

文章编号:1000-582x(2000)06-0079-03

细胞培养基基底膜伸张实验装置的研制

卢晓¹, 王红兵¹, 沈卫东², 黄岂平¹, 王远亮¹

Q2813-11

(1 重庆大学生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400044; 2 解放军通信工程学院,重庆 400046)

摘要:为研究离体培养细胞在应变作用时的生长行为,研制了可模拟生物软组织细胞在生理或病理应变情况的离体加载装置。本装置的方法是将细胞培养于弹性硅橡胶薄膜(厚度0.2 mm)的上表面,弹性膜固定于压力腔的上方,在电路控制下蠕动泵使压力腔的压力产生周期性变化,弹性膜在此压力作用下发生周期性的伸长。弹性膜的周期伸长将牵动粘附于其上表面的细胞产生周期性伸张,从而实现对细胞施加周期拉伸变形的作用。装置中弹性膜周期伸长的应变峰值和周期分别在0.007~0.03和0.06~0.118 Hz范围内可调。本装置对研究细胞的应力-生长关系十分有用。

关键词:弹性膜; 拉伸应变; 细胞培养; 基底膜; 伸张实验装置
中图分类号: Q 66; R 318.01 **文献标识码:** A

在人体和动物体内,细胞的生长、繁殖、分泌等行为是与它们所处的力学环境分不开的。在正常生理状态的力学环境中,细胞能够正常地发挥它们的功能。而在力学环境变化后,细胞的各种功能也随之变化,为了解应力环境对细胞生长的影响,对培养细胞在应力(应变)改变所产生的变化的研究已日渐增多。然而细胞在体内的受力环境十分复杂,以血管为例,血流剪应力对血管内皮细胞的作用十分显著,用流动腔技术研究血管内皮细胞对流动剪应力的响应已取得公认的成果,证明研究离体培养细胞对应力的影响是行之有效的方法。血管壁内的血管平滑肌细胞在生理血压下受到周向的拉伸作用力,因而相应地用于研究培养细胞对拉伸应力(应变)响应的装置也在近年来有所报道:例如真空(负压)加载装置^[1,2]、液体(正压)加压装置^[3]、双轴等应变加载装置^[4]、四点弯曲梁加载装置^[5]、双向应变加载装置^[6],这些装置基底膜(或基底材料)的应变率(挠度),加载频率(挠度变化率)、延伸率、变形均可调节控制并通过光学测量系统或电阻应变计同步监测。

虽然国外在培养细胞对拉伸应力(应变)响应方面已有一些报道,但仍有大量的问题需要深入研究。为研究拉伸应力(应变)对离体培养细胞生长行为的调节

规律,研制能对细胞产生拉伸作用的装置是首先要做的工作,因此,在国家自然科学基金的支持下,笔者研制了“细胞培养基基底膜伸张实验装置”,现将该装置的设计思路和技术指标介绍如下。

1 结构和原理

细胞培养基基底伸张装置的设计思路是通过让硅橡胶膜产生可控制的拉伸形变,带动培养于硅橡胶膜表面上的细胞随之产生形变。从而实现研究细胞在拉伸应力下生长分泌规律的研究。细胞培养基基底伸张装置由细胞变形加载部分,液压部分,控制电路三部分组成,如图1所示。

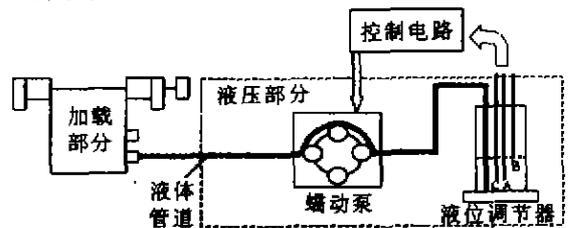


图1 装置的系统示意图

图中虚线框内为液压部分,包括硅橡胶液体管路、蠕动泵和液位调节器;C为参考电极,A和B为液位控制电极。电极接入控制电路,并通过控制电路控制蠕

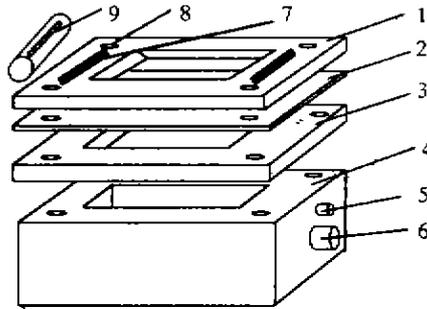
· 收稿日期:2000-02-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(19502020)

