

- [18] Kim JW, Lee SH, Park YS, et al. Inhibition of in vitro hepatitis B virus replication by lentivirus-mediated short-hairpin RNA against HBx[J]. Korean J Hepatol, 2009, 15(1): 15-24.
- [19] Pu C, Wang L, Miao X, et al. Optimized tandem amiRNA mediates stronger inhibitory effects on hepatitis B virus infection[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2011, 20(3): 271-278.
- [20] 段梦夕, 袁宏, 等. RNA 干扰沉默 Bcl-xL 基因对肝癌细胞 HepG-2 生物学行为的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(3): 98-101.
- [21] Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Pathol, 2006, 208(3): 372-380.

- [22] Chen CC, Sun CP, Ma HI, et al. Comparative study of anti-hepatitis B virus RNA interference by double-stranded adeno-associated virus serotypes 7, 8, and 9[J]. Mol Ther, 2009, 17(2): 352-359.
- [23] Li GQ, Xu WZ, Wang JX, et al. Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2. 2. 15 cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(16): 2324-2327.
- [24] 汤宏斌, 邬开朗, 姜妮, 等. 双表达小干扰 RNA 抑制小鼠体内 HBV 感染[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 1-6, 封 2.

(收稿日期: 2011-12-31)

• 综 述 •

干细胞体外三维培养的研究进展*

王甜甜 综述, 赵树铭[△] 审校

(第三军医大学西南医院输血科, 重庆 400038)

关键词: 干细胞; 三维培养; 生物支架; 生物反应器; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 06. 047

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)06-0733-03

胚胎干细胞(ESCs)、造血干细胞(HSCs)和间充质干细胞(MSCs)等属于全能或多能干细胞,具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能,可在特定条件下诱导分化为巨核细胞、骨细胞、生殖细胞等^[1-2]。目前干细胞的主要来源于脐血,具有采集方便、移植成活率高、移植抗宿主病(GVHD)发生率低、扩增能力强等特点,故广泛应用于各系统疾病的肝细胞移植治疗^[3]。但单份脐血量较少,且移植后归巢定植率不高,有时无法满足成人移植需要,因此需要体外大量扩增干细胞以达到治疗所需^[4-6]。近年来,细胞治疗的临床应用日益广泛,也需要对干细胞进行体外扩增和诱导分化,以获取大量的治疗用细胞。传统的干细胞培养主要依赖二维平面培养,其培养体系在空间结构、细胞外基质、细胞因子添加等方面无法模拟体内的三维造血微环境。因此,国内外学者在干细胞三维培养方面进行了广泛探索,取得了较大进展。本文将对干细胞体外三维培养技术的研究进展进行综述。

1 三维细胞培养

细胞的发育和功能都依赖于细胞微环境中分子间的相互作用。传统的二维细胞培养是较为普遍的细胞培养手段,并不是细胞生长的自然状态,因而细胞在基因表达、信号转导和形态学方面都可能与天然状态存在差异。三维细胞培养(TDCC)是将三维载体与细胞在体外共培养,使细胞在载体的立体空间结构中迁移、生长,构成三维的细胞载体复合物。三维培养体系为细胞提供类似体内生长环境的支架或基质,细胞通过紧密连接和(或)缝隙连接等方式建立细胞间及细胞与基质间的联系,形成一定的三维结构;TDCC在基因表达、基质分泌及细胞功能活动等方面与二维培养均有明显差异,与体内细胞生长环境更为相似。因此,TDCC既能保留体内细胞微环境的物质结构基础,又能体现细胞培养的直观性及条件可控制性。

