

引文格式:

陈晓彤, 王泽南, 魏军, 等. 贴壁细胞超声脱壁技术研究 [J]. 集成技术, 2022, 11(5): 1-11.

Chen XT, Wang ZN, Wei J, et al. Study on ultrasonic detachment of adherent cells [J]. Journal of Integration Technology, 2022, 11(5): 1-11.

贴壁细胞超声脱壁技术研究

陈晓彤^{1,2} 王泽南^{2*} 魏军^{1*} 胡颖^{2*}

¹(济南大学自动化与电气工程学院 济南 250024)

²(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

摘要 细胞从培养皿表层脱壁是贴壁细胞传代的必须操作, 目前, 胰蛋白酶消化法是细胞脱壁的主要方法, 但该方法操作复杂, 难以实现自动化细胞培养。此外, 胰蛋白酶还会对细胞蛋白造成不可逆的伤害, 造成细胞产量下降及自修复时间长等问题。超声脱壁技术使用物理手段完成细胞脱壁, 可以避免损伤细胞蛋白, 实现脱壁过程的自动化。该文研究了一种超声脱壁技术, 采用基于亮场显微镜的细胞融合度检测方法, 对超声脱壁技术的脱壁效果进行评估, 以人脐带间充质干细胞为目标细胞, 研究了贴壁细胞超声脱壁技术的关键控制参数。实验结果显示, 当超声换能器输入电压为 255 V、超声频率为 159~161 kHz 扫频、超声时间为 2 min 时, 将细胞与超声换能器距离调至 3 mm, 使用 12 mL 生理盐水作为震荡液体, 可以使 T75 瓶中细胞脱壁面积达到 95%, 细胞成活率达到 70%。

关键词 超声脱壁技术; 自动化控制; 细胞脱壁; 细胞实验

中图分类号 TP 2 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20211229001

Study on Ultrasonic Detachment of Adherent Cells

CHEN Xiaotong^{1,2} WANG Zenan^{2*} WEI Jun^{1*} HU Ying^{2*}

¹(School of Automation and Electrical Engineering, University of Jinan, Jinan 250024, China)

²(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

*Corresponding Authors: zn.wang1@siat.ac.cn; Cse_wj@ujn.edu.cn; ying.hu@siat.ac.cn

Abstract Detaching cells from the surface of the flask is a necessary operation for the adherent cell passage. Trypsinization is currently the primary method for cell detachment. However, this method is complicated to automated cell culture. Trypsin can cause irreversible damage to cellular proteins, decreasing of cell yield and long self-repair time. Ultrasonic detachment technology uses physical means to

收稿日期: 2021-12-29 修回日期: 2022-01-13

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2022B1111010003); 国家自然科学基金项目(62050410349); 深圳市重点基础研究项目(JCYJ20210324115601004)

作者简介: 陈晓彤, 硕士研究生, 研究方向为声表面波微操作关键技术; 王泽南(通讯作者), 副研究员, 研究方向为单细胞操作机器人, E-mail: zn.wang1@siat.ac.cn; 魏军(通讯作者), 副教授, 研究方向为机器人视觉方向, E-mail: Cse_wj@ujn.edu.cn; 胡颖(通讯作者), 研究员, 主要研究方向为医用机器人感知技术及智能控制, E-mail: ying.hu@siat.ac.cn。

complete cell detachment operations, which can avoid damage to cellular proteins and make the realization of automated detachment easier. In this paper, we have developed a device for ultrasonic detachment. Human umbilical cord mesenchymal stem cells were used to study ultrasonic detachment technology control parameters. The experiment results showed that, the optimum cell detachment was achieved (95% detachment rate and 70% survival rate) in 12 mL 5%-saline with 255 V and 159~161 kHz sweeping input signal, 2 min stimulation period, and 3 mm space between flask surface and transducer.

Keywords ultrasonic detachment technology; automatic control; cell detachment; cell experiment

Funding This work is supported by Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (2022B1111010003), National Natural Science Foundation of China (62050410349), and Key Fundamental Research Program of Shenzhen (JCYJ20210324115601004)

Ethical Statement The study was approved by the Institutional Review Board of the Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (ID number: SIAT-IRB-200315-H0487)

1 引 言

生物工程研究通过人工传代实现了规模化的细胞生产^[1-4],其主要环节包括接种、培养、脱壁和收集细胞^[5]。其中,细胞脱壁对传代效率影响较大^[6-10]。目前,贴壁细胞主要的脱壁方法是胰蛋白酶消化脱落法^[11-12],即清洗细胞后在培养瓶中加入胰蛋白酶浸润细胞表面,配合移液管吹打进行细胞脱壁。胰蛋白酶可以切断蛋白质中的肽键,降解细胞膜与培养皿结合处的蛋白,从而使细胞脱壁。胰蛋白酶消化法主要存在两个问题^[13-14]:胰蛋白酶会损伤与细胞活性显著相关的细胞膜蛋白^[15-16];在自动化工业流程中,细胞脱壁效率低下。胰蛋白酶长时间地消化会延迟细胞的第一次分裂,可能使暴露于胰蛋白酶中的细胞蛋白质表达发生改变,引起与代谢生长相关的蛋白下调,与凋亡相关的蛋白上调^[17],造成细胞活性降低^[18-19]。细胞传代流程的自动化有益于降低细胞污染的概率,提高传代^[20]效率。目前,自动化传代流程中均使用胰蛋白酶和移液机器人进行细胞脱壁^[21],但该方法得到纯净细胞的步骤繁杂、耗时较长。

