

# 组织工程骨在生物反应器内的构建与检测

宋克东<sup>1</sup>, 杨志明<sup>2</sup>, 刘天庆\*<sup>1</sup>, 智伟<sup>2</sup>, 李香琴<sup>1</sup>,  
邓力<sup>2</sup>, 崔占峰<sup>3</sup>, 孙相玉<sup>1</sup>, 马学虎<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学 干细胞与组织工程研究室, 辽宁 大连 116024  
2. 四川大学 干细胞与组织工程研究室, 四川 成都 610041;  
3. 牛津大学 工程科学系, 牛津 OX1 3PJ)

**摘要:** 用经绿色荧光蛋白标记的新西兰兔颅骨来源的成骨细胞复合到生物衍生骨支架材料上, 在新型旋转壁式生物反应器内三维构建组织工程骨, 同时与静态培养环境中构建的结果进行比较. 每12h取样一次, 培养至1周后结束. 分别进行组织学、免疫组织化学和代谢产物等分析. 结果显示反应器中以两种密度接种和构建的组织生长良好, 细胞仍保持正常的染色体形态, 并且反应器中构建物的细胞扩增是静态培养的5倍. 研究结果还表明, 通过反应器内部流体对流所产生的应力刺激及其提供的三维培养环境, 可提高成骨细胞碱性磷酸酶的活性表达, 从而完成成骨细胞的快速增殖与分化并缩短工程化组织的构建时间. 本实验进一步证实了骨组织工程产业化的现实可行性.

**关键词:** 成骨细胞; 生物反应器; 生物衍生骨; 绿色荧光蛋白; 三维构建

**中图分类号:** R782 **文献标识码:** A

组织工程是一个涉及多种学科的交叉研究领域, 在活体组织及器官的移植和重建治疗方面已经展示了良好的发展前景<sup>[1]</sup>.

本课题组已经在旋转壁式生物反应器(RWVB)内针对工程化组织的三维构建进行了一些有意义的探索<sup>[2]</sup>. 该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分析, 并对构建物分泌胞外基质和形成钙化结节的能力进行了比较, 但是此项工作侧重的是体外研究, 培养周期较长(3周), 而临床对骨组织构建物体外培养的时间要求一般为1周. 并且临床上对体外构建的工程骨组织的安全性等方面还需进行更多的参数检测. 因此, 有必要对RWVB内构建工程化组织进行更深层次的探讨.

本研究着重分析在RWVB内构建1周的工程化组织的各项生物学指标, 检测经由RWVB构建的新西兰兔成骨细胞在染色体水平上的变异情况, 并对两种不同构建方式下成骨细胞的扩增倍

数进行定量比较. 因为在本文后续的工作中要使用本研究所构建出的工程化组织进行大量的动物实验, 为了使植入实验动物体内的材料中的外源细胞与其内源细胞相区别, 本文对成骨细胞进行绿色荧光蛋白(GFP)标记. 本研究旨在探索一种缩短工程化组织的构建时间、降低其制造成本来加速其广泛临床应用的方法.

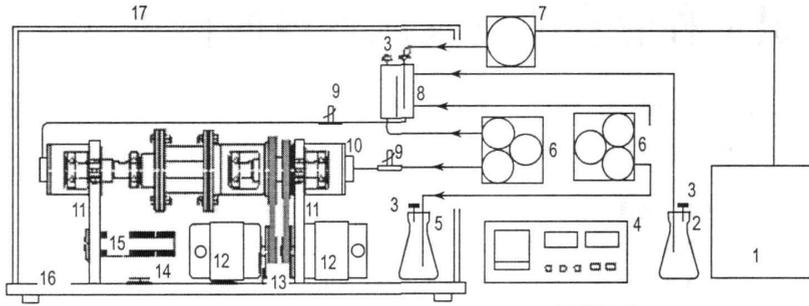
## 1 材料和方法

### 1.1 材料

F12培养基(Gibco公司), 新生小牛血清(Gibco公司), 碘化丙啶(Pi)及Hoechst(Sigma公司), Biorad-M RC1024M P激光共聚焦显微镜, Amary-1000B扫描电镜, JEM 21005透射电镜, Epics Elite Esp. 流式细胞仪(美国Coulter公司), Vitr S 250乳酸测试仪, Olympus-AU5400全自动生化分析仪, CO<sub>2</sub>培养箱(Sanyo), Olympus倒置相差显微镜, Biorad酶标仪. 旋转壁式生物反应器(RWVB, 大连理工大学干细胞

与组织工程研究室自制). 生物衍生骨由四川大学干细胞与组织工程研究室提供. 旋转壁式生物

反应器培养系统如图 1 所示.



