

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710093069.3

[51] Int. Cl.

A61F 2/00 (2006.01)  
A61B 17/00 (2006.01)  
A61M 1/14 (2006.01)  
C12M 3/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年6月18日

[11] 公开号 CN 101199436A

[22] 申请日 2007.11.28

[21] 申请号 200710093069.3

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩街30号

[72] 发明人 王英杰 张世昌

[74] 专利代理机构 重庆中之信知识产权代理事务所  
代理人 涂强

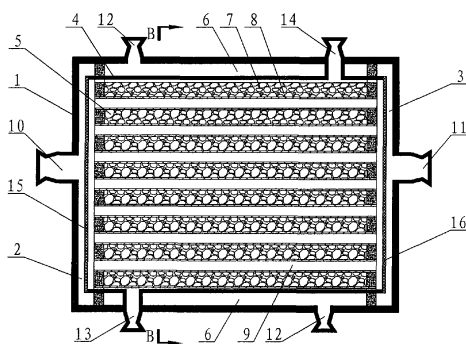
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

[54] 发明名称

三维立体式培养肝细胞的生物反应器

[57] 摘要

一种三维立体式培养肝细胞的生物反应器，包括有带细胞加入口和排气口的细胞培养腔，紧邻于细胞培养腔处设置有带培养液入口的进流腔和带培养液出口的出流腔，位于细胞培养腔内的多根中空纤维的一端均与进流腔相通，另一端均与出流腔相通，进流腔、出流腔与多根中空纤维一起构成培养液过流通道，培养液过流通道与细胞培养腔之间通过中空纤维上的微孔彼此相通，其特征在于：细胞培养腔内设置有三维多孔支架材料。本发明具有可以为肝细胞提供更符合生理环境的生长与培养条件，有利于培养出具有高活性、高密度的肝细胞，保障以此为核心的生物人工肝的肝支持与治疗作用。



1.一种三维立体式培养肝细胞的生物反应器，包括有带细胞加入口（13）和排气口（14）的细胞培养腔（5），紧邻于细胞培养腔（5）处设置有带培养液入口（10）的进流腔（2）和带培养液出口（11）的出流腔（3），位于细胞培养腔（5）内的多根中空纤维（8）的一端均与进流腔（2）相通，另一端均与出流腔（3）相通，进流腔（2）、出流腔（3）与多根中空纤维（8）一起构成培养液过流通道（9），培养液过流通道（9）与细胞培养腔（5）之间通过中空纤维（8）上的微孔彼此相通，其特征在于：细胞培养腔（5）内设置有三维多孔支架材料（7）。

2.如权利要求 1 所述的三维立体式培养肝细胞的生物反应器，其特征在于：三维多孔支架材料（7）充满于整个细胞培养腔内（5）。

3.如权利要求 1 所述的三维立体式培养肝细胞的生物反应器，其特征在于：三维多孔支架材料（7）是这样布置在细胞培养腔（5）内的：多层三维多孔支架材料（7）彼此相隔一段距离依次分布在细胞培养腔（5）内，且每层三维多孔支架材料（7）均充满细胞培养腔（5）所对应的横断面上。

4.如权利要求 1、2 或 3 所述的三维立体式培养肝细胞的生物反应器，其特征在于：在细胞培养腔（5）外，设置有包覆细胞培养腔（5）的辐流腔（6），细胞培养腔（5）的腔壁均用纤维素隔离膜（4）制成，细胞培养腔（5）与辐流腔（6）之间通过纤维素隔离膜（4）上的微孔彼此相通，辐流腔（6）的腔体上设置有与辐流腔（6）相通的辐流液出口（12）。

5.如权利要求 4 所述的三维立体式培养肝细胞的生物反应器，其特征在于：进流腔（2）内设置有与多根中空纤维（8）的端口相对应的滤网（15）。

6.如权利要求 4 所述的三维立体式培养肝细胞的生物反应器，其特征在于：出流腔（3）内设置有与多根中空纤维（8）的端口相对应的滤网（16）。

7.如权利要求 4 所述的三维立体式培养肝细胞的生物反应器，其特征在于：进流腔（2）、出流腔（3）内均设置有与多根中空纤维（8）的端口相对应的滤网（15、16）。

## 三维立体式培养肝细胞的生物反应器

### 技术领域

本发明专利涉及一种医疗设备，特别是一种既可以作为体外生物人工肝支持系统的核心装置，也可以作为一种实验装置或生物制剂装置，还可以用于培养肝细胞的实验研究和提取细胞产品的小型生产装置。

