



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104342370 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 11

(21) 申请号 201410231024. 8

(22) 申请日 2014. 05. 28

(71) 申请人 中国科学院力学研究所

地址 100190 北京市海淀区北四环西路 15
号

(72) 发明人 石峰 蓝鼎 王育人

(74) 专利代理机构 北京和信华成知识产权代理
事务所（普通合伙） 11390
代理人 胡剑辉

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006. 01)

C12M 1/36 (2006. 01)

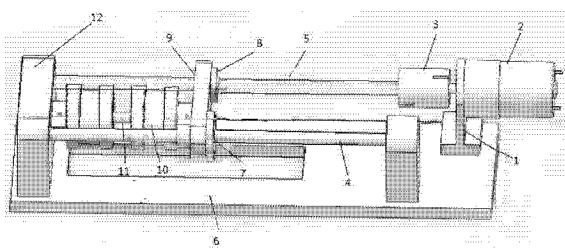
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学
系统

(57) 摘要

本发明提供了一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统，包括细胞生物支架，用于模拟人体细胞真实的三维生长环境；生物反应器，设有夹持所述细胞生物支架的夹具及容纳所述细胞生物支架的腔体；蠕动泵，用于带动细胞培养液进入所述生物反应器进行灌流；施加载荷装置，用于对键合的所述生物反应器中的夹具提供周期性往复牵拉，进而对细胞施加拉伸或压缩力学刺激；控制模块，与计算机相连，对所述施加载荷装置进行控制，调节样品长度、拉伸比、往返频率及往返次数。本发明模仿了体内真实复杂的力学环境，在实现三维细胞培养的同时，实现可控的灌流拉伸或压缩力学环境对细胞生长影响的定量化研究，探索细胞力学—生物学耦合规律。



1. 一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,其特征在于包括:
细胞生物支架,用于模拟人体细胞真实的三维生长环境;
生物反应器,设有夹持所述细胞生物支架的夹具及容纳所述细胞生物支架的腔体;
蠕动泵,用于带动细胞培养液进入所述生物反应器进行灌流;
施加载荷装置,用于对键合的所述生物反应器中的夹具提供周期性往复牵拉,进而对细胞施加拉伸或压缩力学刺激;
控制模块,与计算机相连,对所述施加载荷装置进行控制,调节样品长度、拉伸比、往返频率及往返次数。

2. 如权利要求1所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,其特征在于:

所述细胞生物支架为弹性多孔结构,孔径均一、贯通性好;具有良好的生物相容性或生物惰性,对细胞无毒无害;具备一定的机械强度,使其能够在力的作用下不至于发生破坏,维持细胞所需要的空间环境;具备一定的结构变形和恢复能力。

3. 如权利要求2所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,其特征在于:

所述生物反应器材质为生物相容性良好的刚性塑料,由两个生物容器和弹性支架夹具组成,所述生物容器上有溶液进出口,通过相应硅胶管与装有细胞培养液的蓝口瓶相连,在所述蠕动泵作用下形成灌流的循环回路。

4. 如权利要求3所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,其特征在于,所述生物容器包括:

第一弹性夹持,上端设计有与施力装置键合的部件,下端具有内螺纹;

第二弹性夹持,两端具有外螺纹,内部为空腔,侧壁具有溶液出入口;

第一弹性紧固件与第二弹性紧固件,所述第一弹性紧固件与第二弹性紧固件可拼接成一个圆环,所述圆环端面设有螺纹孔;

第三弹性夹持,为具有中心圆孔的端盖形状,具有内螺纹;

所述第一弹性紧固件与第二弹性紧固件固定在第二弹性夹持一边端面上,且所述第一弹性夹持与所述第三弹性夹持可分别旋合到所述第二弹性夹持两端。

5. 如权利要求4所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,其特征在于:

