

文章编号: 1004-7220(2014)06-0582-07

空间细胞生物反应器技术研究进展

上官冰^{1,2}, 孙树津², 高宇欣², 侯文生¹, 龙勉²

(1. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044; 2. 中国科学院力学研究所 微重力重点实验室, 生物力学与生物工程中心, 北京 100190)

摘要: 为了研究空间微重力环境对生命系统的影响, 在空间进行细胞生物学实验是不可或缺的环节。空间细胞生物反应器作为支持空间生命科学的重要技术手段, 直接影响到空间实验数据的质量和水平。迄今为止, 空间细胞生物反应器技术仍在发展之中, 尚无统一标准。综述空间细胞生物反应器发展的现状, 介绍几类典型空间细胞生物反应器的工作原理, 着重分析培养液供应方式和空间流体力学环境的特点, 并简要分析对温度、溶氧、溶液 pH 值等过程参数控制及在线显微观测技术, 以期探讨空间生物反应器的未来发展方向。

关键词: 空间生物反应器; 微重力; 微流体技术; 参数控制; 显微成像

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Technical advances in space cell bioreactor

SHANGGUAN Bing^{1,2}, SUN Shu-jin², GAO Yu-xin², HOU Wen-sheng¹, LONG Mian²

(1. Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Key Laboratory of Microgravity, Center of Biomechanics and Bioengineering, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Cell biology experiments in space are indispensable for investigating the effects of microgravity environment on living organisms. As an important technological means of supporting life science research, space cell bioreactor may directly influence the data quality of space cell biology experiments and research level. To date, space cell bioreactor techniques are still under development, and lack of standard rationale. In this article, the technical progresses of space cell bioreactor were reviewed, by introducing the operational principle of several typical space cell bioreactors, analyzing the mode of culture medium supplying and character of fluid mechanics environment in space, as well as the relevant supporting techniques about the parametric controlling on temperature, dissolved oxygen and pH value and on-line microscopic imaging, so as to discuss the future perspective about space cell bioreactor techniques.

Key words: Space bioreactor; Microgravity; Microfluidic technique; Parametric control; Microscopic imaging

空间环境下, 因重力消失会导致宇航员骨质流失、心血管功能失调、免疫功能抑制等一系列生理变化^[1-4], 细胞作为构成生命有机体的基本结构和功能单位, 研究其在空间环境下的生长情况无疑是了解宇航员在空间活动中所产生生理变化的重要基础。此外, 在空间微重力环境下, 由于细胞不再发生重力

沉降而聚集, 可能利于细胞的三维生长和高密度培养, 或可利用空间环境培养出品质优良的“种子”细胞以用于内源性药物的制备^[5]。

由于空间环境下重力引起的对流、沉降、静水压趋于消失, 气-液界面形式以及传质、传热特性均发生改变, 同时受到空间资源(体积、重量和功耗等)

收稿日期: 2014-03-27; 修回日期: 2014-04-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 973 项目(2011CB71090), 中国科学院空间科学战略性先导专项(XDA04020219)。

通信作者: 侯文生, 教授, Tel: (023) 65111931; E-mail: wshoucq@163.com;

孙树津, 高级工程师, Tel: (010) 82544132; E-mail: sunshj@imech.ac.cn。

以及可操作性的限制,在空间进行细胞培养无法使用地面常用的细胞培养容器和装置,需要研制专门适用于空间环境的细胞生物反应器。空间细胞生物反应器同样需要满足地面培养装置所具备的承载、温控、培养液供应、气体交换和 pH 缓冲功能,但在其功能实现上必须考虑空间微重力环境的力学特点,尤其是重力变化引起的流体力学行为改变,并且基本上依赖于自动控制操作。

本文总结了空间细胞生物反应器的发展现状,对温度、溶氧、pH 值等参数控制以及显微观测等关键技术进行分析,并探讨空间细胞生物反应器技术的发展方向。

1 空间细胞生物反应器的主要类型

目前已经进行过空间飞行的典型的生物反应器主要有转筒式生物反应器(rotating wall vessel bioreactor, RWVB)、灌流式生物反应器(perfusion bioreactor, PB)。

转筒式生物反应器^[6](见图 1(a))将细胞或接种有细胞的微载体注入充满培养液的圆筒状培养器,在一定的旋转速度下,可实现细胞三维培养。然而, RWVB 因为密封需求难以实现在线换液,随着营养物质的耗尽和代谢废物的积累,细胞将停止生长,限制了培养时间和培养量。

