

新型体外细胞加压培养装置的构建及应用

梁倩¹, 杨子楠²

1. 广州医科大学附属口腔医院·广州口腔疾病研究所·口腔医学重点实验室, 广东 广州 510140; 2. 南方医科大学口腔医院牙周种植科, 广东 广州 510280

【摘要】目的:设计一种新型简易细胞加压培养装置模拟在体外培养条件下对细胞施加流体静压,为进一步研究恒定流体静压条件下体外细胞变化打下基础。**方法:**装置包括压力培养罐、微压传感器、可编程控制器以及微型气泵。通过在可编程控制器上编写控制程序来控制微型气泵的运行,进而调节培养罐内的气体压力,从而控制细胞受到的流体静压。**结果:**装置的压力加载范围为0~120 mmHg,波动幅度为 ± 2 mmHg。可将常规细胞培养板及培养瓶平稳放置在压力培养罐中并施加预设的流体静压。**结论:**该装置具有良好的准确性与可靠性,可用于在体外研究恒定流体静压下细胞变化。**【关键词】**压力加载装置;细胞力学;流体静压力
【中图分类号】R318.6;R329.24 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1005-202X(2020)02-0226-05

Development and application of a new pressure loading apparatus for cells *in vitro*

LIANG Qian¹, YANG Zi'nan²

1. Key Laboratory of Oral Medicine, Guangzhou Institute of Oral Diseases, Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China; 2. Department of Periodontology and Implantology, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Abstract: Objective To design a new pressure loading apparatus for cells *in vitro* for simulating the hydrostatic pressure on cells *in vitro*, thereby providing a foundation for the further study on the changes of cells *in vitro* under hydrostatic pressure. **Methods** The designed apparatus consisted of a pressure chamber, a micropressure sensor, a programmable controller and a mini air pump. The running status of the mini air pump was regulated by the control program coded on the programmable controller, so that the hydrostatic pressure on cells was controlled by regulating the gas pressure inside the chamber. **Results** The loading pressure of the apparatus ranged from 0 to 120 mmHg, with a fluctuation range of ± 2 mmHg. The common cell culture flask or plate could be steadily put in the pressure chamber and loaded with preset hydrostatic pressure. **Conclusion** The designed pressure loading apparatus has high accuracy and reliability, and it is suitable for studying the effects of constant hydrostatic pressure on cells *in vitro*. **Keywords:** pressure loading apparatus; cell mechanics; hydrostatic pressure

前言

人体内大部分细胞依据其所处微环境都暴露在各种生物机械力下。研究者们对介导细胞在压力下发生变化的细胞内信号传导通路进行了广泛而又深入的研究。研究显示环磷酸腺苷、前列腺素E2以及环前列腺素等细胞因子表达量的增高可能是环境压

力升高作用于体外培养细胞过程中的重要环节^[1-2],而来自人体的各种细胞在流体静压力下也会在细胞形态和功能上产生相应变化。例如,内皮细胞暴露在升高的流体静压力下时,碱性纤维母细胞生长因子的表达升高可能会导致细胞在形态和增殖能力上的一系列变化^[3]。与此同时,研究发现实体瘤中的组织间质液压高于周围正常组织中的压力,这可能是肿瘤组织中异常的淋巴血管系统所导致的组织液回流障碍^[4]。进一步的研究表明肿瘤内的流体静压力可以影响肿瘤细胞的生物学行为^[5]。

对体外细胞在压力下变化的研究离不开体外细胞加压培养装置。早期的研究者曾尝试将鸡胚胎胫骨内膜细胞培养在成对的肋间肌基质上,在肌肉组

【收稿日期】2019-10-15

【基金项目】广东省医学科学技术研究基金(A2019162)