2 三维培养材质

2.1 生物支架 组织工程的关键在于构建细胞和生物支架的

三维复合体,为细胞摄取营养和气体交换等提供立体空间。目前,TDCC所用的生物材料主要包括可降解高分子材料、新肽生物材料、天然高分子与合成高分子的复合物、有机材料与无机材料的复合物等^[7-8]。天然高分子材料及生物可降解材料无毒性、无致癌作用,对人体无不良反应,但材料中存在杂质,因此选用时必须经过严格的纯化,而且力学强度相对比较差。合成高分子材料及新肽生物材料的操作性更强,可以根据要求进行分子设计,并用物理化学方法调节支架大小,可批量生产,但材料中残存的杂质,例如低聚物、催化剂等,会对细胞产生不利影响,因此必须进行生物毒性及相容性检测。Ouyang等^[9]用聚对苯二甲酸乙二酯(PET)纤维材料培养、扩增ESCs,研究表明PET的三维结构能够为细胞提供仿生环境,并可使细胞免受剪切力的损伤,孔径小的PET纤维材料更利于细胞生长。Cao等^[10]将MSCs接种在PET支架上,培养20d后观察细胞生长和代谢,鉴定表面标志。结果表明,MSCs接种密度最低时,扩增倍数最高,并维持其未分化状态及细胞的多潜能性,细胞扩增受支架孔隙率、表面积、吸水性、种植率等因素的影响。

2.2 微载体 微载体直径介于60~250 μm,是用明胶、胶原、纤维素、甲壳质及其衍生物海藻酸盐等材料制成微珠^[11]。细胞培养时,将其悬浮在细胞培养液中,细胞可完全舒展,紧密黏附于微载体表面。微载体悬浮于培养体系中,细胞吸收营养均匀,培养环境也易于检测、控制和优化,细胞更易贴壁培养,因此,可以获得较高的细胞密度。Eibes等^[12]在搅拌式生物反应器(Stirred-tank Bioreactor)中采用明胶微载体复合血清培养基培养MSCs,结果显示,细胞很好地黏附和扩展,第8天时即可扩增8倍以上,并保留成脂和成骨分化潜能,流式细胞仪测得CD73、CD90和CD105的标记率可达90%。在大规模细胞培养中,微载体培养有利于利用培养基的有效空间,与搅拌反应器结合,可更好地增加细胞的营养物质的吸收和代谢产物的扩散,提高了扩增效率。

* 基金项目:重庆市科委科技攻关项目(CSTC:2011AC5039)。

△ 通讯作者, E-mail: shumingzhao@yahoo.com。

2.3 微囊 将细胞包裹于天然或合成高分子生物材料制成的选择性半透膜中即可形成微囊。细胞被包裹在微囊材料中固定培养,最大优点是细胞的生长在其所处的微小环境中受到一定的保护,与微载体培养相比,减少了搅拌过程中对细胞产生的剪切力,细胞活性保持比较好。Lyu 等^[13]用聚电解质络合物(PEC)包裹培养 MSCs,可使细胞增殖和分化得很好。微囊化培养还可用于其他干细胞的共培养。细胞生长需要外环境提供足够的 O₂ 和营养供给,而囊壁具有一定厚度,而且孔径很小,可阻碍 O₂ 以及其他营养成分的进入和代谢废弃物的扩散,不利于大规模细胞扩增。Serra 等^[14]用海藻酸钠微囊结合搅拌式生物反应器扩增 ESCs,并将细胞冻存于微囊内,研究显示解冻后的细胞回收率超过 70%,与非微囊冻存细胞比较,存活细胞依然保持干细胞特性。

2.4 其他 纤维素膜属于天然高分子材料,其生物相容性和降解性良好,降解产物对人体无毒害作用,且参与代谢循环,易被人体吸收。醋酸纤维素是常用天然高分子材料之一,是由可再生的纤维素经乙酰化反应得到的产物,其制备的多孔膜对水和中等相对分子质量的溶质分子都有良好渗透性,且醋酸纤维素价格低廉,生物相容性、生物降解性以及机械强度高,因此得到广泛应用。Yamazoe 和 Iwata^[15]将未分化 ESCs 接种于醋酸纤维素中空纤维膜内部,并将中空纤维膜置于骨髓基质细胞来源的 PA6 细胞培养基中培养,使其诱导 ESCs 定向分化为多巴胺能神经元,培养 16 d 后扩增倍数达到 8 倍左右。醋酸纤维素中空纤维膜的良好生物相容性使葡萄糖和 O₂ 等低相对分子质量物质能够很好地通过,不但利于多巴胺的扩散,而且避免了免疫系统的排斥反应,有效地保护多巴胺能神经元。

