

# 生物反应器在干细胞培养中的应用研究进展

杨忠财 邱明宁 刘红亮 刘 军 权富生\* 张 涌\*

(西北农林科技大学动物医学院, 农业部生物技术重点开放实验室, 杨凌 712100)

**摘要** 干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞, 在再生医学、药物筛选及毒理学等生物医学领域呈现出诱人的前景。通过目前的干细胞分离培养技术可获得的干细胞数量极少, 远远不能满足临床需要, 因此体外大规模扩增培养干细胞是亟待解决的问题。该文简述了适用于干细胞培养的各种生物反应器的特点, 以及悬浮生物反应器体系在不同类型干细胞群中的研究应用。同时对利用生物反应器培养干细胞过程中几个主要的关键参数进行了阐述, 将为干细胞的培养和研究从思路和方法上提供参考。

**关键词** 干细胞; 生物反应器; 悬浮培养; 组织工程; 再生医学

## Stem Cells Cultivation Research Progress in Bioreactors

Yang Zhongcai, Qiu Mingning, Liu Hongliang, Liu Jun, Quan Fusheng\*, Zhang Yong\*

(Key Laboratory of Biological Technology, Ministry of Agriculture, College of Animal Veterinary Medicine, Northwest Agriculture & Forest University, Yangling 712100, China)

**Abstract** Stem cells are generally capable of both self-renewal and multilineage differentiation, which are very appealing for regenerative medicine, drug screening, toxicology and other biomedical applications. However, the actual number of stem cells that can be obtained from available donors is very low. One possible solution for several generation applications is to scale up the culture of these cells *in vitro*. This review describes the characteristics of several bioreactors, particularly recent developments in the cultivation of many different types of stem cells in bioreactors and considerations regarding critical influencing parameters in bioreactors culture. We expect that this review will provide updated information focusing on the systematic production of stem cell through using robust and cost-effective approaches.

**Key words** stem cells; bioreactors; suspension culture; tissue engineering; regenerative medicine

干细胞(stem cell, SC)是机体内存在的一类未分化的、尚不成熟的特殊细胞, 具有自我更新、增殖及多向分化的潜能<sup>[1]</sup>, 在体外可分离、扩增和冷冻保存, 且能在适当条件下被诱导分化为不同的组织细胞和器官, 具有潜在的再生功能。目前, 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)及其他干细胞

等在再生医学、药物筛选、体外毒理学等领域中表现出诱人的前景, 给科学界和医学界带来了巨大的希望。

但是, 一般情况下, 可从供体中获得的干细胞数量是很少的。即使在含量丰富的骨髓中, 每10 000-15 000个骨髓细胞中只有一个造血干细胞(haematopoietic stem cell, HSC), 人和动物皮肤中的

收稿日期: 2012-10-18 接受日期: 2012-12-10

国家高技术研究发展计划(863)(批准号: 2011AA100303)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 029-87080092, E-mail: quanfusheng@nwsuaf.edu.cn; Tel: 029-87080085, E-mail: zhangyong1956@nwsuaf.edu.cn

Received: October 18, 2012 Accepted: December 10, 2012

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (Grant No.2011AA100303)

\*Corresponding authors. Tel: +86-29-87080092, E-mail: quanfusheng@nwsuaf.edu.cn; Tel: +86-29-87080085, E-mail: zhangyong1956@nwsuaf.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-04 15:13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130304.1508.003.html>

干细胞含量仅为7%~8%<sup>[2]</sup>。在许多细胞治疗中, 治疗一个成年病人所需要的细胞量已经远远超过来自供体的可用细胞量。例如: 心肌梗死病人需要 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ 的心肌细胞去代替损伤的心肌组织<sup>[3]</sup>。胰岛移植时, 一个体重70 kg的病人需要 $1.3 \times 10^9$ 个胰岛 $\beta$ 细胞<sup>[4]</sup>。