【作者简介】梁倩,硕士,主治医师,主要从事口腔颌面部肿瘤的临床和基础研究,E-mail: lqskywalker@163.com

【通信作者】杨子楠,博士,医师,主要从事口腔颌面部肿瘤的临床和基础研究,E-mail: yzn1988@yeah.net

织萎缩后,肋骨会彼此靠近,以此来对培养在其上的细胞提供压力的作用。随后,研究者们进一步利用气体或液体产生的静压使细胞受到相应的压应力作用,使研究进入量化阶段^[6]。经过多年改进和发展,多种体外培养细胞的加力装置已经被研制出来,大致可分为离心力加载装置、流体剪切力加载装置、空气液体静压应力加载装置^[7]、基底形变加载装置、静态膜式细胞牵张力加载装置^[8]、Flexercell细胞加载装置和Petriperm弹力膜培养皿加载装置等,其中部分装置已经商品化。但这些装置都各有优缺点,并分别适用于研究不同的细胞类型。如离心力加载装置不能真实反映细胞的生理状态, Flexercell细胞加载装置、Petriperm弹力膜培养皿加载装置结构复杂且价格昂贵,流体剪切力加载装置仅适用于研究血管内皮细胞的体外加载实验等。

为了便于研究体外细胞在流体静压力下的变化及其机制,有必要开发出一种新的简易细胞加压培养装置,该装置应可以在体外对细胞在指定的培养条件下进行流体静压力的加载,并对压力大小和作用时间进行灵敏的控制。因此,本研究开发出了一种新型简易细胞加压培养装置,并初步应用于研究工作。

1 装置原理及设计

1.1 装置原理

本装置可用于模拟组织内细胞的流体静压力环境。将压力培养罐整体放入常规的细胞培养箱内,并将加压装置的进气导管口固定在细胞培养箱内,导管引出到放置于培养箱外的加压装置内。使用时,将细胞培养瓶、培养皿或培养板放入压力培养罐,拧紧罐体上盖(罐体与罐体上盖通过橡胶密封圈密封),插入电源对控制装置进行通电,通过控制器按键对所需实验压力以及压力波动范围进行设定,操作控制器按键启动自动控制程序,微型气泵自动运转向压力培养罐充压。当细胞密封培养罐内压力达到设定试验压力时,气泵自动停止运转;当细胞密封培养罐压力低于设定的试验下限压力时,气泵再次自动运转,直至再次达到设定试验压力。本装置同时设有手动启动气泵运转功能,可直接操作控制器按键启动微型气泵达到所需的压力。本装置在细胞密封培养罐上盖顶部另设有罐内压力释放阀,可按需要随时释放罐内压力。新型简易细胞加压培养装置结构图见图1a。

1.2 装置设计

1.2.1 气体压力加载 进气源选择常规细胞培养箱内气体,即5%的CO₂和95%的空气组成的混合气体,

同时保证培养腔内的无菌环境。压力培养罐选用市售的家用压力锅改装,见图1b。

1.2.2 测量、控制与执行 细胞加压培养装置测量、控制与执行部分由3个主要元件构成(图1c):(1)具有高精度、高灵敏度的微压传感器(VP4-4-1-1MP-M20*1.5-P2微压传感器,广州华茂传感仪器有限公司,测量范围:-15~15 kPa,测量精度:±0.5%),可实时监控细胞压力培养罐内压力的变化,并将压力大小数值转换成电信号输入到可编程序控制器;(2)可编程序控制器(TP04P-22XA1R可编程序控制器,台达电子,2入2出+模拟量输入,DC24V),可以按照细胞加压培养的实验要求编制自动控制程序,并可随时在可编程序控制器附带的LED屏幕设定和修改实验压力参数,LED屏幕可以实时显示微型气泵的工作状态以及细胞压力培养罐内压力(具体显示内容见下述);(3)微型气泵(WXQB-1型微型气泵,台达电子,工作电压:24 V,最大工作压力:450 mmHg,最大工作流量:2 L/min),接收可编程序控制器的电信号后开始运行,向压力培养罐内泵入常规细胞培养箱内气体的混合气体(体积分数为5%的CO₂与体积分数为95%的空气),并在达到设定压力后停止运转;细胞加压培养装置测量、控制与执行部分电气控制原理及工作原理见图2。

