

载细胞水凝胶体系中微通道结构对 营养物输送能力的影响

黄国友¹, 徐峰^{1,2}, 周丽宏¹, 周进雄¹, 陈咏梅^{1,3}, 卢天健¹

(1. 西安交通大学生物医学工程与生物力学中心, 710049, 西安; 2. 哈佛大学医学院, 02115, 美国波士顿;
3. 西安交通大学非平衡物质结构及量子调控教育部重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 为了优化载细胞水凝胶中微通道的结构设计, 通过数值模拟, 系统地研究了孔隙率、微通道数目及排布方式等参数对营养物输送能力的影响. 研究表明: 在给定微通道数目下, 微通道尺寸和间距均存在最优值, 与此相对应的营养物输送能力最佳; 当孔隙率或微通道数目较大时, 微通道排布方式对营养物的输送能力无明显影响. 通过参数优化, 可以更好地提高微通道的营养物输送能力, 尤其是保证远离微通道表面的细胞得到充足的营养物供应, 为组织工程化组织中微通道结构的优化设计提供指导.

关键词: 载细胞水凝胶; 微通道; 营养物输送; 消耗速率

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2011)04-0115-06

Influence of Microfluidic Channels on Delivery of Nutrient in Cell-Laden Hydrogels

HUANG Guoyou¹, XU Feng^{1,2}, ZHOU Lihong¹, ZHOU Jinxiong¹, CHEN Yongmei^{1,3}, LU Tianjian¹

(1. Biomedical Engineering and Biomechanics Center, School of Aerospace, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;
2. Harvard Medical School, Boston 02115, USA; 3. MOE Key Laboratory for Non-Equilibrium Condensed Matter and
Quantum Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: To optimize the structural parameters of microfluidic cell-laden hydrogels embedded with microchannels, a mathematical model is developed to systematically investigate the influence of microchannel size, inter-channel separation, number of channels and their distribution on nutrient transport in cell-laden hydrogels. The simulation results show that there exist the optimal microchannel size and inter-channel separation for enhanced nutrient utilization. While the porosity is fixed, the capability of nutrient transport is improved with the increasing channel number. The distribution of channels exerts slight effect on the nutrient delivery as the number of channels gets beyond 6. In addition, the nutrient transport can be enhanced by adjusting the diffusion properties of hydrogels. The present results provide useful guidance for the experimental design of microfluidic tissue constructs.

Keywords: cell-laden hydrogel; microfluidic channel; nutrient delivery; consumption rate

随着人类寿命的增长, 临床中对供体器官的需求也在不断增长. 目前, 供体器官的严重不足使得许

收稿日期: 2010-10-13. 作者简介: 黄国友(1984—), 男, 博士生; 卢天健(联系人), 男, 教授, 博士生导师. 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10825210, 10872157); 国家“111 引智计划”资助项目(B06024); 陕西省自然科学基金资助项目(2010JQ1010); 西安交通大学校基金资助项目(08143004).

网络出版时间: 2011-01-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1069.T.20110117.1046.011.html>

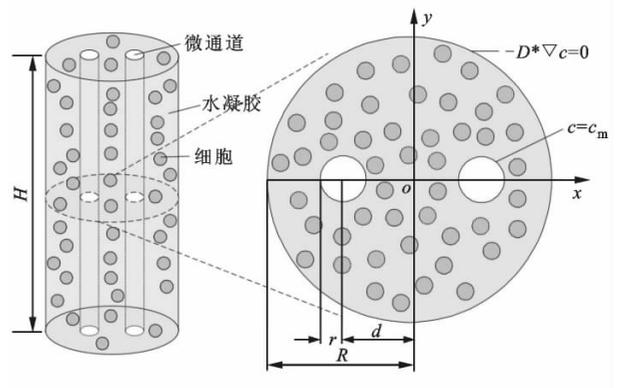
多病人因为不能获得可替代的器官而死亡. 器官缺乏已经成为生物医学领域亟待解决的突出问题^[1], 而组织工程概念的提出和组织工程技术的发展为这一问题提供了一种最有潜力的解决方案^[2].

