

使用旋转式生物反应器体外扩增人表皮细胞 *

晁 洋¹ 倪 华¹ 兰青艳¹ 李 娟¹ 王卫华¹ 金 岩^{1△}

(第四军医大学口腔医学院组织病理科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:使用 Cytodex-3 微载体和高截面纵横比的旋转式生物反应器容器作为培养系统大规模扩增人表皮细胞(hECs)。方法:使用中性蛋白酶和胰蛋白酶-EDTA 两步法从人皮肤中分离出人表皮细胞,使用 DIL 标记细胞后结合微载体后在旋转式生物反应器(RCCS)中培养。细胞贴附微载体的生长状态使用倒置显微镜、扫描电镜观测。并且分析细胞群体倍增时间来比较微重力培养与平面培养的体外增殖能力差异。结果:在旋转式生物反应器的微重力培养体系中,人表皮细胞能快速贴附到微载体表面,在培养过程中达到很大的细胞密度,并且表现出很强的增殖能力和细胞活性。结论:使用旋转式生物反应器和微载体悬浮培养人表皮细胞,是大量制备皮肤组织工程种子细胞的一种有效方法。

关键词 旋转式生物反应器;微载体;人表皮细胞

中图分类号:Q813 R318.08 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)13-2409-04

Amplification of Human Epidermal Cells by a Rotary Bioreactor in Vitro*

CHAO Yang¹, NI Hua¹, LAN Qing-yan¹, LI Juan¹, WANG Wei-hua¹, JIN Yan^{1△}

(1 Department of Histopathological dentistry, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, People's Republic of China)

ABSTRACT Objective: We attempted to produce human epidermal cells (hECs) on a large scale by Rotary Cell Culture System (RCCS). In this cultural system we used Cytodex-3 microbeads as microcarriers and high aspect ratio vessel RCCS as cultural system. **Methods:** The hECs were obtained from human skin by using the method of digesting human foreskin with Dispase II and Trypsin-EDT and cultured in vitro and labeled with DIL, then combined with Cytodex-3 in RCCS. The characteristics of hECs combined with microcarriers were observed with Inverted microscope, and scanning electronic microscope (SEM). The proliferative capacities of microgravity cultivation and routine cultivation were compared by group doubling time. **Results:** Our results showed that hECs rapidly attached to the microcarriers in the RCCS, achieving high cell densities. hECs cultured on the microbeads in the RCCS remained actively proliferating potentials. **Conclusion:** Using biological reactor and microcarriers culture human epidermal cells is a kind of effective method for preparation a large number of seed cells for tissue engineering.

Key words: Rotary Cell Culture System (RCCS); Microcarriers; hECs

Chinese Library Classification(CLC): Q813 R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)13-2409-04

前言

随着细胞培养技术的提高,对皮肤相关细胞的培养,特别是人表皮细胞的培养,有了很大的进展^[1]。在适宜的培养条件下,单个细胞在培养中不断增殖,逐渐融合成片状,形成了类似表皮的上皮组织。这使得在较短的时间里,用大量表皮细胞培育成小片状的上皮组织成为可能。临床工作中,外科医生和细胞生物学家们也大量培养自体表皮细胞并用来修复皮肤缺损的病人。表皮细胞培养技术也从使用含血清和滋养层的培养方式,到不含血清、滋养层的培养方式。培养方法的发展也促进了临床应用,从最初的细胞悬液移植到自体异体细胞膜片移植,以及表皮细胞生物材料复合物移植^[2]。培养和移植方法的发展使人们在治疗大面积皮肤缺损方面看到了希望^[3]。因此,将微载

体培养技术应用到贴壁依赖型细胞的大量培养^[4],并提供足够数量的种子细胞^[5],可以使组织工程皮肤的临床应用达到一个新的水平。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

微载体 Cytodex-3 (GE Healthcare 公司,USA); 旋转式生物反应器 (Synthecon 公司,USA); k-sfm 培养基、EpiLife 培养基、胎牛血清、胰酶(Gibco 公司,USA); 二甲基亚砜(DMSO,杭州四季青)、平底 6 孔培养板(Nunc 公司,USA); 倒置相差显微镜及照相系统(Olympus 公司,JPN); 70 um 细胞筛网(Falcon 公司,USA); 扫描电子显微镜(Hitachi 公司 S-3400, JPN)。

1.2 人表皮细胞的分离培养及扩增

* 基金项目:国家 863 计划项目资助(2006AA02A119)