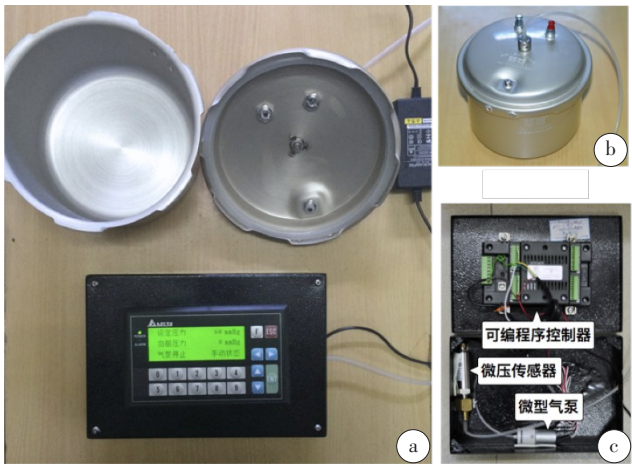


图1 细胞加压培养装置
Fig.1 Pressure loading apparatus

1.2.3 细胞加压培养装置实际操作 (1)将待加压细胞平稳放入压力培养罐内,安放好罐盖后,将压力培养罐整体放入常规的细胞培养箱内,并将加压装置的进气导管口固定在细胞培养箱内,严密关闭细胞培养箱门。(2)将开关电源插头插入房间内220 V电源后,控制器屏幕显示装置名称(时间约3 s):细胞培养压力控制器。然后屏幕显示:设定压力(mmHg);

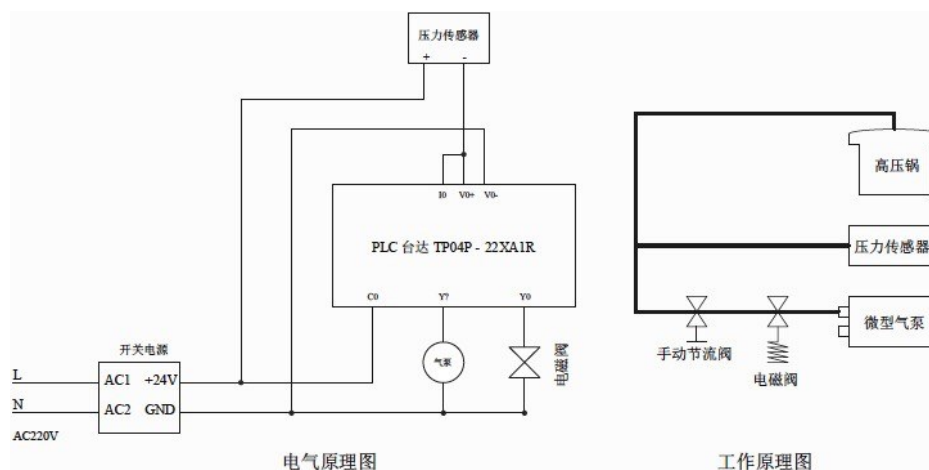


图2 加压培养装置电气控制原理图及工作原理图

Fig.2 Schematic diagram of the electric control for pressure loading apparatus and its working schematic diagram

当前压力(mmHg);气泵停止;手动状态。(3)按压“2”键进入压力设定界面,屏幕显示:设定压力(mmHg);标准压力(mmHg);上限压力(mmHg);下限压力(mmHg)。如需确定或更改设定压力,按压“5”键,在屏幕显示的方框内输入所要参数,然后按压“ENT”键返回上一界面;若不需更改,则按压“ESC”键返回上一界面。如需确定或更改标准压力、上限压力、下限压力则分别按压“6”、“7”、“8”键,方法同上。参数设定或更改完成后,再次按压“2”键,返回上一界面。(4)按压“1”键进行“手动状态”与“自动状态”功能互换。当屏幕显示“自动状态”时,细胞加压培养装置按上述已设定的试验压力条件自动启动已编制完成的试验自动控制程序,使细胞压力培养罐内维持在预设压力范围。(5)当屏幕显示“手动状态”时,长时间按压“0”键,微型气泵开始工作,细胞压力培养罐内压力缓慢上升。达到实验所需压力时,松开“0”键,微型气泵停止工作。

2 结果

2.1 流体静压力加载实验

应用本装置研究体外培养时流体静压力对舌鳞癌细胞 SCC-9 体外迁移能力的影响。根据文献[9-10]报道并考虑舌鳞癌患者体内肿瘤组织微环境的流体静压力,本实验选择实验压力值为 30 mmHg。