灌流式生物反应器^[7](见图 1(b))通过灌流方式实现特定流速下新、旧培养液的在线更替,为细胞样品的生长代谢提供稳定的环境,可能实现长时间连续培养。然而,如果灌流带来较大的流体剪切会对细胞造成损伤或机械刺激,故设计培养液灌流方式时,既要促进物质交换还要尽可能地降低流动剪切^[7]。目前,已有若干种形式的灌流式生物反应器在空间实验中得到应用^[8-9]。

旋转灌流式生物反应器(rotating perfused bioreactor)结合了转筒式生物反应器和灌流式生物反应器的特点,由两个同心圆筒组成,培养液及细胞样品位于两个圆筒之间,进料泵连续地向培养容器中输送溶有氧气的新鲜培养液,培养容积内的培养液通过中心轴上的排液孔排出,从而使培养体系内营养液得到更新。同时,通过两个圆筒的差速旋转以及端部效应来产生二次流,借以提高对流水平,克服空间微重力下物质交换不充分的问题^[8]。然而,旋转

灌流式具有设备体积相对较大、不易取样且可操作性不强、易形成气泡并不易消除等缺点。

美国陆军医学研究院(WRAIR)研制的空间细胞培养模块^[10](cell culture module, CCM),包括一系列的筒式灌注单元,每个单元可以是培养细胞的中空纤维培养器或组织培养筒,由蠕动泵驱动培养液循环并在培养器外进行气体交换。中空纤维培养器(见图 1(c))通过纤维管壁薄膜渗透来进行物质交换,供应在管外黏附生长的细胞,这样细胞不会直接经受纤维管内流体的剪切,只要流量控制在一定范围内即可控制流动剪切水平。该反应器具有高培养密度,一定程度上可以减轻流动剪切力等特点,并于航天飞机飞行实验(任务 STS-45)中成功培养了哺乳类动物细胞^[10-13]。然而,如果培养液流速不是足够快,营养成分会沿纤维管壁形成较大的梯度,不利于营养的均衡供应,难以实现细胞的均匀种植。此外,将中空纤维培养器应用于空间实验,细胞的观察与收获也很不方便。

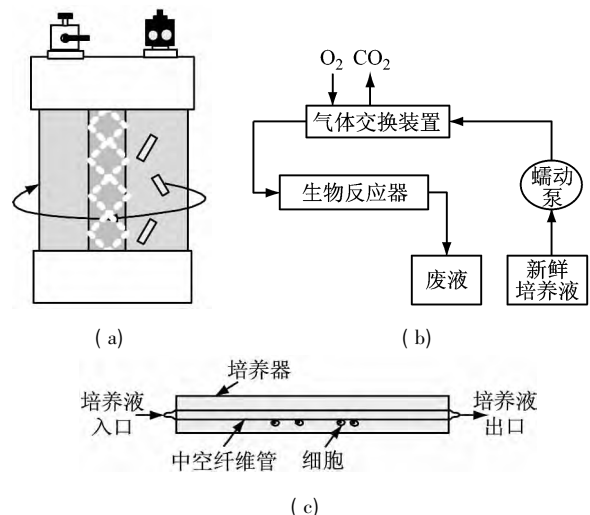


图 1 3 种典型空间细胞生物反应器示意图 (a) 转筒式生物反应器, (b) 灌流式生物反应器, (c) 中空纤维生物反应器

Fig. 1 Schematic diagram of 3 typical space cell bioreactors

(a) Rotating wall vessel bioreactor, (b) Perfusion bioreactor, (c) Hollow fiber bioreactor

灌流腔式生物反应器是美国宇航局(NASA)在国际空间站上开发的专用的细胞培养单元组件(cell culture unit, CCU)的组成部分。其细胞样品室(cell specimen chamber, CSC)为柱状容积,周边和底部使用可以通透培养液但能阻挡细胞的多孔薄膜将 CSC

的有效细胞培养空间隔离出来。培养液由底部灌注进入细胞培养空间,而通过四周的多孔薄膜流出,进入培养液循环回路,同时培养液腔室通过磁力搅拌棒使培养液混合均匀^[8-10]。从已有的文献资料来看,该反应器试图设计成为面向多种培养对象的空间通用实验设备,但其结构和内部流场均很复杂,从空间实验对可靠性要求以及力学环境的量化角度来看是很不利的,仍有待于更多实验数据的验证。

