

三维支架材料中软骨细胞生长过程的数值模拟

Numerical Simulation of Chondrocyte Growth in 3-D Scaffolds

江 华,周 燕,谭文松*

JIANG Hua, ZHOU Yan and TAN Wen-Song*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

摘 要 组织工程是临床上用于修复以及重建受损软骨的一项有广泛应用前景的方法。但是在支架材料内部物质传递仅仅依赖于扩散,这是支架材料中细胞生长的主要限制因素。利用氧扩散-反应基本原理建立了软骨细胞生长过程的数学模型,同时考虑了由于细胞生长引起的扩散系数下降以及空间抑制因素对细胞生长的影响。模拟结果与实验数据吻合良好,表明该模型对材料内部的细胞生长的分析具有较高的可靠性,可用于组织工程生物反应器以及三维多孔支架材料的优化设计。

关键词 组织工程,软骨细胞,多孔介质,数值模拟

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0171-05

Abstract Tissue engineering is a promising technique to repair or reconstruct the damaged cartilage in clinical use. However, chondrocyte growth is limited by the mass transport in scaffolds as diffusion is likely to be the primary mechanism. In this study, a mathematical model was developed based on oxygen diffusion and reaction to simulate chondrocyte growth. In order to accord with the fact, effective diffusion coefficients and space limitation were considered in this model and good agreement was found between experimental data and mathematical simulations. Furthermore, relationships established in the model system can be used to optimize the situation in real bioreactors and the design of three-dimensional scaffolds.

Key words tissue engineering, chondrocyte, porous media, numerical simulation

组织工程为临床修复及重建受损伤的组织提供了一条新的具有广泛应用前景的途径,例如皮肤、软骨、骨等目前都在体外构建过程中获得不同程度的成功^[1]。在体外三维多孔材料中接入一定数量的细胞进行培养组织的方法面临一个关键问题就是如何为材料内的细胞提供足够的营养以满足其生长需要。对于厚度较小的组织例如皮肤,通常的二维表面培养就可以满足需要,而在三维多孔支架培养过

程中,即使支架材料的厚度很小,通常都会形成不均匀的细胞分布,特别是在材料的表面会形成一层致密的细胞层,而在材料内部则只是非常有限的不均匀的细胞生长。当多孔材料的厚度增加或者材料内细胞密度增加时,营养物质在材料内的传递就会受到限制,从而抑制材料内部细胞的生长扩增,这种现象在很多三维工程化组织培养过程中都曾观察到^[2]。通常在多孔材料内部的营养传递方式是分子

Received: August 23, 2006; Accepted: October 27, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 20576036) and the State High-Tech R&D Program (No. 2001AA210641).

* Corresponding author. Tel: +86-21-64250948; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20576036)和国家高技术研究发展计划(863计划)项目(No. 2001AA210641)期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

扩散,这种传递方式下细胞生长都局限在与培养液接触的几百微米以内,这与体内组织相类似,体内毛细血管的间距都在 $100\mu\text{m}$ 左右,而在毛细血管之间的组织细胞则依靠扩散方式传递营养物质来维持组织功能。与体内丰富的毛细血管网相比,体外培养组织缺乏相应的血管,其材料内部营养物质的传递完全依赖于扩散,而且营养物质的浓度受到材料表层细胞的消耗后其相对培养液中的浓度要低很多,因此营养物质的传递是体外构建工程化组织的重要参数。

大量实验研究表明,在体外构建软骨过程中,一个关键的参数是材料中氧的浓度分布^[3-6]。由于氧在培养液中的溶解度很低,且在多孔材料中,相同的表观扩散距离下其分子实际扩散距离随着曲折因子的增加而增加,以及较高的细胞氧消耗速率,通常认为氧是体外构建软骨组织过程中首先受到限制的营养成分。

