

肝组织工程支架的仿生设计与有限元分析

赵倩, 刘亚雄, 高琨, 贺健康, 连芩, 李涤尘, 靳忠民

(西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 为了解决细胞在细胞支架复合培养中难以植入的问题,提出了一种卷裹型支架.将平面多孔支架采用卷裹的方式成型,使细胞在整个支架内部形成螺旋状三维分布,支架表面的管道结构可使培养液在支架内部渗透,从而提高物质交换效率.提出了一种具有仿生参数的流道设计方案,从肝脏血管铸型中提取血管的形状数据,作为仿生学依据进行流道设计,具体为树状多层分支结构.用此流道结构仿生了动脉、静脉的血液循环功能,并利用多孔材料仿生了毛细血管的渗透功能.建立了不同形状参数的流场分析模型,进行流体与多孔材料的渗流分析.结果表明,仿生设计方案的流场分布最为均匀,且平均流速较高,间接表明营养物质的输送效率最高.该支架能够使细胞呈三维分布,并扩大培养液在支架内的有效分布范围,更好地维持细胞的存活、增殖和迁移,为向组织化方向发展奠定了一定的基础.

关键词: 仿生设计;有限元分析;肝组织工程;细胞培养支架

中图分类号: Q811.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2011)08-0108-05

Bionics Design and Finite-Element Analysis for Liver Tissue Engineering Scaffold

ZHAO Qian, LIU Yaxiong, GAO Kun, HE Jiankang, LIAN Qin, LI Dichen, JIN Zhongmin

(State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: For three-dimensional cell spreading, a tube type scaffolds constructed by porous rolling plane is designed, and cells seeded on the surface are bent as a spiral. The channels in the scaffold promote culture medium permeating and material interchange. A bionic structure designed for this kind of scaffold is beneficial to measure the shape of liver vessels from liver vascular casting and extract the bionics parameters by statistic analysis, which has different hierarchies as a tree to imitate the functions of artery and vein. The micro-pores of the scaffold material also imitated capillary. With the changed parameters, finite-element models are established to compare the flow field distribution of different channel shapes on scaffolds. The results verify the most uniform flow field and the highest nutrition transfer efficiency, which enlarges the effective area of medium spread in scaffold, and provides better micro-environment for cells survival, multiplication and migrate.

Keywords: bionics design; finite-element analysis; liver tissue engineering; scaffold

肝移植手术是目前治疗肝病重症患者的重要手段,但却一直受供体匮乏的制约^[1].组织工程的目的就是将细胞人为地培养出具有一定器官功能的组

织,从而替代原组织的功能^[2].细胞培养支架为细胞提供依附生长的载体,它的结构和材料直接决定了细胞的存活和生长情况^[3-4],是组织工程中的关键环

节之一。

目前,国内外均有关于建立类血管网络流道的研究工作^[5-6]。肝脏作为人体内重要的解毒器官,具有丰富且复杂的血液循环系统^[7],较其他软组织器官来说需要更为丰富的血流供应^[8],因此针对肝细胞培养的支架管路设计尤为重要。

目前应用于细胞培养的支架常为多孔结构^[9-11]。经过细胞培养实验,证实了微孔结构能为肝细胞提供更大的三维生长空间,并且利于其团聚生长和功能表达^[12]。支架结构直接影响氧气和营养物质的分布情况^[13]。单一的多孔结构只能通过渗透作用在小尺度范围内保证细胞与流体的物质交换,难以充分渗透进支架内部,这就限制了细胞支架的宏观尺寸^[14-15]。如果支架内部具有供培养液和氧气传输的宏观管路,就能够显著地扩大三维支架的细胞培养范围^[11,16-17],尤其在动态培养环境中,不同形状的管路对细胞的影响更加明显^[16]。

本文提取了肝脏血管的形态学数据,统计出主要的特征尺寸参数,设计了一种树形分支流道结构。该结构以阵列方式分布在矩形平面支架上,再通过卷裹的方式形成流道在支架内部的三维分布。通过改变流道形状参数,建立了一系列有限元分析模型,流体分布结果证实具有仿生特征的结构比无仿生参数的结构能够为细胞提供更有利的培养环境。这种新型支架为细胞培养提供了良好的组织化、功能化载体,为进一步的细胞培养实验打下了基础。