为了解决灌注式生物反应器的流动剪切问题,使各营养成分和 pH 值梯度尽量减少,孙树津等^[10,14-16]设计了片层逆流培养反应器(counter sheet flow sandwich cell culture bioreactor, CSSCC)。CSSCC 由 3 层扁平片状腔室组成,利用可以透过培养液但能阻挡细胞的薄膜将中间的细胞培养单元与两侧的培养液输运单元隔离,通过对两侧培养液输运单元施加逆向流动提供相对均匀的物质交换。该反应器试图一方面维持足够的培养液流速,一方面降低流体剪切并促进均匀的物质交换,以期更好地分离流体剪切因素对重力条件变化因素的影响。CSSCC 于 2005 年 8 月搭载我国第 22 颗返回式卫星成功进行了胎盘滋养层肿瘤细胞的培养和细胞糖代谢与激素分泌实验,但该反应器在细胞固定和在线显微观测等自动操作需求上仍需进一步改进。

灌注式空间细胞生物反应器一般借助于流动回路系统实现对培养液物质交换的控制,液体系统是液密的回路,但须具有与外界气体交换的功能。一般的灌注式空间细胞生物反应器系统原理图如图 2 所示。

生物反应器的微型化有利于解决细胞培养结构中营养成分存在梯度的问题。Wu 等^[17]设计了微型三维细胞灌注培养平台,利用微流体技术,通过气动微泵驱动气室带动 PDMS 膜产生脉动效应,促进培养基在微流道中流动;该平台能够提供均匀稳定的细胞培养环境、高效的介质输送以及细胞装载,同时减少人工介入,可以实现更高精度和高产量的细胞培养实验。此外,Cui 等^[18]还设计了一种基于微模式化基底的灌注式生物反应器,可以实现对单个细胞的铺展形态控制,还可通过计算分析优化流速、壁面剪切力、压差等流体动力学参数。上述技术如经过改进应用于空间实验,可满足空间环境下部分实验对细胞培养小体积、低功耗、精确智能控制的要求。

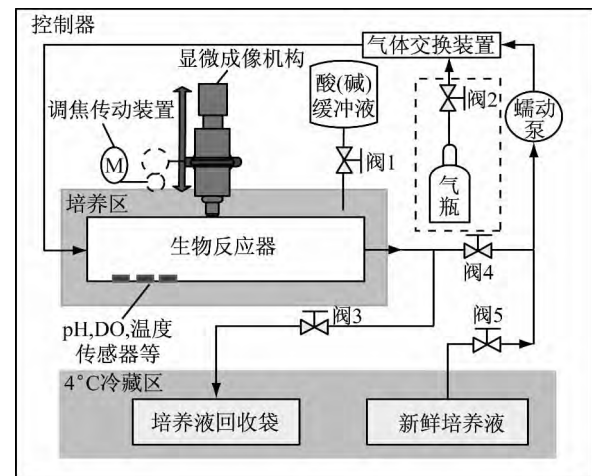


图 2 空间细胞生物反应器系统原理图(图中虚框部分为可选项,依航天器内部气体环境而定)

Fig. 2 Principle diagram of the space cell bioreactor

2 过程参数控制技术

2.1 温度监控

细胞生长和产物合成都需要合适的温度条件^[19-20],同时空间细胞培养实验往往需等到飞行器返回地面以后才能取得样品,故样品还需要低温保存;此外,尚未使用的新鲜培养液也需要低温保存。因此,空间实验系统一般需要设计两个温区,即进行细胞培养的 37 °C 温区和用于培养液或样品保存的低温区(4 或 0 °C 以下)。

2.1.1 温度传感器 用于空间生物反应器的温度检测元件有热电阻、热电偶以及 PN 结温度敏感元件^[21-22],其中热电阻 Pt100 因其体积小、响应快、检测精度高、稳定性好等特性在细胞生物反应器中得到了广泛应用。考虑到空间环境下对流传热不良,仅靠传导和辐射传热可能存在温度场分布不均匀的现象,常采用多个温度传感器固定于培养装置的不同位置来同时监测温度。