相关学者还研发了一些无胰蛋白酶的细胞脱壁方法。一种方法是利用细胞刮刀从细胞贴壁表面分离细胞,同时将培养基替换为磷酸盐缓冲盐水^[22-23]。细胞刮刀的脱壁效率主要取决于操作者的能力,实现细胞脱壁自动化技术难度较大。另一种方法是利用培养容器表面涂层技术与温度响应聚合物使细胞自发脱壁^[24-25]。当温度降低时,培养皿表面会迅速水合,由疏水特性变为亲水特性,使细胞自发脱落。该方法已应用于细胞片层^[26]和组织^[27-28]的生成中,但培养容器表面的温度响应聚合物昂贵,为避免细胞过早脱落,还需要技术人员熟练操作,因此,尚未应用于自动化细胞培养中。Kurashina等^[29]开发了一种更换特定培养基后利用可调节温度的超声震荡装置进行细胞脱壁的方法,以培养基、培养时间、温度为核心理念,配合超声震动实现细胞脱落。但该方法在培养过程中,需要对培养基进行更换,难以应用于工业自动化流程中。

Inui等^[30]利用聚能型超声换能器实现了小范围的细胞脱落,并确定了在小区域内稳定消除细胞的最佳条件,但因脱落面积较小,尚未应用于自动化脱落中。直接利用工业超声换能器也能实

现细胞的脱壁, 若可以将脱落面积扩大, 那么既可以避免对细胞蛋白造成损伤, 又因其普适性可以应用于工业自动化生产中。Tauchi 等^[31]曾利用工业换能器进行细胞脱壁实验, 并提出一种利用换能器激发超声波和低浓度胰蛋白酶消化协同分离细胞的方法, 该方法与标准浓度胰蛋白酶消化脱壁法分离的细胞数量相同, 且在培养 72 h 后, 细胞增殖的数量比标准浓度胰蛋白酶脱壁组更多。该结果表明, 与胰蛋白酶消化脱落法相比, 超声震荡与低浓度胰蛋白酶组合的脱壁方法对细胞的损伤更小。该方法虽证实了超声换能器在自动化细胞脱壁中的可行性, 但仍未能避免使用胰蛋白酶。

本文研究了一种超声震荡细胞脱壁方法, 设计了综合考虑脱壁自动化应用需求和实验需求的超声换能单元, 并以输入信号、瓶内液体、距离位置等控制参数为变量进行实验, 探究了超声脱壁过程中各参数对脱壁效果的影响, 得到了最佳脱壁效果的对应控制参数。

2 材料和方法

2.1 超声震荡系统

超声震荡系统由控制中心、信号发生、信

号检测、移动控制和超声震荡组成, 如图 1 所示。控制中心操控信号发生和移动控制部分, 控制信号发生器产生实验所需信号后, 经高功率放大器 (ATA-4052, Aigtek, 中国) 放大及示波器 (DZ4000, rigol, 中国) 信号检测, 然后输入超声换能单元。

超声换能单元由 4 个超声波换能器 (40k-60, 广源达, 中国) 正方形排列组成, 如图 2 所示。直线滑台带动细胞培养瓶, 通过调节贴壁细胞层与换能器的间距 d , 来调整细胞在超声能场中的位置。超声换能器上放置的凹槽负责承载超声波传导介质。

2.2 细胞制备

使用人脐带间充质干细胞作为超声脱壁实验的目标细胞。其培养过程为: 首先, 将冷冻保存于液氮中的脐带间充质干细胞置于 37 °C 恒温水浴中复苏后, 使用离心法从冷冻保护剂溶液中分离细胞; 其次, 在添加 10% 胎牛血清的 D-MEM/F12 培养基 (D8900, Sigma-Aldrich MO, 美国) 中孵育细胞, 并在培养基中加入 0.89% 青链霉素 (15140-122, Gibco, 美国)、1 μg 血管内皮生长因子 (100-20-10, Peprotech, 美国) 和 1 μg 血小板衍生生长因子 (100-14B-10, Peprotech, 美国); 再次, 将细胞置于湿润的 5% CO₂ 的 37 °C

