细胞直接受控组装技术的实现与研究进展

颜永年① 刘海霞① 熊 卓① 程 捷① 王小红① 林 峰① 吴任东① 王常勇②

(①清华大学机械工程系激光快速成形中心, 生命科学与医学研究院生物制造研究所, 北京 100084. ②军事医学科学研究院组织工程中心, 北京, 100850. E-mail: dmeyyn@tsinghua.edu.cn)

组织器官损伤和功能障碍是全人类共同关注的问题[1], 如何从根本上解决组织器官的修复与重建, 是当前科学研究的热点. 上世纪末, 出现了细胞间接受控组装技术, 即在已成形支架上种植细胞的组织工程. 这一技术为人工器官的制造开创了一条崭新的道路, 但仅局限于某些组织, 如骨、皮肤和肌腱[2~5]等, 对于制造复杂的内脏器官则困难重重. 目前, 直接组装细胞成为一个活的预定义结构体的技术还没有完全实现[6~9].

从材料科学与制造科学的观点出发, 可将组织视为细胞和细胞外基质材料(ECMs——Extracellular Matrix)的复合体, 是一个细胞和其ECMs可进行物质和能量交换的开放系统[10]. 仅将大量细胞无序堆砌起来并不能构建具有功能的人工组织器官. 可见, 探寻并优化一种三维结构, 在计算机控制下实现细胞和ECMs的有序统一的空间排布, 使其形态和结构满足开放系统要求, 是实现具有大尺寸和特定功能的人工组织器官的关键.

本实验室提出了一种基于离散/堆积快速成形原理的细胞直接受控组装技术. 将细胞与生物相容性很好的水凝胶材料(37℃至 0℃之间)均匀共混作为原材料, 通过控制溶胶/凝胶相转变, 实现在成形支架的同时结合细胞. 这一技术可以被应用在按着解剖学的准确位置定点排布细胞以期获得生物学功能的复杂问题中[5].

具体实验方法及步骤, 用平衡液(0.09 mol/L NaCl tris-HCl, pH: 7.2~7.4)作为溶剂, 将 10%(*w*/*v*)明胶(购于Sigma)溶液过滤灭菌, 10%(*w*/*v*)海藻酸钠(购于Sigma)溶液70℃, 间歇灭菌 30 min, 按体积比 1∶1 混合均匀以备用. 将单个心肌细胞(由军事医学科学院组织工程中心提供)与已备溶液均匀混合, 得到细胞密度为 2×10^8 个/mL[1]的细胞-明胶-海藻酸钠溶液混合物. 取 0.5 mL共混物注入特制的容积 1 mL喷腔中. 10℃下根据预先设计的结构和规划的路径, 将混合溶胶通过细胞组装机(本实验室研制, 图 1)组装成形. 得到具有一定孔隙结构的三维结构体(图 2). 将这一含有细胞的结构体浸入到 0.45 mol/L灭菌的$CaCl_2$溶液中浸泡 5 min交联固化, 生理盐水冲洗, 37℃, 5%CO_2环境下培养.

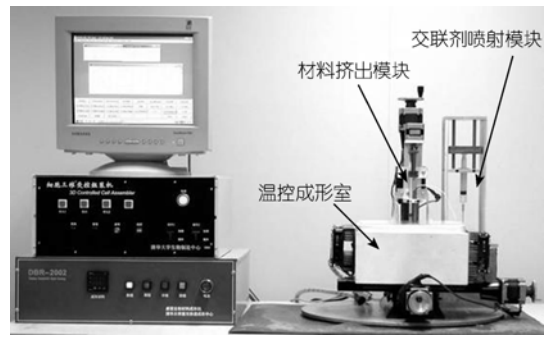


图 1　细胞组装机

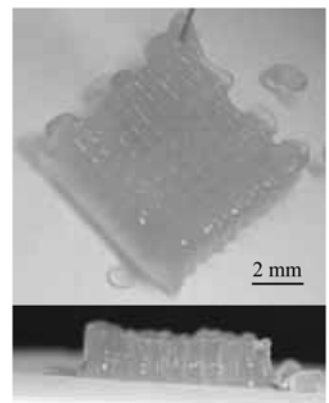


图 2 含有心肌细胞的类组织结构体
(10 mm×10 mm×3mm)

明胶-海藻酸钠共混复合材料既避免了单纯物理交联后的热稳定性和力学稳定性不高的问题, 同时也避免了单纯化学交联后生成光滑包络面使后继材料无法粘结的成形困难. 被包裹的明胶给细胞的生长提供了一种溶胶态的环境, 化学交联的海藻酸盐网络是支撑结构, 提供暂时力学支持的同时, 也起到保持组织形成的空间结构. 这一含有细胞的结构体事实上是一种液固相相结合的亚稳态结构, 随着细胞的增殖和明胶的不断溶出, 最终达到细胞与 ECMs 之间结构上的平衡.