利用组织工程技术, 国内外研究者已构建了皮肤^[3]、软骨^[4]和动脉管^[5]等较为简单的组织工程化组织, 但是在构建具有高细胞浓度、细胞代谢活动旺盛的组织(如心脏、肝脏等)时, 从表面扩散到组织内的营养物质会很快被细胞耗尽, 很难保证内部的细胞获得充足的营养物质以及排出代谢产物^[6]. 营养物的缺乏和代谢产物的积累均会影响细胞的正常代谢活动以及组织工程化组织的生理功能, 如何加强营养物质供应已成为组织工程中亟待解决的问题之一.

近年来, 随着微制造技术的发展, 激光直写^[7]、软光刻^[8]和生物打印^[9]等技术已用于构造带有微通道的水凝胶人工支架或载细胞的水凝胶组织. Song等^[10]初步研究了单、双通道结构对载有成纤维细胞的琼脂糖水凝胶中营养物质浓度分布及细胞活性的影响, Bian等^[11]研究了单通道和三通道对载有软骨细胞的琼脂糖水凝胶中细胞的生理活动及组织工程化组织力学性能的影响, 发现在载细胞的水凝胶中引入微通道可以提高营养物的输送能力. 目前, 国内外未见关于微通道结构对载细胞水凝胶体系中营养物质输送能力影响的系统性研究. 通过数值模拟, 本文系统地研究了微通道尺寸、微通道排布方式以及微通道数目等对营养物质输送能力的影响, 研究结果可以为载细胞水凝胶体系中微通道的结构优化设计提供指导.

1 计算模型

考虑目前在组织工程研究中较多采用的一种典型组织工程化组织结构, 即带有微通道的圆柱状载细胞水凝胶结构, 如图1a所示. 采用归一化参数贝克莱数(Pe)代表微通道中流体对流与扩散的相对比例, 定义为 $Pe = 2vr/D_0$, 其中 v 为微通道中流体的流速, D_0 为营养物质在流体中的扩散系数, r 为微通道的半径. 当流体流速较快且 $Pe \gg H/(2r)$ 时(H 为微通道的高度), 营养物质浓度可近似为沿微通道轴向不变, 故可采用图1b所示的二维模型对营养物质在水凝胶中的扩散过程进行分析^[12]. 由于水凝胶的透水性比较差, 可认为微通道中流体的对流运动不影响营养物质在水凝胶中的扩散输运过程^[13]. 此外, 在细胞培养的早期(<24 h), 假设细胞在水凝胶中的分布均匀且细胞浓度不变^[14].



(a) 三维结构示意图 (b) 横截面图

图1 双通道(对称分布)圆柱状载细胞水凝胶结构示意图

在任意时刻 t , 营养物质在水凝胶中(不包含细胞)的浓度 c_0 (mmol/L) 满足如下的质量守恒方程

$$\frac{\partial c_0}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{j} = s \quad (1)$$

式中: \mathbf{j} 为扩散通量, $\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; s 为外源项, $\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{s})$. 由 Fick 扩散定律知, 扩散通量 $\mathbf{j} = -D\nabla c_0$, 其中 D 为扩散系数, 则从式(1)可得

$$\partial c_0 / \partial t = D \nabla^2 c_0 + s \quad (2)$$

针对载有细胞的水凝胶复合体系, 不考虑细胞对营养物的吸收时, 对扩散过程而言, 细胞相当于多孔介质中的固相介质障碍物(营养物质不能通过细胞膜), 营养物质在水凝胶中的扩散与物质在多孔介质中的扩散机理相同, 故可采用多孔介质理论对营养物质在水凝胶中的扩散过程进行描述^[15]. 定义变量 ψ (如浓度、扩散通量和源项等) 在代表性体积单元 (REV) 中的平均值为

$$\langle \psi \rangle = \frac{1}{V} \int_{V_0} \psi dV \quad (3)$$

式中: V 为 REV 的体积, 包含细胞和水凝胶两部分, m^3 ; V_0 为 REV 中水凝胶所占的体积, m^3 .