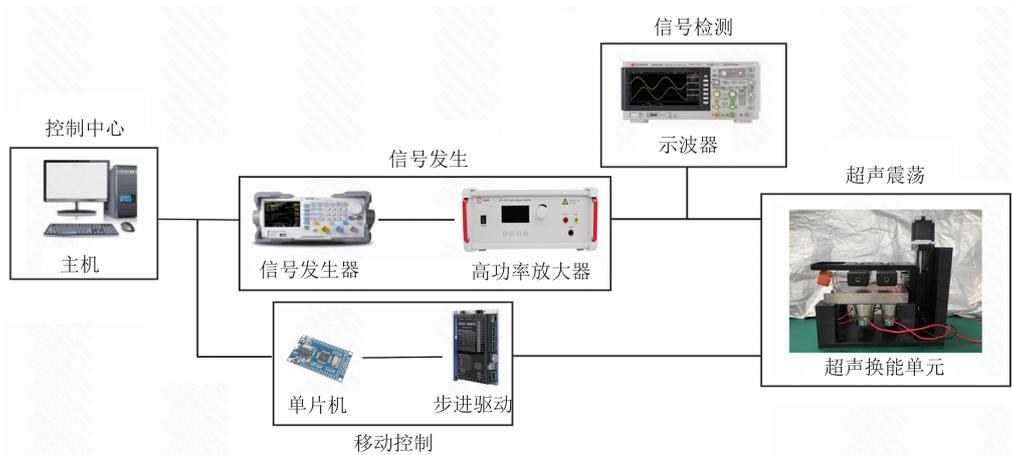


图 1 超声震荡系统

Fig. 1 Ultrasonic vibration experimental system

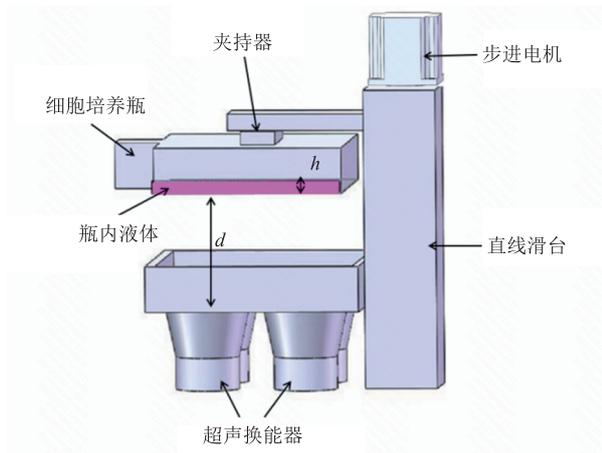


图2 超声震荡单元示意图

Fig. 2 Schematic diagram of ultrasonic vibration device

培养箱中培养 3 d; 最后, 用 0.05% 胰蛋白酶 (15400054, Gibco, 美国) 消化处理, 3 d 后进行细胞传代。第三代细胞使用血替培养基培养, 血替培养基是在间充质干细胞基础培养基 (6114011, DAKWE, 中国) 中添加 4.7% 血清替代物 (EPA-0 50, Elitecell Biomedical Corp, 加拿大) 和 0.95% 青链霉素 (15140-122, Gibco, 美国)。该孵育样品为后续细胞传代实验的原代细胞。

2.3 超声脱壁实验参数选择

超声单元控制信号的输入幅值和作用时间直接决定了作用在细胞上的流体切向力的大小和时长; 输入信号波形的不同也会导致流体切向力不同; 震荡的频率不仅关系到换能器的频率特性和方向特性, 而且影响换能器的发射功率、效率和灵敏度等重要性能指标; 频率也是超声脱壁实验中重要的影响参数。通常超声换能器工作在自身的谐振基频时获得最佳工作状态, 产生最大发射功率和效率。但由于低频超声对细胞的空化会损伤细胞, 因此, 谐振基频并非最佳选择, 需要以输入信号频率为变量进行实验。

Imashiro 等^[32]研究了超声换能器的超声波特性, 声场特性示意图如图 3 所示, 公式(1)中的近场距离 N 指示了声场分布特性。

$$N = \frac{D^2 f}{4c} \quad (1)$$

其中, D 为换能器直径 (mm); f 为超声换能器频率 (Hz); c 为介质中的声速 (m/s)。声场中聚焦区 F_z 与焦距 F 及 N 的关系如公式(2)所示。

$$F_z = \frac{2F^2}{N + 0.5 \times F} \quad (2)$$

声强度 I 可由公式(3)计算得到。

$$I = 2\rho c \pi^2 f^2 A^2 \quad (3)$$

其中, ρ 为介质密度; A 为振动幅值。

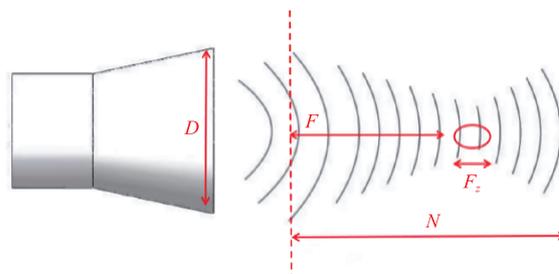


图3 超声换能器声场示意图

Fig. 3 Schematic diagram of sound field of ultrasonic transducer

基于声场特性可知, 贴壁细胞层与换能器的距离 d 会直接影响细胞所受剪切力和瓶中液位的高度。

瓶内液体成分也是影响超声脱壁实验的因素之一, 大量超声脱壁实验使用磷酸盐缓冲盐水代替培养基作为震荡时瓶内的液体。培养基对细胞有保护作用, 但不利于细胞脱壁, 为平衡细胞脱落率与死亡率, 瓶内液体成分也需要作为控制变量进行实验。