1 材料与设备

实验材料有:成年远交群大鼠 40 只,体重为 250 g 左右,购于军医进修学院动物实验中心;聚丙烯腈-丁二烯-苯乙树脂(ABS 树脂),购于红狮涂料有限公司制漆厂;丙酮,购于北京化学试剂公司;油画颜料。

使用的设备为数码相机(SonyDSC-F717)和光学显微镜(KEYENCE VH-Z450)。

2 流道结构的仿生设计

2.1 自然肝脏血管铸型制备

将 ABS 塑料颗粒 25 g 加入 100 mL 丙酮中,经过 24 h 充分溶解后,加入油画颜料充分搅拌均匀,灌注前 5 min 加入 5 mL 邻苯二甲酸二甲酯^[18]。大鼠经戊巴比妥麻醉(45 g/kg 体重),行剖腹术,充分显露门静脉主干,插管、结扎固定,自门静脉注入肝素 150 U,使全身肝素化。自门静脉注入肝素盐水

(1.5 U/mL),冲洗肝脏血管,同时剪开下腔静脉远端放血,直到经过 1 min 左右肝脏变灰白为止。自下腔静脉远端插管至近肝静脉处,结扎固定。自腹主动脉插管至近肝动脉处,结扎固定。剪开膈肌,结扎下腔静脉肝上端、胸主动脉,防止填充剂进入膈上大血管内,以保持进入肝脏的压力。冲洗完毕后立即先从门静脉注入配置好的 ABS 填充剂,灌注压力为 300~800 Pa。隔 2 h 后再补灌,共补灌 2~3 次,补灌压力为 500~800 Pa,置室内过夜。2 d 后,将肝脏切下,置于 25%盐酸溶液中腐蚀。7 d 后,将标本用流水缓慢冲洗,除去细胞及结缔组织,然后用肥皂水浸泡 1 d,即可得到大鼠肝脏血管铸型。

2.2 血管形态测量方法

光学显微镜放大倍率为 25~300,显示屏分辨率为 1 620×1 220 像素。显微镜自带操作系统以及图像处理软件,可完成长度、角度等几何尺寸的测量。由于支架是空间分布的,在平面照片中的夹角测量结果难免与实际值有误差,因此只挑选夹角平面与观察面平行的夹角进行测量。

其测量方法如下:从每一个血管树的根部即最高级开始测量其直径和该级血管与下一级的夹角;再将根部上的子枝分别剪下来,记为第 2 级,从该级的根部开始测量以上的几何参数;如此类推,测至第 3 级。

测量结果通过 SPSS 软件进行统计分析,具体参数如表 1 所示。

表 1 血管测量参数

级数	1	2	3
角度	α_1	α_2	α_3
直径	d_1	d_2	d_3

2.3 流道设计

运用 CAD 软件(Pro/Engineer,PTC,USA)进行支架流道结构的仿生设计。自然血管呈三维网状交织分布,模具制造困难,且灌注后难以脱模,因此应在制造工艺可行的基础上进行设计。本研究将所有流道设计在一个矩形平面支架表面,欲通过卷裹方式形成流道在整个圆柱体支架内的三维分布。

血液在体内是通过动脉血管流入毛细血管,再汇聚入静脉流出的。设计的流道也包括入流道和出流道,分别仿生主动脉和静脉。入流道从上端向下呈逐级展开的树状分支结构,出流道则是入流道的相反形式。流道的每一级夹角和长度均参考实际的统

计数据,各级流道的直径则按照相邻级间的直径之比确定.

3 有限元渗流分析

3.1 建立有限元分析模型

为了对比仿生流道和未采用仿生参数的流道的流场分布,共建立了 4 种有限元分析模型,包括只有主流道无分支流道,以及另外 3 种树形分支模型(仅改变分支夹角参数),分支夹角为 90° ,仿生结构夹角为 77.72° 和 45° .

由于整个支架的流道结构是相似形的横向阵列(见图 3),这里仅提取一个特征阵列单元建立流体分析模型.提取设计的结构面(包括流道面和多孔材料支架面),在有限元分析软件(ADINA,ADINA R & D, Inc.)中进一步分析.