### 背景技术

现有的用于临床上的生物反应器是中空纤维型反应器，其结构与血液透析器完全相同，只是所用半透膜的材料、孔径及分子截留量不同，该中空纤维型反应器是将一束（50~100根）中空纤维密封于透明有机材料外壳内，由中空纤维将其分为内、外两腔，分别用于放置肝细胞和流动患者血液，借助该中空纤维半透膜，进行双向物质传输和免疫阻隔作用，从而实现生物人工肝支持与治疗作用。

这种模式的反应器在实际应用中存在诸多的缺陷：1. 在结构上，传统普通反应器的中空纤维平行密集排列，呈束状柱形，较少考虑肝细胞的培养环境，肝细胞培养与物质转运、交换不协调；2. 在细胞培养方面，只能为肝细胞提供二维培养，不能提供三维培养微环境，不利于肝细胞在体外的组织化培养和功能恢复；3. 在细胞分布方面，当加入细胞受重力的作用往往沉积于反应器底部，无法均匀分布于中空纤维之间，即使细胞可以到达纤维束中间也会因氧供不足而失活；4. 在临床肝支持中，该传统反应器因细胞量少（一般仅有1%~5%的成人肝细胞量）、活力低、功能差而难以发挥应有的生物学功能和作用。

目前，还有一种灌流床式支架型反应器，它是生物人工肝细胞培养或生物人工肝研究和动物实验使用较多的反应器，其结构是将不同材料或不同孔径的三维支架材料密封于外壳内，利用三维支架为肝细胞提供三维培养微环境。当进行肝细胞培养时，不断循环地从外壳通入培养液，培养液经三维支架与肝细胞之间的缝隙进行循环流动，为

肝细胞提供丰富的氧气及营养物质；当作为生物人工肝进行研究或临床使用时，将患者的血液或血浆不断地从外壳通入，血液或血浆经三维支架与肝细胞之间的缝隙进行循环流动，正常肝细胞对血浆或血液进行解毒。

该生物反应器存在的如下的缺点：1. 从反应器结构上，当作为生物人工肝研究或临床使用时，患者血液或血浆直接与三维支架内的肝细胞接触，无任何免疫阻隔作用，不利于保护患者的免疫安全，难以在临床推广使用；2. 当进行肝细胞培养时，在营养供应方面，营养液通过三维支架和肝细胞之间的缝隙流过，随着肝细胞的生长，缝隙逐渐变小，使循环流动的营养液易受阻塞，导致循环不畅，灌流不均，营养供应受限；3. 血液、血浆或营养液受到泵的作用下进行循环流动，使细胞受直接受到较大的剪切力，容易造成肝细胞的损伤。

所以，上述缺陷是目前生物人工肝治疗肝衰竭疗效难以进一步提高的重要因素之一。

### 发明内容

本发明专利的目的就是提供一种结构简单和使用方便的三维立体式生物反应器，它可以为肝细胞提供更符合生理环境的生长与培养条件，有利于培养出具有高活性、高密度的肝细胞，最大限度地发挥生物学作用，实现肝特异性解毒功能、生物合成与转化代谢功能，实现肝细胞培养、免疫阻隔、物质传输的完美结合，保障以此为核心的生物人工肝的肝支持与治疗作用。

本发明的目的是通过这样的技术方案实现的，它包括有带细胞入口和排气口的细胞培养腔，紧邻于细胞培养腔处设置有带培养液入口的进流腔和带培养液出口的出流腔，位于细胞培养腔内的多根中空纤维的一端均与进流腔相通，另一端均与出流腔相通，进流腔、出流腔与多根中空纤维一起构成培养液过流通道，培养液过流通道与细胞培养腔之间通过中空纤维上的微孔彼此相通，其特征在于：细胞培养腔内设置有三维多孔支架材料。

在本发明中，所述的三维多孔支架材料是生物医学领域组织工程中所指的生物材料，它是种子细胞形成组织之前赖以生存和依附的三维支架，它可将细胞固定于一定的位置，为其生长、繁殖、新陈代谢及细胞外基质分泌等生理活动提供场所，并引导再生组织基本形状。因此，它既具有良好生物相容性，又具有特定形状和三维连通多孔结构的支架材料，主要为细胞生长提供支持和三维生长空间，包括可降解和非可降解三维支架材料，如壳聚糖、胶原、纤维蛋白、聚乳酸、聚乳酸-聚羟乙酸酯、聚氨酯等。

三维多孔支架材料可以充满于整个细胞培养腔内，也可以是这样布置在细胞培养腔内的：多层三维多孔支架材料彼此相隔一段距离依次分布在细胞培养腔内，且每层三维多孔支架材料均充满细胞培养腔所对应的横断面上。当然，使用者或生产者可以根据实际需要三维多孔支架材料随意地设置于细胞培养腔内。