作者简介:晁洋(1979-)男,硕士研究生,主治医师。主要研究方向:口腔组织工程与再生医学 caffeyn@foxmail.com

△通讯作者:金岩 E-mail: yanjin@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-03-04 接受日期:2011-03-30)

获取新生儿包皮切除术后组织,用手术剪剪成 2 mm×5 mm 的长条形,在 4℃ 下用含青霉素和链霉素的 PBS 反复冲洗数次,剪去多余的脂肪和肌肉组织,用中性蛋白酶 4℃ 消化过夜,用镊子分离表皮层和真皮层,将剥下的表皮层组织收集后剪碎成糊状,用质量浓度 2.5 g/L 胰蛋白酶在 37℃ 消化 15min,使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化,轻柔吹打成均匀悬液,70μm 细胞筛网过滤,离心收获其中的表皮细胞,接种于培养瓶中,用 k-sfm 培养液进行原代培养,从第二代起使用 EpiLife 培养液培养,取 3~5 代培养扩增后的表皮细胞使用。

1.3 DiL 标记人表皮细胞

细胞示踪剂 DiL(DiL,细胞膜红色荧光探针),是一种亲脂性膜染料,可以与磷脂双层膜结合后逐渐使整个细胞的细胞膜被染色,DiL 在进入细胞膜之前荧光非常弱,仅当进入到细胞膜后才可以被激发出很强的红色荧光。DiL 的激发光谱和发射光谱:最大激发波长为 549nm,最大发射波长为 565nm。在 25℃ 条件下,用质量浓度 2.5 g/L 胰酶消化对数期生长的细胞,用 PBS 洗涤两遍,离心 5min,小心吸去上清液,加入 2ml 无血清 DMEM 培养液,避光环境下加入浓度 100μM 的 DiL 溶液 100μL,吹打均匀,置 37℃ 10min 后离心,用含血清 DMEM 洗涤两遍后制成细胞悬液。吸取 100μL 悬液在荧光显微镜下检查标记的表皮细胞染色效果和荧光强度,并观察细胞的活力。

1.4 Cytodex-3 微载体和旋转式生物反应器的预备

Cytodex-3 微载体的最适宜培养密度为 5g/L。按照实验设计需求,称取数份 0.1g 和 0.3g Cytodex-3 微载体,用不含钙镁离子的 PBS 室温浸泡三小时使微载体充分膨胀湿化,小心吸取去除上清液,再用 PBS 清洗三次。高压蒸汽灭菌(15min,115℃),浸泡于 EpiLife 培养液中放入 4℃ 冰箱备用,使用前用温热的 EpiLife 培养液再次冲洗。

选用的 RCCS 为 55ml 容积的高截面纵横比容器(high aspect ratio vessel, HARV),将各部件拆卸分解,用去离子水清洗并浸泡过夜。将各部件组装结合,检查可靠性后打包,高压蒸汽灭菌(105℃/30 min)备用。

1.5 建立旋转式生物反应器微载体培养体系

将预备好的 0.3g Cytodex-3 加入旋转式生物反应器,加入 30ml EpiLife 培养液。加入 5×10^5 个 DiL 标记的表皮细胞,将旋转式生物反应器加满 EpiLife 培养液,使用 5ml 注射器抽排气体后关闭换液口开关。旋转式生物反应器放入 37℃ 孵箱中静置,前 10 小时间断性转动(每 2 小时转动 1 分钟),使细胞与微载体充分接触,贴附。10 小时后持续转动,调整旋转式生物反应器旋转速度,使微载体能悬浮到培养液中。培养期间隔天换液,换液前将旋转式生物反应器静置 1 小时,使微载体沉淀,小心吸取上清后加入新鲜培养液,每次换液量为 20ml。

1.6 扫描电镜观察细胞形态

使用扫描电镜观测,样品先以 PBS 冲洗,再以 2%戊二醛 37℃ 固定 2 h,然后以 PBS 轻柔清洗,四氧化锇再固定。继以梯度酒精脱水(50%、60%、70%、80%、90%、99%),再用乙酸异戊脂置换 4 h 以上,使用临界干燥器干燥,真空状态下喷溅铂金离子,扫描电子显微镜观察细胞生长情况并摄影。

1.7 人表皮细胞体外扩增的倍增时间计算

使用细胞倍增时间计算公式,计算出细胞倍增时间。 $t =$

$(\text{TN2}-\text{TN1})/\log_2(\text{A2}/\text{A1})$ 。公式中 TN2 和 TN1 表示某次测量细胞数的时间差。A2 细胞培养终末点细胞数。A1 细胞培养起始点细胞数。

