



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101892153 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 201010243578. 1

(22) 申请日 2010. 08. 03

(71) 申请人 北京航空航天大学

地址 100191 北京市海淀区学院路 37 号

(72) 发明人 樊瑜波 李萍 牛旭锋 冯利敏

李欣蔚 贾璐

(74) 专利代理机构 北京永创新实专利事务所

11121

代理人 周长琪

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006. 01)

C12M 1/42 (2006. 01)

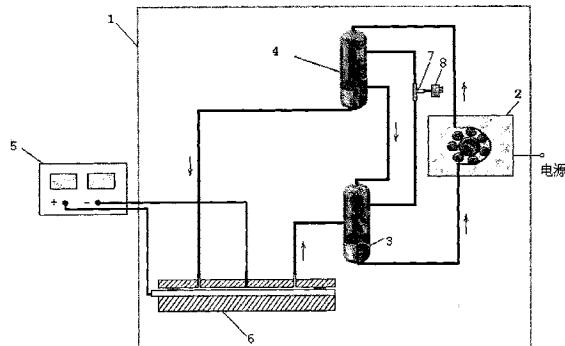
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置

(57) 摘要

本发明提供了一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置，主要包括培养箱、蠕动泵、下游储液瓶、上游储液瓶、信号发生器和平板流动腔。蠕动泵、下游储液瓶与上游储液瓶等部件通过硅胶管连接，构成培养液灌流系统，用于提供细胞生长所需营养，为细胞加载剪切力刺激；信号发生器用于提供电信号，给细胞加载电刺激；平板流动腔，用于提供细胞生长所需基底，并通过与信号发生器和培养液灌流系统相连为平板电极上的细胞提供剪切力 - 电共同作用环境。本发明建立了力刺激联合电刺激下的细胞培养的环境，克服了现有技术不能模拟体内细胞处于力、电刺激共同作用环境的缺陷，为促进细胞、组织的功能化培养奠定基础。



1. 一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置, 其特征在于 : 包括培养箱 (1)、蠕动泵 (2)、下游储液瓶 (3)、上游储液瓶 (4)、信号发生器 (5)、平板流动腔 (6)、三通 (7) 和滤器 (8); 所述的信号发生器 (5) 设置在培养箱 (1) 外部, 其余设置在培养箱 (1) 内部;

所述的蠕动泵 (2)、下游储液瓶 (3)、上游储液瓶 (4)、三通 (7) 和滤器 (8) 共同构成培养液灌流系统, 用于为平板流动腔 (6) 内的细胞生长提供循环的细胞培养液和剪切力;

所述信号发生器 (5) 有正极和负极两个电极, 正极通过电极线与平板流动腔 (6) 的平板电极相连, 负极通过电极线与平板流动腔 (6) 的金属片电极相连, 为平板流动腔 (6) 内的细胞生长提供电刺激;

所述培养液灌流系统各部分具体连接为 : 下游储液瓶 (3) 与上游储液瓶 (4) 之间通过三条硅胶管连接, 第一条硅胶管上连接有蠕动泵 (2), 下游储液瓶 (3) 中的细胞培养液在蠕动泵的作用下被送到上游储液瓶 (4); 第二条硅胶管连通两个储液瓶中细胞培养液上方的气体环境, 同时第二条硅胶管通过三通 (7) 连接滤器 (8), 使得下游储液瓶 (3)、上游储液瓶 (4) 中细胞培养液上方气体环境与培养箱 (1) 中气体环境相通; 第三条硅胶管用于使上游储液瓶 (4) 中的细胞培养液回流到下游储液瓶 (3) 中;

上游储液瓶 (4) 通过底部连通第四根硅胶管, 所述的第四根硅胶管与平板流动腔 (6) 的流体入口连通; 下游储液瓶 (3) 通过第五根硅胶管与平板流动腔 (6) 的流体出口连通, 形成一个细胞培养液循环系统。

2. 根据权利要求 1 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置, 其特征在于 : 所述培养箱 (1) 两侧分别有一个与外界相通的孔道, 用于通过信号发生器 (5) 的电极线和蠕动泵 (2) 的电源线, 所述的孔道与电极线、电源线的连接处是密封的。