本发明可以用于肝细胞的培养，也可以用于体外生物人工肝，还可以用于实验研究及用于制备生物制剂。

用本发明进行培养肝细胞培养的方法是：

1、将本发明专利放置到细胞培养箱内，予以 95%的氧气、5%的二氧化碳和 100%的湿度条件。

2、将经过体外消化技术分离的肝细胞，运用离心接种法和循环灌流接种法接种到本发明的细胞培养腔中的三维多孔支架材料内，具体步骤如下：

(1)、离心接种法：将肝细胞悬液经肝细胞加入口加入到细胞培养腔内，每次加入量为 30~100 克，并进行离心处理 3 分钟，将本发明上下顺序颠倒，反复离心 5 次。

(2)、循环灌流接种法：肝细胞加入口通过蠕动泵和硅胶管与排气口连通，以构成一个循环通道，在蠕动泵的作用下，使肝细胞培养内的肝细胞悬液以 1ml/分钟的速度在循环通道内循环流动，30 分钟后，使肝细胞均匀分布于肝细胞培养腔中的三维多孔支架材料内。

(3)、去掉蠕动泵和硅胶管，封闭肝细胞加入口和排气口。

3、将本发明进行如下的连接：培养液池通过硅胶管、蠕动泵、氧合器与本发明的培养液入口连通，本发明的培养液出口通过硅胶管通至培养液池，从而使本发明的培养液过流通道与氧合器、蠕动泵、培养液池一起构成一个培养液循环通道。

4、在蠕动泵的作用下，培养液进行如下的循环流动：由培养液池经氧合器流入本发明的培养液入口，然后流过培养液过流通道，再从本发明的培养液出口返回至贮池内；培养液循环流动的速度控制在 30ml/min 左右。培养液在循环流动过程中，通过中空纤维上的微孔向细胞培养腔内的肝细胞均匀地提供丰富的氧气及营养物质，使肝细胞在三维多孔支架材料内呈三维立体生长，从而培养出大量、高活性、高密度的肝细胞，肝细胞具备优良的生物学功能。

利用本发明按上述的方法培养出大量的肝细胞后，就可以将本发明用于体外生物人工肝，此时，培养液过流通道中循环通过的不是培养液，而是患者血液或血浆，细胞培养腔中的正常肝细胞通过中空纤维的微孔对患者的血液或血浆进行解毒，同时，阻隔了血液或血浆直接与肝细胞直接接触，起到了免疫阻隔作用，从而发挥更好的人工肝支持与治疗作用。当然，也可以将本明用于实验研究，它可满足肝细胞的生理要求；将本发明用于制备生物制剂时，可提取更多的细胞产物。

由于采用了上述技术方案，本发明专利具有如下的优点：

1. 结构合理，将三维多孔支架材料和中空纤维相结合并应用到生物反应器中，更有效地满足人工肝生物反应器对肝细胞培养、物质传输、免疫阻隔的要求。

2. 使用中空纤维，可以有效地进行培养液或病人血液的物质传输，同时起到免疫阻隔的作用，显著地减轻培养液的剪切力对肝细胞的影响。

3. 利用三维多孔支架材料为肝细胞提供三维支持作用，使肝细胞在三维多孔支架材料内呈三维立体生长，易组织化，肝细胞密度高、数量大、功能强。

4.三维多孔支架材料中的小孔径微孔可使肝细胞均匀地分布在三维多孔支架材料中，避免了肝细胞沉积于细胞培养腔底部，有效克服原有中空纤维反应器难以高效培养肝细胞的不足。

5.培养液以辐流和弥散两种方式同时为肝细胞均匀地提供氧气和营养物质，明显地提高营养物质和氧气的供应距离，突破弥散作用100 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ 的距离限制，使肝细胞得到的氧气和营养物质更加丰富。

6.肝细胞代谢产物由纤维素隔离膜上的微孔辐流至辐流腔内，能有效降低代谢产物中的毒性物质对肝细胞的毒害作用。

### 附图说明

本发明的附图说明如下：

图1是本发明第一种实施例的结构示意图；

图2是本发明第二种实施例的结构示意图；

图3是图2中A-A剖视图；

图4是本发明第三种实施例的结构示意图；

图5是图4中B-B剖视图；

图6是本发明第三种实施例使用状态的连接关系图。

图中：1.壳体；2.进流腔；3.出流腔；4.纤维素隔离膜；5.细胞培养腔；6.辐流腔；7.三维多孔支架材料；8.中空纤维；9.培养液过流通道；10.培养液入口；11.培养液出口；12.辐流液出口；13.细胞加入口；14.排气口；15.滤网；16.滤网；17.培养液池；18.硅胶管；19.蠕动泵；20.氧合器；21.蠕动泵；22.硅胶管；23.废液池。