为了能够量化随着培养时间的延长细胞在材料内的分布,本文综合氧在材料内的扩散-反应方程以及细胞在氧限制下的生长动力学方程,模拟三维多孔材料中细胞随时间变化的密度分布,从而为更深入地理解材料内部细胞生长提供量化模型,并为优化组织工程生物反应器和三维组织材料提供一定的依据。模型包含了细胞的分布对氧组分传递的影响以及氧浓度对细胞生长的影响,并考虑了材料空间对细胞增殖的抑制作用。模拟结果与文献数据的比较表明该模型能够对三维多孔材料内软骨细胞的生长趋势作出很好的预测,其细胞分布与实验数据相吻合。

1 材料与方法

1.1 实验方法

在本研究中,我们采用 Malda^[7,8]所报道的实验数据。Malda 的研究工作主要是考察不同结构的支架材料内氧浓度分布的差异,其采用的是通过压缩成型后进行粒子过滤的方法制作的 PECT/PBT 复合材料,材料孔径为 $182\mu\text{m}$,孔隙率为 77.5%,材料为 $4\text{mm} \times 4\text{mm}$ 的圆柱,如图 1 所示。每块材料接种 3×10^6 个牛软骨细胞,在转瓶内培养 6 周。材料内氧浓度利用精密微电极进行测量,每隔 $100\mu\text{m}$ 布置一个测量点,该步骤每个测量点重复 3 次取其统计平均值。材料内细胞密度的空间分布则利用组织切片来测量。实验测量得到的细胞密度表明在材料表层细胞得到大量扩增,而在材料内部则增长幅度很

小,氧的测量值表明氧浓度从材料表面到材料中心逐渐下降。在材料表层,由于细胞密度较高,氧在该区域急剧下降,而在材料内部,由于细胞密度较小,氧在该区域的浓度下降比较缓慢。

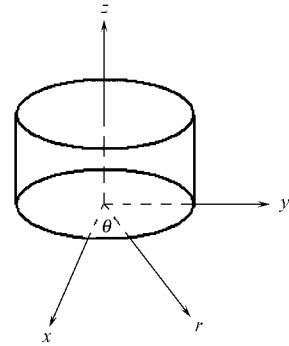


图 1 三维材料几何示意图

Fig. 1 Schematic representation of the 3-D scaffold

1.2 模型控制方程

模型假设组织培养过程中存在唯一限制物为氧,而其他成分则是充足的,不影响组织细胞的生长,多孔材料在培养过程中形状不发生改变。由于多孔支架材料的阻力以及支架表层细胞对传递的影响,氧在多孔支架内的传递方式为分子扩散,无对流引起的物质传递。氧的总消耗速率与细胞密度有关系,且细胞对氧的消耗速率与氧浓度的关系遵从 Michaelis-Menten 方程^[9]。因此描述多孔材料内氧扩散及消耗的方程如下:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla D_{\text{eff}} \nabla C - \frac{\mu_{\text{max}} C}{K_m + C} \rho$$

由于材料内部存在空间限制和接触抑制,因此在材料内细胞不可能无限制地生长扩增,其存在一个可能达到的最大细胞密度,本文考虑该因素对细胞密度变化的影响。细胞生长速率为限制基氧浓度的函数,通常采用 Monod 方程或者线性方程来描述^[10]。本文采用一阶线性方程来描述。故细胞密度随时间变化的微分方程如下:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = kC\rho \left(1 - \frac{\rho}{\rho_{\text{max}}}\right)$$

在大多数采用组织工程方法体外培养的人工组织中,都存在材料表层细胞密度非常高,而在材料内部细胞密度非常低的现象,不同空间位置细胞密度的差异造成原本孔隙率比较均匀的支架材料在内部孔隙率较高,而在材料表层孔隙率很低。这种现象使培养基组分的扩散系数在材料内也变得不均匀,在材料表层扩散系数较低,材料内部扩散系数相对外围要高。最近发展的通过体积平均的方法求解有