挤出成形后, 细胞形态仍然很好. 取成形后结构

体的 1/10 分成 5 个样本，分别用 0.1mol/L 柠檬酸钠溶液完全溶解，离心(1000×g)后去上清，添加 PBS，经 0.25%台盼蓝染色计数，细胞存活率均值为 90%. 试验结果显示水凝胶材料起到保护细胞的作用，缓解压力的同时保持细胞在受压过程中不失水.

图 3 是培养 5 d 后的光学显微照片，可以看到，细胞体积明显增大，出现大而圆的单个、双个甚至多个细胞核，胞浆丰富，部分细胞处于分裂相.

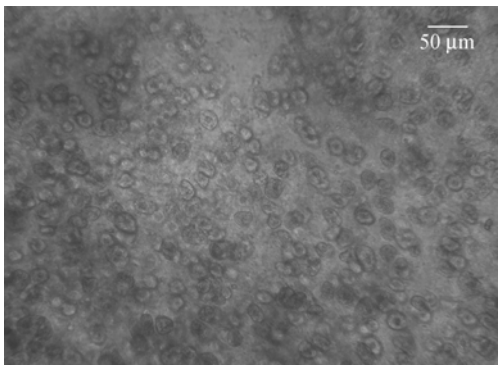


图 3 培养 5 d 结构体内部细胞光学显微镜照片

图 4 是培养 7 d 后的组织切片(6 μm)HE 染色照片，可以明显的看到细胞的分裂相. 实验结果说明，组装成形的这种模拟人体组织结构的细胞三维环境，不会引起细胞的不适应，能高效的确保细胞的生存、分裂和分化. 另外，对软骨细胞、肝细胞、成纤维细胞也进行了上述细胞受控组装实验，都得到了良好的结果.

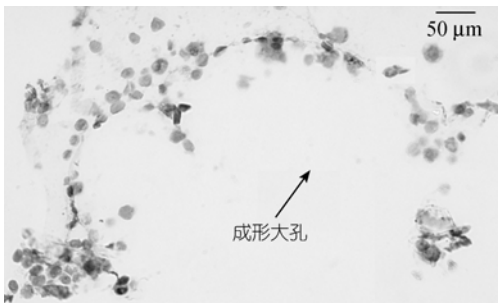


图 4 培养 7 d 后的组织切片照片

本研究表明，采用基于离散/堆积快速成形的细胞直接三维受控组装技术，通过合理的设计材料组分和配比，精确的控制成形环境温度，分步固化成形，可以实现细胞-材料共混物的直接成形，制造活的三维结构体. 主要优点有:

(1) 成形过程易于控制，可以很好的保持生物材料的生物活性和细胞的活性.

(2) 制造复杂形状方面柔性高，结构体的孔隙尺寸和相互贯通性可以得到很好的控制，有利于细胞营养和新陈代谢物质的交换. 通过设计和调整喷头，可以实现多种细胞的定点排布.

(3) 采用复合材料，通过调整材料配比和影响降解的参数(温度、pH 值、交联剂浓度及交联时间等)达到细胞增殖与材料降解相匹配.

目前的研究工作主要是关注于哺乳动物细胞挤出成形后的存活性，下一步着重研究细胞基质材料受控组装后的三维结构体长期稳定性及向特定功能类组织的形成.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30440043)和清华大学基础研究基金(批准号: Jc2003015)资助项目.

参 考 文 献

1 Joseph P, Vacanti J P. Tissue and organ engineering: can we build intestine and vital organs? Journal of Gastrointestinal Surgery, 2003, 7: 831~835[DOI]

2 Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. Science, 1993, 260: 920~926

3 Tatsuya S, Masayuki Y, Akihiko K, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. Biomaterials, 2003, 24: 2309~2316[DOI]

4 Drury J L, Mooney D J. Hydrogels for tissue engineering:scaffold design variables and applications. Biomaterials, 2003, 24: 4337~51[DOI]

5 Sun W, Darling A, Starly B, et al. Computer aided tissue engineering Part I: overview, scope and challenges. Biotechnol Appl Biochem, 2003, 39(1): 29~47

6 Xu T, Jin J, Gregory C, et al. Inkjet printing of viable mammalian cells. Biomaterials, 2005, 26: 93~99[DOI]

7 Nishimura I, Garrell R L, Hedrick M. et al. Precursor tissue analogs as a tissue-engineering strategy. Tissue Engineering, 2003, 9: 77~89[DOI]

8 Landers R, Hübnerb U, Schmelzeisenb R, et al. Rapid prototyping of scaffolds from thermoreversible hydrogels and tailored for application in tissue engineering. Biomaterials, 2002, 23: 4437~4447[DOI]

9 Mironv V Boland T, Trusk T, et al. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends in Biotechnology, 2003, 21(4): 157~161

10 姚康德, 王向辉, 侯信. 组织工程相关生物材料. 天津理工学院学报, 2000, 16: 1~5

(2004-12-09 收稿, 2005-03-24 收修改稿)