3 TDCC 培养系统

3.1 搅拌式生物反应器 搅拌式生物反应器通过叶轮或桨式搅拌器的转动来搅动培养液,以增加物质传递能力,确保 O₂ 和各种养分均匀分布,有利于细胞保持天然形态,并维持其正常新陈代谢,目前多用于培养悬浮细胞。Serra 等^[16]将 ESCs 接种在涂有基质胶的 Cytodex 微载体上,在搅拌式生物反应器中进行培养,并将培养环境中氧分压控制在 30%,结果显示所得细胞数量较二维培养提高了 12 倍,且扩增的 ESCs 保持未分化表型和全能性,说明 ESCs 在搅拌式生物反应器中具有很好的扩增效果,与微载体共培养可使细胞紧密贴合于载体上。Luni 等^[17]利用一种靠浮力驱动的搅拌生物反应器,HSCs 培养 7 d 即可达增殖高峰,所得细胞数量是二维培养的 16 倍以上;改变搅拌条件对细胞扩增、干细胞特性无明显影响。该生物反应器的优点是对细胞的危害较小,可精细控制各种参数,使 HSCs 体外扩增更为有效。搅拌式生物反应器不足之处在于,由于采用机械搅拌装置,搅拌过程中产生的泡沫会造成细胞污染,流体剪切力对暴露的细胞也有损伤作用,搅拌速度过高破坏细胞的完整性,搅拌速度过低则不利于 O₂ 的扩散。

3.2 旋转式生物反应器 旋转生物反应器(Rotary Cell Culture System)是利用体内空间微重力效应,采用水平旋转,且流体剪应力较低的细胞组织培养系统,可在旋转过程中模拟微重力培养环境,这对细胞生长至关重要。Chen 等^[18]运用旋转生物反应器共培养 MSCs 和 HSCs,到第 8 天反应器中细胞量达最大值,MSCs 中 CD44+、CD34-细胞分别增加 29 倍和 8 倍,HSCs 中 CD34+、CD44+细胞分别增加 9 倍和 29 倍,生物反应器处理的细胞集落形成效率比未处理细胞高 1.44 倍,但细胞生长周期很短,20 d 后细胞数量开始下降,且培养后期,旋转生物反应器中的细胞易产生聚集现象,所以不能支持高密度

细胞培养。另外,在悬浮培养中,微载体和生物反应器壁之间的碰撞易造成细胞机械性损害,破坏细胞黏附,导致微载体上的基质沉积。

3.3 灌流式生物反应器 灌流式生物反应器(Perfusion Bioreactor)是一种流动循环装置,反应器可以连续置换培养系统中的培养基,但并不影响细胞因子浓度,也不会造成细胞机械损伤。培养液的循环交换不但促进培养基的有效混合,而且培养基的连续循环灌流增加了 O₂ 和营养物的传递,也可有效排除代谢废物。Zhao 等^[19]分别采用 PET 制备的静态支架和并行灌注系统培养 MSCs 35 d,结果表明,低速灌注培养可形成外基质网络,而该网络的变化影响 MSCs 细胞核的形状。在静态支架中,MSCs 核伸长率高出表面 15.2 倍,而生长在灌流式生物反应器中细胞则是表面均匀的球形核,且 CFU-F 集落形成能力较低,REX-1 和 Oct-4 干细胞的基因表达能力下降。灌流式生物反应器不足之处在于,随着细胞数量的增加,灌注阻力越来越大,而不断的灌流也可能导致细胞分泌的生长促进因子和分化抑制因子等的流失,对细胞的扩增不利。