效扩散系数,认为多孔材料内包含两相,其中一相为细胞相,另一相为非细胞相,根据各相所占有的体积分数求解营养物质的有效扩散系数^[11-13]。本文中由于多孔材料的孔隙率较低,因此材料本身所占有的体积不能忽略,故有效扩散系数利用下式求解:

$$\frac{D_{\text{eff}}}{D} = \frac{\alpha(1 - \epsilon_{\text{cell}} - \epsilon_s)}{2 + \epsilon_{\text{cell}} + \epsilon_s}$$

$$\epsilon_{\text{cell}} = \frac{1}{6}\pi d_{\text{cell}}^3 \rho$$

其中方程的边界条件为:

$$C = C^0; t > 0; r = d/2; 0 \leq z \leq h$$

$$C = C^0; t > 0; z = 0; 0 \leq r \leq d/2$$

$$C = C^0; t > 0; z = h; 0 \leq r \leq d/2$$

初始条件为:

$$C = C^0; t = 0; 0 \leq r \leq d/2; 0 \leq z \leq h$$

$$\rho = \rho^0; t = 0; 0 \leq r \leq d/2; 0 \leq z \leq h$$

1.3 模型参数

所建立的模型中使用的参数如表 1 所示。

表 1 模型参数

Table 1 Model parameters used in the simulation

Parameter	Value	Units	Source
C^0	0.211	mol/m ³	[7]
D	3.0×10^{-9}	m ² /s	[9]
μ_{max}	1.86×10^{-18}	mol/cell·s	[14]
K_m	0.006	mol/m ³	[9]
ϵ_s	22.5%	-	This work
d_{cell}	8	μm	[15]
k	1.27×10^{-5}	mol ⁻¹ ·s ⁻¹	[16]

2 结果

通过有限元方法采用时间隐式格式求解所建立的数学模型,得到在材料内部不同空间位置的氧浓度、细胞密度以及有效扩散系数随培养时间的变化过程。模拟结果和实验数据都表明在三维多孔材料内,氧分布都呈现从材料表面到材料中心逐渐下降

的趋势,在培养 3d 时,氧浓度基本趋于线性下降,而培养 14d 后,氧在材料表层有限的厚度内急剧下降,在到达 1000 μm 左右的厚度时,则基本趋于水平状态,如图 2 所示。实验数据与模拟结果对比吻合较好,但是也存在一定的差异,在 1000 μm 厚度内模拟结果要比实验数据下降得快,而在 14d 时,模拟结果中氧浓度在 1000 μm ~ 2000 μm 范围内仍然有一定程度的下降,而实验数据则呈现水平分布。

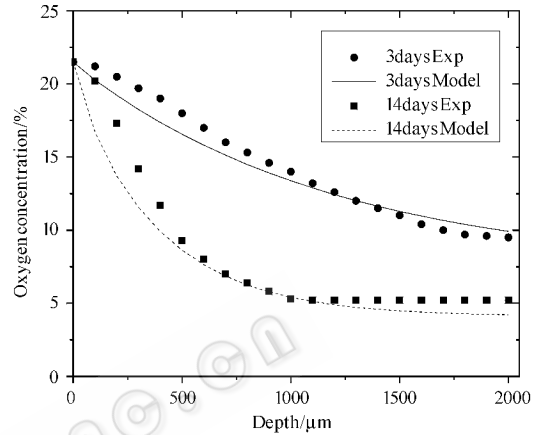


图 2 氧浓度的实验数据与模拟结果的比较

Fig. 2 Comparison of oxygen concentration between literature experimental data and model predictions

细胞在材料内的分布如图 3(A, B, C)所示,分别为培养 3d、14d、35d 的细胞密度在材料中心线上的分布。由图中分布可知,在培养过程中,细胞密度在材料各空间位置都处于增长状态,但是不同区域其增长幅度差异非常大。在材料表层,细胞在培养过程中增长迅速,特别是在距离表面 400 μm 厚度内,而在超过 1000 μm 以后细胞增长非常缓慢。同时随着细胞的扩增,由于最大细胞密度的限制使其增殖速率也逐渐下降,在达到最大细胞密度后停止增殖。图 4 为培养 35d 时模拟细胞密度分布,由图可见材料表层的细胞远远高于材料内部。