基于上述分析, 本文选择超声单元控制信号的幅值、频率、作用时间、震荡方式、细胞与超声换能单元间距、瓶内液体类型及液体高度作为控制参数开展实验。

2.4 超声脱壁实验设计

细胞超声脱壁实验的流程如图 4 所示。先在超声换能器上置凹槽内加入与距离 d 同等高度的去离子水, 充当超声波传导介质。接着取出待实

验细胞, 将细胞瓶中培养原液替换为待测液体, 并使用基于亮场显微镜的人脐带间充质干细胞融合度检测方法^[33]检测细胞脱壁情况。检测完成后, 细胞贴壁层置下, 用滑台夹持器固定培养瓶, 控制步进电机, 使贴壁层移动到指定距离 d 处, 与培养瓶接触传导介质。利用信号发生器和功率放大器, 为超声换能器施加指定波形, 对细胞进行超声震荡实验。

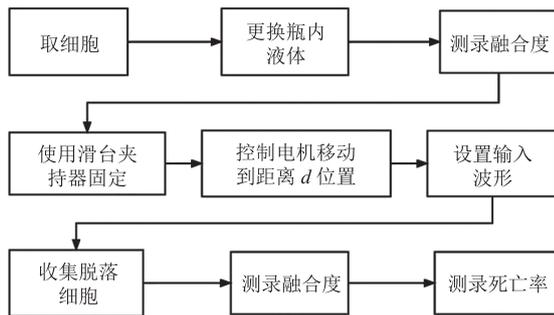


图 4 细胞超声脱壁实验流程

Fig. 4 Experimental procedure of ultrasonic detachment of cells

震荡结束后, 不使用移液管进行吹打, 直接收集震落细胞, 并再次检测瓶内剩余细胞融合度, 计算细胞脱壁面积的百分比, 即细胞脱落率。此外, 利用台盼蓝特性检测细胞死亡率, 即活细胞的胞膜结构完整, 能够排斥台盼蓝, 而丧失活性或细胞膜不完整的细胞会被台盼蓝染成蓝色。

为更加直观地判断细胞震荡脱落效果, 引入脱落效果参数 K 作为判断依据, K 为细胞脱落率和细胞成活率的乘积, K 值越大脱落效果越好。

每组实验对 3 瓶细胞进行相同的处理, 以降低单瓶细胞导致的误差, 每组实验重复 4 次。采用 t 检验评价差异的统计学意义, 当 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

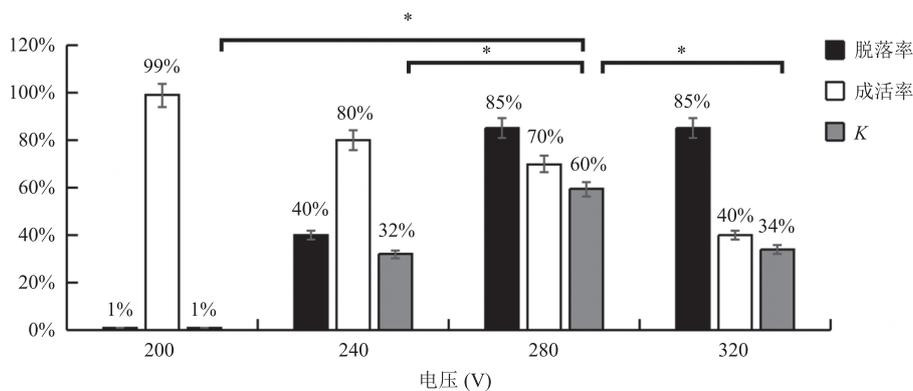
3 材料和方法

3.1 输入信号对细胞脱壁影响

3.1.1 输入电压对细胞脱壁影响

超声换能器的输入电压直接影响细胞受到的超声辐射压力^[34], 本研究选择 200 V、240 V、280 V、320 V 的电压作对照实验, 频率为 160 kHz, 时间为 2 min, 距离 $d = 2$ mm, 使用 15 mL 生理盐水作为瓶内液体。实验结果显示, 施加电压为 200 V 时, 基本无细胞脱落; 施加电压为 240 V 时, 细胞脱落面积约为 40%; 施加电压为 280 V 和 320 V 时, 细胞脱落面积均为 85%。使用台盼蓝观察震荡脱落细胞可知, 施加电压为 320 V 时, 震落细胞成活率明显低于其他 3 组, 如图 5 所示, 施加电压约为 280 V 时, 脱落效果 K 最佳。

电压对细胞脱落效果影响较大, 为选择更为



注: $n = 4$, $*P < 0.05$, 下同

图 5 电压对细胞脱落影响

Fig. 5 Effect of voltage on detachment rate

合适的电压，本研究以 5 V 为步长，补充进行了 240~280 V 之间的震荡实验，最终选择 K 值最高时所对应的施加电压 255 V 作为最佳输入电压。

3.1.2 输入频率影响

为测试输入频率对细胞脱落效果的影响，本实验选择超声换能器实际振荡频率及谐振频率：37.5 kHz、105 kHz、160 kHz 进行实验。电压设置为 255 V，时间为 2 min，距离 $d=2$ mm，使用 15 mL 生理盐水作为瓶内液体。实验结果显示，当输入频率为 37.5 kHz 与 160 kHz 时，细胞脱落面积均可达到 85%，然而，当输入频率为 105 kHz 时，细胞脱落面积仅为 30%。如图 6 所示，160 kHz 组细胞成活率大于 37.5 kHz 组，与理论一致，且脱落效果 K 在频率为 160 kHz 时达到最佳。