1 CO<sub>2</sub> 培养箱; 2 废液罐; 3 过滤器; 4 控制板; 5 新鲜培养基罐控制台; 6 蠕动泵; 7 空气泵; 8 培养基充氧器; 9 进液三通阀; 10 反应器; 11 反应器支架; 12 可调速电动机; 13 激光计数器; 14 风扇; 15 加热器; 16 底座; 17 保温罩

图 1 旋转壁式生物反应器培养系统

Fig. 1 Rotating wall vessel bioreactor culture system

## 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 一月龄新西兰兔(四川大学华西医院)两只,清洗,碘伏浸泡消毒.取颅盖骨, PBS中洗去骨膜、血管及其他结缔组织.剪碎, 0.25% 胰蛋白酶结合 0.1% 胶原酶消化一定时间,加入等体积含 10% 小牛血清的 DMEM 中止消化,离心(1 200 r/min, 5 min),弃上清液,加入含有 20% 新生小牛血清的 F12 培养基吹打,混匀接种,入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养.细胞生长至融合状态时传代培养,取 4~9 代细胞备用.

1.2.2 成骨细胞转染 分别使用 Lipofectin 和 Transfectin 两种不同的转染试剂对成骨细胞进行 GFP 标记.首先制备 DNA/Lipofectin (Transfectin) 混合物,加入 DNA 液,将 10% FBS 培养基 2 mL 分别加入各培养瓶中.接着加入 DNA/Lipofectin (Transfectin) 混合物至培养瓶内.细胞悬液各 1 mL 分别加入培养瓶内,37℃ 孵育,使用 G418 筛选.

1.2.3 支架材料预处理 将生物衍生骨支架材料切割成 5 mm×5 mm×15 mm 尺寸大小后经环氧乙烷灭菌处理.在接种细胞前使用含 10% 小牛血清的新鲜培养基浸泡 3 h.

1.2.4 三维和静态构建组织工程骨 将经 GFP 标记的成骨细胞制成  $2 \times 10^6$  个/mL 和  $1 \times 10^6$  个/mL 两种密度的细胞悬液,分别用微量移液枪将 100 μL 的细胞悬液逐滴滴加到支架材料上.3 min 后将材料翻转,以同样的方式滴加到另一面.静置 10 min,按浓度高低对材料做好标记,将两种接种浓度的支架材料分别放入培养皿并在孵箱培养 2 h 后加入适量培养基再培养 2 h.将其中一

部分支架材料固定到 RWVB 的外筒内壁上,其余的仍放在培养皿中静态培养.启动 RWVB 外部的温控、气控以及培养基的循环等装置,先将反应器内外筒的转速调至 5 r/min, 12 h 后均调整为 10 r/min.此后每天取样观察是否有细胞脱落.实验至第 7 d 结束.两种培养方式在培养的过程中都不换液.每天所取的培养液样品于 -70℃ 冷冻保存,收集后测定葡萄糖、乳酸的含量.

1.2.5 扫描电镜观察 PBS 漂洗 3 次,2% 的戊二醛固定 4 h,系列乙醇逐级脱水,乙酸异戊酯置换,临界点干燥,表面喷金,扫描电镜观察<sup>[3]</sup>.

1.2.6 激光共聚焦显微镜观察 分别用 DAPI 和 BoDIPY 标记细胞核和细胞骨架,在 37℃ 孵育 45 min 后观察.

1.2.7 组织学、免疫组织化学检查 组织块包埋、切片处理过程见文献[4].苏木精-伊红(HE)染色:用丙酮固定 15 min,蒸馏水洗一次后入苏木精染液 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<sup>[4]</sup>.甲苯胺蓝染色:用丙酮固定 15 min, PBS 冲洗后入甲苯胺蓝染液,静置染色 1 h.倾去染液,用 PBS 冲洗,用二甲苯透明两次,各 5 min.树胶封固<sup>[4]</sup>.

1.2.8 静态和 RWVB 内构建的组织工程骨上的细胞解离后的检测 将细胞分别从静态和 RWVB 构建出的工程化组织上解离后,以  $4 \times 10^5$  个/mL 的密度制成细胞爬片,放入孵箱中培养 48

h后进行以下各种相关检测。

(1) 碱性磷酸酶 (ALP) 染色和 Hoechst-Pi 双染

ALP检测: 用 PBS冲洗新鲜的培养爬片, 用冷丙酮固定 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 4 h. 用蒸馏水冲洗. 涂上 2% 的硝酸钙 2 min, 2% 的硝酸钴 2 min. 用蒸馏水冲洗. 涂上 1% 硫化铵 2 min. 用蒸馏水冲洗. 自然干燥, 用树胶封固. 观察. 阳性反应呈黑色颗粒或块状沉淀<sup>[5]</sup>.

Hoechst-Pi 双染: 将适量细胞悬于 1 mL 含血清的 DMEM 中, 加入 Hoechst 储存液 ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 10 mL, 混匀. 于  $37^\circ\text{C}$  孵育 15 min. 细胞置于冰上冷却后, 于  $4^\circ\text{C}$  离心, 去上清液. 将细胞重新悬于 1 mL PBS 中, 加入  $5 \mu\text{L}$  的 Pi 储存液 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 混匀, 荧光显微镜下观察.

