

微重力组织工程的产生与发展^{*}

江青艳 张守全 傅伟龙

(华南农业大学动物科学系 广州 510642)

摘要 概述了微重力组织工程的产生与发展趋势。动物细胞培养技术为研究细胞的形态、结构、功能与遗传特性,揭示细胞分裂、组织分化、器官组织形成等生命科学领域的基本问题发挥了巨大作用;大规模动物细胞培养技术已广泛应用于生物制药、生产疫苗以及生物学诊断试剂。但是,常规培养技术无法实现由细胞重建组织这一构想。微重力组织工程利用旋转培养器产生的微重力环境与动物细胞培养技术相结合,使组织重建成为可能,成为生命科学发展史上的一个新的里程碑。

关键词 细胞培养 微重力 组织工程

动物细胞培养技术自建立以来,在细胞形态学、细胞生物学、细胞遗传学等研究领域得到广泛应用,为揭示细胞的形态、结构、功能与遗传特性,进一步认识细胞分裂、组织分化、器官组织形成等生命科学的基本问题发挥了巨大作用,促进了生命科学的迅猛发展。长期以来,研究者们一直致力于由离体细胞重建组织,实现人工构建组织、器官的梦想,但是,由于离体环境与在体环境的巨大差异,以及对细胞分化、组织微环境、细胞之间的相互作用等问题的认识不足,重建组织的研究未获突破。进入 90 年代,随着生命科学研究的深入和多学科的渗透与交叉,在空间生命科学研究领域,将动物细胞培养技术与微重力环境相结合,终于使重建组织的研究获得突破性进展,开创了组织工程研究的新领域——微重力组织工程。本文概述了微重力组织工程的产生、发展、作用及其意义。

1 动物细胞培养技术的简单回顾

动物细胞培养技术的历史可以追溯到 100 年以前。Roux(1885)用温生理盐水在体外培养鸡胚组织并使之存活了数月,被认为是组织培养的萌芽。随后, Jolly(1903)、Beebe(1906)分别培养了蝶螈白细胞和狗淋巴细胞。这些早期的培养技术虽然粗陋,却为以后的组织和细胞培养技术的建立提供了基础。

从 20 世纪初至 20 世纪中叶,动物细胞的基本培养技术逐步建立起来^[1]。这一阶段的代表性工作有:Harrison(1907)创建了盖片覆盖凹窝玻璃悬滴培

养法; Carrel(1912)首次采用传代培养;1924 年, Maximow 又把 Carrel 的悬滴培养法改良为双盖片培养,使之更易于传代和减少污染。Carrel 于 1923 年又设计出卡氏瓶培养法,进一步扩大了组织的培养空间。50 年代后,组织培养进入了一个迅猛发展阶段。1951 年 Pomerat 设计出灌流小室,实现了培养液的连续更新。Dulbecco 于 1957 年采用胰蛋白酶消化处理,获得了单层细胞培养。单层细胞培养技术的建立,极大地推动了细胞培养技术的发展,并成为此后细胞培养普遍采用的技术,用单层细胞法建立了许多细胞系(cell line)。

60 年代以后,一大批新的培养器皿、培养装置和合成培养基等相继问世,细胞培养技术逐步向专门化、规模化方向发展。现代细胞培养技术可以分为单层细胞培养技术、悬浮细胞培养技术、固定化细胞培养技术和采用动物细胞培养生物反应器的大规模细胞培养技术。单层细胞培养主要针对大多数动物细胞需要附着于带正电荷的固体或半固体表面的特性,适用于成纤维细胞、上皮细胞及 HeLa、Vero、BHK、CHO 等细胞系;悬浮细胞培养适用于一些来源于血液、淋巴组织的细胞,许多肿瘤细胞以及某些转化细胞;固定化细胞培养则是采用吸附、共价交连、微囊、包埋等方法将细胞固定在支持物上,或形成细胞絮结,或将细胞嵌入微囊或高分子聚合物的网络中,对贴壁依赖性细胞与非贴壁依赖性细胞均适用。动物细胞培养生物反应器以其培养容量大(10 - 10000 L)而被应用于细胞产物的制备与生产。普遍采用的生物反应器主要有:空气提升式生物反应器、搅拌槽式生物反应器、中空纤维管式生物反应器、陶

^{*} 国家 863 - 2 资助项目(863 - 2.7.2.17)

质矩形蜂窝式生物反应器、流化床式生物反应器、固定床式生物反应器等。目前,采用动物细胞培养生物反应器的大规模细胞培养技术的热点集中在微载体培养技术、中空纤维培养技术和微囊化技术。