按实验方案将细胞培养板放入细胞密封培养罐内,安装罐盖使培养罐密封,关上培养箱门后,操作控制器向培养罐内充气,使罐内压力达到预定 30 mmHg。同时,控制器显示屏显示实时监控的罐内压力。根据控制器内自设的逻辑控制程序,当罐内压力下降 2 mmHg 时,气泵自动运转向罐内充气加压。当压力达到 30 mmHg 时,气泵停止运转,压力稳定在预设压力范围。通过此

控制程序,可以使罐内压力稳定控制在预设压力的 ± 2 mmHg(即 28~32 mmHg 之间)。

2.2 细胞培养及划痕实验

将 SCC-9 细胞接种在六孔板中,采用含 10.0% 胎牛血清(Fatal Bovine Serum, FBS)的 DMEM 培养液,在 37.0℃、5.0%CO₂ 的培养箱中进行培养。待细胞生长至 70% 融合后,用无菌的标准规格 200 μ L 枪头,中等力度在孔中间垂直滑行,划出一道无细胞区域(即划痕)。划痕后的细胞使用无血清 DMEM 培养液清洗 3 遍,以去除细胞碎屑以及悬浮的细胞。划痕后的细胞使用含 1.0% FBS 的 DMEM 培养液进行培养,实验组细胞放置在预设压力为 30 mmHg 的培养罐内,对照组细胞直接放在培养箱内。在实验的第 0、48 小时对划痕进行观察和拍照,估测细胞划痕的愈合速度。

实验结果显示,实验组和对照组在细胞形态上无明显差别。实验组划痕愈合的速度明显快于对照组,见图 3。

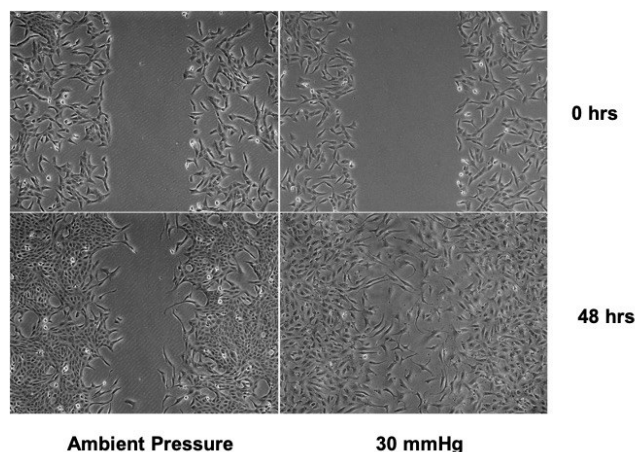


图3 30 mmHg 的流体静压力促进 SCC-9 细胞划痕愈合

Fig.3 Scratch-healing of SCC-9 cells increased by 30 mmHg hydrostatic pressure

3 讨论

为了研究细胞在压力下发生的改变及其机制,有必要在体外创造出一个相似的压力环境,因此研究者们开发出了各种不同的压力培养装置以满足不同研究的需要^[7-8]。但由于不同研究课题的具体实验要求不同,这些装置之间并不一定能相互替代。徐劲松等^[11]研制出了一套高压培养细胞装置,该装置可以模拟动脉内压力随着心脏收缩和舒张产生的静水压波动,较好地还原了细胞在高血压病理状态下所承受的机械力学的变化。冯雪等^[8]研制的弹性膜细胞压力加载系统则可以对细胞直接施加机械压力,对培养细胞进行有效的机械牵拉加载,可用于在体外研究正畸治疗对人牙周膜成纤维细胞的影响。但是,这些装置都不适合在体外模拟流体静压力环境。

早在1998年,Kawata等^[12]就开发研制出了一套细胞加压培养装置,可以在体外对细胞施加流体静压力,并用其研究鼠肾小球系膜细胞在压力下的增殖能力的改变。之后,也有厂家研制出相类似的装置并商品化,应用于研究中。与此同时,我国学者也研发出了此类装置,如第四军医大学口腔医学院的压力和温度可控性细胞压力加载仪器^[13-14]、上海中医药大学的压力加载控制装置^[15]以及四川大学的体外细胞压应力加载装置^[6]等。然而,这些细胞加压培养装置的结构均较为复杂,需要包含储气钢瓶、步进电机、电脑等一系列配套设施,并占据专门的空间来进行实验。而且,无论是购买商品化的装置还是自行研制,费用都较高,难以广泛地在科研单位中推广应用。