2.1.2 温度控制 常用的加热器有硅胶加热膜、加热电阻丝、半导体制冷片等,其中半导体制冷片工作时,N、P 两端会产生温差而形成冷热端,故可以通过合适的热设计,使半导体制冷片为培养区供热的同时为低温区制冷,充分利用空间资源。为了防止温度过冲,温度控制采用 PID 算法^[21],通过脉宽调压控制加热器的工作功率。由于微重力环境下对流较

差,如果需要控温的实验系统容积较大,必须采取强迫对流(如风扇等)以促进控制容积内温度的均匀分布。

2.2 溶氧(dissolved oxygen, DO)监控

培养液中的氧分压对细胞的增殖、分化以及产物的生成有重要影响^[23-24],而空间微重力条件下物质交换率大为下降,培养液中的溶解氧常常满足不了细胞代谢所需耗氧量,故检测空间培养系统溶解氧浓度、控制氧分压成为空间生物反应器的关键技术之一。

2.2.1 DO 传感器 传统的 Clark 氧电极^[25]通过检测扩散电流测定氧浓度,该电极需要经常更换电解液和薄膜,且消耗氧,不适用于长时间的检测。光纤氧电极^[26-28]将可被氧猝灭的荧光指示剂制成氧传感膜固定于光纤端部,由发光二极管和光电二极管共同组成检测系统,通过检测荧光强度或荧光寿命测定氧浓度。与 Clark 氧电极相比,光纤氧电极可以实现溶解氧的在线连续监测,具有灵敏度高、响应速度快、体积小、质量轻等优点,适用于空间生物反应器中溶解氧的测定。

2.2.2 DO 控制 为了确保空间微重力条件下细胞代谢对溶解氧浓度的需求,目前的空间细胞生物反应器有利用模拟重力场和膜式增氧两种增加溶氧的方式。

旋转式空间生物反应器由外层储备气体的圆筒以及中间的细胞培养区组成,利用旋转产生离心力场来模拟重力场^[29],使气液相对运动而提高氧的传递速率,增加溶解氧浓度,但这种方法旋转耗能大,空间利用率低而且剪切应力大。膜式增氧是通过由半透膜制成的通气管浸入培养基进行通气^[30],根据需要还可以通过迂绕管路等方法增大气体交换面积,这种方法可以减少在增氧过程中产生气泡,而且剪切应力低,空间利用率高,故发展前景较大。

增加空间生物反应器溶氧还可以配合使用氧载体和表面活化剂技术^[31]。氧载体技术利用合成血红蛋白模拟物、全氟碳化合物等氧载体来增加溶氧,表面活化剂细化气泡,增加气泡的表面积从而增加氧传质速率。但这些技术应用于以自动化操作为主的空间无菌、液密系统仍面临相当的技术难度。

2.3 pH 监控

2.3.1 pH 传感器 空间实验设备不易在线维修,

为了降低失败风险,避免培养液污染,用于检测 pH 的探针最好不与培养液接触;且由于空间实验飞行时间较长,不便于更换探针,探针最好可以进行长时间连续使用,并满足细胞培养的灭菌要求。

传统的电化学 pH 电极通过测量电位变化检测 pH 值^[32],氢离子敏感场效应管^[33]通过检测与氢离子浓度相关的漏极电流检测溶液的 pH 值,但这两种电极均易受环境影响,且不能进行高温高压灭菌。典型的光纤 pH 电极^[34]通过在光纤端面固定包被有酸碱指示剂的 pH 敏感膜制成,通过检测光强或荧光效应来检测溶液的 pH 值;然而基于敏感膜的光纤 pH 电极易受光漂白的影响,并会因为酸碱指示剂的析出而影响电极的准确性。

非接触光电式 pH 传感器^[35]利用培养液中的苯酚红作为酸碱指示剂,当 pH 改变时,苯酚红对绿光(558 nm 波长)的吸收特性发生改变,对红光(625 nm 波长)无特异性吸收,通过检测绿光和红光接收光强的比值检测溶液的 pH 值。因此,可将光电探头放置在透明管路外部监测 pH 值,满足空间实验设备对非接触、避免污染、稳定性高、可进行长时间检测的要求,适用于空间生物反应器。美国 NASA 开发研制的光电式 pH 传感器可以检测的 pH 量程在 6.5 ~ 7.5,精度可达 ± 0.1 pH 单位,经一次标定后可连续使用 120 d。