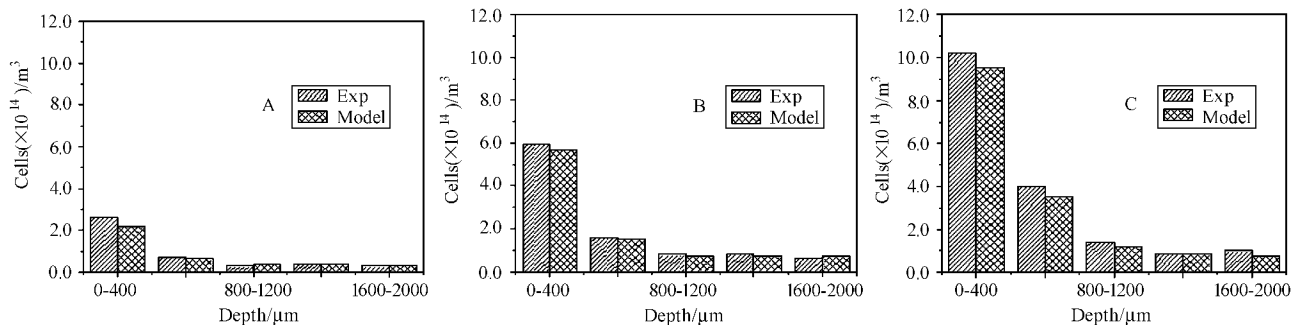


图 3 培养 3、14、35d 后细胞密度分布的预测结果与实验数据的比较

Fig. 3 Comparison of cell number density between the experimental data and model predictions on days 3, 14 and 35

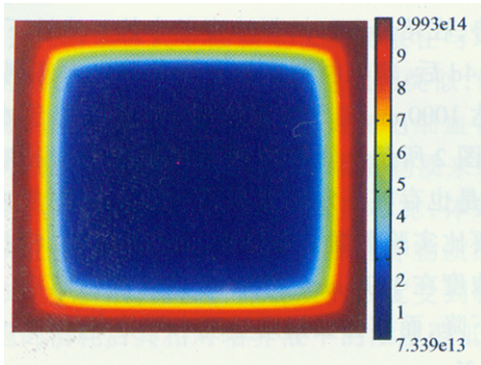


图4 材料纵截面上细胞密度分布(35d)

Fig.4 Predictions of cell number densities at the cross-section on day 35

图5为材料纵截面35d时氧的有效扩散系数的分布,由图可见,在材料内有效扩散系数相对培养开始时小,下降得最多的区域在材料表层 $400\mu\text{m}$ 厚度内,而在材料中心扩散系数相对要高于表层,这主要是由于不同区域细胞扩增量差异导致材料孔隙率的变化引起的。

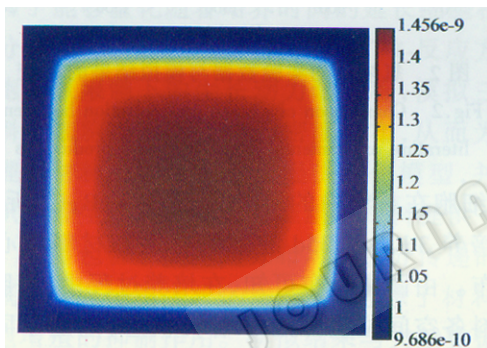


图5 材料纵截面氧扩散系数分布(35d)

Fig.5 Predictions of oxygen diffusion coefficients at the cross-section on day 35

模拟结果表明基于扩散-反应原理所建立的软骨细胞在三维多孔材料内的生长扩增数学模型能够较好地模拟该过程,模拟得到的氧浓度、细胞密度以及扩散系数随时间和空间的变化与实验数据符合较好。