应用平均化理论^[16], 不考虑细胞对营养物的吸收(即在细胞膜表面满足 $\mathbf{j} \cdot \mathbf{n} = 0$, \mathbf{n} 为细胞膜的法向矢量), 可得

$$\frac{\partial \langle c_0 \rangle}{\partial t} + \nabla \cdot \langle \mathbf{j} \rangle = \langle s \rangle \quad (4)$$

由式(4)可导出载细胞水凝胶中的营养物质扩散方程

$$\alpha \frac{\partial c}{\partial t} = D^* \nabla^2 c + s \quad (5)$$

式中: c 为平均单元体积 V 下的营养物质浓度; $\alpha = V_0/V$ 代表细胞外水凝胶所占的体积分数; $D^* = \alpha D / \lambda^2$ 为有效扩散系数, 归一化参数 λ 代表细胞对营养物质

扩散造成的阻碍,其取值一般大于 1.

考虑细胞对营养物的吸收时,式(5)应修正为^[17]

$$\alpha \frac{\partial c}{\partial t} = D^* \nabla^2 c + s - \frac{V_{\max} c}{K_m + c} \rho \quad (6)$$

式中: V_{\max} 为单个细胞对营养物的最大吸收速率; ρ 为水凝胶中的细胞密度, m^{-3} ; K_m 为 Michaelis-Menten 常数(即 $V_{\max}/2$ 处所对应的营养物浓度), mmol/L ^[18]. 式(6)在脑组织^[13]和基于水凝胶的组织工程化组织^[10]的研究中已得到了应用和验证.

如图 1b 所示,模型采用的边界条件:外边界(水凝胶外表面)条件为 $-D^* \nabla c = 0$;内边界(载细胞水凝胶与微通道的界面)条件为 $c = c_m$,其中 c_m 代表微通道中营养物的浓度,为一定值.

构造微通道的目的是为了给载细胞水凝胶中的细胞输送营养物质,因此描述组织工程化组织中营养物的输送能力时应该考虑营养物对细胞的存活和基因表达的影响. Song 等^[10]已定性地验证了营养物浓度分布与细胞存活率的关系,而目前缺乏一个确切的关系对此进行刻画.为简单起见,本文直接采用细胞摄入的营养物的多少进行描述^[19]. 营养物浓度与空间位置有关,若载细胞水凝胶中水凝胶的体积为 V_H ,体系中全部细胞消耗营养物的速率为 Q (mol/s) (以下简称消耗速率,其大小可用来衡量营养物的输送能力),则有

$$Q = \int_{V_H} \frac{V_{\max} c}{K_m + c} \rho dV \quad (7)$$

系统的归一化过程如下: $c^* = c/c_m, \rho^* = \rho/\rho_0, D' = D^*/(c_m^{-1} V_{\max} \rho_0 R^2), s^* = s/(V_{\max} \rho_0), K_m^* = K_m/c_m, x^* = x/R, y^* = y/R, r^* = r/R, d^* = d/R, t^* = t/(c_m V_{\max}^{-1} \rho_0^{-1}), Q^* = Q/(V_{\max} \rho_0 R^3)$. 其中, ρ_0 (m^{-3})代表初始细胞密度, R 和 d 分别为载细胞水凝胶的半径和微通道中心与载细胞水凝胶中心的距离(图 1b). 归一化后式(6)和式(7)分别为

$$\alpha \frac{\partial c^*}{\partial t^*} = D' \nabla_*^2 c^* + s^* - \frac{c^*}{K_m^* + c^*} \rho^* \quad (8)$$

$$Q^* = \int_{V_H^*} \frac{c^*}{K_m^* + c^*} \rho^* dV^* \quad (9)$$

假设水凝胶中营养物初始浓度为 0,其他计算参数列入表 1. 数值求解过程在多物理场耦合软件 COMSOL Multiphysics 3. 5a 中进行.