2.3.2 pH 控制 实验室常规的培养系统利用 CO₂ 气体与培养液内 NaHCO₃ 组成的缓冲系统来维持 pH 的稳定,然而空间实验系统是封闭式的培养系统,需要自行携带 CO₂ 压力气瓶,所供应的气体有限,不适合相对长期或大量的细胞培养;此外,航天器对于携带压力容器的要求也比较苛刻,从而增加实验成本。Lee 等^[36]通过往培养器中直接添加碱(酸)性溶液来调节溶液的 pH 值,通过 pH 传感器反馈信号控制酸(碱)液泵的工作状态,进而控制酸(碱)溶液的注入量,不失为一种替代方法。

3 在线显微观测技术

对于空间细胞培养实验,细胞显微图像的实时采集对于观察细胞不同时期的形态、大小、数量,深入研究空间细胞生长特性有重要的意义^[37-38]。

地面观察细胞的显微成像系统通常由光源、显微镜和电荷耦合元件(CCD)组成^[39-41]。由于空间

实验人工操作性差,且发射时运载条件(如冲击、振动、过载)和在轨运行时环境条件(如压力、温度、微重力等)的变化可能造成相机的焦平面产生不同程度偏移,为了保证成像质量,相机在空间投入使用前需进行调焦并固定焦面。虽然也可以通过地面遥控的方式操控机械结构调节焦距,但这只适合于对实时性要求不高的情况。

全自动显微成像系统^[42-43]借助调焦装置实现自动聚焦功能。常见的调焦机构有丝杆丝母调焦和凸轮调焦两种方式,丝杆丝母调焦易于加工,费用低,但在真空低温条件下易产生卡滞现象,抗冲击振动能力差;而凸轮调焦方式精度高,凸轮、齿轮等运动件表面经特殊处理后无冷焊、无卡滞现象,有很好的抗冲击振动能力,故空间实验中适合用凸轮调焦。同时,可借助计算机通过全自动聚焦算法反馈控制调焦机构实现聚焦,并通过图像采集卡和计算机技术实现图像实时采集、传输、观测。具有自动调焦功能的在线显微图像获取技术将是空间细胞生物反应器系统外围设备的发展方向。

4 总结与展望

随着航天技术的发展,空间生命科学研究的方学与技术需求日趋迫切。到目前为止,空间细胞生物反应器经历了从静态的批量培养、动态的连续灌流式培养到在线监测、显微观察的细胞培养的发展变化^[1-3]在一定程度上满足了空间细胞培养的要求。但鉴于空间实验条件的特殊性,空间细胞生物反应器面对的技术难题仍很多,特别是在与规范和量化实验条件(尤其是力学条件)相关的实验参数监控技术与数据获取技术方面。这些技术障碍一方面缘于空间环境条件的客观需求,另一方面缘于空间飞行器发射、运行和回收条件的制约。空间实验资源稀缺、代价高昂且设备不易在线维修,对自动化操作、防振性能以及可靠性要求非常高,实验技术的开发必须考虑上述特点。

未来空间细胞生物反应器的发展亟需提升以下关键技术:①利用微流体控制技术,实现培养装置的小型化,同时解决各营养成分和pH值的梯度问题;②利用增氧技术控制合适的氧浓度;③利用传感器

微型化和光学传感器技术,实现温度、pH、DO等过程参数的实时、长时程精确检测,并通过电路反馈系统实现参数的自动调节;④借助调焦机构和全自动聚焦算法实现自动聚焦、多点拍摄的全自动显微成像系统;⑤生物样品的在线处理和保存技术。

上述微流体控制技术、传感技术、显微成像技术以及计算机技术等的发展,将进一步促进空间生物反应器的小型化、自动化、智能化以及易操作性^[13-22],从而促进空间细胞生物学实验研究朝着定量、可控、规范化方向发展,为阐明细胞对空间环境特别是重力环境改变的响应机制提供方法学基础^[44-45]。

参考文献:

