

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.51.008 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

李扬, 沈建成, 徐枫, 张华, 陈磊, 杨惠林, 施勤. 纳米细菌纤维素的细胞生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(51): 9541-9545.

## 纳米细菌纤维素的细胞生物相容性\*★

李扬<sup>1,2</sup>, 沈建成<sup>2</sup>, 徐枫<sup>2</sup>, 张华<sup>1</sup>, 陈磊<sup>3</sup>, 杨惠林<sup>1</sup>, 施勤<sup>1</sup>

**文章亮点:** 证实了细菌纤维素具有良好的生物相容性, 对细胞黏附和增殖无影响, 具有作为组织工程支架材料的可行性。

**关键词:** 细菌纤维素; CCK-8; 生物相容性; 组织工程; 生物材料

### 摘要

**背景:** 细菌纤维素是一种新型天然高分子材料, 具有良好的三维网状结构和高持水性等独特性能。

**目的:** 观察天然高分子材料细菌纤维素与细胞共培养的生物相容性。

**方法:** 采用静置培养方案制备细菌纤维素支架, 将处于对数生长期的 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞和 L<sub>929</sub> 细胞分别与细菌纤维素支架材料在体外共培养, 采用扫描电镜观察材料微结构, 倒置相差显微镜观察细胞生长及增殖情况, CCK-8 比色法检测细胞增殖率。

**结果与结论:** 细菌纤维素具有精细的三维结构, 纤维直径为纳米级别。C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞和 L<sub>929</sub> 细胞在细菌纤维素材料上可以很好地生长、增殖, 细胞状态为正常的梭型, 形态无明显变化; 两种细胞在细菌纤维素材料上的相对增殖率均 ≥100%, 细胞毒性为 0 级。说明细菌纤维素具有良好的生物相容性, 对细胞黏附和增殖无影响。

### Cellular biocompatibility of nano-bacterial cellulose

Li Yang<sup>1,2</sup>, Shen Jian-cheng<sup>2</sup>, Xu Feng<sup>2</sup>, Zhang Hua<sup>1</sup>, Chen Lei<sup>3</sup>, Yang Hui-lin<sup>1</sup>, Shi Qin<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Bacterial cellulose is a new type of biological polymer materials, characterized by the advantages such as three-dimensional structure and high hydrophilicity.

**OBJECTIVE:** To investigate the biocompatibility of the natural polymer bacterial cellulose by co-cultured with cells *in vitro*.

**METHODS:** Bacterial cellulose scaffold was prepared with static culture program. Then the C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells and L<sub>929</sub> cells in exponential phase of growth were co-cultured with bacterial cellulose *in vitro*. The morphology of bacterial cellulose scaffold was observed with scanning electron microscope. The growth and the proliferation of the cells were observed by using phase contrast microscope and the cell proliferation rate was measured by Cell Counting Kit-8 colorimetry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Bacterial cellulose had a fine three-dimensional structure and the fiber diameter was in the nano-level. The C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells and L<sub>929</sub> cells could *in vitro* grew and proliferate on the bacterial cellulose scaffold and showed fusiform shape; and their morphology did not changed significantly. The relative proliferation rates of C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells and L<sub>929</sub> cells on the bacterial cellulose scaffold were ≥100%. The cytotoxicity grade of bacterial cellulose was 0. Bacterial cellulose has good biocompatibility which is benefit to cell adhesion and proliferation.

Li Y, Shen JC, Xu F, Zhang H, Chen L, Yang HL, Shi Q. Cellular biocompatibility of nano-bacterial cellulose. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(51): 9541-9545.

<sup>1</sup> 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006; <sup>2</sup> 绍兴市中医院检验科, 浙江省绍兴市 312000; <sup>3</sup> 中国科学院遗传和发育生物学研究所, 北京市 100190

李扬★, 男, 1987年生, 山东省临沂市人, 汉族, 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院在读硕士。liyong87915@163.com

通讯作者: 施勤, 副教授, 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006 shiqin@suda.edu.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344  
(2012)51-09541-05

收稿日期: 2012-05-12  
修回日期: 2012-05-19  
(20120316006/GW-C)

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 21500, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Shaoxing City, Shaoxing 312000, Zhejiang Province, China; <sup>3</sup>Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China

Li Yang★, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 21500, Jiangsu Province, China liyang87915@163.com

Corresponding author: Shi Qin, Associated chief physician, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 21500, Jiangsu Province, China shiqin@suda.edu.cn

Supported by: Jiangsu Orthopaedic Clinical Center\*

Received: 2012-05-12  
Accepted: 2012-05-19

## 0 引言

组织工程是应用工程学和生命科学原理, 以支架材料为载体, 结合有修复潜力的种子细胞、生长因子, 通过体内或体外继续培养, 进而构建出有生命活力的器官组织。在组织工程中如何选择合适的支架材料一直是这一领域的研究重点。