因此, 若要将干细胞推向临床应用化及产业化等实际应用, 迫切需要解决的一个问题就是如何在体外大规模扩增这些干细胞, 使干细胞产品在量上达到临床治疗的要求。目前, 生物反应器(bioreactor)的提出为干细胞培养提供了一种有效的方法, 利用生物反应器培养干细胞能实现规模化扩增, 并能有效地维持干细胞的未分化特性, 进而满足临床上细胞治疗量的要求。

## 1 生物反应器的发展及应用

传统上, ESCs和iPSCs等干细胞都是在有血清和饲养层(feeder layer)的条件下贴壁扩增进行传代培养的, 即采用标准的2D(two-dimensional)培养模式。这类方法需要分离饲养层, 有病原体污染的危险, 且不易操作, 培养出的干细胞容易发生变异, 细胞产量也受到一定的限制。而生物反应器的提出在一定程度上解决了这些问题。

### 1.1 生物反应器的发展

至今, 已经发展出了多种类型的生物反应器<sup>[5]</sup>。

(1)滚瓶式生物反应器(roller bottles bioreactor): 此种方法利用转瓶培养器在不断摇动的细胞培养箱中进行细胞培养。此种方法操作最简单, 转瓶培养器具有使用方便、价格低廉等特点。但此种培养体系只适合于贴壁依赖型细胞的培养。培养过程中可实时监控各种理化参数(pH、 $O_2$ 等)的变化, 但不够直观, 而且pH改变造成的浓度梯度对培养环境仍有很大的影响。

(2)搅动悬浮培养生物反应器(stirred suspension bioreactor, SSB): 此种体系设计是最经典、最早被采用的一种生物反应器, 通常由罐体、管路、阀门、泵和马达等组成, 由马达带动桨叶混合培养液, 通过搅拌器的作用使细胞和养分在培养液中均匀分布, 罐体上安装的不同传感器在线持续检测培养液的pH、温度、溶氧等参数。此法操作也较简单, 既适用于以细胞团块或单细胞形式进行的悬浮细胞培养, 也适合贴壁型细胞的微载体培养。相比于滚瓶

式生物反应器, SSB培养过程中的各种理化参数的变化可以得到更好的监控。但是搅动会对细胞造成一定的损伤, 死细胞比较多, 另外也会存在微载体黏连细胞或细胞聚团的现象发生。

(3)摇袋式生物反应器(wave bioreactor): 此种体系是由美国研发的一种专利产品。装置中, 细胞及培养液被置于一个预先消过毒的无菌一次性塑料袋中, 通入由除菌过滤器过滤的空气后会形成具有一定空间的培养容器, 袋子被置于一个摇动的平台上, 随着摇动平台的左右摇动, 培养基液体在袋子中形成波浪式的运动, 起到良好的混合作用。此种方法通过一次性耗材进行细胞培养, 使污染的可能性降到最低, 更符合标准化操作的要求, 但是操作中细胞的放取及监控细胞培养状态等具有不简便性, 同时成本花费比较大。

(4)旋转壁式生物反应器(rotating wall vessel, RWV): 此种体系与SSB体系工作原理及装置大致相同, 只是此种方法不是利用搅动来混合细胞和营养物质, 而是利用旋转来混合。相比于SSB系统, 对细胞造成的损伤比较小, 并且能更好地进行气体交换。但此系统需要复杂的设备, 且不易进行可量化使用。

(5)平板型生物反应器(parallel plates bioreactor, PPB): 此系统通常由多层平板、中空支架和外壳三部分组成。平板与平板之间隔开固定于中空支架上, 中空支架是直径为1 cm的空心圆柱体, 上端开口、下端封闭。每层平板上都有一层纤维支架, 作为细胞附着的载体。在柱体上侧还开有四条纵长的侧孔, 这些侧孔被层层支架分割成一个个小孔分布于每两层支架之间, 这些小孔的作用是用于细胞的培养和培养液的循环。此种体系可实现细胞的大规模培养, 其培养过程中细胞新陈代谢产生的副产物可以随时去除, 使其有毒代谢物含量比较低, 但是同时细胞培养中产生的分泌性因子也随之减少, 对细胞培养也有一定的害处。