1.7.1 平面单层培养细胞的倍增时间计算 采用常规培养方法,接种 5×10^5 个人成纤维细胞,在细胞约 80%汇合时传代,至第 6 天时消化获取所有细胞。倒置显微镜下血细胞计数器直接数细胞个数,每样本四个象限。

1.7.2 微载体旋转培养细胞的倍增时间计算

取出 RCCS 中全部微载体,沉淀,小心吸取出培养基,再用 pH7.6、含 0.02%(质量体积比)乙二胺四乙酸(EDTA)的无 Ca 离子、Mg 离子的 PBS 洗微载体 5 分钟。弃去 EDTA-PBS 溶液,加入质量浓度 2.5 g/L 胰蛋白酶,37℃ 孵育,间断搅动。15 分钟后,加入含血清的培养基中止胰蛋白酶的作用。此时微载体上附着的细胞已经脱落。再通过 70μm 细胞筛网过滤,将微载体与细胞悬液分离。倒置相差显微镜下血细胞计数器直接数细胞个数,每样本三个象限。

1.8 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数±标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示,用 SPSS13.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察人表皮细胞在 RCCS 中生长情况

接种 24 h 后,大部分细胞贴附于微载体表面,培养液中只有少量散在分布的球形、折光性弱的细胞。微载体在培养液中均匀分布。随着培养时间增加,微载体表面的细胞数量逐渐增多,第 5 天时,多数微载体上都密布细胞(图 1)。当观察到 RCCS 中悬浮微载体被增殖细胞粘结形成逐渐增大的颗粒时,需加大旋转反应器旋转速度,使微载体能够在培养基内悬浮生长,不沉积也不与四周碰撞。

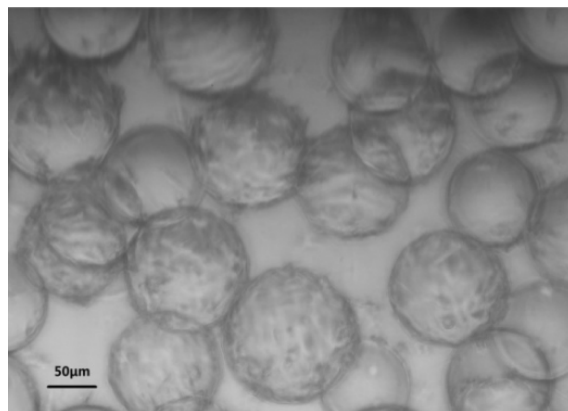


图 1 倒置显微镜下观察人表皮细胞接种到微载体上第五天的生长状态。(标尺为 50 微米)

Fig.1 Under the observation of Inverted microscope, DiL staining of hECs inoculated on Cytodex microcarrier. (Scale bar =50μm)

2.2 荧光显微镜观测结果

细胞接种后一天,可见微载体表面有细胞贴附,有少量微载体上未贴附细胞。细胞接种第 5 天,微载体表面细胞数量明显增加,细胞分布较均匀,细胞形态呈球形,围绕微载体紧密贴附(图 2)。

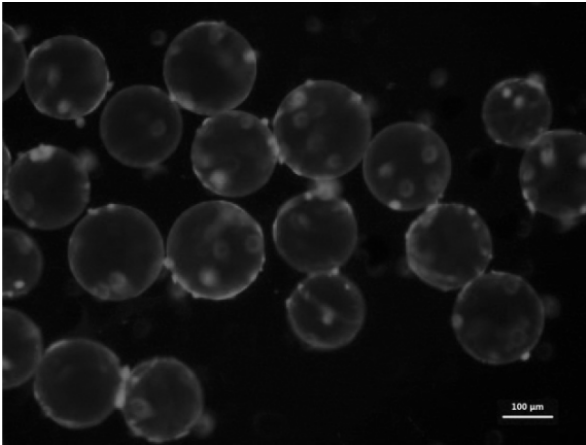


图 2 荧光显微镜下观察 DIL 染色细胞接种到微载体上第五天的生长状态。(标尺为 100 微米)

Fig.2 Under the observation of fluorescent microscope, DIL staining of hECs inoculated on Cytodex microcarrier.(Scale bar =100μm)