3 讨论

本文利用扩散-反应基本方程,在基于氧限制的细胞生长动力学基础上,考虑空间抑制和氧扩散系数的变化,模拟三维多孔支架材料内软骨细胞生长的动态过程,特别是材料内氧浓度和细胞分布的演变规律。模拟结果与文献报道的数据进行了详细对比,表明该模型计算得到的氧浓度和细胞密度在不同培养时间段都与实验结果定性吻合较好。但是由于细胞代谢过程的复杂性,数学模型仍然存在诸多

简化,例如细胞死亡、产物抑制等因素并没有在模型中体现,因此模拟结果和实验对照在定量分析上有一定的差距,这将在今后的研究中进一步完善。

模拟结果表明在组织培养过程中三维支架材料内部存在较严重的扩散-反应抑制,处于材料表层的细胞消耗了大部分的氧,而材料内部氧浓度较低,这最终导致材料内的细胞得不到足够的氧,限制了其扩增,因此细胞密度较材料外围要显著降低。而在培养过程中细胞密度变化是由扩散和反应两端的各项参数分别控制的,即氧在材料内部的有效扩散系数、细胞初始分布、细胞耗氧速率以及细胞生长速率。

细胞在支架材料内的初始分布是一个非常重要的参数,均匀的初始分布有利于后续培养过程中组织形成的均匀性。而实际上从外部往材料内接种要达到整个材料各空间位置细胞分布均匀是非常困难的,这主要是由于材料内部缺乏流体流动或者流速极低,难以将细胞输送到材料内部,在高密度接种的情况下,由于细胞的聚集和黏附,甚至会堵塞在多孔材料表面。通常的静态接种和转瓶接种都会存在这方面的缺陷,而灌注接种方法也只能在低接种密度情况下改善均匀性问题,对于高密度接种也难以实现细胞均匀分布,特别是在材料通透性较差的情况下。因此,同时改善材料的微观结构参数和通透性并结合灌注接种方法是实现初始细胞接种均匀的可能途径。

研究表明,软骨细胞能适应厌氧和有氧两种条件,因此本研究采用 Michaelis-Menten 动力学方程,表明细胞的耗氧速率随着氧浓度的不同而发生变化,结合局部细胞密度得到氧在各空间点的消耗。材料表面处于氧浓度较高的环境下,细胞密度高且单个细胞耗氧速率较高,因此总的氧消耗量也较多;而材料内部处于氧浓度较低的环境下,细胞密度低且单个细胞耗氧速率也较低,因此氧消耗量也较少。细胞生长速率与氧浓度成正比,因此氧在扩散传递过程中的梯度直接导致细胞在不同空间位置生长速率的不均匀,处于材料表层的细胞由于接触新鲜培养基和较高浓度的氧,其生长速率较高。由于氧浓度在经过表层细胞的消耗后降低了,因此材料内部细胞生长速率随氧浓度的降低而下降,且代谢产物在材料内部较高,可能对其生长产生抑制。由此表明,随着培养时间的延长,材料表层的细胞逐渐增加,氧浓度也从材料表面向内部逐渐下降,更加限制了材料内细胞的生长和扩增。

影响氧在材料内的扩散输运能力主要是氧在培养基中的扩散系数以及材料的孔隙率,扩散能力越强且孔隙率越高,则形成氧限制的可能性就越小,一般在液体培养基中氧的扩散系数与其在水中的扩散系数相近。但是在组织培养过程中,细胞在多孔材料内随着培养时间的延长逐渐生长扩增,细胞密度不断提高,占据越来越多的材料空间,使得材料内的孔隙率逐步下降,从而降低了氧在材料内的有效扩散系数,氧的扩散输运能力下降。特别是在材料表面,由于初始接种密度一般较内部高,且细胞生长速率相比材料内部较快,因此在该区域材料的有效扩散系数下降最为剧烈。而在材料内部虽然细胞的生长扩增也会降低孔隙率,但由于其生长速率较低,因此扩散系数下降不明显。