### 具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明：

如图1、2、3所示，本发明包括有带细胞加入口13和排气口14的细胞培养腔5，紧邻于细胞培养腔5处设置有带培养液入口10的进流腔2和带培养液出口12的出流腔3，位于细胞培养腔5内的多根中空纤维8的一端均与进流腔2相通，另一端均与出流腔3相通，进流腔2、出流腔3与多

根中空纤维 8 一起构成培养液过流通道 9, 培养液过流通道 9 与细胞培养腔 5 之间通过中空纤维 8 上的微孔彼此相通, 其特征在于: 细胞培养腔 5 内设置有三维多孔支架材料 7。

实施例 1: 如图 1 所示, 三维多孔支架材料 7 可以充满于整个细胞培养腔 5 内。实施例 2: 如图 2、3 所示, 三维多孔支架材料 7 也可以是这样布置在细胞培养腔 5 内的: 多层三维多孔支架材料 7 彼此相隔一段距离依次分布在细胞培养腔 5 内, 且每层三维多孔支架材料 7 均充满细胞培养腔 5 所对应的横断面上。

本发明可以用于肝细胞的培养, 也可以用于体外生物人工肝, 还可以用于实验研究及用于制备生物制剂。

用本发明进行培养肝细胞培养的方法是:

1、将本发明专利放置到细胞培养箱内, 予以 95%的氧气、5%的二氧化碳和 100%的湿度条件。

2、将经过体外消化技术分离过的肝细胞, 运用离心接种法和循环灌流接种法接种到本发明的细胞培养腔 5 中的三维多孔支架材料 7 内, 具体步骤如下:

(1)、离心接种法: 将肝细胞悬液经肝细胞加入口加入到细胞培养腔 5 内, 每次加入量为 30~100 克, 并进行离心处理 3 分钟, 将本发明上下顺序颠倒, 反复离心 5 次。

(2)、循环灌流接种法: 肝细胞加入口 13 通过蠕动泵和硅胶管与排气口 14 连通, 以构成一个循环通道, 在蠕动泵的作用下, 使肝细胞培养腔内的肝细胞悬液以 1ml/分钟的速度在循环通道内循环流动, 30 分钟后, 使肝细胞均匀分布于肝细胞培养腔中的三维多孔支架材料 7 内。

(3)、去掉蠕动泵和硅胶管, 封闭肝细胞加入口 13 和排气口 14。

3、将本发明进行如下的连接: 培养液池 17 通过硅胶管 18、蠕动泵 19、氧合器 20 与本发明的培养液入口 10 连通, 本发明的培养液出口 11 通过硅胶管 18 通至培养液池 17, 从而使本发明的培养液过流通道 9 与氧合器 20、蠕动泵 19、培养液池 17 一起构成一个培养液循环通道, 可以参照图 6 可知。

4、在蠕动泵 19 的作用下，培养液进行如下的循环流动：由培养液池 17 经氧合器 20 流入本发明的培养液入口 10，然后流过培养液过流通道 9，再从本发明的培养液出口 11 返回至培养液池 17 内；培养液循环流动的速度控制在 30ml/min 左右。培养液在循环流动过程中，通过中空纤维 8 上的微孔向细胞培养腔 5 内的肝细胞均匀地提供丰富的氧气及营养物质，使肝细胞在三维多孔支架材料 7 内呈三维立体生长，从而培养出大量、高活性、高密度的肝细胞，肝细胞具备优良的生物学功能。

利用本发明按上述的方法培养出大量的肝细胞后，就可以将本发明用于体外生物人工肝，此时，培养液过流通道 9 中循环通过的不是培养液，而是患者血液或血浆，细胞培养腔 5 中的正常肝细胞通过中空纤维 8 的微孔对患者的血液或血浆进行解毒，同时，阻隔了血液或血浆直接与肝细胞直接接触，起到了免疫阻隔作用，从而发挥更好的人工肝支持与治疗作用。当然，也可以将本明用于实验研究，它可满足肝细胞的生理要求；将本发明用于制备生物制剂时，可提取更多的细胞产物。