表 1 模型所采用的计算参数

参数	参数值	归一化值	参考文献
$c_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	22	1	[18, 20]
ρ_0/cm^{-3}	40×10^6		[18, 20]
$D^*/\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$9.2 \times 10^{-6} \times 0.85$	0.423 5	[18, 20]
$V_{\max}/\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$	6.5×10^{-14}		[18, 20]
$K_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.35	0.015 9	[18, 20]
α	0.96	0.96	[18, 20]
$s/\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$	0	0	[18, 20]
R/mm	7.5		[10]

2 结果与分析

2.1 单通道分析

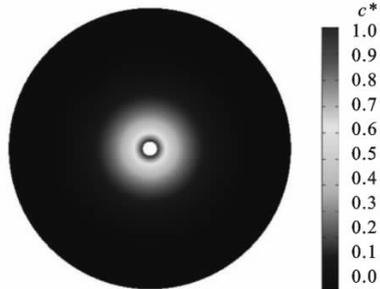
目前的研究主要集中于单通道对载细胞水凝胶中营养物分布和细胞活性的影响^[8, 12],首先针对营养物在具有单通道(微通道位于体系中心)结构的载细胞水凝胶中的扩散和分布进行了计算和分析,结果如图 2 所示,其中图 2a 给出了营养物浓度的分布图,图 2b 为径向方向营养物浓度的分布随时间的演化.

从图 2b 可知,营养物浓度从微通道表面向外逐渐减少,同时随着时间增加,水凝胶中营养物的浓度也增加并很快达到一个稳定的分布状态. 营养物浓度的分布对消耗速率 Q^* 产生影响,当营养物浓度增加并达到稳定状态时, Q^* 也增加并趋于稳态值,如图 2c 所示. 图 2c 表明 Q^* 的稳态值随着 r/R 的增加而呈现先增加后减少的趋势,图 2d 则更清楚地表明了该结果. 随着 r/R 的增加,微通道与载细胞水凝胶的接触面积增大,从而提高了稳态时水凝胶中的营养物浓度,但载细胞水凝胶的体积 V_H 减少,组织工程化组织中的平均细胞浓度相应减少. 为了使组织工程化组织中具有较高的平均细胞浓度,在保证营养物供应的同时,体系中微通道所占的体积应尽可能小.

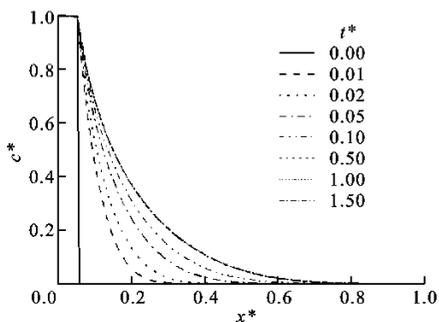
上述计算结果表明,增加单通道的尺寸可以提高营养物的输送能力,这与 Song 等^[10]得到的研究结论是一致的. 本文的计算结果同时还表明,微通道尺寸并非越大越好,而是存在一个最优值.

2.2 多通道分析

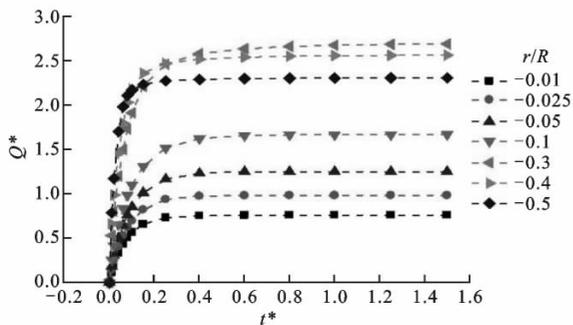
当体系仅有一个微通道时,营养物在沿微通道表面向外扩散的过程中会逐渐被细胞消耗掉(如图



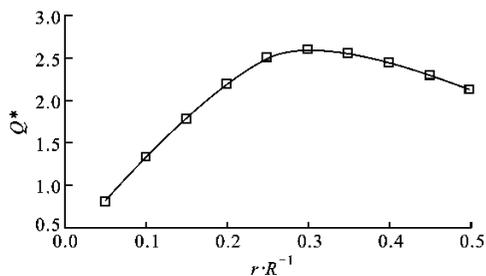
(a) 营养物质浓度分布图 ($r/R=0.05, t^*=1.5$)