所述弹性支架夹具形状为哑铃状,内部中空,用于放置所述细胞生物支架;所述弹性支架夹具材料具有良好弹性的同时,具有很好的生物惰性,对细胞无毒;所述弹性支架夹具内部腔壁与所述细胞生物支架固化在一起。

6. 如权利要求5所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,其特征在于:

所述施加载荷装置包括电机、电机固定法兰、轴联器、滑动轴承、铜滑块、活动头、光滑导轨、丝杠、导轨支撑、支撑板;所述电机通过轴联器带动所述丝杠旋转,所述活动头在丝杠和光滑导轨上做水平方向运动;所述施加载荷装置由所述电机固定法兰和导轨支撑安放于所述支撑板上,所述支撑板中部掏空,便于安装生物反应器。

7. 如权利要求6所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,其特征

在于：

所述光滑导轨上设一滑动轴承，用于保证在拉伸或压缩过程中，增加水平方向的运动稳定性；在拉伸过程中，电机转速可调，可以实现不同拉伸频率下的拉伸试验。

8. 如权利要求 7 所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统，其特征在于：

通过销钉将所述生物反应器固定在所述活动头和导轨支撑之间。

9. 如权利要求 8 所述的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统，其特征在于：

所述控制模块在实验室虚拟工作平台 LabVIEW 中运行，先选择匹配的串口名称，根据需要定量调节样品长度、拉伸比、往返频率及往返次数；“开始”、“停止”键控制装置的启动及停止；所述蠕动泵蠕动频率可控制灌流流速，流速用流量计测得。

用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物力学的细胞培养系统,具体的讲,用于对三维生物弹性支架中细胞的灌流拉伸或压缩培养试验,探索细胞力学—生物学耦合规律。

背景技术

[0002] 作为生命体基本单元的细胞,一直处在复杂的三维力学环境中。力学刺激如何调控细胞骨架,细胞形态,细胞的增殖、分化等的机制尚不明确。研究表明,影响骨髓间充质干细胞的增殖、分化的力学因素主要有牵张应变、剪切应力、压应力、重力等。由于真实生物体内环境复杂,因此在体外进行细胞的分离、培养及力学实验是生物力学领域重要的研究方法。为考察力学刺激对细胞的影响,需要在三维环境的培养过程中施加力学刺激,研究力学信号对细胞的调控机制。

[0003] 目前,通常用于生物力学实验的力学刺激主要加载系统有四点弯曲、轴向牵拉、真空作用模型及 Flexercell 加载系统,这些加载系统主要针对二维膜结构的培养基,通常依靠加载频率及形变量调控力学刺激,对于三维材料的细胞培养并施加载荷的方法和装置还不常见。装置设计的难点在于,如何在三维系统中培养细胞并加以灌流拉伸 / 压缩。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对目前细胞培养及力学加载装置上的不足之处,提出一种三维灌流拉伸或压缩培养的生物力学系统,观察三维环境中灌流拉伸或压缩力学刺激对细胞生长影响的定量化研究,探索细胞力学—生物学耦合规律。

[0005] 为了解决上述问题,本发明提供一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,包括:

[0006] 细胞生物支架,用于模拟人体细胞真实的三维生长环境;

[0007] 生物反应器,设有夹持所述细胞生物支架的夹具及容纳所述细胞生物支架的腔体;

[0008] 蠕动泵,用于带动细胞培养液进入所述生物反应器进行灌流;

[0009] 施加载荷装置,用于对键合的所述生物反应器中的夹具提供周期性往复牵拉,进而对细胞施加拉伸或压缩力学刺激;

[0010] 控制模块,与计算机相连,对所述施加载荷装置进行控制,调节样品长度、拉伸比、往返频率及往返次数。

[0011] 进一步,所述细胞生物支架为弹性多孔结构,孔径均一、贯通性好;具有良好的生物相容性或生物惰性,对细胞无毒无害;具备一定的机械强度,使其能够在力的作用下不至于发生破坏,维持细胞所需要的空间环境;具备一定的结构变形和恢复能力。