综上所述,由于细胞在材料表层初始接种密度相对较高,且靠近培养基主体,营养物和氧的浓度较高,细胞生长扩增速率较快,造成氧扩散能力下降,同时表层高密度细胞消耗了大部分氧,这些因素导致在材料内部的细胞得不到充分的氧供给,影响了其生长和扩增,因此所培养的组织软骨的细胞密度非常不均匀。本研究所建立的模拟方法也很好地验证了这一点,其结果与实验数据及观察到的现象较好吻合。

由于材料内部各种参数的测量非常困难,数学模拟方法为我们理解和掌握多孔材料内各种组分分布和细胞生长状况提供了可能。通过完善模型,考虑更多复杂的影响因素,提高模型的精度和预测能力,将有利于我们完善组织工程生物反应器的设计和操作,同时节约实验成本和时间。

符号说明

C ——氧的浓度(mol/m^3)

t ——培养时间/ s

D_{eff} ——氧在材料内的有效扩散系数(m^2/s)

μ_{max} ——最大比消耗速率($\text{mol}/\text{cell}\cdot\text{s}$)

K_m —— $\frac{\mu_{\text{max}}}{2}$ 时的氧浓度(mol/m^3)

ρ ——细胞密度(cell/m^3)

k ——细胞比生长速率常数($\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

ρ_{max} ——最大细胞密度(cell/m^3)

D ——氧在水中的扩散系数(m^2/s)

ϵ_s ——多孔支架材料所占的体积分数

ϵ_{cell} ——细胞所占的体积分数

d_{cell} ——细胞的直径/ μm

C^0 ——为初始氧浓度(mol/m^3)

ρ^0 ——为初始细胞接种密度(cell/m^3)

d ——材料直径/ mm

h ——材料高度/ mm

REFERENCES(参考文献)

- [1] Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science*, 1994, **260** (5110): 920-926.
- [2] Freed L, Vunjak-Novakovic G, Marquis JC, et al. Kinetics of chondrocyte growth in cell-polymer implants. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, **43**(7): 597-604.
- [3] Hay PD, Veitch AR, Smith MD, et al. Oxygen transfer in a diffusion-limited hollow fiber bioartificial liver. *Artificial Organs*, 2000, **24**(4): 278-288.
- [4] Kellner K, Liebsch G, Klimant I, et al. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **80**(1): 73-83.
- [5] O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS, Comisso CN. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res*, 1997, **15**(5): 682-687.
- [6] Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G, et al. Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **63**(2): 197-205.
- [7] Malda J, Woodfield TB, van der Vloodt F, et al. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs. *Biomaterials*, 2004, **25**(26): 5773-5780.
- [8] Malda J. Cartilage tissue engineering: The relevance of oxygen. Ph.D. thesis, Institute for BioMedical Technology, University of Twente, The Netherlands, 2003.
- [9] Haselgrove JC, Shapiro IM, Silverton SF. Computer modeling of the oxygen supply and demand of cells of the avian growth cartilage. *Am J Physiol*, 1993, **265**(34): C497.
- [10] Palsion B Φ, Bhatia S N. Tissue Engineering. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2003.
- [11] Wood BD, Whitaker S. Diffusion and reaction in biofilms. *Chemical Engineering Science*, 1998, **53**(3): 397-425.
- [12] Wood BD, Whitaker S. Cellular growth in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **64**(6): 656-670.
- [13] Wood BD, Quintard M, Whitaker S. Calculation of effective diffusivities for biofilms and tissues. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **77**(5): 495-516.
- [14] Obradovic B, Meldon JH, Freed LE, et al. Glycosaminoglycan deposition in engineered cartilage: experiments and mathematical model. *AIChE Journal*, 2000, **46**(9): 1860-1871.
- [15] Bush PG, Haal C. The volume and morphology of chondrocytes within on-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2003, **11**(4): 242-251.
- [16] Lewis MC, Macarthur BD, Malda J, et al. Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **91**(5):