3. 根据权利要求 1 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置, 其特征在于 : 所述第一条硅胶管的两端分别连接在下游储液瓶 (3) 的底部位置和上游储液瓶 (4) 的顶部位置; 第二条硅胶管的两端分别连接在下游储液瓶 (3) 上靠近顶部的位置和上游储液瓶 (4) 上靠近顶部的位置; 第三条硅胶管的一端连接在下游储液瓶 (3) 的顶部位置, 另一端连接在上游储液瓶 (4) 上的位置低于第二条硅胶管连接端。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置, 其特征在于 : 所述上游储液瓶 (4), 其内细胞培养液的水平面到达第三条硅胶管的位置时, 细胞培养液回流到下游储液瓶 (3) 中。

5. 根据权利要求 1 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置, 其特征在于 : 所述平板流动腔 (6) 包括有机玻璃盖子、硅胶垫圈、平板电极和有机玻璃底座; 其中, 有机玻璃盖子上有一个金属片电极、一个流体入口和一个流体出口;

所述有机玻璃底座放置在最下面, 其上放置平板电极, 平板电极上放置有硅胶垫圈, 硅胶垫圈上面放置有机玻璃盖子, 硅胶垫圈为长方形, 平板电极、硅胶垫圈与硅胶垫圈上放置的有机玻璃盖子三者共同围成一个流动腔; 有机玻璃盖子通过螺丝固定在有机玻璃底座上;

流体入口和流体出口都与所述流动腔相通。

6. 根据权利要求 5 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置, 其特征在于 : 所述平板流动腔 (6) 的平板电极由导电玻璃组成, 或者由导电玻璃和导电聚合物组成;

所述导电玻璃, 为掺杂氟的二氧化锡导电玻璃, 或者氧化铟锡导电玻璃;

所述导电聚合物，为聚吡咯、或者聚吡咯与聚乳酸的共聚物、或者聚吡咯与壳聚糖的共聚物，沉积或平铺于导电玻璃上。

7. 根据权利要求 5 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置，其特征在于：所述金属片电极，为不锈钢电极或者铂电极。

8. 根据权利要求 1 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置，其特征在于：所述的剪切力为定常流或者脉动流的流体剪切应力。

9. 根据权利要求 1 所述的一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置，其特征在于：所述的电刺激为恒电压、脉冲电压或者直流微电流。

## 一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞工程和组织工程领域,特别是将力学环境与电学环境联合作用于细胞的培养装置。

### 背景技术

[0002] 在组织工程中,细胞、组织的体外功能化培养已成为组织工程的核心,也是形成组织工程产业的必要技术基础。而提供与体内细胞生存条件相近似的体外生长环境,对于细胞、组织的三维培养和功能化至关重要。其中,力场、电场等物理影响因子在其中起着不可忽视的作用。

[0003] 力学环境对器官、组织、细胞甚至亚细胞等各个层次的生命活动都有重要的影响。如血流产生的剪切力,直接作用于内皮细胞,对内皮细胞形态、结构和功能均产生影响,有别于静态培养情况。内皮细胞在剪切力作用下细胞面积和长轴逐渐增加,长轴沿流向排列,内皮细胞在形态学上的变化与剪切力大小和持续时间有关;内皮细胞在受剪切力后,血管舒张因子(前列腺环素、一氧化氮)和血管收缩因子(内皮素-1)的合成和分泌都发生一定的改变,也同样能使血管某些蛋白的基因表达增加,如黏附分子、生长因子、细胞活素等;剪切力能激活内皮细胞整合素、钾离子、钙离子通道等将机械信号转化为生化信号,从而促进内皮细胞黏附及分泌功能等;不同类型剪切力对内皮细胞增殖的影响也不同,层流及脉动流剪切力会抑制内皮细胞的增殖,而往复流剪切力或带梯度剪切力会促进内皮细胞增殖;剪切力能够诱导人内皮细胞凋亡抑制蛋白(IAP-1 和 IAP-2)表达,从而抑制内皮细胞凋亡发挥抗动脉粥样硬化作用。细胞间隙液流体剪切力可有助于骨细胞感知细胞周围机械环境变化,在机械力信号传导中发挥重要的作用,从而影响骨细胞活化、骨细胞矿物动态平衡和矿化等。剪切力可调节成骨细胞的增殖、分化、矿化,这种调节表现出对剪切力大小的依赖性。低剪切力可激活血管平滑肌细胞的 C-fos 和 C-myc 基因,调节转录,从而调节剪切力 - 血管平滑肌细胞的信号转导通路,进而影响血管平滑肌细胞的增殖和凋亡。