[0012] 进一步,所述生物反应器材质为生物相容性良好的刚性塑料,由两个生物容器和弹性支架夹具组成,所述生物容器上有溶液进出口,通过相应硅胶管与装有细胞培养液的蓝口瓶相连,在所述蠕动泵作用下形成灌流的循环回路。

- [0013] 进一步,所述生物容器包括:
- [0014] 第一弹性夹持,上端设计有与施力装置键合的部件,下端具有内螺纹;
- [0015] 第二弹性夹持,两端具有外螺纹,内部为空腔,侧壁具有溶液出入口;
- [0016] 第一弹性紧固件与第二弹性紧固件,所述第一弹性紧固件与第二弹性紧固件可拼接成一个圆环,所述圆环端面设有螺纹孔;
- [0017] 第三弹性夹持,为具有中心圆孔的端盖形状,具有内螺纹;
- [0018] 所述第一弹性紧固件与第二弹性紧固件固定在第二弹性夹持一边端面上,且所述第一弹性夹持与所述第三弹性夹持可分别旋合到所述第二弹性夹持两端。
- [0019] 进一步,所述弹性支架夹具形状为哑铃状,内部中空,用于放置所述细胞生物支架;所述弹性支架夹具材料具有良好弹性的同时,具有很好的生物惰性,对细胞无毒;所述弹性支架夹具内部腔壁与所述细胞生物支架固化在一起。
- [0020] 进一步,所述施加载荷装置包括电机、电机固定法兰、轴联器、滑动轴承、铜滑块、活动头、光滑导轨、丝杠、导轨支撑、支撑板;所述电机通过轴联器带动所述丝杠旋转,所述活动头在丝杠和光滑导轨上做水平方向运动;所述施加载荷装置由所述电机固定法兰和导轨支撑安放于所述支撑板上,所述支撑板中部掏空,便于安装生物反应器。
- [0021] 进一步,所述光滑导轨上设一滑动轴承,用于保证在拉伸或压缩过程中,增加水平方向的运动稳定性;在拉伸过程中,电机转速可调,可以实现不同拉伸频率下的拉伸试验。
- [0022] 进一步,通过销钉将所述生物反应器固定在所述活动头和导轨支撑之间。
- [0023] 进一步,所述控制模块在实验室虚拟工作平台 LabVIEW 中运行,先选择匹配的串口名称,根据需要定量调节样品长度、拉伸比、往返频率及往返次数;“开始”、“停止”键控制装置的启动及停止;所述蠕动泵蠕动频率可控制灌流流速,流速用流量计测得。
- [0024] 相对于现有技术,本发明具有下列技术效果:
- [0025] 与现有技术相比,本发明具有的优点在于:模仿了体内真实复杂的力学环境,在实现三维细胞培养的同时,实现可控的灌流拉伸或压缩力学环境对细胞生长影响的定量化研究,探索细胞力学—生物学耦合规律。

附图说明

- [0026] 图 1 为本发明的灌流拉伸或压缩装置结构示意图。
- [0027] 图 2 为本发明的生物反应器拆分图。

具体实施方式

- [0028] 下文中将结合附图对本发明的实施例进行详细说明。需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互任意组合。
- [0029] 实施例一:
- [0030] 本发明提供了如附图 1-2 所示的一种用于细胞三维灌流拉伸压缩培养的生物力学系统,包括施加载荷装置、生物反应器、弹性细胞支架及程序控制部分等。
- [0031] 细胞生物支架(图中未示出),用于模拟人体细胞真实的三维生长环境;细胞生物支架为弹性多孔结构,孔径均一、贯通性好;具有良好的生物相容性或生物惰性,对细胞无毒无害;具备一定的机械强度,使其能够在力的作用下不至于发生破坏,维持细胞所需要的