- [1] Buravkova LB, Grigorieva V, Rykova MP. The effect of microgravity on the in vitro NK cell function during six International Space Station Missions [J]. *Microgravity Sci Technol*, 2007, 19(5-6): 145-147.
- [2] Slenzka K. Neuroplasticity changes during space flight [J]. *Adv Space Res*, 2003, 31(6): 1595-1604.
- [3] Wilson JW, Ott CM, Zu Bentrup KH, et al. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(41): 16299-16304.
- [4] 秦岭. 力学刺激促进成骨和骨再生 [J]. *医用生物力学*, 2012, 27(2): 129-132.
Qin L. Mechanical stimulation enhances osteogenesis and bone generation [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(2): 129-132.
- [5] Board SS. A strategy for research in space biology and medicine in the new century [M]. Washington DC, USA: National Academy Press, 1998.
- [6] Song K, Liu T, Cui Z, et al. Three-dimensional fabrication of engineered bone with human bio-derived bone scaffolds in a rotating wall vessel bioreactor [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 86(2): 323-332.
- [7] Horner M, Miller WM, Ottino JM, et al. Transport in a grooved perfusion flat-bed bioreactor for cell therapy applications [J]. *Biotechnol Prog*, 1998, 14(5): 689-698.
- [8] Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues [J]. *Adv Space Biol Med*, 2001, 8: 177-195.
- [9] Vunjak Novakovic G, Searby N, De Luis J, et al. Micro-

- gravity studies of cells and tissues [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 974(1): 504-517.
- [10] 龙勉,孙树津,霍波. 第8章:空间生物技术[M]//胡文瑞. 微重力科学导论. 北京:科学出版社,2010: 323-363.
- [11] Piret JM, Cooney CL. Model of oxygen transport limitations in hollow fiber bioreactors [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37(1): 80-92.
- [12] Tharakan JP, Chau PC. A radial flow hollow fiber bioreactor for the large-scale culture of mammalian cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28(3): 329-342.
- [13] Walther I, Van Der Schoot B, Boillat M, et al. Performance of a miniaturized bioreactor in space flight: Microtechnology at the service of space biology [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27(10): 778-783.
- [14] Sun SJ, Gao YX, Shu NJ, et al. A novel counter sheet-flow sandwich cell culture device for mammalian cell growth in space [J]. *Microgravity Sci Technol*, 2008, 20(2): 115-120.
- [15] Hu W, Long M, Kang Q, et al. Space experimental studies of microgravity fluid science in China [J]. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(22): 4035-4048.
- [16] Long M, Sun SJ, Huo B, et al. Biomechanics on cell responses to microgravity [M]//Hu WR. *Advances in microgravity sciences*. USA: Transworld Research Network Press, 2010: 215-233.
- [17] Wu M, Huang S, Cui Z, et al. Development of perfusion-based micro 3-D cell culture platform and its application for high throughput drug testing [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2008, 129(1): 231-240.
- [18] Cui YH, Huo B, Sun SJ, et al. Fluid dynamics analysis of a micropatterned cell bioreactor [J]. *Ann Biomed Eng*, 2011, 39(5): 1592-1605.
- [19] Chen Z, Wu B, Liu H, et al. Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture [J]. *J Biosci Bioeng*, 2004, 97(4): 239-243.
- [20] Yoon SK, Song JY, Lee GM. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 82(3): 289-298.
- [21] Altman GH, Stark P, Martin I, et al. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering [J]. *J Biomech Eng*, 2002, 124(6): 742-749.
- [22] Walther I, Van Der Schoot BH, Jeanneret S, et al. Development of a miniature bioreactor for continuous culture in a space laboratory [J]. *J Biotechnol*, 1994, 38(1): 21-32.
- [23] Heijnen JJ. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 53(2): 168-178.
- [24] Piiper J, Scheid P, Perry SF, et al. Effective and morphometric oxygen-diffusing capacity of the gills of the elasmobranchs *Scyliorhinus stellaris* [J]. *J Exp Biol*, 1986, 123(1): 27-41.
- [25] Carritt DE, Kanwisher JW. Electrode system for measuring dissolved oxygen [J]. *Anal Chem*, 1959, 31(1): 5-9.
- [26] Kroneis HW, Marsoner HJ. A fluorescence-based sterilizable oxygen probe for use in bioreactors [J]. *Sens Actuators*, 1983, 4: 587-592.
- [27] Mcevoy AK, McDonagh CM, Maccraith BD. Dissolved oxygen sensor based on fluorescence quenching of oxygen-sensitive ruthenium complexes immobilized in sol-gel-derived porous silica coatings [J]. *Analyst*, 1996, 121(6): 785-788.
- [28] Papkovsky DB. New oxygen sensors and their application to biosensing [J]. *Sens Actuators B Chem*, 1995, 29(1): 213-218.
- [29] Garcia HE, Locarni RA, Boyer TP, et al. Dissolved oxygen, apparent oxygen utilization, and oxygen saturation [M]//Levitus S. *World Ocean Atlas 2005*. Maryland, USA: US Department of Commerce, 2006.
- [30] Kirk TV, Szita N. Oxygen transfer characteristics of miniaturized bioreactor systems [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(4): 1005-1019.
- [31] Körner H, Zumft WG. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(7): 1670-1676.
- [32] Walther I, Van Der Schoot B, Boillat M, et al. Microtechnology in space bioreactors [J]. *Chimia (Aarau)*, 1999, 53(3): 75-80.
- [33] Cane C, Gracia I, Merlos A. Microtechnologies for pH IS-FET chemical sensors [J]. *Microelectronics J*, 1997, 28(4): 389-405.
- [34] Lobnik A, Majcen N, Niederreiter K, et al. Optical pH sensor based on the absorption of antenna generated europium luminescence by bromothymolblue in a sol-gel membrane [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2001, 74(1): 200-206.
- [35] Jeevarajan AS, Vani S, Taylor TD, et al. Continuous pH monitoring in a perfused bioreactor system using an optical pH sensor [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78(4): 467-472.
- [36] Lee HL, Boccazzi P, Ram RJ, et al. Microbioreactor arrays with integrated mixers and fluid injectors for high-