(6)固定流化床式生物反应器(fixed and fluidized bed bioreactor): 通过3D(three-dimensional)支架来为细胞的贴壁和生长提供依附, 细胞被固定在中空的载体上, 载体固定在中空管中, 培养基在管内流动。在固定床中, 培养基在载体间流通, 在流化床中载体在培养基的上升流作用下流动, 培养基在床体间流动, 随着流动, 床体高度增加。在此种体系中细胞与细胞间、细胞与基质间的相互作用能更好地模仿

生物体内的复杂结构,更有助于细胞的生长。但相比于其他生物反应器,不能进行大规模的扩增细胞。各种不同生物反应器的主要特征介绍如表1所示。

早期的生物反应器研究侧重于细胞扩增,近年来研究则侧重于3D培养环境对细胞的表面标志物、细胞的增殖能力、分化能力等的影响。选择合适的3D培养方法,能够为细胞创造良好的环境,用以保持培养过程中干细胞特性。优化反应条件,包括建立最佳培养环境,改良生物反应器结构,实现个体化干细胞生产流程。所以各种生物反应器将在干细胞体外培养扩增、定向分化和组织工程中有极大的实际应用潜能。

## 1.2 生物反应器在干细胞中的应用

目前,生物反应器培养体系已成功应用于某些干细胞群(如造血干细胞、间充质干细胞、多能干

细胞等)的分离和培养。

1.2.1 造血干细胞(haematopoietic stem cell, HSC)造血干细胞(HSC)是最原始的造血细胞,是体内各种血细胞的唯一来源。1973年, Dexter等<sup>[6]</sup>首次在体外成功分离培养出小鼠造血干/祖细胞。1980年,人造血干细胞也被成功分离<sup>[7]</sup>。之后HSC便成为干细胞领域的研究热点,但自始至终却一直不能突破分离得到的HSCs量少的难题。直至20世纪90年代,搅动悬浮培养(stirred suspension cultures)造血干细胞体系逐渐被提出<sup>[8]</sup>,在一定程度上提高了分离造血干细胞的效率。虽然分离HSCs的效率有所提高,但是HSCs的体外扩大培养仍不能很好地得到改善。之后,随着各种科学技术的不断发展和研究者的不断探索,3D培养系统——灌注生物反应器(perfusion reactors)逐渐发展起来。相比于传统的静态培养,灌注

表1 用于干细胞培养的不同生物反应器的主要特性(根据参考文献[5]修改)

Table 1 Summary of the main characteristics of different bioreactors used for stem cell culture(modified from reference [5])

生物反应器类型 Bioreactor configuration	主要特征 Main characteristics
Roller bottles	Versatile system with simple operation and usage Only allows anchorage-dependent cell culture Low-cost solution Concentration gradients are minimized, but still persist Monitoring and control is possible, but not straightforward
Stirred suspension bioreactor	Simple design, homogeneous conditions are achieved In addition to suspension culture(as cell aggregates or single cells), also allows adherent growth when microcarriers are used Bioreactor operation and sampling are easily performed Hydrodynamic shear stress due to mechanical agitation can be harmful to cells Monitoring and control solutions are widely available Microcarrier bridging and/or cell agglomeration may occur
Wave bioreactor	Disposable system and easily scalable High-cost solution Sampling, monitoring and control are not as simple as with other systems Contamination issues are minimized and sterilization is not needed, rendering it suitable for GMP operations
Rotating wall vessel	Low-shear stress environment and efficient gas transfer Complex system, not easily scalable
Parallel plates bioreactor	High productivities can be achieved Medium-intensive culture system Accumulation of toxic metabolic side-products is minimized, but continuous removal of secreted factors may be detrimental Effects of hydrodynamic shear stress are unknown
Fixed and fluidized bed bioreactor	Provides 3D scaffolding for cell attachment and growth Spatial concentration gradients(in the fixed bed configuration) Cell-cell or cell-matrix interactions are possible, providing a better mimic of the <i>in vivo</i> intricate structure Possible shear stress effects(in the fluidized bed configuration) Low volumes and difficulties in scaling-up, when compared with other systems