空间环境；具备一定的结构变形和恢复能力。利用造孔剂与有机溶剂均匀混合，浇注后固化成型，最后去除造孔剂，是制备多孔细胞生物支架材料的一种常用方法。该方法简单实用，孔隙率高，孔径可控。在本实施例中，利用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 与羟基磷灰石 (HA) 复合，改进造孔剂法，制备了一种弹性多孔细胞生物支架材料。其中 PDMS 作为一种生物惰性高分子材料，具有很好的弹性及可加工性。HA 是人体中硬组织的主要无机成分，对骨的强度起主要作用。HA 组分使材料具有良好的生物相容性，提高了材料的强度。将 PDMS 与 HA 按一定比例复合来制备三维弹性细胞生物支架，使得所制备的三维弹性细胞生物支架材料在保持良好弹性的同时有利于细胞在孔内壁黏附。

[0032] 如图 2，生物反应器，设有夹持细胞生物支架的夹具及容纳细胞生物支架的腔体；生物反应器材质为生物相容性良好的刚性塑料，由两个生物容器 10 和一个弹性支架夹具 11 组成，生物容器 10 上有溶液进出口，通过相应硅胶管与装有细胞培养液的蓝口瓶相连，在蠕动泵作用下形成灌流的循环回路。

[0033] 生物容器 10 包括：第一弹性夹持 13，上端设计有与施力装置键合的部件 19，通过销钉将生物反应器固定在活动头 9 和导轨支撑 12 之间，下端具有内螺纹；第二弹性夹持 14，两端具有外螺纹，内部为空腔，侧壁具有溶液出入口 18，下端有凹槽与弹性支架夹具 11 相连；第一弹性紧固件 15 与第二弹性紧固件 16，第一弹性紧固件 15 与第二弹性紧固件 16 可拼接成一个圆环，圆环端面设有螺纹孔，用于固定弹性支架夹具 11；第三弹性夹持 17，为具有中心圆孔的端盖形状，具有内螺纹；第一弹性夹持 13 与第三弹性夹持 17 可分别旋合到第二弹性夹持 14 两端，并将第一弹性紧固件 15 与第二弹性紧固件 16 固定在第三弹性夹持 17 与第二弹性夹持 14 之间，保证了腔体的密封性。

[0034] 弹性支架夹具 11 形状为哑铃状，内部中空，用于放置细胞生物支架；弹性支架夹具 11 材料具有良好弹性的同时，具有很好的生物惰性，对细胞无毒；弹性支架夹具 11 内部腔壁与细胞生物支架固化贴合在一起。弹性支架夹具 11 和生物容器 10 固定，然后与拉伸或压缩装置键合。

[0035] 蠕动泵，用于带动细胞培养液进入生物反应器进行灌流。

[0036] 施加载荷装置，用于对键合的生物反应器中的夹具提供周期性往复牵拉，进而对细胞施加拉伸或压缩力学刺激；施加载荷装置包括电机 2、电机固定法兰 1、轴联器 3、滑动轴承 7、铜滑块 8、活动头 9、光滑导轨 4、丝杠 5、导轨支撑 12、支撑板 6；电机 2 通过轴联器 3 带动丝杠 5 旋转，活动头 9 在丝杠 5 和光滑导轨 4 上做水平方向运动；施加载荷装置由电机固定法兰 1 和导轨支撑 12 安放于支撑板 6 上，支撑板 6 中部掏空，便于安装生物反应器。光滑导轨 4 上设一滑动轴承 7，用于保证在拉伸或压缩过程中，增加水平方向的运动稳定性；在拉伸过程中，电机 2 转速可调，可以实现不同拉伸频率下的拉伸试验。

[0037] 控制模块，与计算机相连，对施加载荷装置进行控制，调节样品长度、拉伸比、往返频率及往返次数。

[0038] 控制模块在实验室虚拟工作平台 LabVIEW 中运行，先选择匹配的串口名称，根据需要定量调节样品长度、拉伸比、往返频率及往返次数；“开始”、“停止”键控制装置的启动及停止；蠕动泵蠕动频率可控制灌流流速，流速用流量计测得。