- throughput experimentation with pH and dissolved oxygen control [J]. *Lab Chip*, 2006, 6(9): 1229-1235.
- [37] Tucker KG, Chalder S, Al-Rubeai M, *et al.* Measurement of hybridoma cell number, viability, and morphology using fully automated image analysis [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(1): 29-35.
- [38] Wingate R, Kwint M. Imagining the brain cell: The neuron in visual culture [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(9): 745-752.
- [39] Kluge JA, Leisk GG, Cardwell RD, *et al.* Bioreactor system using noninvasive imaging and mechanical stretch for biomaterial screening [J]. *Ann Biomed Eng*, 2011, 39(5): 1390-1402.
- [40] Porter BD, Lin AS, Peister A, *et al.* Noninvasive image analysis of 3D construct mineralization in a perfusion bioreactor [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(15): 2525-2533.
- [41] Stephens DJ, Allan VJ. Light microscopy techniques for live cell imaging [J]. *Science*, 2003, 300(5616): 82-86.
- [42] Lee J, Kim K, Nam B, *et al.* Implementation of a passive automatic focusing algorithm for digital still camera [J]. *IEEE Transact Consum Electron*, 1995, 41(3): 449-454.
- [43] Ren S, Li J, Xie L. Automatic focusing technique based on gray scale difference method [J]. *Opto-electro Eng*, 2003, 30(2): 53-55.
- [44] Li H, Chen J, Zhang Y, *et al.* Effects of oriented substrates on cell morphology, the cell cycle, and the cytoskeleton in Ros 17/2.8 cells [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(9): 1085-1091.
- [45] 张晨, 吕东媛, 孙树津, 等. 地基微重力效应模拟影响骨髓间充质干细胞生物学行为及其调控机理 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(3): 285-291.
- Zhang C, Lv DY, Sun SJ, *et al.* Impacts from ground-based microgravity simulation on biological responses of bone marrow mesenchymal stem cells and the underlying mechanisms: A mini-review [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(3): 285-291.

~~~~~

(上接第 581 页)

- [36] Willinger R, Taleb L, Viguier P, *et al.* Rotation translation duality in head trauma: perceptive and objective evidence [C] // *Proceedings of International IRCOBI Conference on the Biomechanics of Impacts*. Lyon, France: IRCOBI, 1994: 63-76.
- [37] McIntosh AS, Lai A, Schilter E. Bicycle helmets: head impact dynamics in helmeted and unhelmeted oblique impact tests [J]. *Traffic Injury Prev*, 2013, 14(5): 501-508.
- [38] Mills NJ. Critical evaluation of the SHARP motorcycle helmet rating [J]. *Int J Crash*, 2010, 15(3): 331-342.
- [39] Lee HP, Gong SW. Finite element analysis for the evaluation of protective functions of helmets against ballistic impact [J]. *Comput Meth Biomech Biomed Eng*, 2010, 13(5): 537-550.