(2) MTT 法测定细胞生长曲线与扩增倍数比较

以  $4 \times 10^5$  个 / mL 的密度制成细胞悬液接种到 96 孔板中, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$ . 将 MTT ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 加入 96 孔板 ( $10 \mu\text{L}$  / 孔),  $37^\circ\text{C}$  孵育 4 h. 吸去 MTT 后加入  $50 \mu\text{L}$  DM SO 破解细胞, 振荡 5 min 后, 将液体转入 96 孔板中. 在酶标仪上测定光吸收度, 检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm.

(3) 免疫组化检测

I 型胶原检测: 细胞爬片用羊血清封闭, 加入一抗 (兔抗人 I 型胶原抗体) 孵育, 二抗 (羊抗兔) 孵育, 内源性过氧化物酶封闭, 加入 ABC 试剂作用, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水封片<sup>[5]</sup>.

BM P-2 (骨形态形成蛋白) 检测: 参见文献 [5].

(4) 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡

消化收集细胞, 离心 ( $1\ 500 \text{ r} / \text{min}$ , 10 min), 用 70% 乙醇溶液固定后, 用流式细胞仪测试细胞周期和进行凋亡分析.

(5) 不同构建方式细胞染色体分析

将构建 1 周的复合物进行细胞分裂中期相染色体染色, 观察染色体数目及形态. 染色体计数方法: 随机抽取 3 张玻片, 每片随机计数 100 个细胞的染色体数目, 求其平均数<sup>[5]</sup>.

(6) ALR pH 和代谢产物分析

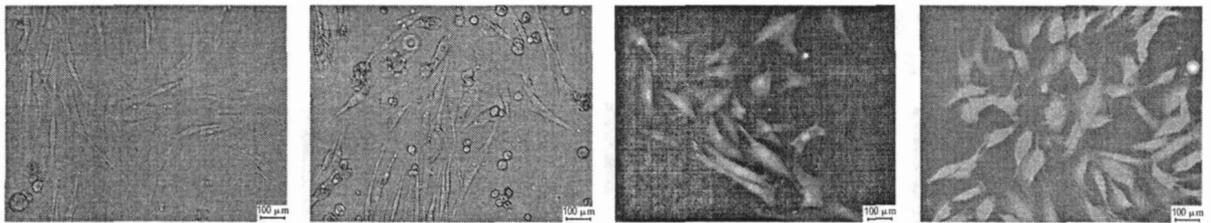
使用酶标仪测定碱性磷酸酶在 415 nm 的表达. 葡萄糖和乳酸分别使用 Olympus-AU 5400 全自动生化分析仪和 Vitr S 250 乳酸测试仪全自动检测.

1. 2. 9 实验数据分析 实验中统计数据以  $\bar{x} \pm s$  表示. 结果采用 *t* 检验分析, 用 Origin 7. 0 软件进行处理.

## 2 结 果

### 2.1 成骨细胞转染—绿色荧光蛋白标记

如图 2 所示, 倒置显微镜下观察, 经 GFP 转染的成骨细胞均贴壁生长良好, 呈长梭形、椭圆形或多边形. 细胞膜光滑完整, 胞浆丰富, 有多个突起, 核轮廓清晰, 细胞增殖速度无改变. 为了得到较高的转染率, 本实验使用了两种不同的转染试剂: Lipofectin 和 Transfectin. 荧光显微镜下观察发现, 经由 Lipofectin 转染的细胞荧光强度较弱, 转染效率相对较低; 而经由 Transfectin 转染的细胞表达强烈的绿色荧光且转染率高, 因此可以发现目的基因已成功转染到成骨细胞内并得到非常有效的表达.



(a) 倒置, Lipofectin, 100 × (b) 倒置, Transfectin, 100 × (c) 荧光, Lipofectin, 100 × (d) 荧光, Transfectin, 100 ×

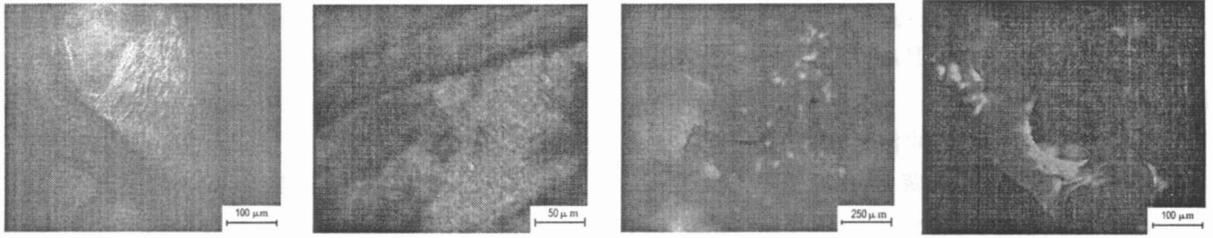
图 2 成骨细胞转染 1 周后的倒置显微镜和荧光显微镜图片

Fig. 2 Inverted and fluorescence microscope pictures of transfected osteoblasts after one week

### 2.2 转染细胞三维和静态构建组织工程骨

2.2.1 倒置显微镜和荧光显微镜观察 如图 3 所示, 倒置显微镜下观察可以发现, 在静态和 RWVB 两种条件下构建的支架材料, 其孔隙和表面都有致密的成骨细胞聚集, 并大量分泌胶原纤

维. 荧光显微镜下观察发现, 经由 GFP 转染的成骨细胞均匀地黏附在生物衍生骨支架材料的表面和孔隙之中, 并发出均匀的绿色荧光. 显示了该种支架材料良好的生物相容性.