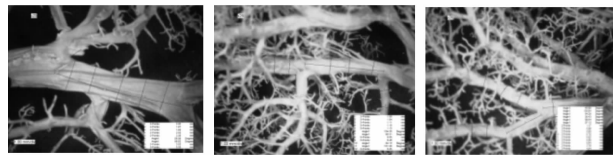
3.2 分析参数设置

在导入的平面模型中,流道材料属性按照细胞培养液(DMEM)在 37°C 的特征参数设置(黏度系数 $\eta=1.45\times 10^{-3}\text{ Pa}\cdot\text{s}$,密度 $\rho=1\,000\text{ kg/m}^3$).ADINA 材料库中自带的多孔材料模型具有流体和固体的双重属性,假设为固体属性时具有刚性结构,多孔结构和形状随机分布特性.固体属性设置孔隙率为 80% ,孔径为 $100\text{ }\mu\text{m}$,密度为 300 g/mm^3 ,液体属性设置与流道材料相同.从整个上边界竖直向下加载 1 mm/s 的流速,左右设置为可滑移的边界,整条下边界的出口压力为一个大气压.计算时考虑重力加速度($g=9.8\text{ m/s}^2$)的影响,有限元网格均设置为 4 节点网格.

4 结 果

4.1 自然肝血管铸型形状测量结果

得到的大鼠肝门静脉血管铸型在光镜下各级血管的测量照片如图 1 所示.血管在照片中清晰可见,长度和角度等参数在照片中直接量取.



(a)第 1 级管道 (b)第 2 级管道 (c)第 3 级管道

图 1 小鼠肝门静脉血管树灌注模型

由于不同大鼠的体型差异,血管的直径也不同,第 1 级和第 2 级、第 2 级和第 3 级之间的直径比集中分布在 $1.41\sim 1.7$ 之间,不同级间的血管夹角相

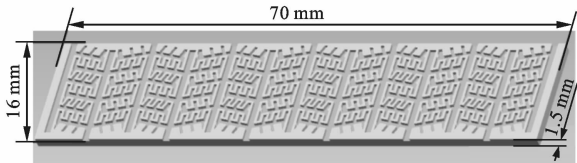
差不大,平均值分布在 $75^{\circ}\sim 85^{\circ}$ 之间(见表 2).统计全部的血管夹角数据,发现其呈均值为 $(77.72\pm 9.09^{\circ})$ 的正态分布.

表 2 血管形态测量结果

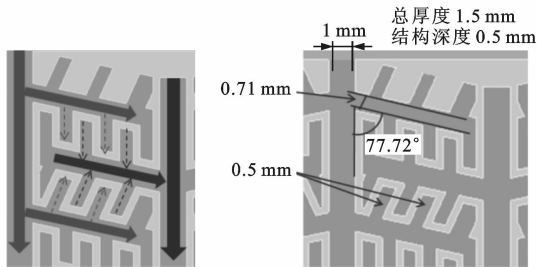
$a_1/(^{\circ})$	76 ± 6.07
$a_2/(^{\circ})$	78 ± 10.45
$a_3/(^{\circ})$	83.62 ± 3.98
d_1/mm	2.12 ± 0.58
d_2/mm	1.43 ± 0.37
d_3/mm	0.88 ± 0.21

4.2 流道设计结果

流道具体设计结果如图 2 所示.流道呈树状分支结构(见图 2a),培养液从上向下流动(见图 2b).第 1 级主流道宽为 1 mm ,第 2 级流道宽为 0.71 mm ,第 3 级流道宽为 0.5 mm .这时流道直径的级间比均为 1.41 ,管道深度均为 0.5 mm ,分支夹角均为 77.72° .



(a)总体设计方案



(b)局部放大图

(c)仿生设计的尺寸参数

图 2 卷裹型支架的仿生设计方案

4.3 CFD 分析模型与结果

针对不同结构建立的 4 种模型以及网格划分结果,如图 3 所示.分析得到的剪切应力分布情况如图 4 所示,其中图 4a、图 4b、图 4d 结构的剪切应力在流道边缘显著大于支架材料内部,而图 4c 结构最为均匀,没有明显的应力集中现象.