颗粒由于细胞生长较密集 聚合成团块状(图 3)。

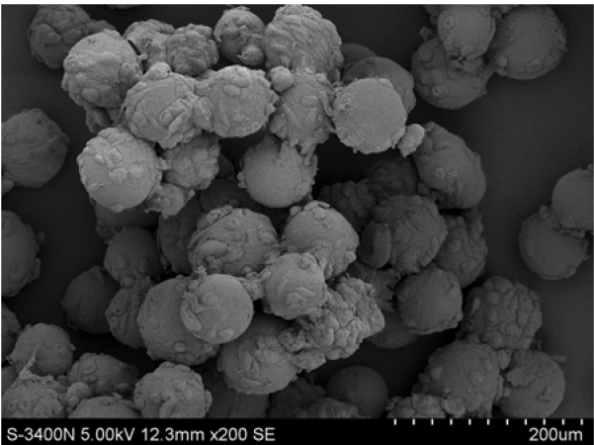


图 3 扫描电镜观察,细胞在微载体上生长状况良好 ,第 5 天可以看到一些微载体颗粒聚合成团块状

Fig.3 Under the observation of scanning electronic microscope, hECs present well growth on microcarrier. From five day cells-bead aggregates gradually formed

2.3 扫描电镜观测细胞贴附生长情况

使用扫描电镜观测微载体。第 5 天 ,微载体表面的细胞呈半球形或椭圆形 ,少数呈多角形以及不规则形 ,一部分微载体

2.4 人表皮细胞体外扩增的倍增时间计算的统计结果

表 1 平面培养组细胞数与倍增时间
Table 1 The cell count and doubling time in plane culture group

Group	Cell number	Group doubling time(day)
1	1.4 x 10 ⁶	4.039
2	1.6 x 10 ⁶	3.575
3	1.2 x 10 ⁶	4.751
4	1.5 x 10 ⁶	3.785
5	2.1 x 10 ⁶	2.897

表 2 旋转培养组细胞数与倍增时间
Table 2 The cell count and doubling time in RCCS cultivation group

Group	Cell number	Group doubling time(day)
1	1.7 x 10 ⁶	3.798
2	2.1 x 10 ⁶	2.897
3	2.2 x 10 ⁶	2.807
4	2.4 x 10 ⁶	2.651
5	1.9 x 10 ⁶	3.115

Note : RCCS cultivation and routine cultivation were compared by group doubling time ,RCCS cultivation significantly shorted group doubling time compared with routine cultivation. (*P<0.05)

根据倍增时间计算公式 ,计算出常规平面培养的人表皮细胞的倍增时间为 3.809 ± 0.676d ,在 RCCS 中培养的倍增时间为 3.054 ± 0.449d。采用 SPSS 13.0 软件进行两均数间比较 ,结果为使用两种培养方式的 hECs 细胞的倍增时间 P<0.05 ,两均数间有显著性差异 ,RCCS 中培养的细胞群体倍增时间短。

3 讨论

旋转式生物反应器(RCCS)是由一个水平轴旋转的培养容器和与其共轴的氧合器组成 ,当容器以水平轴开始旋转时 ,充满其中的培养液作为一个整体也发生旋转 ,这种方式使内容物受到极小的剪切力。培养体系中的细胞旋转时所受的离心力、重力和科氏力抵消 ,因此细胞能大体维持悬浮状态。培养体系中的细胞受到极小的机械力的同时可以获得足量的氧、营养物质^[6]。细胞所需的气体通过硅橡胶膜微量而持续的交换 ,避免了旋转培养体系中出现大的气泡和涡流。微载体培养环境中 ,通

过在培养液中轻柔的转动或者搅拌,细胞在微球表面呈现单层或者复层生长,在这种并不复杂的悬浮培养体系中,最大可获得 2×10^8 个/毫升的细胞量^[7]。Cytodex 微载体是 GE Healthcare 公司为大量培养各类动物细胞专门开发的微载体,培养的容器可以从数毫升到数千升,非常适合大规模扩增细胞^[8]。这种微载体的表面对细胞生长过程中的贴附和伸展过程专门优化,微载体的直径和密度也非常适合悬浮状态大规模培养扩增各类细胞^[9]。构成微载体微球的基质材料生物稳定性很好,提供给细胞适宜的表面生长环境。透光的微球体也很容易通过显微镜观察贴附之上的细胞。通过以往的广泛使用可以看出,cytodex 十分适合作为微载体培养细胞。细胞培养技术对研究动物细胞的结构、功能和分化过程中的作用非常重要^[10]。经过三十余年的发展,该技术目前已渐趋完善和成熟,不但在皮肤组织工程领域积极探索^[11,12],并广泛应用于骨、软骨组织工程^[13,14],人工肝脏体外构建^[15,16],视网膜病变^[17]以及多种干细胞^[18-21]在微重力环境下特性的研究。

