

文章编号: 1004-0374(2010)10-1047-06

微重力条件下细胞培养和组织工程研究进展

雷晓华, 宁立娜, 曹宇静, 段恩奎*

(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 随着空间生命科学研究的发展, 人们将细胞、组织培养技术与微重力环境相结合产生了组织工程研究的一个新领域——微重力组织工程。模拟微重力条件下细胞培养和组织构建研究表明, 微重力环境有利于细胞的三维生长, 形成具有功能的组织样结构, 培养后的三维组织无论从形态上还是基因表达上都更接近于正常的机体组织。这种微重力对细胞的作用效应, 将可能为未来组织工程和再生医学研究提供一条新途径。该文概述了近十年来国内外微重力组织工程相关研究的最新进展。

关键词: 微重力; 生物反应器; 细胞培养; 组织工程

中图分类号: R329.28; R329.3 **文献标识码:** A

Advances in cell culture and tissue engineering under microgravity

LEI Xiao-hua, NING Li-na, CAO Yu-jing, DUAN En-kui*

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Along with the development of space biology, the technique of tissue and cell culture under microgravity is becoming a new research field, which has been known as microgravity tissue engineering. The study of microgravity or simulated microgravity on cells and tissues culture indicated that microgravity could offer special effects on forming three-dimension (3-D) tissue structure and functional tissues. The 3-D tissue constructs generated on microgravity condition exhibit more similar phenotypes in either morphous or gene expression profiles to those in normal tissues. This review summarizes the recent advances of microgravity tissue engineering in the past 10 years.

Key words: microgravity; bioreactor; cell culture; tissue engineering

“组织工程”概念是由加利福尼亚大学圣地亚哥分校的Fung教授于1987年在美国国家科学基金会(NSF)会议上提出并确定下来的, 是利用生命科学和工程学的原理与技术, 在正确认识哺乳动物正常及病理两种状态下组织结构与功能关系的基础上, 研究、开发用于修复、维持和改善损伤组织功能的组织替代物的一门学科^[1]。组织工程研究的主要问题是更好地产生一个具有生物功能的三维组织结构, 达到适用于体外科学研究和适用于病损器官替换的目的。长期以来, 研究者一直都在致力于探索离体细胞的组织重建, 实现机体组织和器官人工构建的梦想, 然而, 由于离体环境与体内环境存在巨大的差别, 加上人们对细胞的分化、细胞与细胞

相互作用以及细胞与组织微环境相互作用等问题的认识还不深, 体外组织的重建遇到很大困难^[2]。近年来人们逐渐认识到一些化学信号、物理信号在组织重建过程中起着重要作用^[3]。特别是伴随人类空间探索的广泛开展, 人们发现空间独特的微重力环境对机体细胞和组织产生了许多完全有别于地面正常重力条件下的作用。随着近年来空间生命科学的

收稿日期: 2010-05-18; 修回日期: 2010-06-30

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目子课题(KGCX1-YW-24); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KJCX2-YW-L08)

*通讯作者: E-mail: duane@ioz.ac.cn; Tel: 010-64807308

发展,人们将细胞培养技术与空间微重力环境相结合研究组织发生和重建过程,研究发现微重力条件较之地面重力条件更有利于细胞三维生长形成组织器官,由此开创了组织工程研究的一个新领域——微重力组织工程。本文概述了近十年来国内外微重力组织工程研究的最新进展及今后的发展趋势。

1 空间组织工程的研究进展

1.1 微重力培养:一种新的细胞培养环境

多年来离体细胞的体外培养研究囿于技术的桎梏,多局限于二维的平面培养,这与细胞在机体内所处的三维立体环境存在很大的不同。人们试图最大限度地模拟体内细胞所处的真实微环境,提供物质运输的动态过程,从而研究细胞生长、分化和组织形成的生物规律,这就需要建立三维培养体系。