目前在组织工程中应用较广泛的有聚乳酸、聚羟基乙酸、胶原及壳多糖等材料<sup>[1-2]</sup>。但某些生物材料如聚乳酸在降解后会产生酸性环境, 不利于细胞的生长和组织修复, 并可引发无菌炎症。细菌纤维素是一种天然的生物材料, 由生长在液态含糖基质中的细菌产生<sup>[3-4]</sup>。细菌纤维素是葡萄糖以 $\beta$ -1,4糖苷键连接而成的高分子聚合物, 有很多其他材料所不具备的特点, 比如: 良好的生物可降解性; 高结晶度, 高聚合度和非常一致的分子取向; 极强的持水性和透水透气性, 能吸收其干质量60-700倍的水分; 良好的理化性能<sup>[5]</sup>。此外, 细菌纤维素的纳米纤维结构与细胞外基质的结构类似, 有利于组织的传导和再生, 这种优良的性能使得细菌纤维素成为生物材料中的研究热点。但合适的支架材料还需要有良好的生物相容性, 组织工程材料的一个前提就是不能有排斥反应。

生物相容性是指生物材料和生物体组织接触后, 产生的各种生物、物理、化学等反应, 最终被生物体组织相容的程度。用生物材料的浸提液或将材料直接与细胞接触共培养, 观察材料对组织细胞生长、代谢及增殖方面的影响是对生物材料相容性的一种有效评价<sup>[6]</sup>。

本实验选择了两种细胞毒性实验中常用的C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>细胞(小鼠成肌细胞)和L<sub>929</sub>细胞(小鼠成纤维细胞)与细菌纤维素共培养, 观察细胞的生长状态和检测细胞的相对增殖率, 评价细菌纤维素的生物相容性。

## 1 材料和方法

**设计:** 体外细胞学实验。

**时间及地点:** 于2011年8月至12月在苏州大学骨科实验室和中国药品生物制品检定所医疗器

械检测中心完成。

**材料:**

**支架材料与细胞株:** 细菌纤维素, 由中国科学院遗传和发育生物学研究所提供。小鼠成肌细胞(C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>细胞株)与小鼠成纤维细胞(L<sub>929</sub>细胞株), 由协和细胞库提供。

**试剂与仪器:**

试剂及仪器	来源
高糖 DMEM 培养基、胎牛血清	Gibco 公司
0.25%胰酶、二甲亚砜	Sigma 公司
CCK-8	博士德生物工程有限公司
CO <sub>2</sub> 培养箱	REVCO 公司
倒置相差显微镜	IX71 型, 日本 OLYMPUS 公司
离心机	TD5A-WS, 湘仪公司
酶联免疫检测仪	SPECTRA MAX plus 384, 美国 Molecular Devices 公司
微量振荡仪	MS-2 型, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司
单人双面超净台	SW-CJ-1F 型, 中国苏州净化集团

**实验方法:**

**细菌纤维素支架材料的准备:** 将细菌纤维素切成合适的5 mm×5 mm×2 mm大小, 8 000 Gy的<sup>60</sup>Co辐照射线灭菌, 无菌存放于4 ℃, 备用。

**C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>细胞和L<sub>929</sub>细胞的体外传代培养:** 取C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>和L<sub>929</sub>细胞株于37 ℃水浴中解冻, 迅速将细胞吸入有高糖DMEM培养基(含体积分数10%胎牛血清)的离心管中, 离心半径13 cm, 1 000 r/min离心5 min。弃上清, 将细胞悬浮并接种于培养基中(含体积分数10%FBS、青霉素1.0×10<sup>5</sup> U/L、链霉素100 mg/L), 置入37 ℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的孵箱内培养, 第2天全量换液。待细胞长至瓶底80%-90%面积时, 按1:4进行消化传代。两种细胞做相同处理。

**细胞和细菌纤维素的体外共培养:** 收集对数生长期的两种细胞, 调整细胞悬液浓度, 分别以6×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>的种浓度接种于96孔板中, 加高糖DMEM培养基调整至每孔100 μL、每孔相应做5个复孔, 分组培养: 实验组、空白对照组(加了相应量培养液但未加入细胞)、阳性对照组(用含5%二甲亚砜的培养液培养细胞)、阴性对照组(正常培养的细胞)。放入培养箱内培养, 待细