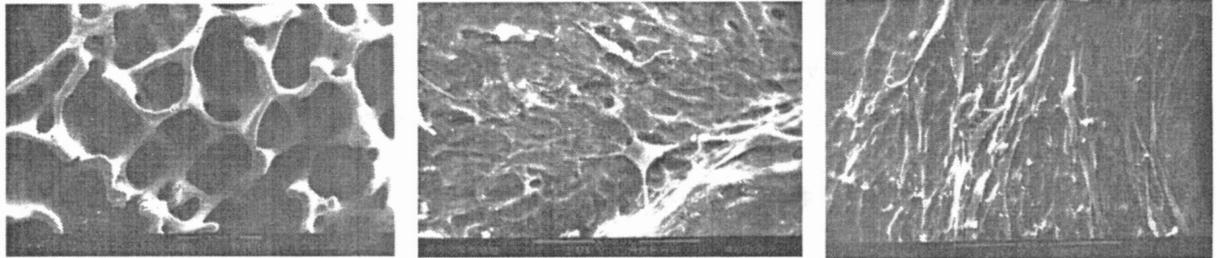
(a) 倒置, 培养瓶, 100 × (b) 倒置, 反应器, 200 × (c) 荧光, 培养瓶, 40 × (d) 荧光, 反应器, 100 ×

图 3 不同培养方式中培养 1 周后细胞 - 支架聚合物的倒置显微镜和荧光显微镜图片

Fig. 3 Inverted and fluorescence microscope pictures of scaffolds cultured in different fashions after one week

2.2.2 扫描电镜观察 由图 4(a)可见,空白生物衍生骨支架材料的表面和壁孔边缘光滑,并展示出良好的三维网状结构. 由图 4(b)可见,在培养瓶中静态培养的支架材料表面分布的成骨细胞数量较少,多呈多边形,细胞排列杂乱无序,并且在表面和孔隙处分布不均匀. 而从 RWVB 中构建的工程化骨中可以发现,孔壁和材料表面黏附

有大量的细胞,呈长梭形且有序的束状排列,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(图 4(c)). 观察结果表明, RWVB 所提供的流体力学刺激与机械振动产生的刺激<sup>[6]</sup>类似,可直接作用于细胞骨架,使成骨细胞的排列方式发生改变.



(a) 空白支架

(b) 培养瓶, 500 ×

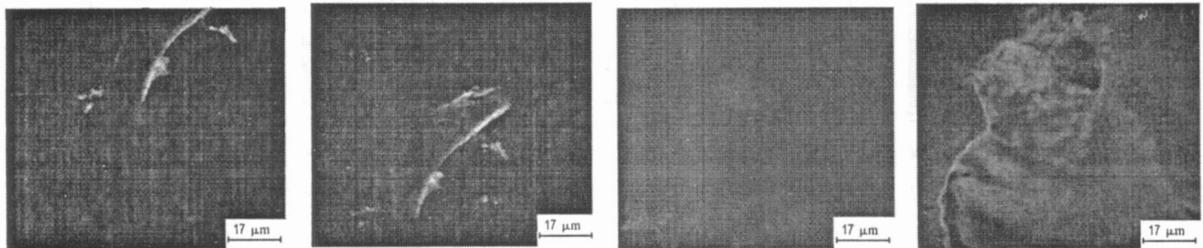
(c) 反应器, 500 ×

图 4 细胞 - 支架聚合物在不同系统中培养 1 周后的扫描电镜图片

Fig. 4 SEM micrographs of scaffolds cultured in different fashions after one week

2.2.3 激光共聚焦显微镜观察 经静态和 RWVB 构建的复合物分别使用 DAPI 和 BoDIPY 标记细胞核和细胞骨架后直接在激光共聚焦显微镜下观察发现(图 5(a) (b)),少量细胞分布在支架材料的孔隙中,且两种构建方式并无明显差别. 这是因为,当直接对构建物进行细胞核和细胞骨架标记时,DAPI 和 BoDIPY 这两种荧光染料可能

被大量存在的衍生骨材料所吸收,使得所能标记上的细胞数量变少,因而这种直接染色的检测方法效果较差. 经硬组织切片后观察发现,静态构建的材料很难发现有明显的细胞分布,这可能是由于成骨细胞在静态构建环境中的分布不均匀,而 RWVB 中构建的材料则有大量的成骨细胞附着(图 5(c) (d)).