培养的HSC的扩增率能提高10~20倍<sup>[9]</sup>。最近有人报道, HSC在搅动或旋转的生物反应器(stirred or rotating wall vessels)中培养200 h后, 细胞数量增加高达400倍, 且CD34+的造血干细胞量增加了30倍<sup>[10]</sup>。

1.2.2 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC) 间充质干细胞(MSC)是典型的贴壁依赖型细胞, 以单层细胞生长在培养皿中。但是, 2003年, Baksh研究小组<sup>[11]</sup>发现, 在细胞因子的作用下, MSCs能以单细胞的形式在搅动悬浮生物反应器中生长和扩增, 通过RT-PCR和流式细胞检测, 发现MSCs仍然保持其干性特征和多系分化潜能。之后, 许多研究表明, 微载体更有助于MSCs的搅动悬浮培养。Frauensuh等<sup>[12]</sup>利用微载体(Cytodex 1)悬浮培养猪MSCs, 结果发现, Cytodex 1能够促进MSCs的生长, 且能维持其向成骨细胞和软骨细胞的分化潜能。随后又相继出现了大鼠骨髓MSCs<sup>[13]</sup>、山羊MSCs<sup>[14]</sup>、人胎盘MSCs<sup>[15]</sup>等在微载体下利用生物反应器进行悬浮培养的报道。至此, 彻底打破了MSCs只能进行贴壁培养的观点。最近, 一种新的灌注系统(激流式灌注系统)也被成功应用于人MSCs的培养, 并且MSCs能更好地保持向成骨细胞方向分化的多能分化潜能<sup>[16]</sup>。这种灌注培养系统可实现激流系统和灌注系统的循环, 灌注系统保证培养液供给, 提供细胞正常生长代谢所需的养分, 同时带走代谢产物; 此外, 还利用激流式生物反应器的拖带式传气技术在线监控溶氧、pH、温度等培养条件, 随时为细胞生长创造最佳的培养环境, 同时此系统也可单独进行悬浮细胞的培养。所以, 目前可以成功应用生物反应器进行MSCs的培养和定向分化, 在组织工程中具有极大的实际应用潜能。

1.2.3 多能干细胞(pluripotent stem cell, PSC) 目前悬浮培养已成功应用于小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)的增殖培养, 克服了之前在饲养层下培养mESC的缺点<sup>[17]</sup>。此研究发现, 在白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的作用下, 悬浮培养的mESC以细胞团块的形式进行增殖, 且表达多能性标记。最近, 也有研究报道, 通过搅动悬浮生物反应器, 可以在有或无*c-Myc*原癌基因的情况下快速、高效地诱导小鼠iPSCs, 悬浮培养的重编程miPSCs表达多能性标记, 体内外均表现出多能分化潜能, 并能在嵌合体小鼠体内产生生殖细胞系<sup>[18]</sup>。随后, Fluri等<sup>[19]</sup>的研究也报道, 在无饲养层时,

利用摇动悬浮培养体系从终末分化的小鼠细胞中分离培养出iPSCs, 并进行全基因组表达谱分析, 结果显示, 悬浮培养的细胞重编程和贴壁培养的细胞重编程有很大的相关性, 且悬浮培养的重编程获得的iPSCs能够在体外分化为三胚层, 体内能够产生嵌合体胚胎。

2010年, Kehoe等<sup>[20]</sup>提出搅动悬浮培养生物反应器(SSB)也同样适用于人ESC和人iPSCs的培养。随后, Amit等<sup>[21]</sup>报道, 在添加白介素6(IL6)与其受体混合(IL6R-IL6)以及添加碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的培养基中悬浮培养未分化的人ESC和人iPSCs, 结果4种人ESC系和2种人iPSCs悬浮培养20代后仍保留了全部的干性特性, 包括稳定的表型和多能性。后来, 相继有报道表明, 动态悬浮培养人多能干细胞, 其扩增率可以提高2.5~3倍, 有的甚至高达6倍<sup>[22]</sup>。