(b) 径向营养物质浓度随时间的变化



(c) 不同 r/R 下消耗速率 Q^* 随时间 t^* 的变化



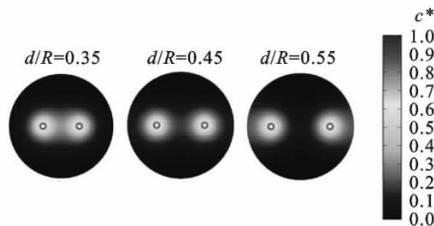
(d) 稳定时消耗速率 Q^* 随 r/R 的变化

图2 单通道载细胞水凝胶

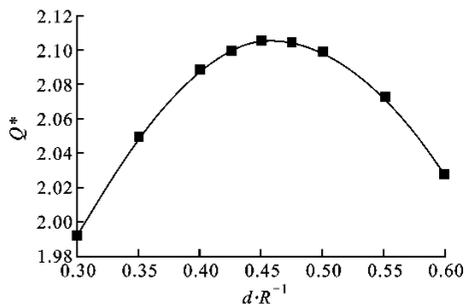
2b所示),使得远离微通道表面的细胞得不到充足的营养物质供应,这在结构尺寸较大时尤为明显.文献[10-11]的研究结果表明,引入双通道和三通道比单通道具有更好的营养物质输送能力,但如何设计多通

道又面临新的问题,除了孔隙率(带有微通道的载细胞水凝胶中微通道所占的体积分数),微通道之间的间距和排布方式都可能会影响营养物的浓度分布.

首先计算了双通道(通道与中心成对称分布)体系中微通道间距对营养物质输送能力的影响,图3a给出了归一化后的营养物质浓度分布图(孔隙率为0.0025,微通道间距 d/R 固定, $t^*=1.5$),图3b给出了消耗速率 Q^* 对 d/R 的依赖关系.由图3b可知,孔隙率不变时,消耗速率随微通道间距的增加呈现先增加后减少的趋势(存在最佳微通道间距使得消耗速率最大),故可通过优化双通道之间的间距,来提高微通道的营养物质输送能力.对于微通道数目大于2的情形,本文的计算结果也得出了类似的结论.对双通道和多通道体系,以下给出的消耗速率值均为优化 d/R 后得到的最大值.



(a) 营养物质浓度分布图

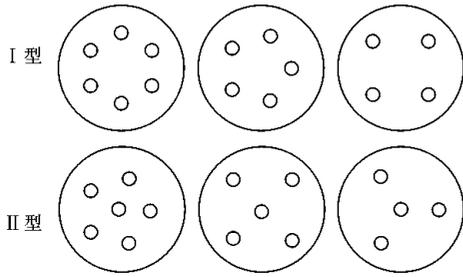


(b) 消耗速率 Q^* 随 d/R 的变化

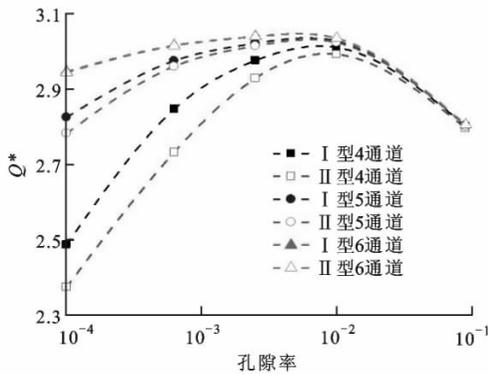
图3 双通道载细胞水凝胶

当微通道数目较多(如4、5、6)时,微通道的排布方式也是影响营养物质浓度分布的一个因素.本文先以两种典型的排布方式(图4a)为例,研究排布方式对营养物质输送能力的影响,计算结果如图4b所示.总体来说,I型排布优于II型排布.在相同微通道数目下,孔隙率越大,排布方式对消耗速率 Q^* 的影响越小,同一孔隙率下,微通道数目越大,排布方式的影响越小.后续计算均采用I型排布方式.

图5显示了不同孔隙率下消耗速率随微通道(I型排布)数目的变化.从图中可知,消耗速率随微



(a)两种典型的微通道排布方式



(b)排布方式对消耗速率的影响 ($t^* = 1.5$)

图 4 微通道排布方式及其对消耗速率的影响

通道数目的增加而增加,并逐渐趋于一个稳定值,且在孔隙率较小时,微通道数目的影响尤为明显.该结果表明,当孔隙率较小时,增加微通道数目既可保证较高的平均细胞密度,又可保证营养物的输送,是提高营养物输送能力的有效方式.需要注意的是,在给定孔隙率的条件下,微通道数目的增加伴随着微通道尺寸的减小.因此,考虑到工艺水平和水凝胶力学性能的影响,构建载细胞水凝胶中的微通道结构时,微通道的尺寸不能选得太小^[11].