组织的构建和装配要求给细胞与细胞间相互作用提供一个良好的环境,同时应该避免高剪切力的负作用。微重力理论上可以提供这样一个条件^[4]。在微重力情况下可以实现轻重不分、上下无别、沉浮和对流消失等物理现象,因此,不同密度的流体可以均匀混合,不同沉降率的细胞或组织可以共同培养和相互作用,形成三维聚集物。细胞或组织内部任何部分与培养液之间缺乏压力(或者压力差)都与微重力环境密切相关,细胞或组织的形态改变及其结构力学应力的消失是微重力影响的主要作用机制。Kim等^[5]研究表明微重力可以为细胞与细胞之间相互作用和组织构建提供一个良好的微环境。

微重力组织工程的核心是建立哺乳动物细胞三维培养体系,包括由高分子可降解聚合物支架构成的三维培养系统。与单层培养相比,三维组织培养系统可以含有高密度细胞,对细胞分化和正常功能维持都具有重要影响^[6]。在组织工程研究领域,微重力环境有助于细胞和组织体外三维培养体系在基因和细胞水平的应答^[7]。

1.2 微重力细胞、组织培养生物反应器

为了充分发挥微重力所带来的潜在作用,美国航空航天局(NASA)科学家研制了转壁式生物反应器(RWVB),并进行了部分类型细胞三维组织构建的研究,结果表明,采用RWVB生物反应器进行的细胞三维组织构建,其组织特性和基因表达明显有别于正常重力条件下培养二维组织的结果^[8],但与机体自身组织的基因表达非常接近。这些研究结果提示我们,微重力环境可能有利于细胞的增殖和分化,从而适用于组织的三维构建。这为微重力组织

工程的研究奠定了基础。

微重力生物反应器除了应配合不同细胞的特性及需求外,还需满足一些基本的要求。生物反应器的设计应方便培养液的均匀混合,并提供精确的控制,使各营养成分和培养液的pH值尽量均一,此动态培养方式可使组织块(由附着于生物支架的细胞生长形成)内的氧及营养传质更充分,代谢产物更容易排出,细胞表型更充分地表达^[9]。培养液混合方式应使剪应力对细胞的损伤降到最低。倘若大量进行干细胞的分化,必须注意精准控制干细胞在不同的分化阶段所需不同的生长因子浓度^[10]。微重力生物反应器设计要使在其中培养的细胞和组织尽可能接近体内的发育情况,而体内各种组织和器官所处环境各异,某些种类细胞要求反应器能提供一定的机械应力,如肌腱在体内主要承受张应力^[11],而骨骼主要承担压应力^[12],心血管主要承受脉动式应力^[13]。因此,微重力生物反应器的设计必须能应不同组织的需求,提供专一性设计。目前应用的微重力生物反应器主要包括,旋转式三维生物反应器(rotating vessel)^[14]、三维回转器(3D clinostat)^[15,16]、灌流生物反应器(perfused chamber)^[17]以及灌注旋转生物反应器(perfused RCCS)^[18](表1)。针对各种不同细胞和组织的培养特性,各生物反应器的性能不同。


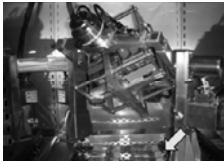

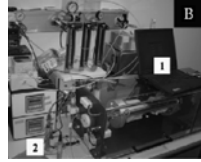
1.3 微重力条件下组织构建

培养在微重力生物反应器中的细胞集聚体或组织由于受到模拟微重力的作用,细胞得到较好的生长和分化,其分化主要受低剪切应力和随机微重力这两个因素的相互作用,从而影响细胞的基因表达,促进了细胞与细胞间相互作用以及细胞间信号的自分泌和旁分泌效应^[19]。微重力生物反应器已被广泛应用于多种细胞(如软骨细胞、成骨细胞、间充质祖细胞、心肌细胞、胰岛 β 细胞、干细胞以及角质细胞等)和生物可降解支架混合(聚乙醇酸-聚乳酸-乙醇酸共聚物)培养,构建人工三维组织^[9]。目前已开展了地面模拟微重力条件下组织构建以及空间微重力条件下组织构建研究。