实施例 3：在细胞培养腔 5 外，设置有包覆细胞培养腔 5 的辐流腔 6，细胞培养腔 5 的腔壁均用纤维素隔离膜 4 制成，细胞培养腔 5 与辐流腔 6 之间通过纤维素隔离膜 4 上的微孔彼此相通，辐流腔 6 的腔体上设置有与辐流腔 6 相通的辐流液出口 12。实现该实施例具体结构如图 4、5 所示，它是在壳体 1 内左右相对两侧分别设置有进流腔 2 和出流腔 3，在进流腔 1 与出流腔 3 之间，由桶状的纤维素隔离膜 4 的内壁与进流腔 2 外壁、出流腔 3 外壁一起围成一个细胞培养腔 5，纤维素隔离膜 4 的外壁与壳体 1 内壁、进流腔 2 外壁、出流腔 3 外壁一起围成一个辐流腔 6，细胞培养腔 5 内充满三维多孔支架材料 7，位于细胞培养腔 5 内的多根中空纤维 8 的一端均与进流腔 2 相通，另一端均与出流腔 3 相通，进流腔 2、出流腔 3 与多根中空纤维 8 一起构成培养液过流通道 9，培养液过流通道 9 与细胞培养腔 5 之间通过中空纤维 8 上的微孔彼此相通，细胞培养腔 5 与辐流腔 6 之间通过纤

纤维素隔离膜 4 上的微孔彼此相通，壳体 1 上设置有与进流腔 2 相通的培养液入口 10，还设置有与出流腔 3 相通的培养液出口 11，壳体 1 上设置有与辐流腔 6 相通的辐流液出口 12，壳体 1 上设置有与细胞培养腔 5 相通的细胞加入口 13 和排气口 14。

如图 6 所示，是本发明实施例 3 的使用状态的连接关系图，图中，辐流腔 6 的辐流液出口 12 通过蠕动泵 21、硅胶管 22 通至培养液池 17 和废液池 23。其它部分的连接关系与前述的实施例 1、2 相同。

将本发明放置到细胞培养箱内，予以 95%的氧气、5%的二氧化碳和 100%的湿度条件，它是这样培养肝细胞的：将经过体外消化技术分离的肝细胞，运用离心接种法和循环灌流接种法接种到本发明专利的细胞培养腔 5 中的三维多孔支架材料 7 内，利用适当的离心力和循环灌流作用使肝细胞均匀分布到三维多孔支架材料 7 中；然后在培养液过流通道 9 中循环通过培养液，并施以一定的压力，使培养液过流通道 9 与辐流腔 6 之间形成压力差，在这个压力差的作用下，部分培养液从培养液过流通道 9 中的中空纤维 8 经细胞培养腔 5 辐流至辐流腔 6，培养液的辐流过程中，一方面为肝细胞均匀地提供丰富的氧气及营养物质，另一方面还带走肝细胞代谢产物至辐流腔 6 内，经辐流液出口 12 排出。这一过程符合正常肝脏的肝细胞生理环境和血液环境，因此，可以培养出大量、高活性、高密度的肝细胞，肝细胞具备优良的生物学功能。

为了防止营养液中的杂质流进细胞培养腔 5 内，如图 1 所示，进流腔 2 内可以设置有与多根中空纤维 8 的端口相对应的滤网 15。同样，如图 2 所示，出流腔 3 内可以设置有与多根中空纤维 8 的端口相对应的滤网 16。如图 4 所示，进流腔 2、出流腔 3 内可以均设置有与多根中空纤维 8 的端口相对应的滤网 15、16。