[0004] 除了复杂的力学环境,电学环境也是体内细胞生长的重要微环境之一。在生理电场存在的情况下,细胞产生分裂、分化和迁移。如将微电刺激用于细胞体外培养中以模拟体内的电学环境,电刺激可以使内皮细胞形态发生改变,细胞向垂直于电场的方向拉长,同时可以促使细胞片状伪足重新分布、刺激肌动蛋白的合成以及激活内皮细胞生长因子受体(VEGFR)等信号通路。电刺激能够诱导人成骨细胞钙离子浓度的增加,促进成骨细胞的增殖、生长因子的分泌以及细胞外基质的合成;使用导电聚吡咯作为培养基质材料对神经细胞 PC-12 等进行培养,实验显示聚吡咯膜支持鸡的包含雪旺氏细胞的坐骨神经细胞、纤维原细胞和其它神经节派生细胞的生长和分化;在心肌细胞培养过程中加载电刺激能诱发心肌细胞的有序生长,提高心肌细胞同步收缩的程度,并观察到高度组织的超微结构,如间隙连接、闰盘等,α - 肌动蛋白、心肌钙蛋白等心脏蛋白分泌量也会增加。

[0005] 由以上可知,力刺激或电刺激的分别加载,能促进细胞的生长。但体内细胞处于力电共同作用的环境下,这两个因素缺一不可,对于维持细胞正常功能、分化、分泌等都至关

重要。目前已经有研究者开始考虑将这两种因素的综合影响应用在组织、细胞的培养中。但是，国内至今还未发现可同时对细胞加载力电刺激的培养装置。

## 发明内容

[0006] 为了使离体培养的细胞更接近在体细胞，从而推动细胞和组织工程快速发展，本发明提供了一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置。

[0007] 本发明为一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置，包括培养箱、信号发生器，以及设置在培养箱内部的蠕动泵、下游储液瓶、上游储液瓶、平板流动腔、三通和滤器。

[0008] 蠕动泵、下游储液瓶、上游储液瓶、三通和滤器共同构成培养液灌流系统，用于为平板流动腔内的细胞生长提供循环的细胞培养液和剪切力；信号发生器有正极和负极两个电极，正极通过电极线与平板流动腔的平板电极相连，负极通过电极线与平板流动腔的金属片电极相连，为平板流动腔内的细胞生长提供电刺激；平板流动腔，用于提供细胞生长所需空间。

[0009] 所述培养液灌流系统各部分具体连接为：下游储液瓶与上游储液瓶之间通过三条硅胶管连接，第一条硅胶管上连接有蠕动泵，下游储液瓶中的细胞培养液在蠕动泵的作用下被送到上游储液瓶；第二条硅胶管连通两个储液瓶中细胞培养液上方的气体环境，同时第二条硅胶管通过三通连接滤器，使得下游储液瓶、上游储液瓶中细胞培养液上方气体环境与培养箱中气体环境相通，防止细菌进入；第三条硅胶管用于使上游储液瓶中的细胞培养液回流到下游储液瓶中。

[0010] 上游储液瓶通过底部连通第四根硅胶管，所述的第四根硅胶管与平板流动腔的流体入口连通；下游储液瓶通过第五根硅胶管与平板流动腔的流体出口连通，形成一个细胞培养液循环系统。

[0011] 打开蠕动泵和信号发生器，同时对平板电极上的细胞加载力刺激和电刺激。

[0012] 本发明所述的剪切力为定常流和脉动流等流体剪切力。

[0013] 本发明所述的电刺激为恒电压、脉冲电压、直流微电流等。

[0014] 本发明所述的平板电极由导电玻璃组成，或者导电玻璃和导电聚合物共同组成。导电玻璃为掺杂氟的二氧化锡导电玻璃或者氧化铟锡导电玻璃。导电聚合物为聚吡咯，或者聚吡咯与聚乳酸的共聚物，或者聚吡咯与壳聚糖的共聚物等，可沉积或平铺于导电玻璃上。