也有研究者尝试用更为简便的方式来模拟流体静压力下的细胞培养环境。黄生高等^[16]通过在压力锅上改装单向进气阀及压力表的方法建立细胞压力培养装置,并通过将整套装置安放在常规的培养箱以获得合适的温度,使用前需要用打气筒手动进行加压。廖明庭等^[17]也使用相类似的方法研究髌突细胞在压力下的变化,只是充压时使用了负压吸引器。还有研究者将进气源设计为氮气,使用氮气对培养罐中的细胞进行加压^[18],以达到对罐内各种气体分压更为精准的控制。这些较为简单的实验装置虽然能实现体外细胞的压力培养环境,但难以长时间保持恒定压力,需要实验者实时对装置内压力进行人工监控,压力下降时随时充压使系统保持在预设的压力值。这些装置不但费时费力,且难以精确地控制压力,不能满足长时间维持恒定压力的实验要求。

参考以上细胞加压培养装置的优缺点,结合我们课题组的实际研究需求,我们开发出了一种新型简易细胞加压培养装置。该装置结构简单,主要由两部分组成:一部分为细胞压力培养罐,可选购市售的家用压力锅进行改装;另一部分为控制部分,由开关电源、可编程控制器、高精度微压传感器、微型气泵、单向阀等部件组成。该装置相对于前文所述的简单加压培养装置,增加了一个控制部分,可以自动监控装置内的压力,当压力达到设定压力下限,自动充压以达到设定的压力值,有效避免人工测压充压所导致的误差。而相较前文所述的复杂的细胞压力培养装置,我们的装置有效利用了常规细胞培养箱所提供的合适的温度、湿度以及混合气体的环境,避免另外设计连接高压气瓶、恒温设备等。另外,将可编程控制器、高精度微压传感器和微型气泵集成为一个控制单元,可同时完成压力设定、压力检测以及充压等控制步骤,简化了电脑、步进电机等配套仪器。这些改进有效地降低了制造成本以及系统的复杂性,使这套装置更易用且便于维护。装置较为简单轻便,可以由一名实验员轻松地拿起并转移位置,使用时更加灵活方便。

由于较前文所述的复杂装置有了一定的简化,我们的装置在功能上也相应的有所欠缺。如Kawata等^[12]的细胞加压培养装置使用了O₂及CO₂的高压气瓶,可以在实验充气的过程中调整二者的混合比例,从而模拟肿瘤微环境中的缺氧的情况;而李明黎等^[6]的细胞加压培养装置包含了电脑、步进电机等,可以实现压力的实时监控并记录压力变化曲线,还可以通过步进电机实现压力的脉冲式波动。这些功能都是我们的简易细胞加压培养装置所不具备的,我们的实验装置不能满足这些特定的实验条件。

综上所述,本简易细胞加压培养装置具有实验压力波动范围小、操作简单灵活、部件少、成本低、便于推广应用等特点,能满足细胞加压培养的要求,适用于研究恒定流体静压力下体外培养细胞的变化及机制。

【参考文献】

- [1] KLEIN-NULEND J, VAN DER PLAS A, SEMEINS C M, et al. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress *in vitro* [J]. *FASEB J*, 1995, 9(5): 441-445.
- [2] YOUSEFIAN J, FIROUZIAN F, SHANFELD J, et al. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1995, 108(4): 402-409.
- [3] ACEVEDO A D, BOWSER S S, GERRITSEN M E, et al. Morphological and proliferative responses of endothelial cells to