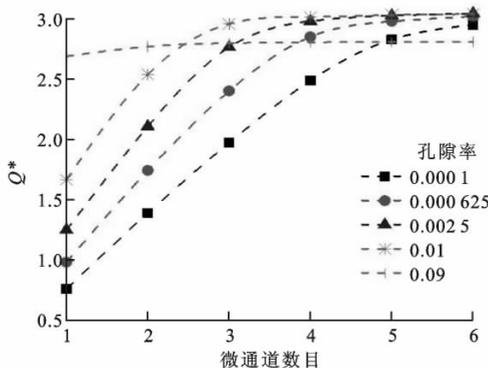
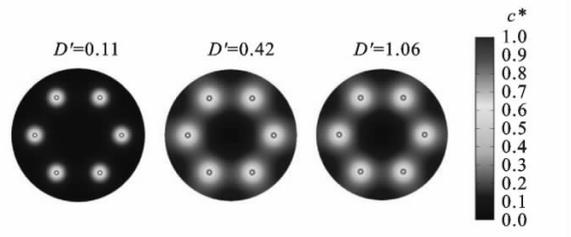


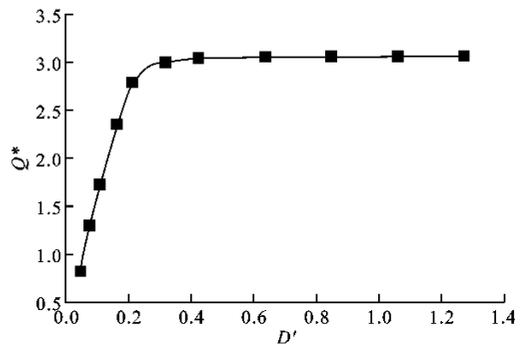
图 5 不同孔隙率下微通道数目对消耗速率的影响

水凝胶种类、聚合物浓度以及交联密度均对营养物在水凝胶中的扩散系数产生影响^[21],故可通过

材料设计调控扩散系数,以改变微通道的营养物输送能力.采用营养物在水凝胶中的扩散系数的测量结果^[22-23],可计算出归一化扩散系数 D' 的数量级位于 $10^{-2} \sim 1$ 之间.本文进而以带有 6 根微通道的载细胞水凝胶为例,模拟计算了 D' 在 $0.042 \sim 1.27$ 之间变化时,消耗速率与 D' 的变化关系.当孔隙率固定为 0.0025 时,图 6a 给出了归一化的营养物浓度分布图,图 6b 给出了消耗速率与 D' 的变化关系图,可见随着 D' 的增加,消耗速率相应增加并很快趋于一个稳定值.



(a)营养物浓度分布图(孔隙率为 0.0025 , $t^* = 1.5$)



(b)消耗速率随扩散系数的变化(其中孔隙率为 0.0025 , d/R 为 0.65 , $t^* = 1.5$)

图 6 6 通道载细胞水凝胶中消耗速率随扩散系数的变化

因此,通过降低水凝胶中的聚合物浓度和交联密度等,可在一定范围内提高扩散系数,从而显著提高营养物的输送能力.但是,必须指出的是,水凝胶的力学性能随聚合物浓度和交联密度的降低而减弱,不利于组织工程化组织结构的稳定性,故在材料设计中也需要考虑这方面的因素^[21].

3 结论

本文的数值模拟结果表明,微通道尺寸、微通道间距和数目、材料性质等均对载细胞水凝胶中营养物的输送能力产生影响.在给定微通道数目下,微通道尺寸和间距均存在最优值,与此相对应的营养物输送能力最佳.当孔隙率或微通道数目较大时,微通道排布方式对营养物的输送能力无明显影响,在一

定范围内增加微通道数目和改变材料性质是提高营养物质输送能力的有效途径. 本文结果对载细胞水凝胶体系中微通道结构的优化设计具有指导意义. 文中的模型具有一定的局限性, 例如没有考虑微通道中流体的流速、水凝胶降解、细胞生长和迁移等对营养物质运输过程和组织结构稳定性的影响, 后续工作将重点针对上述问题展开研究.