[0015] 本发明所述的金属片电极，分为不锈钢电极和铂电极等。

[0016] 本发明与现有技术相比具有如下优点：

[0017] (1) 本发明提供的剪切力刺激与电学刺激联合加载方式更接近于细胞生长、发育的体内环境，力电联合作用可改善细胞生长条件，从而促进细胞生长、提高细胞活性。

[0018] (2) 本发明既可用于细胞、组织培养，也可用于细胞、组织生长研究，并且对细胞体外扩增、细胞 / 支架复合物的体外构建及功能化有积极的意义。

[0019] (3) 本发明操作简单，稳定性好，具有较大的应用前景。

[0020] (4) 本发明的剪切力 - 电联合作用细胞培养装置能够实现对离体细胞同时加载力刺激和电刺激，选用透明的有机玻璃材料，便于在培养过程中实时观察，且生物相容性好、操作简单。

## 附图说明

- [0021] 图 1 为剪切力 - 电联合作用细胞培养装置的结构示意图；  
[0022] 图 2 为平板流动腔的结构示意图。  
[0023] 图中：  
[0024] 1- 培养箱；2- 蠕动泵；3- 下游储液瓶；4- 上游储液瓶；5- 信号发生器；6- 平板流动腔；7- 三通；8- 滤器；601- 有机玻璃盖子；602- 硅胶垫圈；603- 平板电极；604- 有机玻璃底座；605- 金属片电极；606- 流体入口；607- 流体出口。

## 具体实施方式

[0025] 如图 1 所示的，本发明是一种剪切力 - 电联合刺激的细胞培养装置，包括细胞培养箱 1、蠕动泵 2、下游储液瓶 3、上游储液瓶 4、信号发生器 5、平板流动腔 6、三通 7 和滤器 8。其中，蠕动泵 2、下游储液瓶 3、上游储液瓶 4、三通 7 和滤器 8 通过若干硅胶管连接，共同构成培养液灌流系统，用于为细胞加载剪切力，提供细胞生长所需营养。本发明的培养液灌流系统和平板流动腔 6 都置于培养箱 1 中，以保持适于细胞生长的二氧化碳浓度和有湿度的空气环境。

[0026] 培养液灌流系统各部分间连接，如图 1 所示，下游储液瓶 3 和上游储液瓶 4 之间通过三条硅胶管相连，第一条硅胶管连接有蠕动泵 2，用于将下游储液瓶 3 中的细胞培养液送到上游储液瓶 4，该硅胶管的两端分别连接在下游储液瓶 3 底部位置与上游储液瓶 4 的顶部位置。第二条硅胶管用于连通两个储液瓶中的气体环境，该硅胶管的两端分别连接在下游储液瓶 3 上靠近顶部的位置与上游储液瓶 4 上靠近顶部的位置，同时这条硅胶管通过三通 7 连接滤器 8，使下游储液瓶 3 和上游储液瓶 4 的气体环境与培养箱 1 中气体环境相通，防止细菌进入。第三条硅胶管用于使上游储液瓶 4 中的细胞培养液回流到下游储液瓶 3，该硅胶管的两端分别连接在下游储液瓶 3 的顶部，与上游储液瓶 4 底部与第二条硅胶管连接端之间位置。

[0027] 如图 1 所示，细胞培养液装入下游储液瓶 3 中，蠕动泵 2 为下游储液瓶 3 中的细胞培养液流到上游储液瓶 4 提供动力，在上游储液瓶 4 中细胞培养液的水平面到达上游储液瓶 4 所连接的第三条硅胶管的位置时，细胞培养液才回流到下游储液瓶 3 中。

[0028] 如图 1 所示的培养箱 1 用于提供细胞生长所需的二氧化碳、温度和湿度环境，培养箱 1 两侧分别有一个与外界相通的孔道，用于通过信号发生器 5 的电极线和蠕动泵 2 的电源线。培养箱 1 两侧的孔道与电极线、电源线连接处是密封的。

[0029] 如图 1 所示的信号发生器 5，有正极和负极两个电极，信号发生器 5 通过电极线与平板流动腔 6 相连接。

[0030] 平板流动腔 6 如图 2 所示，包括有机玻璃盖子 601、硅胶垫圈 602、平板电极 603 和有机玻璃底座 604，其中有机玻璃盖子 601 上有一个金属片电极 605、一个流体入口 606 和一个流体出口 607。