2 由细胞重建组织——常规培养无法解决的难题

尽管动物细胞培养技术在生命科学领域的研究与产业化过程中发挥了巨大作用,但是,长期以来,许多研究者一直期待并致力于培养技术的另一突破——由离体细胞重建组织。虽然选用了多种不同类型的细胞,提取以及人工合成了不同的培养基质、采用了各种可能的培养条件的组合,重建组织的研究一直未能突破。

现在认为,采用常规方法无法实现完全意义上的组织重建,即由离体细胞完全在体外重建组织,其主要原因是:采用静止培养时,由于培养容器中的营养物质、气体及代谢产物浓度不均一,因而细胞只能呈单层生长,细胞密度低,无分化现象;采用搅拌式发酵罐培养虽然可以克服静止培养的缺点,但由于培养液被搅动时产生的高剪切力,极易导致细胞损伤,并抑制细胞的组织特异性分化。搅拌培养一般只能获得直径在 1mm 以下的多细胞球状体,细胞呈现轻度分化,细胞球状体中心常出现细胞坏死。更为重要的是,在常规培养方法中,由于重力的作用,分离的细胞在培养液中自然沉降,因而限制了细胞与细胞、细胞与基质之间的三维随机组合与共同定位(co-localization),细胞无法实现类似胚胎发育过程中的三维接触和按极性的定向排列,因此只能呈现二维生长,在培养器皿表面平铺,不能形成立体结构。

3 转壁式生物反应器的设计构想及意外收获

正当组织重建的研究处于艰难之时,80 年代末,美国航空航天局(National Aeronautics and Space Administration, NASA)在开展空间生物学试验时,为了保护细胞培养物免遭航天飞机起飞与降落时产生的巨大剪切力的损伤,由 John Space Center 的 Ray Schwarz 等设计研制出一种转壁式生物反应器(Rotating Wall Vessel Bioreactor, RWVB)。采用 RWVB 进行地基试验时,意外地发现离体细胞在 RWVB 中呈现高密度聚集,并形成较大的组织样结构^[2]。这一令人振奋的结果促使 NASA 进一步开展了微重力条件下细胞培养的研究,由此揭开了微重力组织工程的新篇章。

RWVB 的核心结构是由两个同心圆柱体构成的旋转培养装置。将细胞与培养液置入内、外圆柱体之间,整个装置绕纵轴旋转,根据细胞或培养物的大小调节容器的旋转速度,使培养物长时间保持悬浮状态。由于在旋转过程中正常的重力向量被持续随机化,使细胞处于一种模拟自由落体状态,在一定程度上类似于微重力环境,因此称之为模拟微重力,以与在太空飞行时的微重力环境相区别。据计算, RWVB 产生的模拟微重力平均为 $10^{-2}g$,在近地轨道空间站飞行时的微重力为 $10^{-4} - 10^{-6}g$ 。

RWVB 具有如下特点:低剪切力对细胞无机械损伤,充氧不引起涡流,物流转移率高;随机化的重力向量(randomized gravitational vectors)可能直接影响基因表达,或者间接促进细胞的自分泌/旁分泌,有利于细胞间的信号转导^[3];细胞在 RWVB 中有一定程度的三维空间自由,有利于细胞—细胞、细胞—基质之间按组织学特性相互接触,有利于细胞分化,且不易形成坏死中心^[4]。RWVB 的上述特点使之成为模拟微重力环境的理想装置。

4 微重力组织工程的研究现状与发展趋势

微重力组织工程(Microgravity Tissue Engineering)是近年来由美国空间生物技术研究人員开创的一个独特研究领域^[5],其核心技术是建立动物细胞的三维(Three Dimension)培养体系^[6]。研究表明,利用 RWVB 模拟微重力培养环境,可以减少培养液对细胞产生的机械剪切力,增加细胞营养的补充,加速代谢产物的排除,从而改善离体细胞的培养条件,使在普通培养条件下只能呈二维贴壁生长的哺乳动物细胞表现出三维增殖与细胞分化,这类分化的细胞团可进一步形成有功能的组织块^[7]。这一技术上的重大突破,不仅对研究细胞之间的相互作用、细胞分化以及组织形成等生命科学领域的基本问题提供了有效的实验模型,而且可利用离体细胞人工构建有功能的活体组织,为千百万病人提供器官或组织移植的来源,在医学上有极其重要的应用前景。

建立哺乳动物细胞三维培养体系的关键是:提供模拟微重力环境。由于微重力环境需要依靠航天飞行器提供,这一条件受到极大限制。为此,目前国外的动物细胞三维培养研究大多采用 RWVB。选择适当的细胞类型。细胞类型的选择一般以二维培养技术成熟,而且具有良好的应用前景为原则;为细胞贴附生长提供可生物降解的三维高分子支架(Three Dimension Polymer Scaffold)。由于大多数哺乳