[0039] 生物容器 10 中细胞培养液通过硅胶管与生物反应器的溶液进出口 18 相连，可进行灌流；在蠕动泵的作用下，溶液由入口进入生物反应器，进行溶液灌流实验，由出口流出，

形成一个循环回路,为细胞的生长提供营养成分,蠕动泵的蠕动频率控制灌流时溶液流速。同时,通过软件设定好实验参数,计算机控制施加载荷装置,通过活动头 9 和丝杠 5 牵引弹性支架夹具 11,带动支架材料及细胞拉伸运动。

[0040] 具体实施:三维多孔细胞弹性支架制备如下所示:

[0041] PDMS/HAP 浆料制备:乙酸乙酯与 PDMS 混合,PDMS : 乙酸乙酯 = 3 : 1(质量比)。加入一定量 HAP 后球磨混合 5h;

[0042] 多孔材料制备:将筛分后的 NaCl 与 PDMS/HAP 浆料灌入模具中,在 80℃施加一定压力,2h 后固化。将固化后的材料从模具中取出,浸泡于超纯水中,超声处理,每两小时换水一次,NaCl 完全溶解后(1-2 天时间)得到所需的弹性多孔材料;所得试样为直径为 6mm,长度为 10mm 的圆柱体。

[0043] 制备的弹性支架涂上固化液(PDMS 及其固化剂道康宁 184 按照 10:1 的质量比混合),放入夹具内腔,在 80 摄氏度固化 2h;弹性支架夹具材料为医用级硅橡胶,质软,有弹性,形状为哑铃状,内部中空,空腔直径 6mm,上下底座圆直径 18mm,高度为 10mm。

[0044] 生物容器 10 的材质为生物相容性良好的刚性塑料,内部空腔可容纳 5ml—10ml 液体,溶液出入口内径为 2mm,外径为 4mm,与反应器材质相同,带有螺纹,与生物容器螺旋固定,下端圆形凹槽直径 18mm,通过直径 6mm 的圆形通道与空腔相连。

[0045] 将上述材料及蓝口瓶、蠕动硅胶管、生物反应器等高温高压灭菌,超级洁净台中将含有大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)的悬液通过抽真空从支架材料顶部缓慢滴入支架材料,并在 CO₂ 培养箱中培养 2h;种植后将弹性夹具两端放置于第二弹性夹持 14 凹槽中,通过第一弹性紧固件 15、第二弹性紧固件 16 及 6 个螺钉固定,两端的第一弹性夹持 13 与第三弹性夹持 17 采用螺纹螺紧,形成一个密封的通道,第三弹性夹持 17 为硅胶垫防止局部渗液;溶液出入口 18 与硅胶管相连,并用铁丝固定,硅胶管入口端通过蠕动泵通入蓝口瓶,出口端直接通入蓝口瓶中,形成灌流回路,蠕动泵蠕动频率调节灌流速率,通过流量计测得;生物反应器与施加载荷装置通过销钉键合,一端固定在导轨支撑 12 上,一端固定在活动头 9 上,电机 2 通过轴联器 3 带动丝杠 5 和活动头 9 在光滑导轨 4 上水平方向运动,从而牵引弹性支架夹具 11 带动贴壁的三维多孔弹性细胞生物支架水平运动,对细胞施加拉伸力刺激;施加载荷装置通过控制模块与计算机连接,在拉伸控制软件中选择对应串口名称,设定好参数。本实例样品长度为 10mm,拉伸比 10(10%),往返频率 1HZ,往返次数 21600,蠕动频率为 5HZ;接通电源,开始细胞三维灌流拉伸培养。

[0046] 结合实验中的数据,并与静态培养对照组比较,分析三维动态流体剪切环境和拉伸或压缩刺激对细胞生命活动的影响,同时还可进行不同频率不同拉伸比下的拉伸或压缩刺激定量实验及单独的灌流实验,揭示力学—生物学耦合规律。