1.3.1 微重力条件下骨和软骨组织构建

骨和软骨组织工程主要致力于骨和软骨的形成及再生,通过建立细胞与生物材料的三维复合物,构建具有生物活性的组织,进而对受损的骨和软骨组织进行形态结构和功能的重建以求达到永久性替代^[20]。研究表明模拟微重力生物反应器适用于培养组织工程骨和软骨。Qiu等^[21]用可降解的中空生物陶瓷微球作为支架,在RWVB中培养成骨细胞的前体细

表1 微重力生物反应器性能比较

	旋转式容器 (Rotating vessel)	三维回转器 (3D Clinostat)	灌注室 (Perfused Chamber)	灌注旋转室 (Perfused RCCS)
常用生物反应器 (Bioreactor)				
体积 (cm ³)	10、50或110	不确定	3、10或30	50或100
适用组织类型	心血管、软骨、拟胚体、 胰岛、皮肤等	胚胎、骨、上皮、肝等	软骨、骨组织	软骨、骨骼、心肌、 心血管组织等
剪应力	很小	很小	中等	强
传质	弱	弱	中等	强
培养方式	悬浮、微载体、三维支 架材料	悬浮、贴壁、微载体、 三维支架	贴壁、悬浮、微载 体、三维支架材料	悬浮、微载体、三维 支架材料、太空

胞, 获得了三维骨组织, 并成功进行了骨移植实验。Rucci 等^[22]利用 RWVB 研究了成骨样细胞的生长及细胞响应机制, 结果显示微重力条件下成骨细胞表现出高水平的碱性磷酸酶活性, 细胞骨桥蛋白、骨钙素以及骨形成蛋白的表达增加, 而对照组细胞的表达量并没有明显的改变。模拟微重力可能是通过整联蛋白介导的信号通路来增加成骨的分化^[23]。最近, Jin 等^[24]在模拟微重力条件下成功构建了三维组织工程骨结构。然而, Nishikawa 等^[16]研究表明, 3D 回转培养 (3D clinostat) 会抑制新生骨的形成, 这种抑制作用是由于骨髓基质细胞向成骨细胞的分化受限所致。

哺乳动物软骨组织的修复和再生能力弱, 软骨缺损的修复一直是临床上亟待解决的一个难题。而困扰临床应用的关键因素是人工构建的软骨组织存在细胞老化的问题。微重力组织和细胞培养可以提供解决这些难题的一种方法。Freed 等^[25]首次建立了微重力条件下小牛软骨细胞三维培养模型, 软骨细胞可以生长在葡聚糖包被的微载体上, 长达四个月并保持细胞活力。此后, Freed 等^[26]于 1997 年发表了他们在空间微重力环境下构建软骨组织的研究结果显示, 空间微重力环境条件下能够构建软骨组织, 构建组织可以在空间中存活 7 个月并保持细胞活力, 空间微重力条件下构建的组织与地面对照组比较呈现更圆、更小的结构, 但是生物机械能力要差一些。Klement 等^[27]研究认为 RWVB 条件下软骨构建的前期, 细胞的生长受到抑制, 容易引发一些不正常的下游基因表达, 但在软骨构建的晚期

RWVB 有利于软骨细胞的生长和发育。此外, Hwang 等^[28]采用鼠胚胎干细胞、藻酸盐胶囊和 3D 旋转生物反应器进行骨组织构建, 取得了较好的效果。Hahn 等^[29]认为微重力环境可以作为动物内耳组织发育、生长调控、器官分化和病理研究的一个很好的体外培养模型。Song 等^[30]利用新型转壁式生物反应器构建了三维组织工程骨, 朱立新等^[31]采用改良纤维蛋白胶软骨膜块在模拟微重力条件下培养修复关节软骨缺损。

由于在空间微重力环境下进行实验的机会较少, 因此前期的研究工作大多是在模拟微重力环境下进行的, 对空间微重力环境与地面模拟微重力环境组织构建差异的认识还很肤浅。最近, Stamenkovic 等^[32]研究比较了国际空间站 (ISS)、地面模拟微重力以及正常重力条件下新生软骨组织的构建, 结果显示 ISS 微重力条件下构建的新生软骨组织较模拟微重力和正常重力条件下, 呈现出较弱的细胞外基质染色及较强的 I/II 型胶原表达; 正常重力下构建的组织聚集体其蛋白聚糖基因表达谱系要高于其他两组; 模拟微重力条件下构建的组织形态大小介于两者之间。