动物细胞为贴壁依赖型细胞,在正常的活体组织内,这些细胞主要以细胞外基质(Extracellular Matrix)作为支持物,而且细胞的生长、分化及增殖均与细胞外基质密切相关;提供适宜的培养环境。在微重力环境下,由于细胞的代谢速率显著高于普通二维培养的细胞,必须提高培养液中的溶氧和葡萄糖的浓度^[8]。此外,培养容器的旋转速度、培养液的更新速率等也对细胞的生长产生重要影响。

1994年,美国航空航天局(NASA)资助麻省理工学院(MIT)开展了微重力条件下哺乳动物细胞三维培养的研究。Freed等^[9]首次建立了微重力条件下小牛软骨细胞的三维培养模型,并获得了与体内软骨组织形态和功能相似的组织块。这一成果促使NASA在随后的四年中连续以高强度资助十几所大学和研究机构广泛开展哺乳动物和人体细胞的三维培养研究。迄今已取得进展有小牛软骨细胞、狗软骨细胞、大鼠心肌细胞、大鼠唾液腺上皮细胞、卵泡瘤细胞、人的胰岛细胞以及胸腺的器官培养、肝细胞等。其中以软骨细胞的三维培养技术较为成熟,目前已进入临床试验阶段^[10]。在微重力条件下的心肌模型也成功建立^[11],并开展了电生理学研究^[12]。上述研究中采用的三维高分子支架多数是从相应组织中提取出细胞外基质,再加工成三维结构。例如,采用软骨组织中提取的胶原培养小牛软骨细胞得到软骨组织块^[13];采用基膜提取物—基质胶(Matrigel)或层粘连蛋白培养唾液腺细胞可形成腺泡样球状结构^[14]。此外,人工合成的高分子聚合物如聚乙醇酸(Polyglycolic acid, PGA)、Cytodex-3以及P-15(一种合成的类胶原肽)^[15]等也被用作构建高分子支架的材料。最近,Qiu等^[16]以可降解的中空生物陶瓷微球作为支架,在RWVB中培养成骨细胞的前体细胞,获得了三维骨组织,并且可用于骨组织的移植。Slentz等^[17]研究了旋转培养对肌细胞增殖与分化的影响,结果表明在RWVB中肌细胞的增殖速度、总细胞蛋白含量及增殖细胞的核抗原表达均明显增加。Low等^[18]发现小鼠神经前体细胞在RWVB中形成的球状体表现出器官样结构,并且可检测到神经细胞特征抗原的表达。

应该看到,微重力组织工程研究还存在诸多尚未克服的难题。首先,RWVB提供的只是模拟微重力,并非完全意义上的微重力环境,在旋转培养过程中还存在粒子碰撞、剪切力等因素的影响。另一个主要问题是,由于不同组织、细胞的特性不同,需要提供的支架材料各不相同,而且,支架材料的降解速

度必须与细胞或组织的生长速度相匹配,后者实际上已成为微重力组织工程研究的最大限制因素,尤其是对内脏器官的组织工程研究。此外,微重力环境下细胞与基质相互作用的特点尚不清楚。Sastry等^[19]在培养淋巴细胞时发现,RWVB提供的培养条件改变了淋巴细胞表面的分子定向(orientation),使细胞增殖速度及细胞功能产生变化,但是,微重力条件改变细胞分子定向的机制仍有待研究。从长远目标来看,应用微重力组织工程技术所构建的组织或器官最终在医学临床上得以应用还存在许多需要解决的问题。

目前,世界宇航大国如美国、俄罗斯等均把微重力生物技术研究,尤其是组织工程技术研究作为其空间生命科学的研究热点。国内现已开展软骨细胞、肝细胞和杂交瘤细胞的三维培养研究。可以预见,哺乳动物细胞三维培养体系的成功建立,将为人类器官或组织移植提供丰富的材料,为空间生物技术的产业化开辟新途径。