此外, 生物反应器培养体系也可以应用于ESC的分化培养, 增强干细胞诱导分化的能力, 提高干细胞诱导分化的效率。利用生物反应器进行悬浮培养mESC, 诱导分化所获得的拟胚体(EBs)大小更均一, 且EBs的中心坏死区变小, 并能更好地定向分化为心肌细胞<sup>[23]</sup>。2004年, 首次通过旋转式生物反应器(rotating bioreactors)培养hESC形成EBs, 虽然形成的EBs中心区有很多死细胞, 但其增殖效率却增加了70倍, 且形成的EBs具有向三胚层方向分化的潜能<sup>[24]</sup>。后来, Côme等<sup>[25]</sup>改善了这个生物反应器培养系统, 利用灌注系统向细胞源源不断地输送营养物质, 并且实时监测培养环境的各种参数, 保证最佳的培养环境。结果显示, 人ESC向三胚层细胞分化的能力更加高效。另外, 也有研究报道使用旋转锥形瓶(spinner flasks)进行生物反应器的, 该方法培养形成的EBs形态更加均一, 且能更好地向造血细胞分化, 并能在无*c-Myc*的条件下诱导hiPSCs向心肌细胞的方向分化<sup>[26]</sup>。越来越多的研究表明, 利用生物反应器进行的悬浮培养方法, 有望加速对ESC和iPSC形成过程中细胞重编程的研究, 进而促使干细胞的研究和应用更加标准化。

## 2 利用生物反应器培养干细胞需注意的几个关键参数

一般情况下, 动物细胞的培养要求较复杂, 为了获得更好的细胞培养效果, 往往需要对生物反应

器中的各种理化条件进行合理的监控,使其达到最佳的培养环境。

### 2.1 氧含量

氧含量是干细胞培养微环境的重要组成部分,能够影响干细胞自我更新、干性维持及其分化的能力<sup>[27]</sup>。一般情况下,分离得到的间充质干细胞的数量很少,需要在体外进行扩大培养,但是长时间在大气高氧条件下培养会由于氧压力而不利于细胞的生长。为了获得最优的培养条件来满足细胞移植所需的MSCs数量, Dos Santos等<sup>[28]</sup>采用2%低氧水平对hMSC进行培养,并研究了其对MSCs的增殖动力学和新陈代谢的影响。结果表明,相比于常氧条件下,2% O<sub>2</sub>更有助于MSCs的生长和扩增。后来,又有研究报道, mESC来源的神经干细胞也是在2%~5% O<sub>2</sub>下增殖速度较快,且其多能性不受影响<sup>[29]</sup>。

另外,在小鼠中,氧含量对ES细胞分化有很大影响。在低氧水平下培养能自发地诱导ESCs的分化,即使是在LIF存在的情况下也能通过STAT3信号通路的负调控作用来抑制ESCs的自我更新能力<sup>[30]</sup>,低氧有助于小鼠ESCs向心肌细胞的分化和造血细胞的分化。

而生物反应器一般采用夹套进行温度控制,夹套系统内充满循环水,使用蒸汽混合器和电加热器进行加热,注入冷却水进行降温。反应器温度由温度电极进行检测,夹套的加热和冷却由控制程序自动控制。使用蒸汽混合器能提高反应器温度上升的速度,电加热器加热平稳,有利于反应器温度控制的

灵敏性和稳定性。

### 2.2 水流剪切力

水流剪切力能影响细胞的培养特征,在一定程度上影响干细胞在体外的生长<sup>[31]</sup>。由于水流运动,水流剪切力仅发生在细胞表面,进而引起细胞生理损伤、影响细胞生理功能,特别是对细胞数目和细胞生存力具有较大影响<sup>[32]</sup>。在搅动式生物反应器中,搅动能使能量从搅动叶轮传到培养基中,引起培养基的强烈运动,导致悬浮生物反应器中局部微粒产生剪切作用,包括细胞团块表面、细胞与生物反应器之间、或单个细胞表面,进而导致细胞死亡。对于不同的干细胞类型,剪切力的最佳值是不同的(如0.21 Pa对乳腺上皮干细胞是最优的,0.61 Pa对小鼠ESCs是最优的),因此,要根据不同的细胞类型来确定剪切力<sup>[31]</sup>。虽然剪切力对细胞培养有不利影响,但是它却能刺激细胞分化为特定的细胞类型,如分化为上皮细胞<sup>[33]</sup>或成骨细胞<sup>[34]</sup>。

