.* Large scale expansion of rat's osteoblasts in rotating wall vessel (RWV) bioreactor. In: Qiu T S, ed. *Proceedings on The Biomedical Engineering of Dalian University of Technology*, 1. Dalian: Dalian University of Technology Press, 2003. 47 ~ 54
- Aaron S G, Tiffany M J, Christopher D H, *et al.* Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 2001, **22** (11): 1279 ~ 1288
- 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 Tissue Cult Method*, 1992, **14** (2): 51 ~ 58
- 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 Cell Biochem*, 1993, **51** (3): 290 ~ 300
- 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社, 2001. 343 ~ 344
Xue Q S. *Principle and Technology In vitro Culture*. Beijing: Science Press, 2001. 343 ~ 344
- 杨志明. 组织工程. 北京: 化学工业出版社, 2002. 161 ~ 162
Yang Z M. *Tissue Engineering*. Beijing: Chemical Industry Press, 2002. 161 ~ 162
- Itoh F, Aoyagi S, Furihata-Komatsu H, *et al.* Clodronate stimulates osteoblast differentiation in ST2 and MC3T3-E1 cells and rat organ cultures. *Eur J Pharmacol*, 2003, **477** (1): 9 ~ 16
- Sun J S, Chang W H S, Chen L T, *et al.* The influence on gene-expression profiling of osteoblasts behavior following treatment with the ionic products of sintered β -dicalcium pyrophosphate dissolution. *Biomaterials*, 2004, **25** (4): 607 ~ 616
- Osano E, Kishi J, Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF- α -resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicology in Vitro*, 2003, **17** (1): 41 ~ 47
- Gherghi I C, Girousi S T, Voulgaropoulos A N, *et al.* Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta*, 2003, **61** (2): 103 ~ 112
- Gray C, Boyde A, Jones S J. Topographically induced bone formation *in vitro*: implications for bone implants and bone grafts. *Bone*, 1996, **18** (2): 115 ~ 123
- Ng Y-C, Berry J M, Bulter M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotech Bioeng*, 1996, **50** (6): 627 ~ 635
- Forestell S P, Kalogerakis N, Behie L A, *et al.* Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. *Biotech Bioeng*, 1992, **39** (3): 305 ~ 313
- Herbertson A, Aubin J E. Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures. *Bone*, 1997, **21** (6): 491 ~ 500
- Declercq H, Van den Vreken N, De Maeyer E, *et al.* Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials*, 2004, **25** (5): 757 ~ 768
- 杨志明, 李彦林, 解慧琪, 等. 生物衍生骨复合成骨细胞体内异位成骨研究. *中华创伤杂志*, 2001, **17** (8): 475 ~ 478
Yang Z M, Li Y L, Xie H Q, *et al.* *Chinese Journal of Traumatology*, 2001, **17** (8): 475 ~ 478
- Obradovic B, Carrier R L, Vunjak-Novakovic G, *et al.* Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotech Bioeng*, 1999, **63** (2): 197 ~ 205
- Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B, *et al.* Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res*, 1999, **17** (1): 130 ~ 138
- Carrier R L, Papadaki M, Rupnick M, *et al.* Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotech Bioeng*, 1999, **64** (5): 580 ~ 589
- Botchwey E A, Pollack S R, Levine E M, *et al.* Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J Biomed Mater Res*, 2001, **55** (2): 242 ~ 253
- Botchwey E A, Pollack S R, El-Amin S, *et al.* Human osteoblast-like cells in three-dimensional culture with fluid flow. *Biorheology*, 2003, **40** (1 ~ 3): 299 ~ 306
- Granet C, Laroche N, Vico L, *et al.* Rotating-wall vessel promising bioreactor for osteoblastic cell culture comparisons with other 3D conditions. *Med Biol Eng Comput*, 1998, **36**: 513 ~ 519
- Saris D B, Sanyal A, An K N, *et al.* Periosteum responds to dynamic fluid pressure by proliferating *in vitro*. *J Orthop Res*, 1999, **17** (5): 668 ~ 677

Three-dimensional Fabrication of Engineered Bone in Rotating Wall Vessel Bioreactor *

SONG Ke-Dong¹⁾, LIU Tian-Qing¹⁾ **, LI Xiang-Qin¹⁾,
CUI Zhan-Feng²⁾, GE Dan¹⁾, SUN Xiang-Yu¹⁾, MA Xue-Hu¹⁾

¹⁾ *Stem Cell and Tissue Engineering Laboratory, State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;*

²⁾ *Department of Engineering Science, Oxford University, Parks Road, Oxford OX1 3PJ, UK*

Abstract The osteoblasts were expanded in large-scale by microcarrier suspension culture in rotating wall vessel bioreactor (RWV), then the biological functions of the cells were detected by histomorphometry and the cells were seeded at 2×10^6 cells/ml and 1×10^6 cells/ml onto scaffolds respectively to culture for 2 weeks. The biological properties of the fabricated bone tissue were detected by inverted microscope, scanning electron microscope (SEM), alkaline phosphatase (ALP), von-Kossa staining on mineralized nodules and AO/EB fluorescence staining. Meanwhile the cells' metabolism of nutrients was monitored and analyzed during the whole culture process. The bone tissue fabricated in RWV with two different seeded cell densities grew well. Osteoblasts in the scaffolds secreted much collagen fibers and formed mineralized nodules and new osteoid tissue. It can be concluded that: With the stress stimulation inside the fluid in the RWV, the active expression of ALP can be increased, the formation of mineralized nodules can be accelerated. The rapid proliferation and differentiation of osteoblasts are possible and the three-dimensional fabrication of engineered bone could be realized.

Key words engineered bone, osteoblasts, bioreactor, scaffold, cell culture

* This work was supported by grants from The International Cooperation Project for National & Abroad Laboratory of The National Natural Sciences Foundation of China (2002008) and The Science & Technology Foundation of Liaoning Province (20022140).

** Corresponding author. Tel: 86-411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

Received: June 7, 2004 Accepted: June 30, 2004