[0047] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

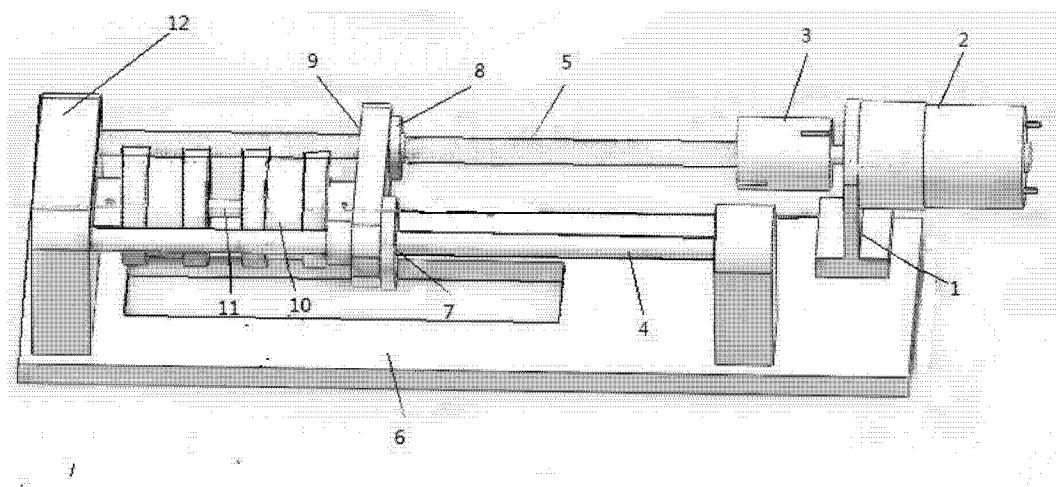


图 1

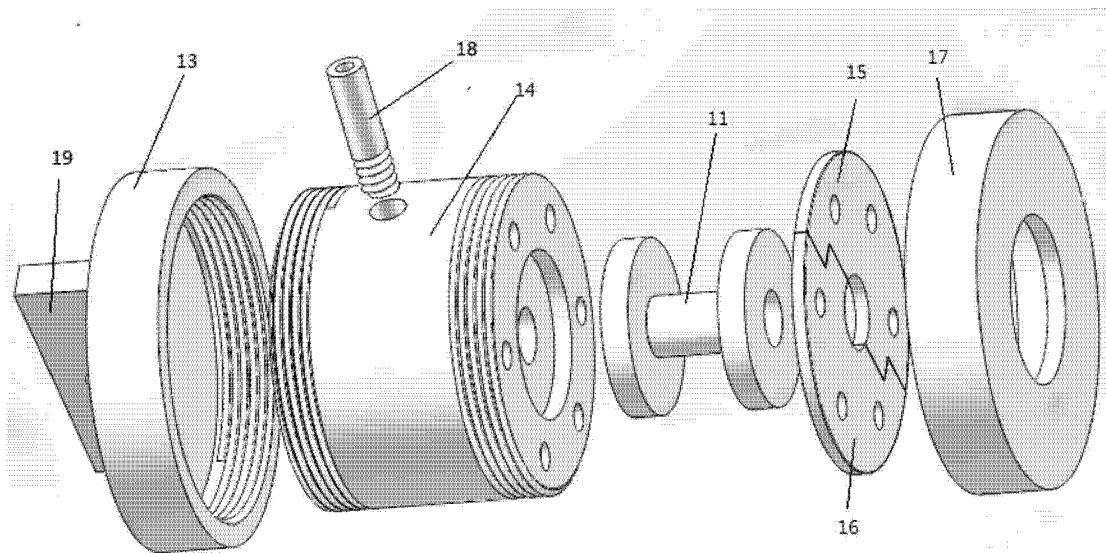


图 2