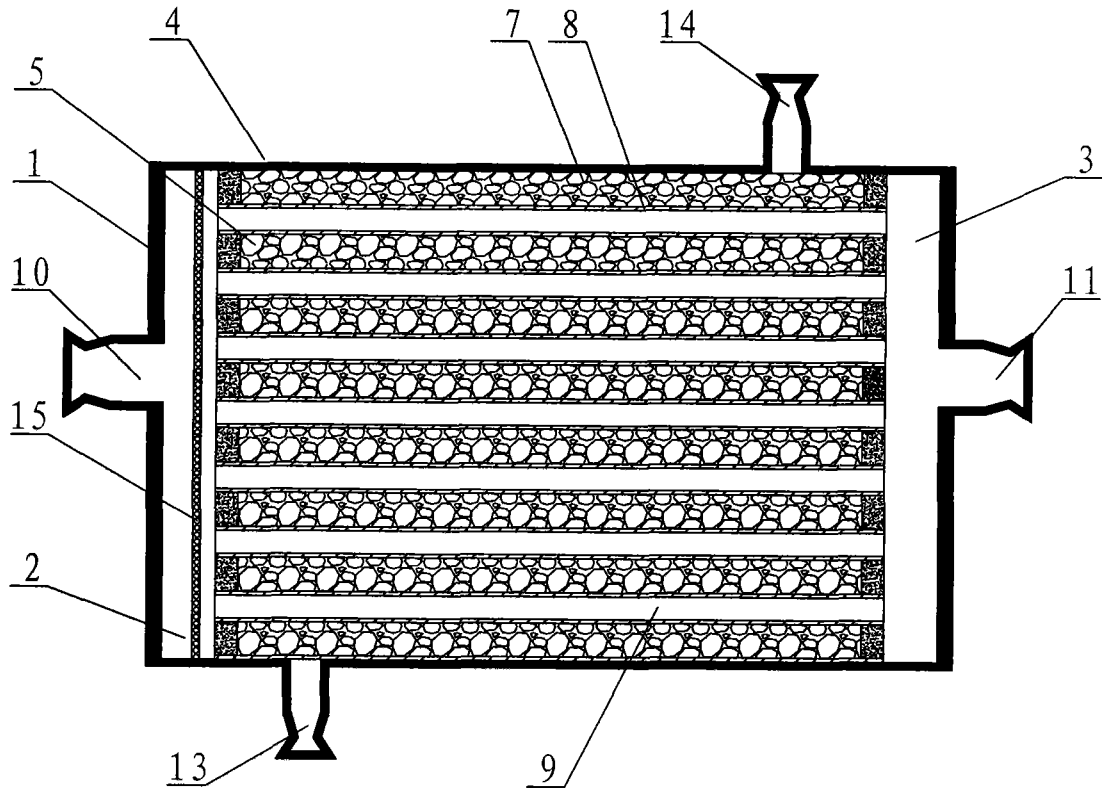


图1

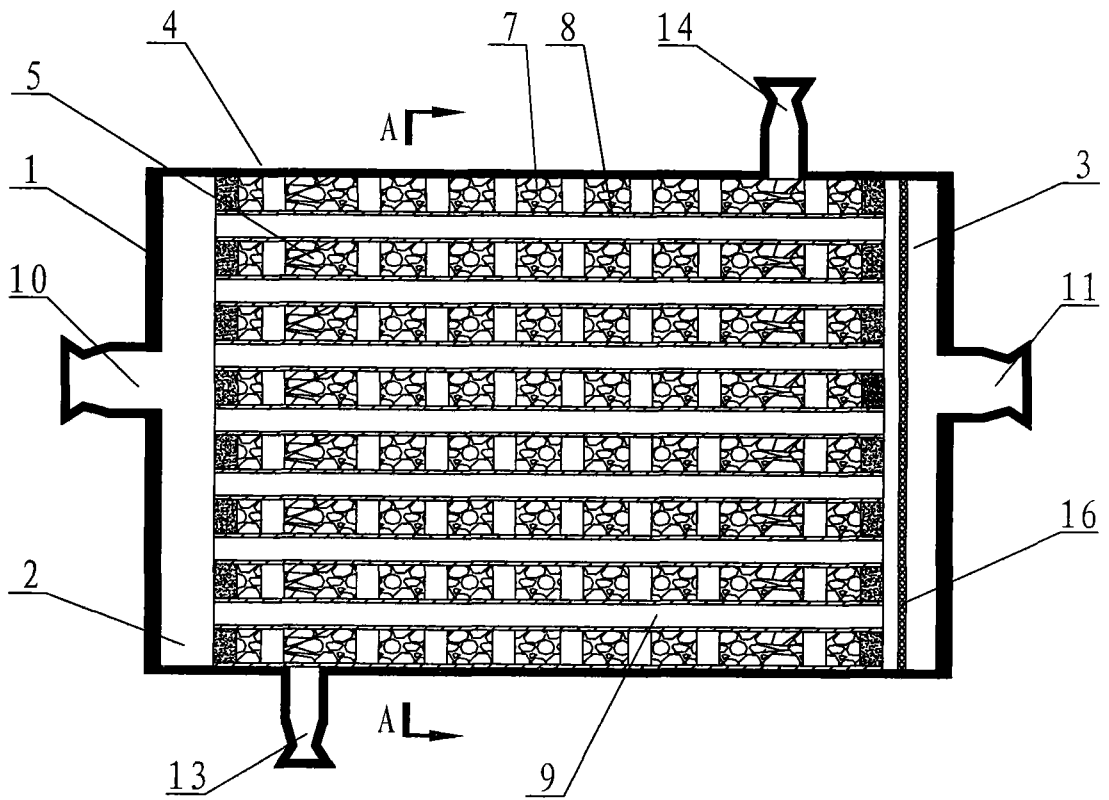


图2