### 2.3 与生长有关的因子

生长因子和细胞因子对干细胞的生长有重要的调控作用,生长因子能够提供干细胞自我更新、增殖、分化的信号。LIF能有效地促进和维持小鼠ES细胞的生长, mESC能在无饲养层和添加LIF的培养基中持续扩增<sup>[35]</sup>。而LIF却不能维持人ES细胞的未分化状态<sup>[36]</sup>。但在添加白介素6及其受体混合物(IL6R-IL6)以及添加bFGF的培养基中悬浮培养未分化的hESC和iPSC, IL6R-IL6却有助于悬浮培养中未分化hESC和iPSC的自我更新和扩增<sup>[21]</sup>。

表2 在生物反应器中影响干细胞增殖和分化的关键技术参数(根据参考文献[5]修改)

Table 2 Critical process parameters influencing stem cell expansion and/or differentiation in bioreactors(modified from reference [5])

变量类别 Variable category	关键参数 Examples of critical parameters
Physicochemical	Dissolved oxygen tension is also an important parameter for stem cell cultivation. Hypoxia, or physiologic oxygen tensions, appears to influence many cellular processes such as stem cell maintenance and differentiation, and therefore the levels of dissolved oxygen in liquid medium should be precisely monitored and controlled
	Hydrodynamic shear stress can occur at the cell boundary due to fluid movement, thus causing cell physiology damage and affect cell functions. In stirred bioreactors, hydrodynamic shear stress is due to mechanical agitation of the liquid and to sparging with air bubbles. Stem cells are especially sensitive to this culture parameter, and therefore it is crucial to control hydrodynamic shear in bioreactors
Biochemical	Nutrients are important for efficient cell metabolism. Glucose and glutamine are the main sources of energy to the cells, providing carbon and nitrogen for cell functions, metabolism and biosynthesis
	Metabolic waste products, especially lactate and ammonia, may inhibit cell growth and should be tightly controlled Growth factors and cytokines are signaling proteins that modulate a wide range of cell functions, including self-renewal, differentiation or survival. For example, LIF and BMP4 can be used in combination to sustain mouse embryonic stem cells in culture, while a cocktail of growth factors composed of SCF, Flt-3 L and TPO can be used for the <i>ex vivo</i> expansion of HSCs

另外, ROCK激酶抑制剂或拮抗剂对细胞的存活有刺激作用<sup>[37]</sup>。有研究表明, ROCK激酶抑制剂Y27632能够促进体外培养的兔来源的胚胎干细胞生长<sup>[38]</sup>, 并能促进人胚胎干细胞向心肌细胞的分化<sup>[39]</sup>和人脐带来源的造血细胞的衍生和存活<sup>[40]</sup>。

## 2.4 营养和代谢

营养和代谢也能影响细胞增殖、分化和死亡。Fernandes等<sup>[41]</sup>研究检测了无血清培养条件下, mESC扩增过程中主要基质(如葡萄糖、谷氨酸盐)的消耗及新陈代谢副产品(如乳酸盐)的产量, 结果显示, 在无血清条件下mESCs具有高水平的新陈代谢, 并揭示谷氨酸盐是细胞增殖中一种重要的能量来源。另外, 在hESCs培养过程中, 高水平的新陈代谢也会产生大量废物特别是乳酸盐, 进而引起培养液的pH降低, 导致增殖后期细胞生长过慢, 多能性标记表达降低等问题<sup>[42]</sup>。

以上表明, 培养过程中各个因素的变化都会导致培养微环境的变化, 进而对细胞的体外培养产生直接影响。虽然, 目前各个因素对细胞影响的具体作用机制仍不清楚, 但是任何一个因素都不是单独作用的, 往往是与其他因素相互作用, 共同影响培养基的微环境变化。因此, 在设计生物反应器培养系统时, 要合理地考虑各种因素, 以获得最优化的培养条件。