[0031] 如图 2 所示的平板流动腔 6 是一个集剪切力刺激与电刺激为一体的平板流动腔，其金属片电极 605 通过电极线与信号发生器 5 的负极相连，平板电极 603 通过电极线与信号发生器 5 的正极相连，流体入口 606 通过第四根硅胶管与上游储液瓶 4 的底部连通，流体

出口 607 通过第五根硅胶管与下游储液瓶 3 相连通。通过打开蠕动泵 2 和信号发生器 5，同时对平板电极 603 上的细胞加载剪切力刺激和电刺激。

[0032] 将接种细胞的平板电极 603 放于有机玻璃底座 604 上，再将硅胶垫圈 602 放于平板电极 603 上，硅胶垫圈 602 围成长方形，并与放在其上的有机玻璃盖子 601 共同围成流动腔，有机玻璃盖子 601 放在最上面，用螺丝将有机玻璃盖子 601 和有机玻璃底座 604 固定。流体入口 606 与流体出口 607 都与所围成的流动腔连通。

[0033] 平板电极 603 由导电玻璃组成，或者导电玻璃和导电聚合物共同组成。导电玻璃为掺杂氟的二氧化锡导电玻璃或者氧化铟锡导电玻璃；导电聚合物为聚吡咯，或者聚吡咯与聚乳酸的共聚物，或者聚吡咯与壳聚糖的共聚物，可沉积或平铺于导电玻璃上。

[0034] 所述的剪切力为定常流和脉动流等流体剪切力。

[0035] 信号发生器 5 提供的电刺激可为恒电压、脉冲电压、直流微电流等。

[0036] 金属片电极 605 可为不锈钢电极或者铂电极等。

[0037] 下面提供了应用本发明装置的实施例进一步说明本发明的装置及其优点。

#### 实施例 1 剪切力 - 电联合刺激的心肌细胞培养

[0039] 在无菌条件下把 1-3 天龄 SD 大鼠乳鼠的心肌细胞按  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  密度接种在平板电极 603 上，平板电极采用如掺杂氟的二氧化锡导电玻璃，预培养 3 天后，将接种心肌细胞的平板电极 603 放于有机玻璃底座 604 上，再将硅胶垫圈 602 放于平板电极 603 上，然后将有机玻璃盖子 601 放在最上面，最后用螺丝将有机玻璃盖子 601 和有机玻璃底座 604 固定。

[0040] 将高压灭菌后的下游储液瓶 3、上游储液瓶 4 通过三根硅胶管如图 1 所示相连。再将上游储液瓶 4 通过一根硅胶管与流体入口 606 相连，下游储液瓶 3 通过另一根硅胶管与流体出口 607 相连。在下游储液瓶 3 中加入培养基。

[0041] 将连接好的装置放入培养箱 1 中，以保证细胞生长对温度、湿度及二氧化碳的要求。将连通下游储液瓶 3 底部和上游储液瓶 4 顶部的一根硅胶管放入蠕动泵 2 中。分别将蠕动泵 2 的电源线和信号发生器 5 的电极线穿过培养箱 1 侧面的孔接入培养箱内。信号发生器 5 电极线与平板电极 603、金属片电极 605 相连。打开调节好的蠕动泵 2 和信号发生器 5 的电源，使得剪切力刺激和电刺激联合作用于心肌细胞，使心肌细胞在机械载荷和电载荷双重刺激的环境下生长、发育，完成培养物的培育。

[0042] 施加的剪切力刺激为  $10\text{dyne}/\text{cm}^2$ ，电刺激为脉冲电压，幅值为  $100\text{mV}$ ，频率为  $1\text{Hz}$ ，脉冲宽度为  $10\text{ms}$ ，刺激时间为  $12\text{h}$ 。

#### 实施例 2 剪切力 - 电联合刺激的内皮细胞培养

[0044] 在无菌条件下把人脐静脉内皮细胞按  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  密度接种在平板电极 603 上，如氧化铟锡导电玻璃，细胞贴壁第二天，将接种内皮细胞的平板电极 603 放于有机玻璃底座 604 上，再将硅胶垫圈 602 放于平板电极 603 上，然后将有机玻璃盖子 601 放在最上面，最后用螺丝将有机玻璃盖子 601 和有机玻璃底座 604 固定。