骨髓间充质干细胞是骨髓来源的具有多向分化潜能的干细胞, 在一定条件下, 如在骨形成蛋白 (BMP) 等调控因子的调控下可以分化形成成骨细胞, 参与骨的形成, 因此许多学者开始将其作为研究微重力条件下骨形成的优选种子细胞^[33]。Terai 等^[34]应用旋转式生物反应器培养骨髓间充质干细胞与聚乳酸羟基乙酸 (PLGA), 并进行组织工程骨构建, 培

养 2 周后即出现钙化现象, 培养 7 周时细胞已被形成的骨样组织包裹。模拟微重力环境中流体应力对破骨细胞的功能特别重要, 流体应力可以增加破骨细胞标志分子的表达, 改善三维支架内细胞基质的空间分布。微重力灌注培养有利于骨髓基质细胞向破骨细胞分化、增殖以及矿化物质的产生, 此外, 生物机械力的刺激还有益于骨髓基质细胞向成骨细胞分化, 改善骨组织构建^[35, 36]。王常勇等^[37]应用旋转生物反应器和微载体技术体外大规模扩增了人骨髓间充质干细胞。利用模拟微重力条件可促进人间充质干细胞体外高效增殖^[38]。

1.3.2 微重力条件下心肌组织构建

采用模拟微重力旋转生物反应器体外构建可供移植的心肌组织对治疗心脏疾患具有重要的临床意义, 此外, 构建的心肌组织还可作为心脏药物筛选、心肌生理研究以及心脏发育和功能等研究的模型。因此, 微重力心肌组织工程研究开始受到国内外学者的关注。近年来, 在心肌组织工程的研究中, 刘兴茂等^[39]利用旋转式细胞生物反应器模拟微重力条件进行心肌细胞的体外培养, 取得了较好的实验结果, 构建了具有同步自律收缩的三维组织。Akins^[8]等研究显示在微重力旋转生物反应器中培养的新生大鼠心肌细胞三维聚集体的形态发生表现出不同的表达模式, 其血管的发生路径与体内心脏发育类似。Akins 等^[40]进一步证实, 与二维生长的心肌细胞相比, 三维培养的多细胞聚集体 mRNA 表达谱发生变化; 内皮细胞的迁移通路上调; 初始基因 (*Nppa* 和 *Ankrd1*) 的表达下降, 对三甲碘腺原氨酸的敏感性增加。

1.3.3 微重力条件下胰岛的体外培养

体外扩增产生足够的可供移植用的胰岛细胞是糖尿病治疗的一种理想方法, 胰岛细胞移植可以有效地纠正糖尿病患者的代谢紊乱, 但如何获得足够数量有功能的胰岛细胞一直是制约其发展的主要因素。模拟微重力条件似乎有可能解决体外胰岛细胞的三维扩增问题。微重力条件下培养的胰岛细胞结构更接近于机体自身胰岛, 且分泌功能优于普通培养组, 此外, 胰岛在微重力条件下培养可降低移植引起的免疫排斥反应, 进而延长移植物体内存活时间^[41, 42]。Murray 等^[43]研究认为旋转细胞培养系统可以作为人胰岛和胰腺 β 细胞很好的体外培养工具, 培养的人胰腺可以长期保持对葡萄糖刺激的敏感作用。

Rutzky 等^[44]比较了静止常规培养和模拟微重力

生物反应器中培养的小鼠胰岛的特性, 并分别移植到由链脲菌素诱导产生糖尿病的小鼠体内。结果显示, 静止条件下或微重力条件下培养的同种异体胰岛较新鲜胰岛存活期长 100 d, 而新鲜胰岛在 15 d 内即被排斥。胰岛滴定实验显示要使移植后血糖达到正常, 新鲜胰岛或静止条件下培养的胰岛需要 250 单位, 而微重力条件下培养的胰岛仅需要 30~120 单位。此外, 糖耐量测试也显示在移植 30 d 后, 微重力条件下培养的胰岛优于另外两者, 免疫染色法和透射电镜分析发现, 两种培养条件下, 在培养过程中, 胰岛内的树突细胞会逐渐消失, 而且微重力条件下培养的胰岛的超微结构与静止条件下培养的胰岛相比, 前者更接近新鲜胰岛。