图 5 为支架内流速场分布情况.图 5a 没有流道分支,培养液全部通过主流道流走,大面积的多孔材

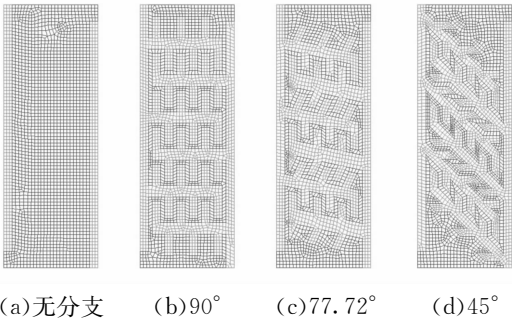


图 3 流体分析模型

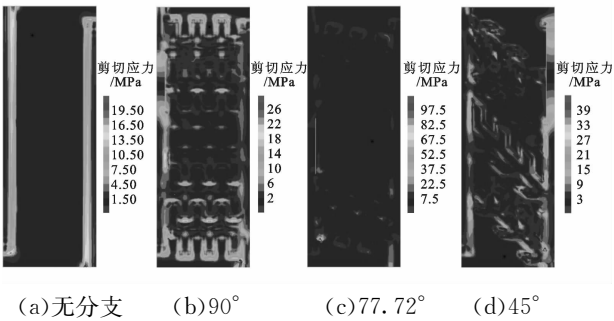


图 4 剪切应力场分布

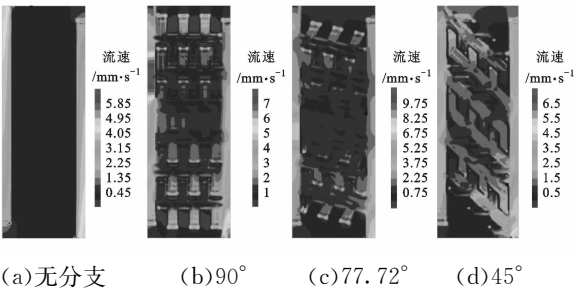


图 5 流速场分布

料区域几乎没有流速;图 5b 结构中培养液主要沿着流道流动,多孔内部仍存在许多流速很低的区域;图 5c 结构中整个流道和支架中的流速分布最均匀;图 5d 结构流道夹角最小,流道与多孔材料之间的流速差较大,流场分布不均。

将多孔支架材料区域内部的流速数据提出,进行统计学分析,得到平均流速和误差,见图 6。可见,

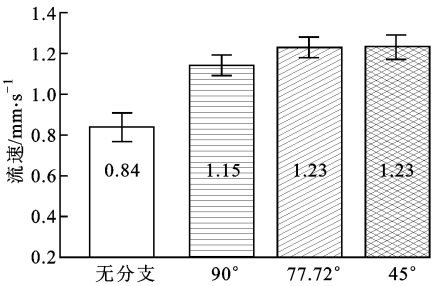


图 6 多孔材料内部流速统计结果

无分支结构的流速最低,而其他结构的平均流速相差不大,进一步说明无分支结构的内部培养液不能充分流通。另外,仿生参数结构的培养液流速误差最小,说明培养液在该结构中的各个位置流速最相近。

5 讨 论

支架内部的流道能够为细胞提供更多的营养物质并且及时运走代谢产物,对支架的生物性能有关键影响^[11-13]。由于肝脏总血液流量的 3/4 通过门静脉流入,因此对门静脉的形状参数进行研究。血管铸型是一种成熟的血管形状重构方法,能够准确将血管形态转化为便于保存的实体模型^[19]。但是,受到灌注材料本身流动性的影响,该方法只能重构尺寸较大的血管^[20]。经过对多只大鼠的统计分析发现,虽然体型不同各铸型的尺寸不同,却符合级间比 1.41~1.7、分支夹角呈正态分布的规律,因此选择级间比 1.41、所有夹角呈 77.72°这两个参数作为设计依据。

有限元分析结果对比了不同结构对流场分布的影响。剪切应力场代表培养液对细胞的冲刷力,流速场代表培养液的输送量^[11,21]。场分布均匀,说明细胞在支架各个位置上的培养条件更加一致。在同样面积内,具有树状分支结构的流道比无分支结构的面积大,材料部分的流速更高,养分输送的效率更高。在不同角度的分支结构中,具有仿生角度结构的流场分布最为均匀,在灌注培养环境中,可以通过调节流速、氧分压等培养参数,将整个支架内的培养环境调整到利于细胞生长的范围内。综合考虑营养的流通效率和整个流场分布的均匀情况,各级流道夹角成仿生参数时的结果最为理想。

6 结 论

本文提出一种具有仿生流道的卷裹型肝细胞组织工程支架,可解决细胞在细胞-支架复合培养中难以植入的问题,并使细胞成三维分布。对血管网络铸型进行显微测量,提取形状特征参数进行统计分析。设计的支架具有树状多级分支结构流道,仿生了动脉、毛细血管、静脉的血管微循环系统,其级间直径比和分支夹角符合血管统计结果。建立了不同流道结构的对比模型进行 CFD 分析,发现仿生结构能够为整个支架提供最为均匀的培养液流通环境。该流道在矩形平面内分布,通过阵列方式形成一系列功能类似的结构,可应用卷裹方式形成流道的三维分布。制造中可采用在负型模具中灌注后冻干的方法,