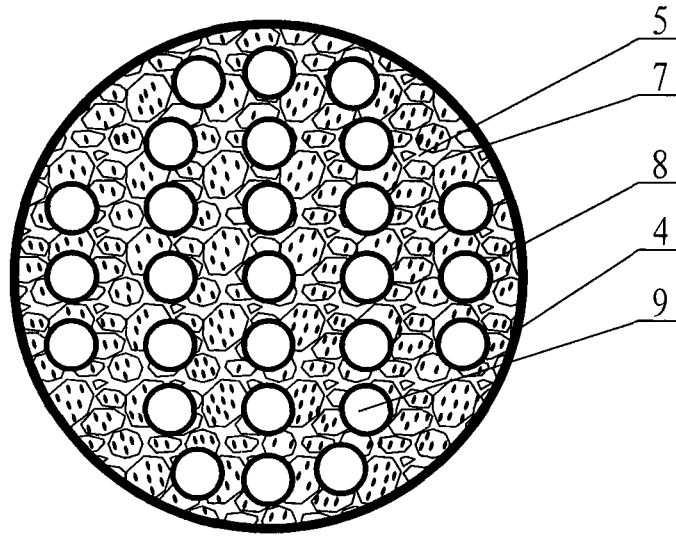


图3

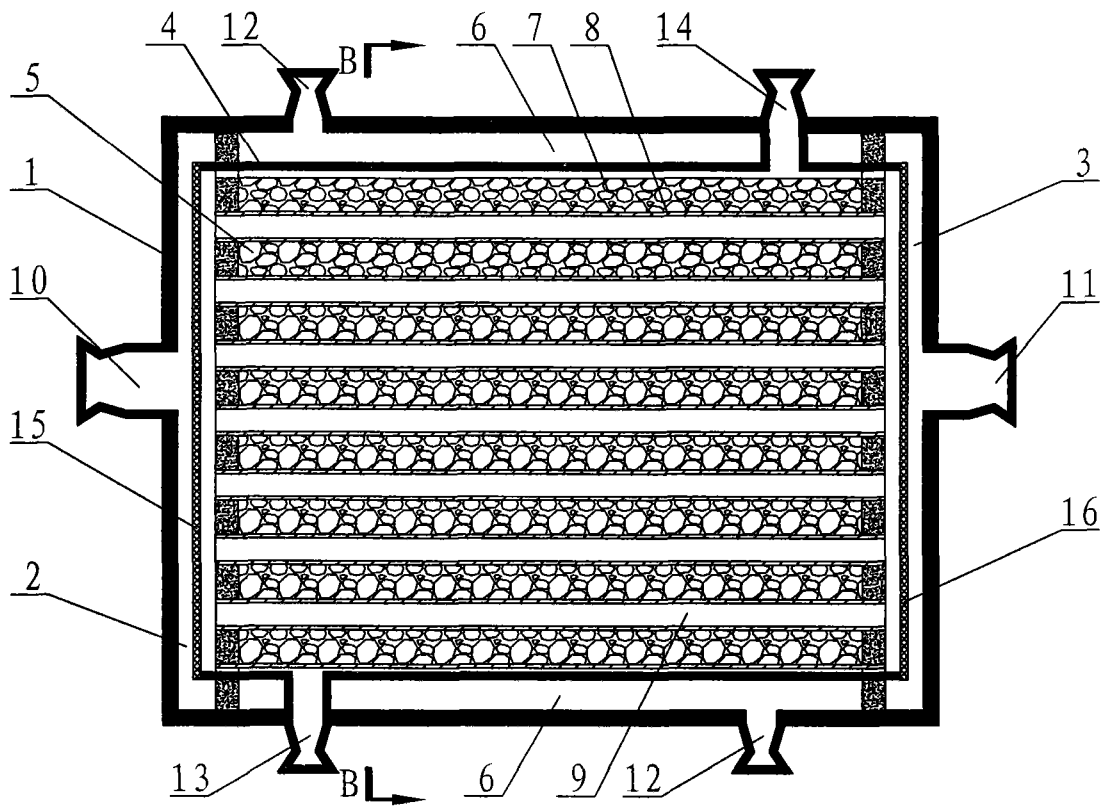


图4