3.1.3 输入波形影响

为更直观地感受波形的影响，本实验选择致细胞脱落率较低的 105 kHz 区间频率，对 105 kHz 持续脉冲、104.7~106.4 kHz 扫频脉冲和 105 kHz 突发脉冲进行实验，发现在同谐振频率区间中，细胞脱落面积为：扫频脉冲 > 持续脉冲 > 突发脉冲，而三者细胞死亡率没有明显区别。故后续实验使用 159~161 kHz 扫频脉冲进行细

胞脱落。

3.2 细胞与超声装置间的距离 d 对细胞脱壁影响

细胞与超声装置间的距离 d 对细胞的脱壁有一定影响。设置 d 为 2 mm、3 mm、4 mm，电压为 255 V，扫频脉冲频率为 159~161 kHz，时间为 2 min，使用 15 mL 生理盐水作为瓶内液体。实验结果显示，在 2 mm 处细胞脱落面积约为 85%，在 3 mm 处细胞脱落面积约为 95%，在 4 mm 处细胞脱落面积约为 60%，其中，2 mm 组成活率最低，如图 7 所示，脱落效果 K 在距离 d 为 3 mm 时达到最佳。

3.3 震荡瓶内液体对细胞脱壁影响

3.3.1 瓶内液体成分

以瓶内液体成分为变量，选择 15 mL 血替原液、15 mL 生理盐水、7.5 mL 血替原液+7.5 mL 生理盐水分别作为瓶内液体 a、b、c 进行实验。其他参数设置：电压为 255 V，频率为 159~161 kHz 扫频脉冲，时间为 2 min，距离 $d=3$ mm。实验结果显示，15 mL 血替原液组细胞脱落面积约为 5%；15 mL 生理盐水组细胞脱落面积约为 95%，死亡率约为 30%；7.5 mL 血替原液+7.5 mL 生理盐水组细胞脱落面积约为 60%，死亡率约为 30%。如图 8 所示，脱落效果 K 在瓶内溶液为 15 mL 生理盐水时达到最佳。

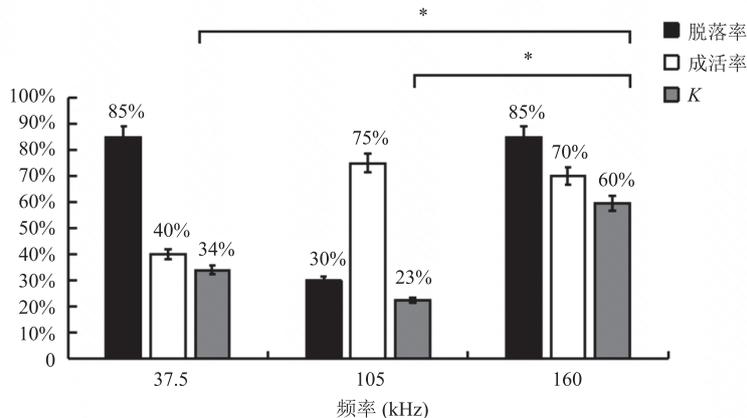


图 6 频率对细胞脱壁影响

Fig. 6 Effect of frequency on detachment rate

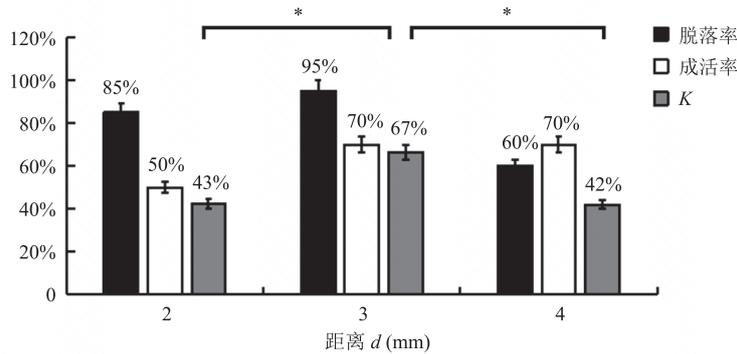


图 7 距离对细胞脱壁影响

Fig. 7 Effect of distance on detachment rate

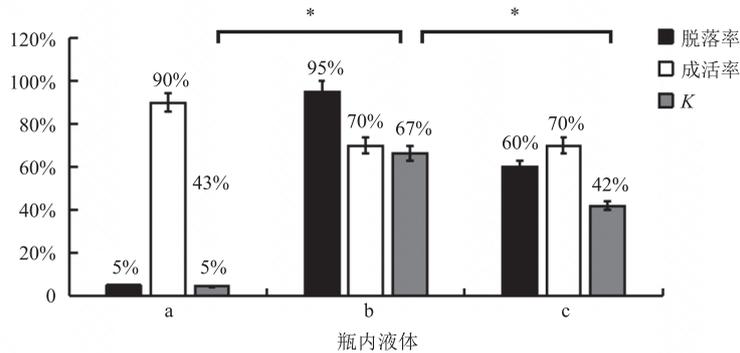


图 8 瓶内液体对细胞脱壁影响

Fig. 8 Effect of liquid on detachment rate

3.3.2 瓶内液位高度 h 对细胞脱壁影响

本实验选择生理盐水作为液体, 溶液体积设置为 9 mL、10.5 mL、12 mL、13.5 mL、15 mL, 即液体高度为 1.2 mm、1.4 mm、1.6 mm、1.8 mm、2.0 mm。其他参数设置: 电压为 255 V, 扫频脉冲频率为 159~161 kHz, 时间为 2 min, 距离 $d=3$ mm。