(a) 培养瓶, 直接染, 600 ×

(b) 反应器, 直接染, 600 ×

(c) 培养瓶, 切片, 600 ×

(d) 反应器, 切片, 600 ×

图 5 细胞 - 支架聚合物在不同培养方式中的激光共聚焦观察

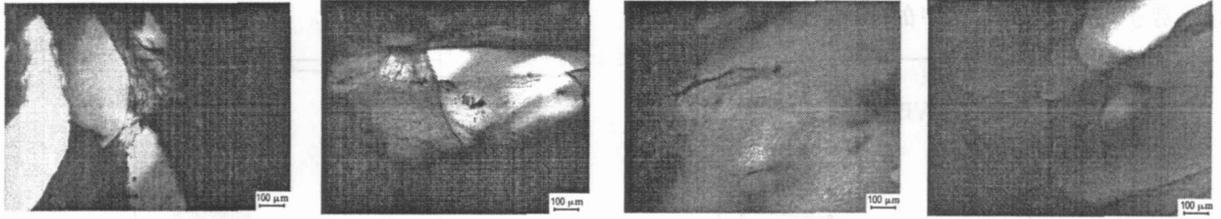
Fig. 5 Laser confocal microscope pictures of scaffolds cultured in different fashions

2.2.4 HE 染色和甲苯胺蓝染色 由图 6 可见,在两种不同构建环境中培养 1 周后,成骨细胞呈

长梭形或多边形附着于生物衍生骨的材料表面和孔隙中, RWVB 中构建材料的近孔隙边缘分布有

更加明显的细胞外基质. 从图 6(a) (b) 可见胞核深染, 胞外基质呈透明状; 从图 6(c) (d) 可见有淡蓝色的胞外基质. 两种染色方法均可以发现

RWVB 中的细胞分布要比静态构建的更加均匀, 数量上也有较明显的差异.

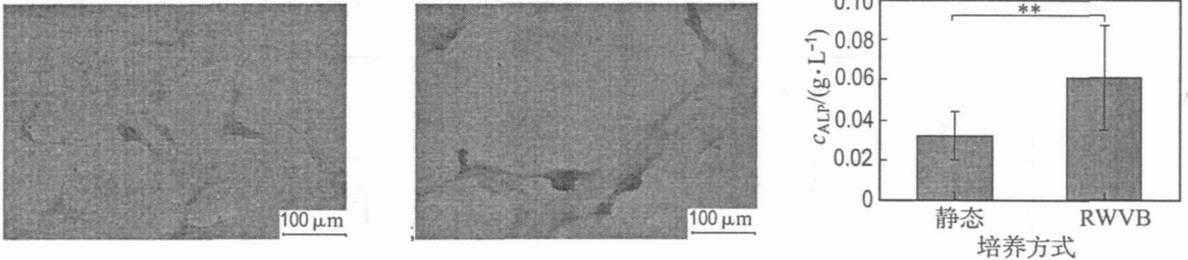


(a) 培养瓶, HE, 100 × (b) 反应器, HE, 100 × (c) 培养瓶, 甲苯胺蓝, 100 × (d) 反应器, 甲苯胺蓝, 100 ×  
图 6 不同培养方式中培养 1 周后细胞 - 支架聚合物的 HE 染色和甲苯胺蓝染色观察

Fig. 6 The stains of scaffolds with HE and toluidine blue cultured in different fashions after one week

2.2.5 ALP 染色和定量检测结果 ALP 是成骨细胞分化成熟的重要标志之一<sup>[7]</sup>. 如图 7(a) (b) 所示, RWVB 中培养的成骨细胞其 ALP 阳性反应明显比静态条件下的强烈, 结节中央呈黑色, 周围呈蓝黑色, 成骨细胞活性良好. 通过对比可以定性地看出, RWVB 扩增的成骨细胞的碱性磷酸酶

的表达得到了增强, 表现出良好的增殖能力. 图 7(c) 所示为 ALP 在 415 nm 波长处的表达, 从图中可以定量地发现在 RWVB 中 ALP 的表达要明显强于静态条件下的表达, 二者有着显著性的差异.



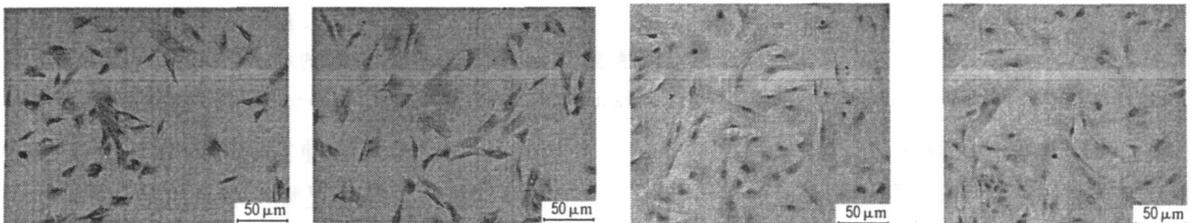
(a) ALP, 培养瓶, 100 × (b) ALP, 反应器, 100 × (c) ALP 表达对比, \* \*  $p < 0.01$

图 7 不同培养方式中培养 1 周后成骨细胞碱性磷酸酶定性和定量表达的对比

Fig. 7 Qualitative staining and quantificational ALP expression of osteoblasts dissociated from scaffolds cultured in different fashions after one week