作者简介:卢晓(1962-),男,重庆人,副研究员,博士。从事生物力学研究。

动泵的正反转。

细胞变形加载部分是该装置的中心部分,见图 2。培养腔呈矩形,长 44 mm、宽 28 mm、深 8 mm,压力腔,内腔长 44 mm,宽 28 mm,深 60 mm,距底部 10 mm,有一个进水口,直径 2 mm,压力腔顶盖周缘向上凸,并有一个排气孔。



1. 培养腔; 2. 硅胶膜; 3. 密封垫; 4. 压力腔; 5. 压力传感器; 6. 液体流入/流出接头; 7. 硅胶膜通过缝; 8. 螺孔; 9. 硅胶膜装配夹

图 2 应变加载单元示意图

硅胶膜装配夹可夹紧硅胶膜同时向双侧张紧,紧张度可按不同要求调节。并通过力传感器确认,能实现基底膜静态一维拉伸加载。

硅橡胶弹性膜厚 200 μm ,透明,置于培养腔和压力腔之间,通过密封圈压紧,其既是培养腔的底,又是压力腔的顶,实验细胞接种在膜上。硅胶膜首先与培养腔叠合,其两端穿过硅胶膜通过缝与硅胶膜装配夹连接以调节紧张度。其后,将它们与密封垫一起叠压在压力腔上,用螺钉固定,即可与液压管路相连接。

液压管路由液体流通管路、液位调节器、蠕动泵组成。蠕动泵的减速电机为 YYJ60D-6 型,减速比 1:20,2.86 r/s。蠕动泵流量为 0.562 mL/s。聚氯乙烯液体管路有两条,一条连接压力腔下部的进水口和蠕动泵出口,另一条连接蠕动泵进口和液位调节器,并串联压力传感器。液位调节器为 25 mL 量筒,密封盖封顶,顶上有 4 个小孔,3 个孔插入电极,1 个小孔通过聚氯乙烯管接蠕动泵。

该装置的控制电路采用了触针控制式。由于以往的触针电路通过的是直流电,使触针很快极化而使触针表面导电率下降而导致控制失效。针对这一问题。本电路触针部分通过的是交流电,这样一来可以相对通直流电时的使用时间大为提高,且较可靠,控制电路的工作原理为通过自锁开关的控制,只要水不低于 A 点,电路自保持,当水低于 A 点,电机正转,泵将水送入管中,当水高于 B 点,电路翻转,电机反转,将水

从管中泵出,见图 1。

工作原理为,利用液体加压泵把压力腔内加满蒸馏水,充分排除腔内的空气,并保证弹性膜处于未受力变形状态,当膜上培养的细胞符合实验要求后,即可给细胞加载。通过液位调节器确定出应变条件下的液体体积,用电机驱动加压泵产生液体压力,利用压力传感器确定液体压力后开始加载,由泵向压力腔泵入液体向硅胶膜施加压力,加载时硅胶膜向上凸起发生弯曲变形,产生双向应变,使生长在膜上的细胞受到拉伸作用,加载方式为脉动循环加载,加载频率 0.06~0.118 Hz。

2 实验结果及应用情况

硅胶膜应变检测时用 YD-15 动态应变仪(上海华东电子仪器厂),SC-16 光电示波器,电阻应变片等仪器测试。应变测定的方法首先将硅胶膜安装于应变加载单元,再将两张应变片按腔的长轴和短轴方向用 502 万能胶粘贴在硅胶膜中心部位,从加载单元的液体流入/流出接头控制液体注入,待硅胶膜平整时,标定为零应变。然后由应变仪和光线示波器可测得每一注入液体量时膜应变的最大值和应变的脉动频率。测出的柯西应变换算成伸长比,以便于与已有文献报道的装置作比较。测定注入压力腔的液体体积与膜最大伸长比之间的关系结果见表 1。

表 1 注入体积与膜最大伸长比及频率对应表

	V/mL		
	1	1.5	2
$\lambda_1/\%$	0.7±0.03	1.1±0.04	3±0.16
$\lambda_2/\%$	0.3±0.01	0.6±0.02	1.5±0.08
f/Hz	0.118±0.008	0.077±0.005	0.060±0.004