1.3.4 微重力条件下其它细胞的培养及组织重建

微重力条件同样对原代培养的肝细胞的生长, 对血管内皮细胞的生长及对角质细胞的生长和三维组织构建具有很大的优势。有研究报道微重力条件会影响干细胞的生长和分化^[45]。Kawahara 等^[46]采用 3D 回转器模拟微重力条件培养小鼠胚胎干细胞, 发现小鼠胚胎干细胞在无饲养层、无血清、不添加 LIF 的条件下培养仍可以保持干细胞特性, 维持干细胞向三个胚层分化的潜能。Cao 等^[47]利用 NASA 研制的旋转器来模拟微重力研究了小鼠早期胚胎的体外培养, 取得了满意的结果。此外, 我们利用旋转器进行人表皮干细胞体外扩增及三维皮肤组织构建, 也取得了优于常规培养的结果。

2 空间组织工程研究存在的问题

尽管目前的研究表明, 无论模拟微重力还是空间微重力条件, 都有可能成为构建组织工程器官的良好环境; 但是, 微重力组织工程研究目前还存在众多难题有待于克服。首先, 地面模拟微重力生物反应器产生的并非完全意义上的微重力环境, 无论是回转或旋转方法只能模拟局部微重力效应; 其次, 细胞在回转或旋转培养的过程中受到众多因素的影响, 如细胞的相互碰撞、流体的剪切力等^[48]; 再次, 从空间微重力环境组织构建来分析, 需要证明的是取自空间的三维工程化组织, 一旦离开培养环境能否依然维持组织的完整性, 并保持正常的组织功能。此外, 我们知道空间环境复杂, 空间中增加的辐射可能会引起细胞 DNA 的损伤, 而 DNA 过多的损伤将造成空间环境下生成的组织发生基因突变^[49]。

由此看来, 微重力条件下构建的三维工程化组织, 其功能和生物学特性还得经过更精确的科学和

临床验证。

3 空间组织工程研究发展趋势及应用前景

无论是地球上模拟微重力还是空间微重力环境, 都有可能为工程化组织分化提供产生条件。在此条件下, 一些在体内尚难生长的细胞(如神经细胞和血管内皮细胞)亦能旺盛生长, 而这些人工组织作为潜在的组织替代物具有重要的临床意义, 可能为解决供体组织器官不足问题做出贡献。同样, 这些人工组织还可作为肿瘤学、毒理学、药理学等不同领域的实验测试材料。目前, 世界航天大国, 如美国、俄罗斯、欧洲、日本等均把微重力生物技术, 尤其是组织工程技术研究作为其空间生命科学的研究热点。美国国家科学委员会(NRC)在2001年提出的21世纪空间生命科学研究重点项目中就包括认识微重力环境对细胞生长和组织形成基本性质的影响。欧洲航空局在2007年公布的微重力实验研究概况中, 也将空间细胞与分子生物学实验放入重点研究项目之列。由日本政府、日本航天局、大学和企业的科研人员组成的“宇宙再生医疗技术研究会”召开研讨会, 着手利用空间的微重力环境研究开发人体器官和组织的再生技术。他们认为, 以培养和移植组织工程器官为主要手段的再生医学是刚刚兴起的医疗技术, 具有广阔的发展前景。

我国空间生命科学与空间生物技术的研究始于二十世纪八十年代末, 在863-2和载人航天等国家计划的支持下开展了一系列空间组织工程相关的地基模拟和太空微重力实验研究, 取得了开展空间细胞和组织培养研究的直接经验, 获得了一批科学研究和空间实验硬件装置的研究成果。目前正在进行的研究包括软骨细胞、肝细胞、心肌细胞、皮肤干细胞、神经干细胞和杂交瘤细胞等多种细胞的微重力三维培养。