在生物反应器中影响干细胞增殖和分化的关键技术参数见表2。

## 3 结语

目前, 生物反应器已成为大规模培养扩增干细胞的一种高效、稳定的培养系统, 为许多重大疾病(如帕金森病、心血管病、糖尿病等)的细胞治疗提供了细胞来源, 为组织工程和再生医学的发展提供了一个重要的技术支撑, 使干细胞及其产品的生产和研究更加标准化, 质量更可靠, 成为向临床诊断和产业应用成功转变的一种潜在生物技术。

在生物反应器中, 干细胞培养过程中的生物化学环境如营养、氧气、pH、渗透压等的变化, 能够进行实时监测和控制, 这为干细胞的培养提供了更加优化的条件; 为更好地研究细胞周期调控及发育生物学提供了一定的基础。

此外, 在药物筛选和体外毒理学研究中, 多能性干细胞提供了一种在体外有再生能力的细胞模

型, 替代了之前需要高花费、高劳动量的体内动物模型。如干细胞经体外定向诱导分化形成的肝细胞和心肌细胞可以用来筛选新的治疗肝中毒和心脏中毒的化学药物, 从而在药物发展和生殖毒理学上展现出诱人的前景。

但是, 干细胞生物反应器要在临床上得到广泛应用, 仍面临着许多问题, 如: 干细胞培养过程中培养基化学成分的确切, 干细胞与宿主之间的免疫性等。总之, 干细胞生物反应器培养体系的快速发展势必有助于未来干细胞及其来源细胞产品向临床应用和毒理学研究的发展, 为组织工程学、再生医学、药物筛选以及体外毒理学上的发展提供了更广阔的前景。

## 参考文献 (References)

- 1 Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res* 2003; 58(2): 324-35.
- 2 Parson AB. Stem cell biotech: Seeking a piece of the action. *Cell* 2008; 132(4): 511-3.
- 3 Jing D, Parikh A, Canty JM Jr, Tzanakakis ES. Stem cells for heart cell therapies. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(4): 393-406.
- 4 Lock LT, Tzanakakis ES. Stem/progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1399-412.
- 5 Rodrigues CA, Fernandes TG, Diogo MM, da Silva CL, Cabral J. Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnology Adv* 2011; 29(6): 815-29.
- 6 Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG, Schofield R, Lord BI. Stimulation of differentiation and proliferation of haemopoietic cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 1973; 82(3): 461-73.
- 7 Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(8): 4756-9.
- 8 Collins PC, Miller WM, Papoutsakis ET. Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications. *Biotechnol Bioeng* 1998; 59(5): 534-43.
- 9 Koller M, Emerson S, Palsson B. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood* 1993; 82(2): 378-84.
- 10 Liu Y, Liu T, Fan X, Ma X, Cui Z. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. *J Biotechnol* 2006; 124(3): 592-601.
- 11 Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol* 2003; 31(8): 723-32.
- 12 Frauenschuh S, Reichmann E, Ibold Y, Goetz PM, Sittlinger M, Ringe J. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. *Biotechnol Prog* 2008; 23(1): 187-93.