实验结果显示, 从细胞脱落的面积看, 溶液高度 1.2 mm 组脱壁面积最小, 其次为 1.4 mm 组和 1.6 mm 组, 1.6 mm 以上的实验组脱壁面积类似, 基本可以全部脱落; 从脱落细胞的成活率看, 液体高度小于 1.6 mm 组细胞成活率均较高, 液体高度较大的两组成活率较低。如图 9 所示, 当瓶内溶液高度 h 为 1.6 mm, 即液体体积为 12 mL 时, 脱落效果 K 达到最佳。

4 结论与分析

本文利用超声换能单元, 以人脐带间充质干细胞作为目标实验细胞, 针对超声脱壁过程中关键参数对脱壁效果、细胞活性等指标的影响进行了研究实验, 结果分析如下。

不同电压对细胞脱落效果影响的实验结果表明, 电压与细胞脱落率成正相关, 与细胞成活率呈负相关, 即增大电压可以增大细胞脱落面积, 但是会降低细胞成活率。这是因为电压的增大会造成液体振幅的增大, 进而导致流体剪切力增大, 在提高脱落率的同时会加重对细胞的伤害, 造成成活率的降低。因此, 在致脱落率较大的电压中, 选择对细胞伤害相对较小的电压, 在本实验条件下, 较合适电压为 255 V。

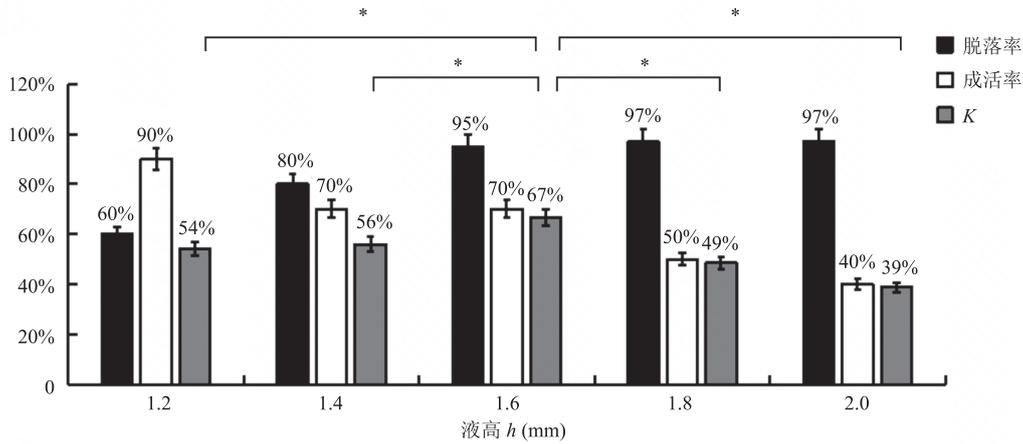


图9 液体高度对细胞脱壁影响

Fig. 9 Effect of liquid height on detachment rate

不同频率对细胞脱落效果影响的实验结果表明, 细胞脱落率与频率并无线性关系, 但频率增大会提高细胞成活率。该结论与相关文献的结论一致^[35], 原因是超声波会在流体中引起空化效应, 即气泡的形成和破裂。气泡破裂会对细胞造成损伤, 超声频率越高, 产生的气泡越小, 对细胞的伤害也就越低。因此, 选择致脱落率类似的较高次谐振频率, 本实验中 160 kHz 为最佳。此外, 与 Wang 等^[36]的发现类似, 在细胞的破坏实验中, 高频和低频超声交替配合比仅用单频处理更有效, 原因是使用高低交替频率产生的流体剪切力会大于单频。因此, 在输入波形的实验中可以观察到, 相同的频率区间内, 在细胞成活率相同的前提下, 扫频脉冲可以提升细胞脱落率。

在 Inui 的研究中, 超声换能器与瓶底距离越近, 脱壁面积越精准; 液体体积越多越易脱壁。而在本文实验中, 细胞脱落率与距离 d 并无线性关系。由于培养瓶结构原因, 细胞贴壁层与超声震荡装置距离 d 为 2 mm 时, 培养瓶与超声震荡装置存在物理接触, 因此猜测此时细胞脱落死亡率较高的原因为, 接触导致增加了机械振动力, 损伤了细胞。但 3 mm 处脱落率反而增大, 结合瓶中液位高度 h 的实验结果, 本文认为细胞脱落