2.2.6 I 型胶原和 BMP-2 表达 成骨细胞是骨组织发育过程中的主要细胞之一<sup>[8]</sup>, I 型胶原为骨组织中成骨细胞合成的特异性胶原蛋白, 型胶原的含量反映了成骨细胞的成熟状况. 图 8(a) (b) 反映了在静态和 RWVB 中培养的成骨细胞的 I 型胶原表达情况, 可以发现二者都有很强的阳性表达, 并无明显差异. 骨形态发生蛋白 (BMP) 是

骨基质中存在的一种重要骨生长因子, 它能诱导未分化的间充质细胞不可逆地分化成为骨和软骨, 从而导致新骨的生成<sup>[9]</sup>. 图 8(c) (d) 反映了在静态和 RWVB 中培养的成骨细胞的 BMP-2 的表达情况, 和 I 型胶原的结果相类似, 二者也无显著性差异.



(a) I 型胶原, 培养瓶, 200 × (b) I 型胶原, 反应器, 200 × (c) BMP-2, 培养瓶, 200 × (d) BMP-2, 反应器, 200 ×  
图 8 不同培养方式中培养 1 周后成骨细胞 I 型胶原和 BMP-2 的表达

Fig. 8 Type I collagen and BMP-2 expression of osteoblasts dissociated from scaffolds cultured in different fashions after one week

2.2.7 不同培养方式下细胞的生长曲线和扩增倍数的比较 不同条件下成骨细胞的生长曲线如图 9(a)所示. 静态培养的成骨细胞以较为平缓的趋势扩增,而 RWVB 中的细胞密度则一直呈现

较快的增长趋势并在第 6 d 达峰值. 如图 9(b)所示,成骨细胞在 RWVB 中的扩增倍数(U)可以达到静态培养的 5 倍. 在不同培养条件下细胞的扩增倍数形成鲜明对比.

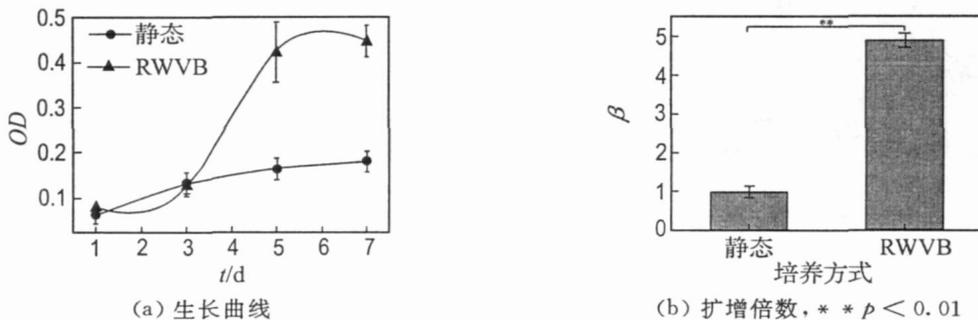


图 9 不同培养方式中细胞生长曲线和扩增倍数的比较

Fig. 9 The comparison of osteoblast growth curves and expanded multiple in different culture fashions

2.2.8 不同培养方式下的细胞周期和染色体分析 对照图 10(a) (b) 可见,两种培养方式构建出的细胞其周期没有明显变化,细胞分别处在 G1 期、G2 期和 S 期所占的比例数没有显著性差异;

同时,两种方式构建出的细胞其凋亡率也都维持在一个非常低的水平. 对照图 10(c) (d) 的染色体核分裂中期相可以发现,经由两种不同方式培养的成骨细胞其染色体数目和形态均保持稳定.

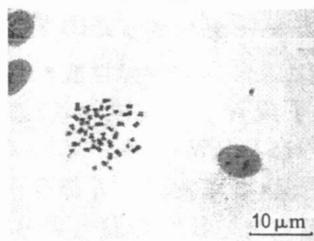
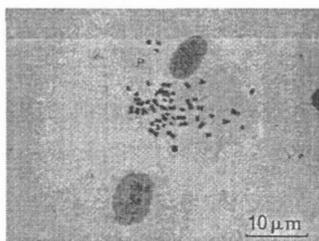
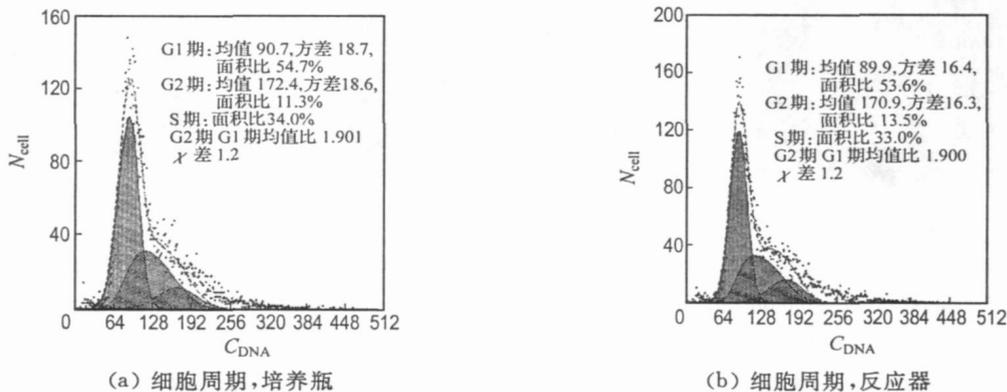