[0045] 将高压灭菌后的下游储液瓶 3、上游储液瓶 4 通过三根硅胶管如图 1 所示相连。再将上游储液瓶 4 通过一根硅胶管与流体入口 606 相连，下游储液瓶 3 通过另一根硅胶管与流体出口 607 相连。在下游储液瓶 3 中加入培养基。

[0046] 将连接好的装置放入培养箱 1 中，以保证细胞生长的对温度、湿度及二氧化碳的要求。将连通下游储液瓶 3 底部和上游储液瓶 4 顶部的一根硅胶管放入蠕动泵 2 中。分别

将蠕动泵 2 的电源线和信号发生器 5 的电极线穿过培养箱 1 侧面的孔接入培养箱内。信号发生器 5 与平板电极 603、金属片电极 605 相连。打开调节好的蠕动泵 2 和信号发生器 5 的电源，使得剪切力刺激和电刺激联合作用于内皮细胞，使内皮细胞在机械载荷和电载荷双重刺激的环境下生长、发育，完成培养物的培育。

[0047] 施加的剪切力刺激为  $20\text{dyne/cm}^2$ ，电刺激为恒电压  $200\text{mV}$ ，刺激时间为  $6\text{h}$ 。

[0048] 实施例 3 剪切力 - 电联合刺激的成骨细胞培养

[0049] 在无菌条件下把成骨细胞 MC3T3 细胞按  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  密度接种在平板电极 603 上，如沉积有导电聚吡咯的导电玻璃，细胞贴壁第二天，将接种成骨细胞的平板电极 603 放于有机玻璃底座 604 上，再将硅胶垫圈 602 放于平板电极 603 上，然后将有机玻璃盖子 601 放在最上面，最后用螺丝将有机玻璃盖子 601 和有机玻璃底座 604 固定。

[0050] 将高压灭菌后的下游储液瓶 3、上游储液瓶 4 通过三根硅胶管如图 1 所示相连。再将上游储液瓶 4 通过一根硅胶管与流体入口 606 相连，下游储液瓶 3 通过另一根硅胶管与流体出口 607 相连。在下游储液瓶 3 中加入培养基。

[0051] 将连接好的装置放入培养箱 1 中，以保证细胞生长的对温度、湿度及二氧化碳的要求。将连通下游储液瓶 3 底部和上游储液瓶 4 顶部的一根硅胶管放入蠕动泵 2 中。分别将蠕动泵 2 的电源线和信号发生器 5 的电极线穿过培养箱 1 侧面的孔接入培养箱内。信号发生器 5 正电极线与平板电极 603 相连，负电极线与金属片电极 605 相连。打开调节好的蠕动泵 2 和信号发生器 5 的电源，使得剪切力刺激和电刺激联合作用于成骨细胞，使成骨细胞在机械载荷和电载荷双重刺激的环境下生长、发育，完成培养物的培育。

[0052] 施加的剪切力刺激为  $15\text{dyne/cm}^2$ ，电刺激为恒电压  $150\text{mV}$ ，刺激时间为  $24\text{h}$ 。