微重力环境影响细胞的生命活动的作用机理尚未完全揭示, 不同类型细胞对微重力的生物学响应也不相同, 还有待于进一步深入地探讨和研究。但可以预期的是, 微重力条件下哺乳动物细胞三维培养体系的成功建立, 不仅能够为空间生物技术提供科学研究和实验技术的创新平台, 也有可能为人类器官或组织移植提供丰富的材料来源, 为组织工程和再生医学的发展开辟新途径。

[参 考 文 献]

- [1] Lanza RP, Langer R, Vacanti JP. Principles of tissue engineering[M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2000: 3-20
- [2] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. Science, 2002, 295(5557): 1009-14
- [3] Mammoto T, Ingber DE. Mechanical control of tissue and organ development. Development, 2010, 137(9): 1407-520
- [4] Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. Nat Med, 1998, 4(8): 901-7
- [5] Kim JB, Stein R, O'hare MJ. Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer—a review. Breast Cancer Res Treat, 2004, 85(3): 281-91
- [6] Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Microgravity tissue engineering. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1997, 33(5): 381-5
- [7] Albrecht DR, Underhill GH, Wassermann TB, et al. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. Nat Methods, 2006, 3(5): 369-75
- [8] Akins RE, Rockwood D, Robinson KG, et al. Three-dimensional culture alters primary cardiac cell phenotype. Tissue Eng: Part A, 2010, 16(2): 629-41
- [9] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol, 2004, 22(2): 80-6
- [10] Ma W, Fitzgerald W, Liu QY, et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. Exp Neurol, 2004, 190(2): 276-88
- [11] Muramatsu T, Muraoka T, Takeshita D, et al. Mechanical properties of tendon and aponeurosis of human gastrocnemius muscle *in vivo*. J Appl Physiol, 2001, 90(5): 1671-8
- [12] Turner CH. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. Osteoporos Int, 2002, 13(2): 97-104
- [13] Adamo L, Naveiras O, Wenzel PL, et al. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. Nature, 2009, 459(7250): 1131-5
- [14] Li S, Ma Z, Niu Z, et al. NASA-approved rotary bioreactor enhances proliferation and osteogenesis of human periodontal ligament stem cells. Stem Cells Dev, 2009, 18(9): 1273-82
- [15] Shimazu T, Miyamoto K, Ueda J. Growth and development, and auxin polar transport of transgenic *Arabidopsis* under simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat. Biol Sci Space, 2003, 17(4): 288-92
- [16] Nishikawa M, Ohgushi H, Tamai N, et al. The effect of simulated microgravity by three-dimensional clinostat on bone tissue engineering. Cell Transplant, 2005, 14(10): 829-35
- [17] Vunjak-Novakovic G, Searby N, De Luis J, et al. Microgravity studies of cells and tissues. Ann NY Acad Sci, 2002, 974: 504-17
- [18] Wurm M, Lubei V, Caronna M, et al. Development of a novel perfused rotary cell culture system. Tissue Eng, 2007, 13(11): 2761-8
- [19] Meyers VE, Zayzafoon M, Gonda SR, et al. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Cell Biochem, 2004, 93(4): 697-707
- [20] Huttmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529-43
- [21] Qiu QQ, Ducheyne P, Ayyaswamy PS. 3D bone tissue en-