图 10 不同培养方式中成骨细胞细胞周期和染色体的检测

Fig. 10 Cell cycle and chromosome assays of osteoblast dissociated from scaffolds cultured in different fashions

2.2.9 营养物质代谢分析 由于在整个培养过程中没有换液,在两种不同构建方式中,pH 都呈现下降的趋势,但是 RWVB 中的下降趋势要快一些. 横向比较两种构建体系中的营养物质和代谢产物的含量(图 11(b) (c)) 则会发现:在葡萄糖的比较中,因 RWVB 构建体系中支架内的细胞活

性高,新陈代谢旺盛使得其营养物质被快速消耗掉,而且在整个培养过程中没有换液,故其浓度一直下降且其消耗速率要稍大于静态构建体系. 对乳酸而言,在 RWVB 构建的整个过程中其生成速率也要稍大于静态条件.

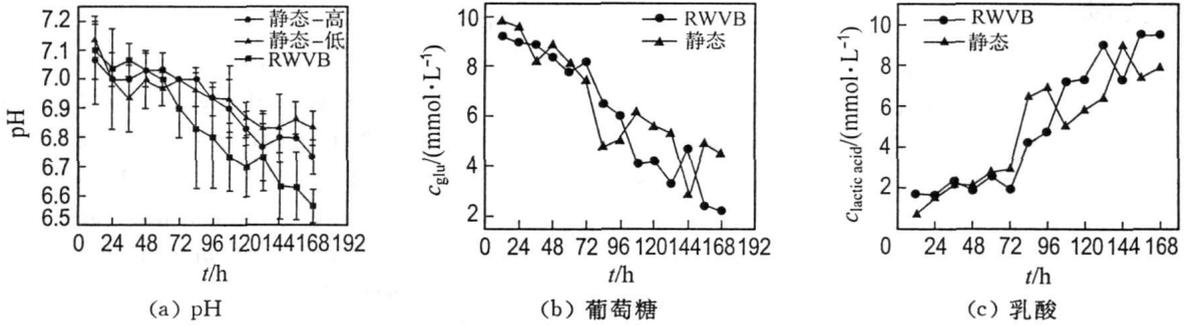


图 11 不同培养方式中培养基葡萄糖和乳酸代谢产物的对比

Fig. 11 Comparison of media pH and metabolism with glucose and lactic acid in different culture fashions

### 3 结果讨论与结论

本文对在静态和 RWVB 中构建 1 周的工程化骨组织的各项生物学指标、复合细胞染色体变异情况进行了检测,并着重定量比较了在两种不同构建方式中成骨细胞的扩增倍数。研究发现, RWVB 中以  $1 \times 10^6$  个 /mL 和  $2 \times 10^6$  个 /mL 两种密度接种和构建的功能性组织生长良好,所复合的成骨细胞仍能保持稳定的染色体形态,并且细胞的扩增倍数可以达到静态培养环境的 5 倍。结果表明,通过 RWVB 内部流体对流所产生的应力刺激及其提供的三维培养环境,可提高成骨细胞 ALP 的活性表达,从而完成细胞的快速增殖与分化并明显缩短工程化组织的构建时间。

工程化组织进行体外三维构建时,细胞初始接种密度应该有最佳的接种范围。为了探索在 RWVB 内的最佳接种工艺,除了以上所述两种接种密度之外,实验中还分别对以  $5 \times 10^5$  个 /mL、 $5 \times 10^6$  个 /mL 和  $1 \times 10^7$  个 /mL 三种密度所接种的复合物在静态和 RWVB 内构建出的工程化组织进行了相关的检测,发现细胞在三种培养环境中均无明显的扩增。这是因为初始的接种密度过高,所制成的细胞悬液很难在支架材料内分布均匀,同时,局部的密度过高也给营养物质的传递和代谢产物的排出造成一定程度的障碍,因而使得细胞的扩增愈加困难。而过低的细胞密度则不利于细胞间的信号传递及细胞因子的分泌。因此,本实验表明在 RWVB 中构建组织工程骨的适宜细胞接种密度范围是  $1 \times 10^6$  个 /mL 至  $2 \times 10^6$  个 /mL。

组织工程的关键在于如何提高所构建的活体替代物的质量,这其中生物支架材料的使用和三维的构建环境都是非常重要的。本实验所采用的

生物衍生骨支架材料本身独特的生物学特性<sup>[2]</sup>,使得本文在 RWVB 内构建的细胞-衍生骨材料复合物比 Granet 等<sup>[10]</sup>在旋转壁式生物反应器内培养的细胞-微载体复合物更接近体内的骨结构,这种结构对于骨组织工程的体外构建是非常重要的。这和本课题组前期的相关工作也是非常吻合的<sup>[2]</sup>。