3.4 中空纤维膜反应器 中空纤维膜反应器(Hollow Fiber Membrane Bioreactor)是模拟人体血管或毛细血管的功能构建的培养系统,由多根中空纤维管组成,增加了培养面积。管道管径约为 200 μm,管壁是多孔膜,厚度为 50~70 μm,这利于 O₂ 和 CO₂ 等小分子自由穿透壁膜进行气体交换。以中空纤维膜作为载体,可以提高营养物质传递效率、促进代谢产物的排出。Miki 等^[20]将未分化 ESCs 接种于以中空纤维膜制备的四腔三维灌流式生物反应器,并诱导其分化为肝细胞,培养 20 d,结果显示,与加入细胞因子促进细胞分化的二维培养体系比较,三维灌注培养诱导生成人类胚胎干细胞源性肝细胞的能力更强。Housler 等^[21]构建了包含 2 各中空纤维膜的四腔生物反应器,可与 O₂ 和 CO₂ 交织形成 2 个气腔,将 HSCs 置于生物反应器中培养 7 d 后,细胞数量增加了近百倍,说明中空纤维膜系统更有利于干细胞的分化和增长。

4 结 语

干细胞三维培养技术近年来发展迅速,在支架材料、培养系统等方面虽取得了重要进展,但依然存在很多问题,如培养细胞的生存能力和分化程度有限,剪切力导致细胞损伤等,可能与三维支架的孔径和极性不能与人体内造血环境存在差异有关。传统培养方法获得的干细胞数量远不能满足临床需求,因此,探索更为有效的干细胞培养方法对干细胞移植治疗具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 刘蒙,杨少光,刘鹏霞,等.人骨髓和脐带来源间充质干细胞体外支持造血能力的比较研究[J].中国实验血液学杂志,2009,17(5):1294-1300.
- [2] Huang P, Lin LM, Wu XY, et al. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germlike cells in vitro[J]. J Cell Biochem, 2010, 109(4): 747-754.
- [3] Andrade-Zaldívar H, Santos L, De León Rodríguez A. Expansion of human hematopoietic stem cells for transplantation: trends and perspectives[J]. Cytotechnology, 2008, 56(3): 151-160.
- [4] 孟强,赵树铭.提高脐造血干细胞移植归巢的研究进展[J].国际检验医学杂志,2011,32(3):366-368.
- [5] Haylock DN, Nilsson SK. Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2007, 2(4): 324-335.

[6] Kresnowati MT, Forde GM, Chen XD. Model-based analysis and optimization of bioreactor for hematopoietic stem cell cultivation [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2011, 34(1): 81-93.

[7] Xu SL, Li DC, Xie YZ, et al. The growth of stem cells within β -TCP scaffolds in a fluid-dynamic environment [J]. *Mater Sci Engin*, 2008, 28(1): 164-170.

[8] Cho CH, Eliason JF, Matthew HW. Application of porous glycosaminoglycan-based scaffolds for expansion of human cord blood stem cells in perfusion culture [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 86(1): 98-107.

[9] Ouyang A, Ng R. Long-term culturing of undifferentiated embryonic stem cells in conditioned media and three-dimensional fibrous matrices without extracellular matrix coating [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 447-454.

[10] Cao Y, Li D, Shang C, et al. Three-dimensional culture of human mesenchymal stem cells in a polyethylene terephthalate matrix [J/OL]. *Biomed Mater*, 2010-11-15 [2011-12-14], <http://iopscience.iop.org/1748-605X/5/6/065013/>.

[11] Zanetta M, Quirici N, Demarosi F, et al. Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts [J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5(4): 1126-1136.

[12] Eibes G, Dos Santos F, Andrade PZ, et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system [J]. *J Biotechnol*, 2010, 146(4): 194-197.

[13] Lyu SY, Kwon YJ, Joo HJ, et al. Preparation of alginate/chitosan microcapsules and enteric coated granules of mistletoe lectin [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(1): 118-126.

[14] Serra M, Correia C, Malpique R, et al. Microencapsulation technology: a powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells [J/OL]. *PLoS One*, 2011-08-05 [2011-12-14], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151290/?tool=pubmed>.