本实验过程中,充分体现了该培养体系的显著优点:1. 细胞的培养环境稳定可靠,相比较普通培养,减少了传代、换液等不利于细胞增殖的步骤。2. 微载体颗粒透明,观察细胞的增殖及生长贴附状态更加方便。3. 需要扩大培养规模时,只需加入新的微载体颗粒进入培养体系,不需要消化细胞。4. 获取及转移细胞更加方便,微载体的表面特性使消化获取细胞更加容易。因此,使用微载体在 RCCS 体系中培养表皮细胞,获得比在普通培养方式更快的细胞增殖速度,并有利于规模化获取组织工程的种子细胞。

参考文献(References)

- [1] Rheinwatd J G, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinized colonies from single cell is[J]. Cell,1975,6(3):331-343
- [2] Zhang X, Deng Z, Wang H, et al. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration [J]. Biomaterials,2009,30(14):2666-2674
- [3] Daniels J T, Kearney J N, Ingham E. Human keratinocyte isolation and cell culture: a survey of current practices in the UK [J]. Burns,1996,22(1):35-39
- [4] Azarin S M, Palecek S P. Development of Scalable Culture Systems for Human Embryonic Stem Cells[J]. Biochem Eng J,2010,48(3):378
- [5] Wang C, Gong Y, Lin Y, et al. A novel gellan gel-based microcarrier for anchorage-dependent cell delivery [J]. Acta Biomaterialia,2008,4(5):1226-1234
- [6] van Loon J J W A, Veldhuijzen J P, Windgassen E J, et al. Development of tissue culture techniques and hardware to study mineralization under microgravity conditions[J]. Advances in Space Research,1994,14(8):289-298
- [7] Dabos K J, Nelson L J, Plevris J N, et al. Microgravity environment in

- a rotary cell culture system (RCCS) promotes cell aggregation and maintains differentiation and proliferation of primary porcine hepatocytes [J]. Journal of Hepatology,1998,28(Supplement 1):62
- [8] Wu Z Z, Zhao Y P, Kisaalita W S. A packed Cytodex microbead array for three-dimensional cell-based biosensing[J]. Biosensors and Bioelectronics,2006,22(5):685-693
- [9] Wang J, Zhang J, Bai S, et al. Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells [J]. Neurochemistry International,2009,55(7):710-716
- [10] Sun T, Jackson S, Haycock J W, et al. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents[J]. Journal of Biotechnology,2006,122(3):372-381
- [11] Liu J Y, Hafner J, Dragieva G, et al. A novel bioreactor microcarrier cell culture system for high yields of proliferating autologous human keratinocytes[J]. Cell Transplant,2006,15(5):435-443
- [12] Yue Z, Wen F, Gao S, et al. Preparation of three-dimensional interconnected macroporous cellulosic hydrogels for soft tissue engineering [J]. Biomaterials,2010,31(32):8141-8152
- [13] Malda J, van Blitterswijk C A, Grojec M, et al. Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation [J]. Tissue Eng,2003,9(5):939-948
- [14] Marlovits S, Tichy B, Truppe M, et al. Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold-free bioreactor [J]. Tissue Eng, 2003,9(6):1215-1226
- [15] Khaoustov V I, Darlington G J, Soriano H E, et al. Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,1999,35(9):501-509
- [16] Yoffe B, Darlington G J, Soriano H E, et al. Cultures of human liver cells in simulated microgravity environment [J]. Adv Space Res, 1999,24(6):829-836
- [17] Dutt K, Sanford G, Harris-Hooker S, et al. Three-dimensional model of angiogenesis: coculture of human retinal cells with bovine aortic endothelial cells in the NASA bioreactor [J]. Tissue Eng,2003,9(5): 893-908
- [18] Lin H J, O'Shaughnessy T J, Kelly J, et al. Neural stem cell differentiation in a cell-collagen-bioreactor culture system [J]. Brain Res Dev Brain Res,2004,153(2):163-173
- [19] Oh S K, Chen A K, Mok Y, et al. Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells[J]. Stem Cell Res,2009,2(3): 219-230
- [20] Zayzafoon M, Gathings W E, McDonald J M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis[J]. Endocrinology,2004,145(5):2421-2432
- [21] Li S, Ma Z, Niu Z, et al. NASA-approved rotary bioreactor enhances proliferation and osteogenesis of human periodontal ligament stem cells[J]. Stem Cells Dev,2009,18(9):1273-1282