率可能与驻波出现位置相关。

驻波长度 ∂ 是半波长的整数倍, 如公式(4)所示。

$$\lambda_n = \frac{2\partial}{n} \quad (4)$$

其中, λ_n 为波长。根据波速 v 、频率 f 与波长之间关系式 $v = \lambda_n / f$ 可知, 当水下声速为 1480 m/s 时, 160 kHz 频率对应的波长为 9.25 μm 。当 n 取 1 时, 驻波位置为 4.625 mm, 当距离 d 为 3 mm、瓶内液体为 12 mL 时, 驻波位置约为 1.625 mm, 此时细胞脱落效果最佳。实验结果显示, 当细胞层位于驻波处附近时, 细胞脱落率较高, 细胞在驻波处是悬浮可控的^[37], 而在扫频状态下, 细胞位置在驻波上下切换, 受到的流体切向力相对稳定。

在含有培养基的液体中, 细胞脱壁效果不佳, 而使用生理盐水作为脱壁液体效果更好, 这可能是因为培养基本身具有促进贴壁的成分。在工业细胞培养传代过程中, 通常使用生理盐水进行清洗或离心, 因此在细胞脱壁时, 使用生理盐水作为细胞震荡液体是可行的。

与 Inui 的聚能型超声换能器脱壁法相比, 本文超声震荡装置脱壁方法实现了更大范围的细胞脱壁, 并确定了应用于自动化流程中细胞

脱壁的较优条件。与 Tauchi 提出的利用超声换能器激发和低浓度胰蛋白酶协同分离细胞的方法相比, 本文方法避免了胰蛋白酶对细胞蛋白的伤害, 还提高了超声震荡脱壁应用与自动化流程中的效率。

综上所述, 本文实验得出的最佳参数为: 超声换能器输入电压为 255 V, 超声频率为 159~161 kHz 扫频, 超声时间为 2 min, 细胞与超声换能器距离为 3 mm, 震荡液体为 12 mL 生理盐水。在该参数控制下, T75 瓶中细胞脱落效果 K 值可达 67%, 脱落率为 95%, 成活率为 70%; 胰蛋白酶脱落法的细胞脱落率约为 98%, 成活率约为 81%; Kurashina 基于温度调制的超声振动细胞脱壁方法的细胞脱落率约为 78%, 成活率约 91%。由此可见, 本实验方法的细胞脱落率与胰蛋白酶脱落法脱落率基本一致, 但成活率较低。

在后续实验研究中, 在保证细胞脱落率的同时, 需要研究提高成活率的方法。可通过更换超声换能器、信号发生器等优化实验条件的方式, 探究更高频超声脱壁是否可以提升细胞成活率。也可通过对其他影响因素的探究实验, 寻找其他控制参数的更优选择。

5 结 论

本文设计了一个兼顾细胞自动化生产应用和待测参数实验的超声换能单元, 以人脐带间充质干细胞作为目标实验细胞, 在避免使用胰蛋白酶的前提下, 研究了超声脱壁过程中的关键参数对脱壁效果、细胞活性的影响。

研究表明, 电压与细胞脱落率呈正相关, 与细胞成活率负相关; 细胞脱落率与频率并无线性关系, 但频率增大会有效增加细胞成活率; 相同的频率区间内, 在不造成细胞损伤的前提下, 扫频脉冲对细胞的脱落率有所提升; 当细胞层处在

驻波位置进行震荡时, 细胞的脱落效果较好; 当瓶内液体为纯生理盐水时, 脱落效果最佳。

综上所述, 本文实验得出了应用于工业自动化流程的超声震荡致细胞脱落的较优参数: 超声换能器输入电压为 255 V, 超声频率为 159~161 kHz 扫频, 超声时间为 2 min, 细胞与超声换能器距离为 3 mm, 震荡液体为 12 mL 生理盐水。该参数控制下, T75 瓶中细胞脱壁面积可达 95%, 细胞成活率可达 70%。

参 考 文 献

- [1] Kino-Oka M, Ogawa N, Umegaki R, et al. Bioreactor design for successive culture of anchorage-dependent cells operated in an automated manner [J]. *Tissue Engineering*, 2005, 11(3-4): 535-545.
- [2] Kobayashi T, Kan K, Nishida K, et al. Corneal regeneration by transplantation of corneal epithelial cell sheets fabricated with automated cell culture system in rabbit model [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(36): 9010-9017.
- [3] Melero-Martin JM, Dowling MA, Smith M, et al. Optimal in-vitro expansion of chondroprogenitor cells in monolayer culture [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 93(3): 519-533.
- [4] Punshon G, Vara DS, Sales KM, et al. The long-term stability in gene expression of human endothelial cells permits the production of large numbers of cells suitable for use in regenerative medicine [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2011, 58(5): 371-375.
- [5] Freshney IR. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications* [M]. New York: Alan R. Liss, 2010: 317-334.
- [6] Tee DEH. *Culture of animal cells: a manual of basic technique* [J]. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1984, 77(10): 902-903.
- [7] Nakao M, Kurashina Y, Imashiro C, et al. A method for collecting single cell suspensions using an ultrasonic pump [J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2017, 65(1): 224-231.