参考文献:

- [1] WOLFE R A, ROYS E C, MERION R M. Trends in organ donation and transplantation in the united states, 1999-2008 [J]. *Am J Transplant*, 2010, 10 (4p2): 961-972.
- [2] LANGER R, VACANTI J P. Tissue engineering [J]. *Science*, 1993, 260(5110): 920-926.
- [3] KIRSNER R S, FALANGA V, EAGLSTEIN W H. The development of bioengineered skin [J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(6): 246-249.
- [4] 胡小红. 软骨修复用水凝胶的制备和性能研究 [D]. 杭州: 浙江大学高分子科学与工程学系, 2009.
- [5] SHIN'OKA T, IMAI Y, IKADA Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(7): 532-533.
- [6] PAPPENBURG B J, LIU J, HIGUERA G A, et al. Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(31): 6228-6239.
- [7] WU W, HANSEN C, ARAGON A, et al. Direct-write assembly of biomimetic microvascular networks for efficient fluid transport [J]. *Soft Matter*, 2010, 6 (4): 739-742.
- [8] LING Y, RUBIN J, DENG Y, et al. A cell-laden microfluidic hydrogel [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(6): 756-762.
- [9] LEE W, LEE V, POLIO S, et al. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(6): 1178-1186.
- [10] SONG Y S, LIN R L, MONTESANO G, et al. Engineered 3D tissue models for cell-laden microfluidic channels [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(1): 185-193.
- [11] BIAN L, ANGIONE S L, NG K W, et al. Influence of decreasing nutrient path length on the development of engineered cartilage [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(5): 677-685.
- [12] CUCHIARA M P, ALLEN A C, CHEN T M, et al. Multilayer microfluidic PEGDA hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(21): 5491-5497.
- [13] RADISIC M, DEEN W, LANGER R, et al. Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array perfused with culture medium containing oxygen carriers [J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2005, 288(3): H1278-H1289.
- [14] ZHOU S, CUI Z, URBAN J P G. Nutrient gradients in engineered cartilage: metabolic kinetics measurement and mass transfer modeling [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(2): 408-421.
- [15] NICHOLSON C. Diffusion and related transport mechanisms in brain tissue [J]. *Rep Prog Phys*, 2001, 64(7): 815-884.
- [16] GRAY W, LEE P. On the theorems for local volume averaging of multiphase systems [J]. *Int J Multiphase Flow*, 1977, 3: 333-340.
- [17] NICHOLSON C. Interaction between diffusion and Michaelis-Menten uptake of dopamine after iontophoresis in striatum [J]. *Biophys J*, 1995, 68(5): 1699-1715.
- [18] SENGERS B G, VAN DONKELAAR C C, OOMENS C W J, et al. Computational study of culture conditions and nutrient supply in cartilage tissue engineering [J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(4): 1252-1261.
- [19] PATHI P, MA T, LOCKE B R. Role of nutrient supply on cell growth in bioreactor design for tissue engineering of hematopoietic cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(7): 743-758.
- [20] SENGERS B G, HEYWOOD H K, LEE D A, et al. Nutrient utilization by bovine articular chondrocytes: a combined experimental and theoretical approach [J]. *J Biomech Eng-T Asme*, 2005, 127(5): 758-766.
- [21] 翁丽惠, 徐坚, 梁松苗, 等. 水凝胶中物质扩散过程研究进展 [J]. *高分子通报*, 2005(5): 100-107.
WENG Lihui, XU Jian, LIANG Songmiao, et al. Progress in the research of the molecular diffusion in hydrogels [J]. *Polymer Bulletin*, 2005(5): 100-107.
- [22] LI R H, ALTREUTER D H, GENTILE F T. Transport characterization of hydrogel matrices for cell encapsulation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 50(4): 365-373.
- [23] GEANKOPLIS C. Transport processes: momentum, heat, and mass [M]. Newton, MA, USA: Allyn and Bacon, 1983: 495-506.

(编辑 杜秀杰)