参考文献

- [1] 鄂征主编. 1997. 组织培养和分子细胞学技术, 北京出版社, 北京. 5 - 9.
- [2] Schwarz R P., Goodwin T J., and Wolf D A., J. Tissue Culture Methods. 1992, 14:51 - 58.
- [3] Licato L L. and Grimm E A., Immunopharmacology, 1999, 44 (3):273 - 279.
- [4] Freed L E., Pellis N., and Searby N., et al., Grav. Space Biol. Bull. 1999, 12(2):57 - 66.
- [5] Vunjak Novakovic G., Obradovic B., and Martin I. et al., Biotechnol. Prog. 1998, 14(2):193 - 202.
- [6] Freed L E., Langer R., and Martin I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1997, 94(25):13885 - 13890.
- [7] Freed L E., Hollander A P., and Martin I., et al., Exp. Cell Res. 1998, 240(1):58 - 65.
- [8] Obradovic B., Carrier R L., and Vunjak-Novakovic G. V. et al., Biotech. Bioeng. 1999, 63:197 - 205.
- [9] Freed L E., Vunjak Novakovic G. Biotechnol. Bioeng. 1995, 46 (4):306 - 313.
- [10] Freed L E., Martin I., and Vunjak-Novakovic, G. Clin. Orth. & Related Res. 1999, 367:S46 - S58.
- [11] Carrier R., Papadaki M., and Rupnick M. et al., Biotech. Bioeng. 1999, 64:580 - 589.
- [12] Bursac N., Papadaki M., and Cohen R. J. et al., Am. J. Physiol. 1999, 46:433 - 444.
- [13] Riesle J., Hollander A. P., and Langer R. et al., J. Cell. Biochem. 1998, 71:313 - 327.
- [14] Lewis M L., Moriarty D M. and Campbell P S. J. Cellular Biochemistry, 1997, 51(3):265 - 271.

(下转第32页)

- 485 - 490.
- [3] 阎锡蕴,田波. 科学通报,1997,42(12):1242 - 1248.
- [4] Adams G. P. , Schier R. Journal of Immunological Methods , 1999 , 231 :249 - 160.
- [5] Waterhouse P. Griffith A. D. , Johnson , K. S. , Winter G. Nucleic Acids Res. 1993 , 21 :2265 - 2266.
- [6] Vaughan T. J. , Williams A. J. Pritchard K. , et al. Nature Biotechnology , 1996 ,14(3) :309 - 314.
- [7] Nissim A. , Hoogenboom H. R. , Tomlinson I. M. , et al. The EMBO Journal , 1994 , 13(3) :692 - 698.
- [8] Griffiths A. D. Williams S. , Hartley O. , et al. The EMBO Journal , 1994 ,13(14) :3245 - 3260.
- [9] Sblattero D. , Bradbury A. , Nature Biotechnology , 2000 ,189(10) : 75 - 80.
- [10] Hoogenboom H. R. Trends in Biotechnology. 1997 ,15:62 - 70.
- [11] Schier R. , McCall A. , Adams G. P. , et al. J. Mol. Biol. 1996 , 263 :551 - 567.
- [12] Hemminki A. , Niemi S. , Hoffren A. M. , et al. Protein Engineering , 1998 ,11(4) :311 - 319.
- [13] Marks J. D. , Griffiths A. D. , Malmqvist M. , et al. Bio/Technology , 1992 ,10:779 - 783.
- [14] Schier R. , Bye J. , Apell G. , et al. J. Mol Biol , 1996 ,255 :28 - 43.
- [15] Rader C. , Cheres D. A. , Barbas C. F. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 1998 ,95:8910 - 8915.
- [16] Saviranta P. , Pajunen M. , Jauria P. , et al. Protein Engineering , 1998 ,11(2) :143 - 152.
- [17] Low N. M. , Holliger P. , Winter G. , J. Mol. Biol. ,1996 ,260 : 359 - 368.
- [18] Osbourn J. K. , Field A. , Wilton J. , et al. Immunotechnology , 1996 ,2:181 - 196.
- [19] Bruin R. de. , Spelt K. , Mol J. , et al. Nature Biotechnology , 1999 ,17(4) :397 - 399.
- [20] Malmborg A. C. , Borreback C. A. K. Journal of Immunological Methods. 1995 ,183:7 - 13.

(接第 39 页)

- [15] Bhatnagar R S. , Qian J J. , and Wedrychowska A. et al. , Tissue Eng. 1999 , 5 :53 - 65.
- [16] Qiu Q Q. , Ducheyne P. , and Ayyaswamy P S. et al. , In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal , 2001 , 37 : 157 - 165.
- [17] Slentz D H. , Truskey G A. , and Kraus W E. et al. , In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal , 2001 , 37 :148 - 156.
- [18] Low H P. , Savarese T M. , and Schwartz W J. et al. , In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal , 2001 , 37 : 141 - 147.
- [19] Sastry K J. , Nehete P N. , and Savary C A. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal , 2001 , 37 :203 - 208.

The Foundation and Development of Microgravity Tissue Engineering

Jiang Qingyan Zhang Shouquan Fu Weilong

(Department of Animal Science , South China Agricultural University , Guangzhou 510642)

Abstract The Foundation and Development of Microgravity Tissue Engineering was summarized. Animal cell culture techniques played an important role in the studies of the structure and function of cells , and tissue differentiation and formation. Large scale cell culture was widely applied in biological pharmacy and the production of vaccines and diagnostic reagents. The reorganizing of cells to tissues could not be realized by conventional cell culture , while the microgravity tissue engineering made it possible and became a milestone in life science.

Key words Cell culture , Microgravity , Tissue engineering