- [8] Umegaki R, Kino-Oka M, Taya M. Assessment of cell detachment and growth potential of human keratinocyte based on observed changes in individual cell area during trypsinization [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 17(1): 49-55.
- [9] Kurashina Y, Hirano M, Imashiro C, et al. Enzyme-free cell detachment mediated by resonance vibration with temperature modulation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(10): 2279-2288.
- [10] Kurashina Y, Takemura K, Friend J, et al. Efficient subculture process for adherent cells by selective collection using cultivation substrate vibration [J]. *IEEE Transactions on Bio-medical Engineering*, 2016, 64(3): 580-587.
- [11] Mitomo H, Eguchi A, Suzuki Y, et al. Fabrication of a novel cell culture system using DNA-grafted substrates and DNase [J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2016, 12(2): 286-295.
- [12] Batista U, Garvas M, Nemeč M, et al. Effects of different detachment procedures on viability, nitroxide reduction kinetics and plasma membrane heterogeneity of V-79 cells [J]. *Cell Biology International*, 2010, 34(6): 663-668.
- [13] Okano T, Yamada N, Okuhara M, et al. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces [J]. *Biomaterials*, 1995, 16(4): 297-303.
- [14] Papadopoulou EL, Barberoglou M, Zorba V, et al. Reversible photoinduced wettability transition of hierarchical ZnO structures [J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(7): 2891-2895.
- [15] Mittal A, Pulina M, Hou SY, et al. Fibronectin and integrin alpha 5 play requisite roles in cardiac morphogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2013, 381(1): 73-82.
- [16] Lorenz A, Just W, da Silva Cardoso M, et al. Electroporation-mediated transfection of *Acholeplasma laidlawii* with mycoplasma virus L1 and L3 DNA [J]. *Journal of Virology*, 1988, 62(8): 3050-3052.
- [17] Huang HL, Hsing HW, Lai TC, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17(1): 36.
- [18] Hirai H, Umegaki R, Kino-Oka M, et al. Characterization of cellular motions through direct observation of individual cells at early stage in anchorage-dependent culture [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 94(4): 351-356.
- [19] Kimura Y, Okuda H, Ogita ZS. Effects of flavonoids isolated from *scutellariae radix* on fibrinolytic system induced by trypsin in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Journal of Natural Products*, 1997, 60(6): 598-601.
- [20] Kino-Oka M, Chowdhury SR, Muneyuki Y, et al. Automating the expansion process of human skeletal muscle myoblasts with suppression of myotube formation [J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2009, 15(4): 717-728.
- [21] Kato R, Iejima D, Agata H, et al. A compact, automated cell culture system for clinical scale cell expansion from primary tissues [J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2010, 16(5): 947-956.
- [22] Lee HT, Han DMR, Lee JB, et al. Biological effects of indirect contact with QELBY[®] powder on nonmacrophagic and macrophage-derived cell lines [J]. *Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 40(1): 1-6.
- [23] Taciak B, Białasek M, Braniewska A, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198943.
- [24] Nakajima K, Honda S, Nakamura Y, et al. Intact microglia are cultured and non-invasively harvested without pathological activation using a novel cultured cell recovery method [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(11): 1213-1223.
- [25] Yang MK, Yang N, Bi SX, et al. Micropatterned designs of thermoresponsive surfaces for modulating cell behaviors [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2013, 24(12): 1102-1109.
- [26] Kobayashi T, Kan K, Nishida K, et al. Corneal regeneration by transplantation of corneal epithelial

- cell sheets fabricated with automated cell culture system in rabbit model [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(36): 9010-9017.
- [27] Nagamori E, Ngo TX, Takezawa Y, et al. Network formation through active migration of human vascular endothelial cells in a multilayered skeletal myoblast sheet [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(3): 662-668.
- [28] Kakegawa T, Mochizuki N, Sadr N, et al. Cell-adhesive and cell-repulsive zwitterionic oligopeptides for micropatterning and rapid electrochemical detachment of cells [J]. *Tissue Engineering Part A*, 2013, 19(1-2): 290-298.
- [29] Kurashina Y, Imashiro C, Hirano M, et al. Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic traveling wave [J]. *Communications Biology*, 2019, 2(1): 393.
- [30] Inui T, Kurashina Y, Imashiro C, et al. Method of localized removal of cells using a bolt-clamped Langevin transducer with an ultrasonic horn [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(8): 575-583.
- [31] Tauchi H, Imashiro C, Kuribara T, et al. Effective and intact cell detachment from a clinically ubiquitous culture flask by combining ultrasonic wave exposure and diluted trypsin [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2019, 24(3): 536-543.
- [32] Imashiro C, Hirano M, Morikura T, et al. Detachment of cell sheets from clinically ubiquitous cell culture vessels by ultrasonic vibration [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 9468.
- [33] Wang ZN, Zhan RC, Hu Y. Automated confluence measurement method for mesenchymal stem cell from brightfield microscopic images [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2021, 27(5): 1093-1101.
- [34] Zhang S, Taylor S, Fei L, et al. Piezoelectric property of relaxor-PbTiO₃ crystals under uniaxial transverse stress [J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 102(17): 172902.
- [35] Levario-Diaz V, Bhaskar P, Carmen Galan M, et al. Effect of acoustic standing waves on cellular viability and metabolic activity [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 8493.
- [36] Wang M, Yuan WQ, Jiang XN, et al. Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 153: 315-321.
- [37] Coakley WT, Hawkes JJ, Sobanski MA, et al. Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation of cells and microparticles [J]. *Ultrasonics*, 2000, 38(1-8): 638-641.