[0053] 上述剪切力刺激、电刺激参数的设置，材料的改变是根据所培养的细胞特点不同进行选择的。

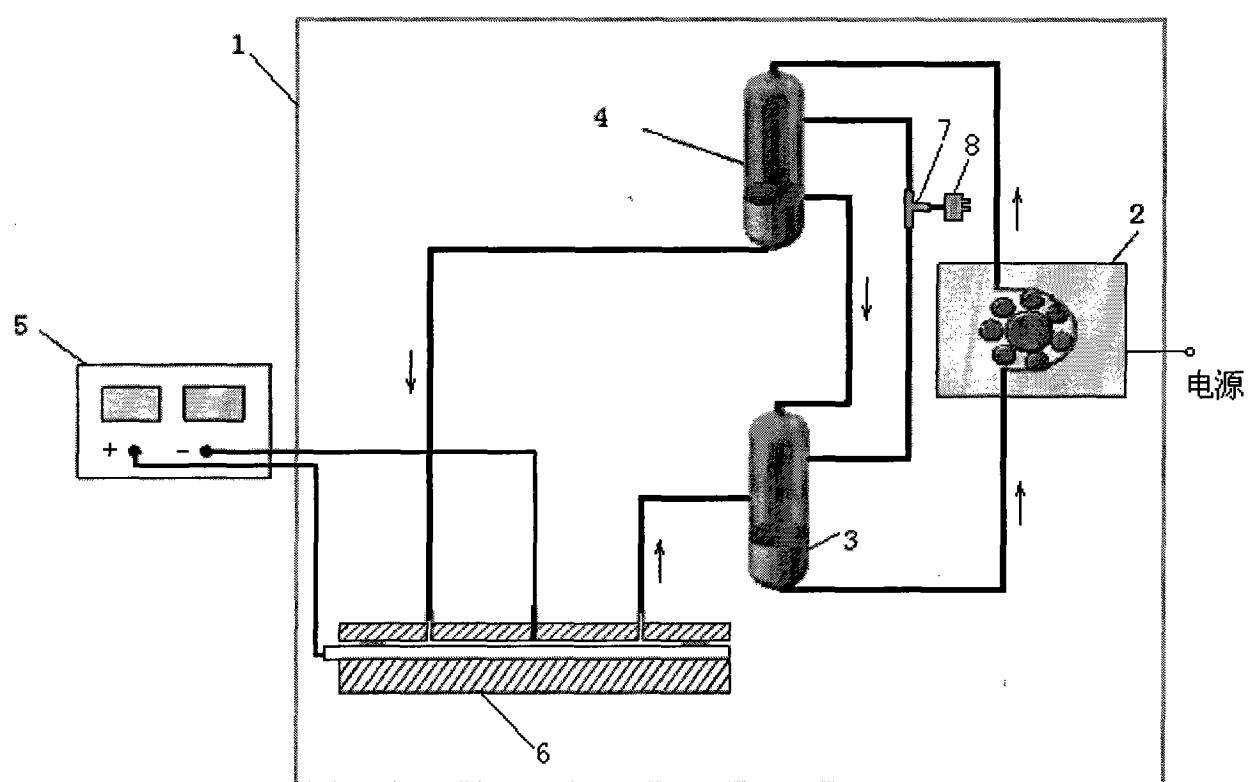


图 1

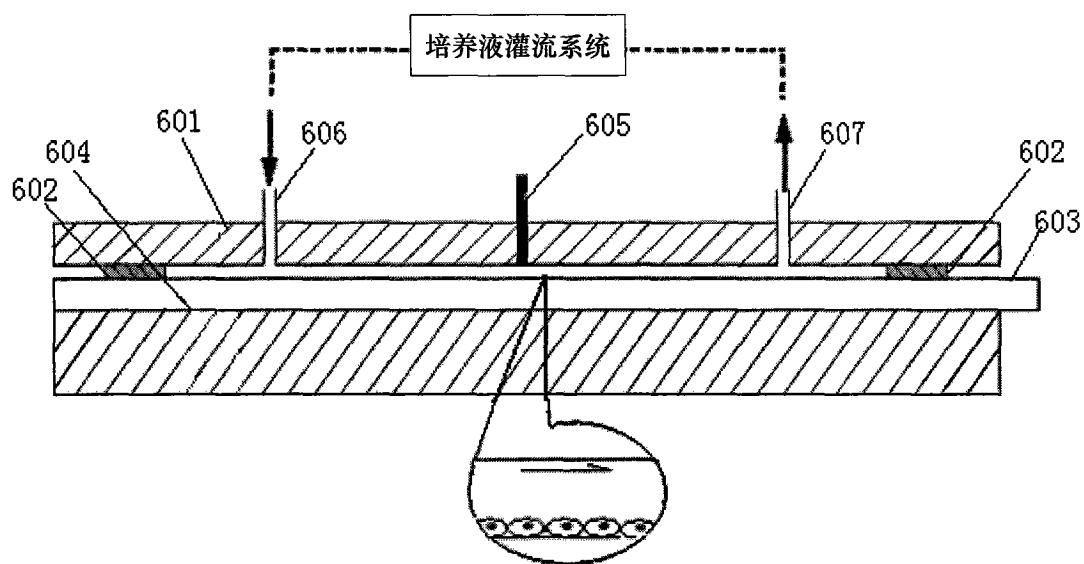


图 2