表中的数据表示为平均值±标准差。纵向伸长比 λ_1 表示矩形框长边方向的伸长比;横向伸长比 λ_2 表示矩形框短边方向的伸长比。

本装置在细胞拉伸变形所致的行行为研究中,工作情况稳定、实验结果重复性好,与国外同类装置用于研究应力应变与血管平滑肌生物学行为的实验结果相比,具有很好的一致性,同时应用本实验装置进行的关于应力应变与血管平滑肌细胞的重塑,应力应变与血管平滑肌细胞表型维持,应力应变与平滑肌细胞分泌血管紧张素 II 等方面的研究工作,也取得了预期实验结果。

国外报道的细胞加载装置主要按细胞所接种的材料分为两类^[1,3],一类是由聚苯乙烯材料制成的培养板(材料较硬),通过使培养板底部变形从而牵动接种于

培养板底部的细胞变形。另一类为弹性膜基底(主要为硅胶膜),通过使弹性膜变形而牵动细胞变形。本装置属后一类。本装置除在加载频率调节,最大应变调节,以及使用方便等方面与国外报道的装置相似外,其特有的优点在于可以通过改变培养腔矩形孔的长宽比从而改变长边方向与短边方向的应变之比,即通过改变孔的形状,改变两个垂直方向的应变之比。这对以后研究中模拟各种细胞在体内时的复杂应力-应变环境提供了比较有利的手段。

3 结束语

应力-生长关系的研究是生物力学重要的课题,体内复杂的力学环境和生理生化过程,使我们无法控制单因素所造成的影响。幸而离体细胞培养技术为实现控制某些因素而研究细胞行为提供了可能。而该实验系统的研制成功,对国内在细胞对拉伸应力(应变)的影响方面的研究将会产生积极的影响。该装置不仅适用于血管壁细胞,也可推广到其它有相似力学环境的组织细胞。该实验系统的主要技术参数达到了国外同类装置的水平。由于其结构简单可靠,基底膜在实际安装条件下的应变可控,并可实现静态的一维和动态二维拉伸,且造价低廉,易为国内研究机构所采用。

该装置需要改进和完善的地方还很多,比如装置

的智能化,实时测量基底膜变形,应变率和动态观察细胞生长情况等,都是有待改进和完善的方面,在今后的研究工作中将进一步完善该实验装置。

参考文献:

- [1] ALBERT J. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cell in vitro[J]. J. Cell Sci. 1985, 75: 35-42
- [2] SUMPPIO B E, BANES A J. Response of porcine aortic smooth muscle cells to cyclic tensional deformation in culture[J]. J Surg Res, 1988, 44: 696-701
- [3] CARL T. The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone of rates to cyclic biaxial mechanical strain [J]. J Bone and Joint Surg, 1991, 173:A320-A331
- [4] HUNG C T. A method for inducing equi-biaxial and uniform strains in elastomeric membrane used as cell substrates [J]. J Biomech, 1994, 27(2):227-232
- [5] VWAN I. Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain[J]. Am J Physiol, 1997, 273:C810-C815.
- [5] SOMA S. Enhancement by conditioned medium of stretched calvarial bone cells of the osteoclast-like cell formation induced by parathyroid hormone in mouse bone marrow cultures[J]. Arch Oral Biol, 1997, 42(3):205-211

An Experimental Device of Culture Cells Which Are Stretched Mechanically

LU Xiao¹, WANG Hong-bing¹, SHENG Wei-dong², HUANG Qi-ping¹, WANG Yuan-liang¹

(1 Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under Ministry of Educational at Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. The Communication Engineering College of PLA, Chongqing 400046, China)

Abstract: In order to study the growth behavior of culture cells which are stretched mechanically, an experimental device of stretching elastomeric membrane is designed to stimulate culture cells mechanically which might simulate the physiological or disorder tensile strains environment of cells in vivo. A sheet of silicone gel membrane (thickness, 0.2 mm) is mounted on a chamber that connected to a rolling pump. The cells that are tested are seeded on the surface of the membrane. Therefore the membrane might be tensioned or relaxed by the cyclic pressure. Since the cells are attached to the surface of the membrane, they presumably experience the same deformation as is applied to the membrane. The peak value and periods of strain of the membrane during tension could be changed according to experimental requirement in the ranges 0.007~0.03 and 0.06~0.118 Hz, respectively. The device of stretching elastomeric membrane to simulate physiological and histological strains of tissue cells is useful to study the in vitro cellular stress-growth relation.

Key words: elastomeric membrane; stretched strain; cell culture

(责任编辑 李胜春)