- gineered with bioactive microspheres in simulated microgravity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, 37(3): 157-65
- [22] Rucci N, Migliaccio S, Zani BM, et al. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved Rotating Wall Vessel bioreactor (RWV). *J Cell Biochem*, 2002, 85(1): 167-79
- [23] Ko YJ, Zaharias RS, Seabold DA, et al. Osteoblast differentiation is enhanced in rotary cell culture simulated microgravity environments. *J Prosthodont*, 2007, 16(6): 431-8
- [24] Jin F, Zhang Y, Xuan K, et al. Establishment of three-dimensional Tissue-engineered bone constructs under microgravity-simulated conditions. *Artif Organs*, 2010, 34(2): 118-25
- [25] Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 46(4): 306-13
- [26] Freed LE, Langer R, Martin I, et al. Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13885-90
- [27] Klement BJ, Young QM, George B J, et al. Skeletal tissue growth, differentiation and mineralization in the NASA rotating wall vessel. *Bone*, 2004, 34(3): 487-98
- [28] Hwang YS, Cho J, Tay F, et al. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2009, 30(4): 499-507
- [29] Hahn H, Muller M, Lowenheim H. Whole organ culture of the postnatal sensory inner ear in simulated microgravity. *J Neurosci Methods*, 2008, 171(1): 60-71
- [30] Song KD, Yang ZM, Liu TQ, et al. Fabrication and detection of tissue-engineered bones with bio-derived scaffolds in a rotating bioreactor. *Biotechnol Appl Biochem*, 2006, 45(Pt 2): 65-74
- [31] 朱立新, 李奇, 林荔军, 等. 改良纤维蛋白胶软骨膜块在模拟微重力培养下修复关节软骨缺损. *中国骨与关节损伤杂志*. 2008, 23(9): 741-4
- [32] Stamenkovic V, Keller G, Nesic D, et al. Neocartilage formation in lg, simulated, and microgravity environments: implications for tissue engineering. *Tissue Eng: Part A*, 2010, 16(5): 1729-36
- [33] Chen X, Xu H, Wan C, et al. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2052-9
- [34] Terai Y, Morikawa N, Okada N. The evolution of the pro-domain of bone morphogenetic protein 4 (Bmp4) in an explosively speciated lineage of East African cichlid fishes. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(9): 1628-32
- [35] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, et al. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 14683-8
- [36] Mauney J R, Sjostorm S, Blumberg J, et al. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74(5): 458-68
- [37] 王常勇, 王永红, 郭希民, 等. 应用旋转生物反应器和微载体技术体外大规模扩增人骨髓间充质干细胞. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(4): 378
- [38] 罗飞, 许建中, 王序全, 等. 模拟微重力环境促进人间充质干细胞体外高效增殖. *第三军医大学学报*, 2005, 27(16): 1640-3
- [39] 刘兴茂, 刘红, 熊福银, 等. 模拟微重力条件下心肌细胞的体外三维固定化培养. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(5): 91-4
- [40] Akins RE, Gratton K, Quezada E, et al. Gene expression profile of bioreactor-cultured cardiac cells: activation of morphogenetic pathways for tissue engineering. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(6): 425-34
- [41] 韩晓明, 王宏, 孔庆学, 等. 模拟微重力条件下大鼠胰岛培养及体内移植的实验研究. *中华航空航天医学杂志*, 2006, 17(4): 269-74
- [42] Webb MA, Platton SL, Dennison AR, et al. Immunohistochemical evidence that culture in the high aspect rotating vessel can up-regulate hormone expression in growth differentiated PPHI-derived islet cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2007, 43(7): 210-4
- [43] Murray HE, Paget MB, Downing R. Preservation of glucose responsiveness in human islets maintained in a rotational cell culture system. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 238(1-2): 39-49
- [44] Rutzky LP, Bilinski S, Kloc M, et al. Microgravity culture condition reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets 1. *Transplantation*, 2002, 74(1): 13-21
- [45] Yuge L, Kajiume T, Tahara H, et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev*, 2006, 15(6): 921-929
- [46] Kawahara Y, Manabe T, Matsumoto M, et al. LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6343
- [47] Cao YJ, Fan XJ, Shen Z, et al. Nitric oxide affects preimplantation embryonic development in a rotating wall vessel bioreactor simulating microgravity. *Cell Biol Int*, 2007, 31(1): 24-9
- [48] Wendt D, Riboldi SA, Cioffi M, et al. Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009, 112: 1-27
- [49] Ohnishi T, Takahashi A, Ohnishi K, et al. Alkylating agent (MNU)-induced mutation in space environment. *Adv Space Res*. 2001, 28(4): 563-8