构建 1 周后可以明显发现,在 RWVB 中构建的组织表面和内部孔隙中分布着大量的成骨细胞,这进一步表明,该构建体系由于在营养物质传递和代谢产物排出方面较静态环境有着明显的优势,成骨细胞在生物衍生骨支架材料的内部分布得非常均匀。在传统的构建方法中对于三维组织的体外构建来说氧气和可溶性营养物质的供给是非常有局限性的<sup>[11]</sup>,这种传质的限制在 RWVB 中可以得到很大程度的改善。由于 RWVB 在三维构建工程化组织方面所具有的优势<sup>[2]</sup>,将可能为实现骨组织工程的产业化提供非常必要的技术保障和可行的构建途径。此外,由于 RWVB 内部流体对流所带来的流体应力刺激又使得成骨细胞的 ALP 表达明显加强,这与软骨细胞在受到流体力学刺激时其 ALP 表达及 DNA 和总蛋白产物的合成增加<sup>[12]</sup>相一致。这种力学刺激把力学信号转化为生物化学信号对细胞发挥作用。

与前人在 RWVB 中悬浮培养工程组织不同,本研究将构建物固定在培养室的外筒壁上使其与转筒一起旋转,从而避免了较大尺度构建物碰撞壁面所造成的损伤,再加上 RWVB 本身的技术优势,使得在反应器内构建任意形状或较大尺寸的工程化组织成为可能。因此,本研究结果对于临床需要的大尺度组织工程产品早日实现产业化有着非常重要的意义。

## 参考文献:

- [1] PETER X M. Scaffolds for tissue engineering fabrication [J]. *Mater Today*, 2004, 7(5): 30-40
- [2] 宋克东, 刘天庆, 李香琴, 等. 新型旋转壁式生物反应器内三维组织工程骨的构建 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(11): 996-1005
- [3] OSANO E, KISHI J, TAKAHASHI Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF- $\alpha$ -resistant mouse sarcoma L929 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2003, 17(1): 41-47
- [4] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 343-344
- [5] 杨志明. 组织工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 161-162
- [6] CARVALHO R S, BUMANN A, SCHAFFER J L, *et al.* Predominant integrin ligands expressed by osteoblasts show preferential regulation in response to both cell adhesion and mechanical perturbation [J]. *J Cell Biochem*, 2002, 84(3): 497-508
- [7] HERBERTSON A, AUBIN J E. Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures [J]. *Bone*, 1997, 21(6): 491-500
- [8] MACKIE E J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(9): 1301-1305
- [9] BESSHO K, KUSUMOTO K, FUJIMURA K, *et al.* Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1999, 37(1): 2-5
- [10] GRANET C, LAROCHE N, VICO L, *et al.* Rotating-wall vessel promising bioreactor for osteoblastic cell culture comparisons with other 3D conditions [J]. *Med Biol Eng Comput*, 1998, 36: 513-519
- [11] MARTIN I, WENDT D, HEBERER M. The role of bioreactors in tissue engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(2): 80-86
- [12] SARIS D B, SANYAL A, AN K N, *et al.* Periosteum responds to dynamic fluid pressure by proliferating in vitro [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(5): 668-677

## Fabrication and detection of tissue engineering bone in bioreactor

SONG Ke-long<sup>1</sup>, YANG Zhi-ming<sup>2</sup>, LIU Tian-qing<sup>\*1</sup>, ZHI Wei<sup>2</sup>,  
LI Xiang-qin<sup>1</sup>, DENG Li<sup>2</sup>, CUI Zhan-feng<sup>3</sup>, SUN Xiang-yu<sup>1</sup>, MA Xue-hu<sup>1</sup>

( 1.Stem Cell and Tissue Eng. Lab., Dalian Univ. of Technol., Dalian 116024, China;  
2. Div. of Stem Cell and Tissue Eng., Sichuan Univ., Chengdu 610041, China;  
3. Dept. of Eng. Sci., Oxford Univ., Oxford OX1 3PJ, UK )

**Abstract** Osteoblasts isolated from the cranium of Zelanian rabbit, after being transfected with green fluorescent protein, were inoculated onto the bio-derived bone to investigate the 3D fabrication of engineering bone in rotating wall vessel bioreactor (RWVB). As a control, the cell-scaffold constructs were cultured in T-flasks simultaneously. During one week's culture, the samples were collected every 12 h. The histological and immunohistochemical assays were operated respectively. Furthermore, the cells' metabolism of nutrients was monitored and analyzed during the whole culture process. The results show that the cell number fabricated in RWVB was five times of that in T-flasks. Bone tissue fabricated in RWVB with two different densities grew well, and osteoblasts maintained normal chromosome. It is demonstrated that with the stress stimulation inside the fluid in RWVB, the active expression of ALP can be increased, a rapid proliferation and differentiation of osteoblasts are possible and the 3D fabrication of engineering bone could be realized.

**Key words** osteoblasts; bioreactor; bio-derived bone; green fluorescent protein; 3D fabrication