- hydrostatic pressure: role of fibroblast growth factor [J]. J Cell Physiol, 1993, 157(3): 603-614.
- [4] LUNT S J, FYLES A, HILL R P, et al. Interstitial fluid pressure in tumors: therapeutic barrier and biomarker of angiogenesis[J]. Future Oncol, 2008, 4(6): 793-802.
- [5] FUKUMURA D, JAIN R K. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize[J]. J Cell Biochem, 2007, 101(4): 937-949.
- [6] 李明黎, 邹远文, 黄学进, 等. 体外细胞压应力加载装置的研制与应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(22): 4291-4294.
- LI M L, ZOU Y W, HUANG X J, et al. Development and application of compressive loading apparatus for *in vitro* cultured cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(22): 4291-4294.
- [7] FINGER A R, SARGENT C Y, DULANEY K O, et al. Differential effects on messenger ribonucleic acid expression by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells seeded in agarose constructs due to ramped and steady applications of cyclic hydrostatic pressure [J]. Tissue Eng, 2007, 13(6): 1151-1158.
- [8] 冯雪, 陈富林, 程兵, 等. 培养细胞机械牵拉加载系统的研制[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(7): 387-389.
- FENG X, CHEN F L, CHENG B, et al. Development of a mechanical stretching loading system for cultured cells[J]. Journal of Clinical Stomatology, 2003, 19(7): 387-389.
- [9] RAJU B, HAUG S R, IBRAHIM S O, et al. High interstitial fluid pressure in rat tongue cancer is related to increased lymph vessel area, tumor size, invasiveness and decreased body weight[J]. J Oral Pathol Med, 2008, 37(3): 137-144.
- [10] YU T, WANG Z, LIU K, et al. High interstitial fluid pressure promotes tumor progression through inducing lymphatic metastasis-related protein expressions in oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Transl Oncol, 2014, 16(6): 539-547.
- [11] 徐劲松, 程晓曙. 介绍一种高压离体细胞培养装置[J]. 高血压杂志, 2002, 10(6): 60-61.
- XU J S, CHEN X S. An *in vitro* pressure loading cell culture system [J]. Chinese Journal of Hypertension, 2002, 10(6): 60-61.
- [12] KAWATA Y, FUJII Z, SAKUMURA T, et al. High pressure conditions promote the proliferation of rat cultured mesangial cells *in vitro*[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1401(2): 195-202.
- [13] 彭磊, 孙铮, 王臻, 等. 持续性压力培养环境对兔骨髓基质干细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(27): 5239-5242.
- PENG L, SUN Z, WANG Z, et al. Effect of continuous pressure on the proliferation of rabbit's bone marrow stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(27): 5239-5242.
- [14] 黄林剑, 李辉, 谢千阳, 等. 静压力下兔髌突软骨细胞COL2A1、SOX9、COL1A1和ALP的表达变化[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2014, 12(4): 295-300.
- HUANG L J, LI H, XIE Q Y, et al. Effect of static pressure on expression of COL2A1, SOX9, COL1A1 and ALP in temporomandibular condylar chondrocytes in rabbit[J]. China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2014, 12(4): 295-300.
- [15] 黄正, 张子峰, 刘益杰, 等. 周期性压力对兔软骨细胞整合素 $\alpha 3\beta 1$ 的影响[J]. 生物医学工程研究, 2014, 33(1): 56-58.
- HUANG Z, ZHANG Z F, LIU Y J, et al. Effects of cyclic pressure on integrin- $\alpha 3\beta 1$ of rabbit chondrocytes [J]. Journal of Biomedical Engineering Research, 2014, 33(1): 56-58.
- [16] 黄生高, 王明朗, 钟孝欢, 等. 大鼠髌状突软骨细胞体外分离培养和压力模型的构建[J]. 实用预防医学, 2007, 14(4): 1013-1017.
- HUANG S G, WANG M L, ZHONG X H, et al. Culture of SD rat chondrocytes and establishment of mechanical pressure model *in vitro* [J]. Practical Preventive Medicine, 2007, 14(4): 1013-1017.
- [17] 廖明庭, 张志光, 苏凯, 等. 压力对体外培养髌突软骨细胞增殖、凋亡的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2005, 26(3): 282-284.
- LIAO M T, ZHANG Z G, SU K, et al. Influence of static compression on proliferation activity, apoptosis, and matrix proteoglycans synthesis in condylar cartilage chondrocytes *in vitro* [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2005, 26(3): 282-284.
- [18] 于玉根, 傅水林, 宫衡, 等. 静压力对CHO细胞表达hGM-CSF的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(6): 86-87.
- YU Y G, FU S L, GONG H, et al. The influence of static pressure on the expression of hGM-CSF in CHO cells [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2005, 18(6): 86-87.

(编辑:谭斯允)