[15] Yamazoe H, Iwata H. Efficient generation of dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells enclosed in hollow fibers [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(28): 4871-4880.

[16] Serra M, Brito C, Sousa MF, et al. Improving expansion of pluripotent human embryonic stem cells in perfused bioreactor through oxygen control [J]. *J Biotechnol*, 2010, 148(4): 208-215.

[17] Luni C, Feldman HC, Pozzobon M, et al. Microliter-bioreactor array with buoyancy-driven stirring for human hematopoietic stem cell culture [J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(3): 1-13.

[18] Chen X, Xu H, Wan C, et al. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2052-2059.

[19] Zhao F, Grayson WL, Ma T, et al. Perfusion affects the tissue developmental patterns of human mesenchymal stem cells in 3D scaffolds [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219(2): 421-429.

[20] Miki T, Ring A, Gerlach J. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(5): 557-568.

[21] Housler GJ, Miki T, Schmelzer E, et al. Compartmental hollow fiber capillary membrane based bioreactor technology for in vitro studies on red blood cell lineage direction of hematopoietic stem cells [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(2): 133-142.

(收稿日期: 2011-11-22)

• 综 述 •

肺炎克雷伯菌多药耐药机制研究进展

钟海琴¹, 蔡 挺^{2△}综述, 张 顺³审核

(1. 宁波大学医学院, 浙江宁波 315211; 宁波市第二医院: 2. 急诊科; 3. 临床研究室, 浙江宁波 315010)

关键词: 肺炎克雷伯菌; 多重耐药; 整合子; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.048

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)06-0735-04

肺炎克雷伯菌(KPN)属于革兰阴性杆菌,通常存在于人类肠道、呼吸道,是除大肠埃希菌外导致医源性感染的最重要条件致病菌^[1]。由于抗菌药物的大量使用,在选择性压力下多药耐药 KPN 菌株不断出现,耐药率日益上升。KPN 耐药机制包括产生抗菌药物灭活酶、外膜渗透性障碍、主动外排、靶点改变等,而耐药基因可通过质粒、转座子、整合子的传播在菌种间传递耐药性。本文就 KPN 多药耐药机制,特别是整合子与 KPN 多药耐药性的关系进行阐述。

1 抗菌药物灭活酶

1.1 β -内酰胺酶 产生 β -内酰胺酶是细菌对 β -内酰胺类抗菌药物耐药的重要机制,可通过水解 β -内酰胺环使抗菌药物失去抗菌活性。KPN 的 β -内酰胺酶耐药机制主要是产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、AmpC 酶、耐酶抑制剂 β -内酰胺酶、KPC 酶及金属 β -内酰胺酶(MBLs)等。

1.1.1 ESBLs ESBLs 是耐药 KPN 产生的最主要的一类酶,由质粒介导。产 ESBLs KPN 对青霉素类、头孢菌素类及单环类药物耐药,但对头霉素和碳青霉稀类及酶抑制剂敏感。ESBLs 分为 SHV、TEM、CTX-M、OXA 及其他类型,其中 SHV、TEM 种类最多。SHV、TEM 型 ESBLs 包括 SHV-1、TEM、TEM-2 型等。CTX-M 型是国内的主要基因型。有研究在突尼斯发现新型的 TEM-164 型 ESBLs^[2]。关于同时产多种 β -内酰胺酶的报道不断增多。王运铎等^[3]从 51 株产 ESBLs KPN 检出同时携带两种或两种以上基因型 23 株(45.10%),且多为 CTX-M 型与 TEM 或 SHV 型共同存在。

1.1.2 AmpC 酶 KPN 中 AmpC 酶由质粒介导。1988 年美国首次报道从 KPN 中分离产 MIR-1 型质粒介导的 AmpC 酶^[4]。之后世界各地先后又从 KPN 中发现 CMY-1、CMY-2、ACT-1、ACC-2、ACT-6、CMY-8、CMY-8b 等质粒介导的 AmpC

△ 通讯作者, E-mail: nbicu@tom.com.