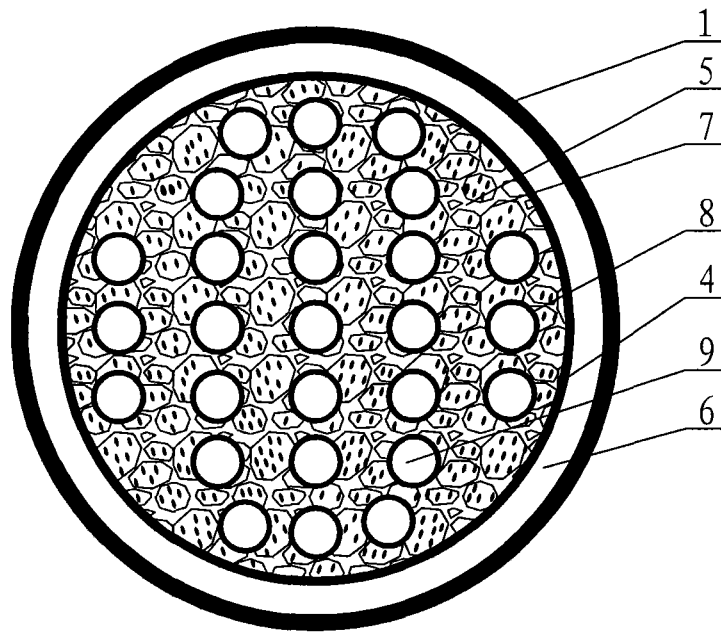


图5

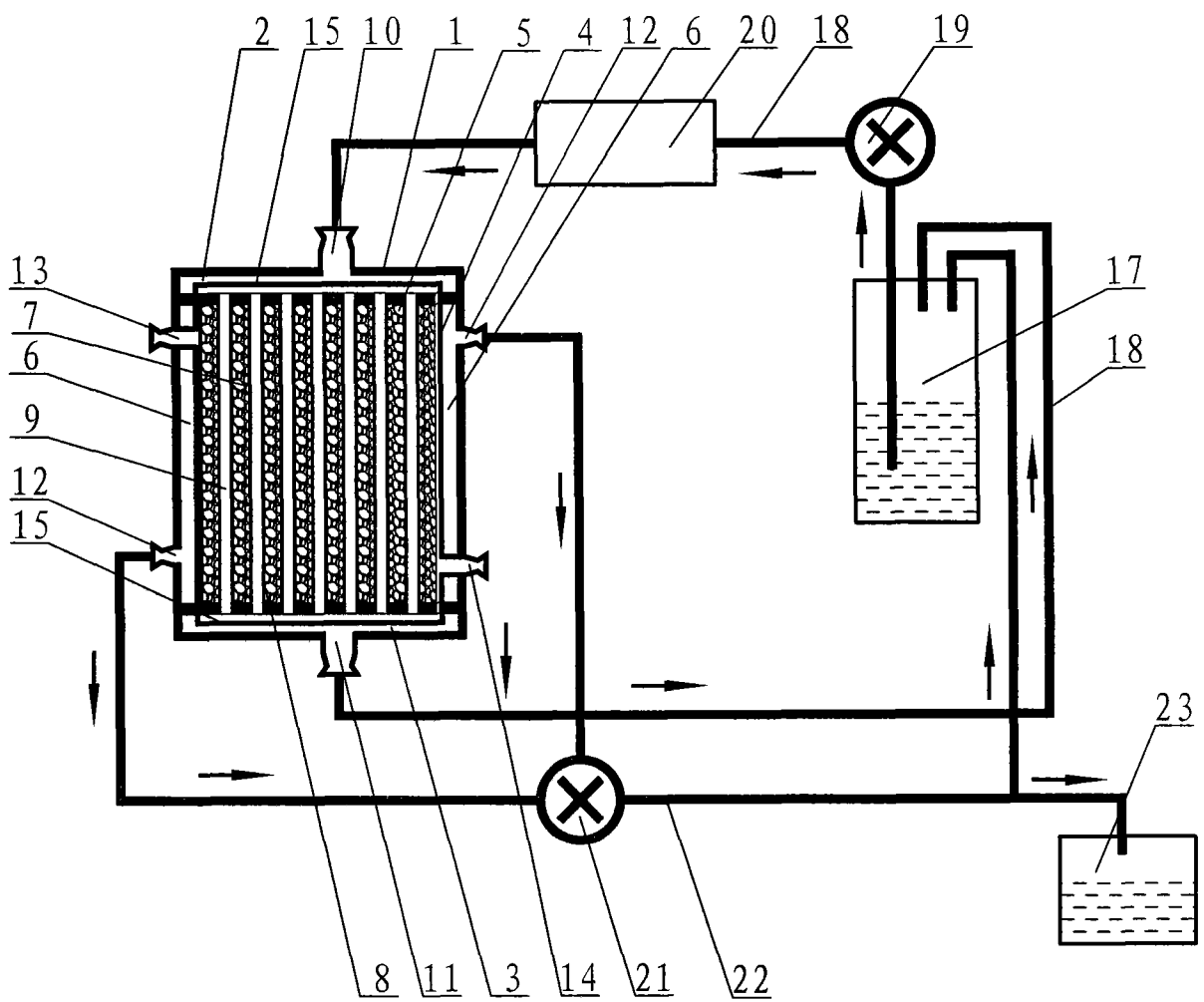


图6