得到具有该仿生流道的多孔支架,经过润湿后卷裹形成圆柱形的三维支架,适用于动态灌流培养系统。下一步需进行体外动态培养和体内植入实验,从而实际评价其细胞培养能力,还可尝试多层卷裹方式,应用于多种细胞复合培养研究。

参考文献:

- [1] 刘利,万涛. 肝组织工程的研究概况[J]. 生物医学工程研究,2006, 25(3): 193-196.
LIU Li, WAN Tao. The study of the liver tissue engineering [J]. Journal of Biomedical Engineering Research, 2006, 25(3): 193-196.
- [2] PANCRAZIO J J, WANG F, KELLEY C A. Enabling tools for tissue engineering[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22 (12): 2803-2811.
- [3] TAKEZAWA T. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior [J]. Biomaterials, 2003, 24 (13): 2267-2275.
- [4] RYU W H, SUNG W M, KYLE E, et al. The construction of three-dimensional micro-fluidic scaffolds of biodegradable polymers by solvent vapor based bonding of micro-molded layers [J]. Biomaterials, 2007, 28 (6): 1174-1184.
- [5] LEE W, LEE V, POLIO S, et al. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(6): 1178-1186.
- [6] FRIMAN O, HINDENNACH M, KÜHNEL C, et al. Multiple hypothesis template tracking of small 3D vessel structures[J]. Medical Image Analysis, 2010, 14 (2): 160-171.
- [7] CIANCIO G, GONZALEZ J, SHIRODKAR S P, et al. Liver transplantation techniques for the surgical management of renal cell carcinoma with tumor thrombus in the inferior vena cava: step-by-step description[J]. European Urology, 2011, 59 (3): 401-406.
- [8] 韩硬海,李树桐. 临床肝脏病学[M]. 山东:山东科学技术出版社, 2004: 1-7.
- [9] KIM T K, YOON J J, LEE D S, et al. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres[J]. Biomaterials, 2006, 27(2): 152-159.
- [10] LEE J, CUDDIHY M J, CATER G M, et al. Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds [J]. Biomaterials, 2009, 30 (27): 4687-4694.
- [11] JIANKANG H, DICHEN L, YAXIONG L, et al. Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering[J]. Acta Biomaterialia, 2009, 5 (1): 453-461.
- [12] DADO D, LEVENBERG S. Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009, 20 (6): 656-664.
- [13] SONG Y S, LIN R L, MONTESANO G, et al. Engineered 3D tissue models for cell-laden microfluidic channels[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395 (1): 185-193.
- [14] OLIVARES A L, MARSAL E, PLANELL J A, et al. Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2009, 30 (30): 6142-6149.
- [15] FREYMAN T, YANNAS I, GIBSON L. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering[J]. Progress in Materials Science, 2001, 46 (3/4): 273-282.
- [16] KUNZE A, BERTSCH A, GIUGLIANO M, et al. Microfluidic hydrogel layers with multiple gradients to stimulate and perfuse three-dimensional neuronal cell cultures[J]. Procedia Chemistry, 2009, 1 (1): 369-372.
- [17] LIU C, XIA Z, CZERNUSZKA J T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering[J]. Chemical Engineering Research and Design, 2007, 85(A7): 1051-1064.
- [18] WANG X Y, ZHANG S X, NING X M, et al. Comparison between vascular cast and three-dimensional ultrasonography on tumor vessels[J]. Clinical Imaging, 2010, 34 (1): 36-42.
- [19] URŠIČ M, RAVNIK D, HRIBERNIK M, et al. Gross anatomy of the portal vein and hepatic artery ramifications in dogs: corrosion cast study[J]. Anatomia, Histologia, Embryologia, 2007, 36 (2): 83-87.
- [20] ZHENG N, GONG J, YU S B, et al. A combination method for preparing casting and transparent liver specimen[J]. Clinical Anatomy, 2010, 23 (5): 559-562.
- [21] KEANE J T, RYAN D, GRAY P P. Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 81 (2): 211-220.

(编辑 杜秀杰)