- 13 Yang Y, Rossi F, Putnins EE. *Ex vivo* expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials* 2007; 28(20): 3110-20.
- 14 Schop D, Janssen F, Borgart E, de Bruijn J, van Dijkhuizen-Radersma R. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: Growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2(2/3): 126-35.
- 15 Yu Y, Li K, Bao C, Liu T, Jin Y, Ren H, *et al.* *Ex vitro* expansion of human placenta-derived mesenchymal stem cells in stirred bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 2009; 159(1): 110-8.
- 16 Yeatts AB, Fisher JP. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2010; 17(3): 337-48.
- 17 Kehoe DE, Lock LT, Parikh A, Tzanakakis ES. Propagation of embryonic stem cells in stirred suspension without serum. *Biotechnol Prog* 2008; 24(6): 1342-52.
- 18 Shafa M, Day B, Yamashita A, Meng G, Liu S, Krawetz R, *et al.* Derivation of iPSCs in stirred suspension bioreactors. *Nat Methods* 2012; 9(5): 465-6.
- 19 Fluri DA, Tonge PD, Song H, Baptista RP, Shakiba N, Shukla S, *et al.* Derivation, expansion and differentiation of induced pluripotent stem cells in continuous suspension cultures. *Nat Methods* 2012; 9(5): 509-16.
- 20 Kehoe DE, Jing D, Lock LT, Tzanakakis ES. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. *Tissue Eng* 2009; 16(2): 405-21.
- 21 Amit M, Chebath J, Margulets V, Laevsky I, Miropolsky Y, Shariki K, *et al.* Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 2010; 6(2): 248-59.
- 22 Zweigerdt R, Olmer R, Singh H, Haverich A, Martin U. Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. *Nat Protocols* 2011; 6(5): 689-700.
- 23 He W, Ye L, Li S, Liu H, Wang Q, Fu X, *et al.* Stirred suspension culture improves embryoid body formation and cardiogenic differentiation of genetically modified embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(3): 308-16.
- 24 Gerecht-Nir S, Cohen S, Itskovitz-Eldor J. Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng* 2004; 86(5): 493-502.
- 25 Côme J, Nissan X, Aubry L, Tournois J, Girard M, Perrier AL, *et al.* Improvement of culture conditions of human embryoid bodies using a controlled perfused and dialyzed bioreactor system. *Tissue Eng* 2008; 14(4): 289-98.
- 26 Zwi-Dantsis L, Mizrahi I, Arbel G, Gepstein A, Gepstein L. Scalable production of cardiomyocytes derived from c-Myc free induced pluripotent stem cells. *Tissue Eng* 2010; 17(7/8): 1027-37.
- 27 Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2010; 7(2): 150.
- 28 Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral J. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cellular Physiol* 2010; 223(1): 27-35.
- 29 Rodrigues CA, Diogo MM, da Silva CL, Cabral J. Hypoxia enhances proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. *Biotechnol Bioeng* 2010; 106(2): 260-70.
- 30 Jeong CH, Lee HJ, Cha JH, Kim JH, Kim KR, Yoon DK, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells *in vitro* via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem* 2007; 282(18): 13672-9.
- 31 King JA, Miller WM. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr Opin Chem Biol* 2007; 11(4): 394-8.
- 32 Kallos MS, Behie LA. Inoculation and growth conditions for high-cell-density expansion of mammalian neural stem cells in suspension bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 1999; 63(4): 473-83.
- 33 Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, *et al.* Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* 2003; 95(5): 2081-8.
- 34 Yourek G, McCormick SM, Mao JJ, Reilly GC. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regenerat Med* 2010; 5(5): 713-24.
- 35 Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Dev* 1998; 12(13): 2048-60.
- 36 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2003; 10(1): 55-63.
- 37 Ongusaha PP, Kim HG, Boswell SA, Ridley AJ, Der CJ, Dotto GP, *et al.* RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Curr Biol* 2006; 16(24): 2466-72.
- 38 Honda A, Hirose M, Ogura A. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2009; 315(12): 2033-42.
- 39 Braam SR, Nauw R, Ward-van Oostwaard D, Mummery C, Passier R. Inhibition of ROCK improves survival of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes after dissociation. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1188(1): 52-7.
- 40 Bueno C, Montes R, Menendez P. The ROCK inhibitor Y-27632 negatively affects the expansion/survival of both fresh and cryopreserved cord blood-derived CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cell Rev Rep* 2010; 6(2): 215-23.
- 41 Fernandes TG, Fernandes-Platzgummer AM, da Silva CL, Diogo MM, Cabral JM. Kinetic and metabolic analysis of mouse embryonic stem cell expansion under serum-free conditions. *Biotechnol Lett* 2010; 32(1): 171-9.
- 42 Chen X, Chen A, Woo TL, Choo AB, Reuveny S, Oh SK. Investigations into the metabolism of two-dimensional colony and suspended microcarrier cultures of human embryonic stem cells in serum-free media. *Stem Cells Dev* 2010; 19(11): 1781-92.