胞单层铺满孔底后, 实验组每孔加入一块无菌的细菌纤维素材料。两种细胞做相同条件的处理。

**细胞状态观察:** 共培养48 h后, 用倒置显微镜观察细胞的形态和结构变化。

**细胞增殖检测:** 在培养12, 24, 48, 72 h后分别取一块96孔板, 以CCK-8法测定细胞活力: 将孔内的细菌纤维素材料取出, 同时小心吸弃培养液, 用PBS洗1遍; 每孔加100  $\mu$ L新鲜培养液和10  $\mu$ L的CCK-8溶液, 在细胞培养箱内继续孵育1 h; 酶联免疫检测仪在450 nm处测定吸光值, 参考波长为630 nm; 绘制两种细胞各自的生长曲线, 计算细胞相对增殖率<sup>[7]</sup>, 细胞毒性评级标准参考ISO-10993-5细胞毒性试验<sup>[8]</sup>。

$$\text{细胞相对增殖率(\%)} = \frac{\text{实验组平均吸光度值}}{\text{空白对照组平均吸光度值}} \times 100\%$$

**细胞毒性评级标准:** 0级, 细胞相对增殖率 $\geq 100\%$ ; 1级, 细胞相对增殖率80%–99%; 2级, 细胞相对增殖率50%–79%; 3级, 细胞相对增殖率30%–49%; 4级, 细胞相对增殖率0–29%。

**主要观察指标:** 各组细胞生长及增殖情况。

**统计学分析:** 所得数据采用SPSS 17.0软件包进行方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 细菌纤维素的扫描电镜观察结果** 从仿生角度考虑, 具有三维有序纳米纤维结构的支架能更好地模仿天然细胞外基质结构, 具备生物功能, 实现与周围组织的整合。电镜照片显示细菌纤维素具有精细的三维结构, 纤维直径为纳米级别。细菌纤维素这种有序排列有利于细胞的取向和表型表达; 并且增强平滑肌细胞的黏附和增殖, 是骨组织工程的理想材料, 见图1。

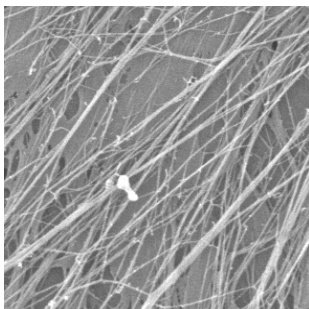
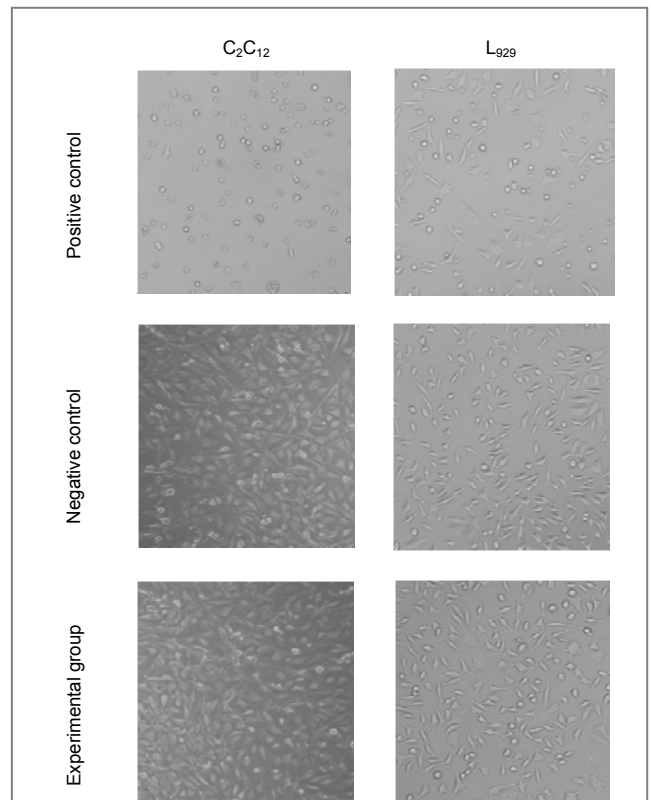


Figure 1 Image of bacterial cellulose under scanning electron microscope ( $\times 3\ 000$ )  
图 1 细菌纤维素的扫描电镜图片( $\times 3\ 000$ )

**2.2  $C_2C_{12}$ 和 $L_{929}$ 细胞与细菌纤维素共培养的生长状态观察** 刚接种的细胞成圆形, 在接种48 h后倒置相差显微镜下放大100倍观察细胞状态。由图2可以看到大部分 $L_{929}$ 细胞呈典型的长梭形, 生长良好; 由于 $C_2C_{12}$ 细胞生长较快, 细胞多呈梭形或多边形, 都有正常的分裂增殖现象; 并且实验组与阴性对照组无明显差异, 细胞形态良好; 随着培养时间的增长, 实验组细胞开始增多并有部分细胞会沿着支架材料表面生长, 阳性对照组细胞都出现了细胞状态变差、细胞膜通透性变大、细胞形态变圆甚至细胞裂解、死亡等现象。与细菌纤维素共培养的两细胞生长良好。

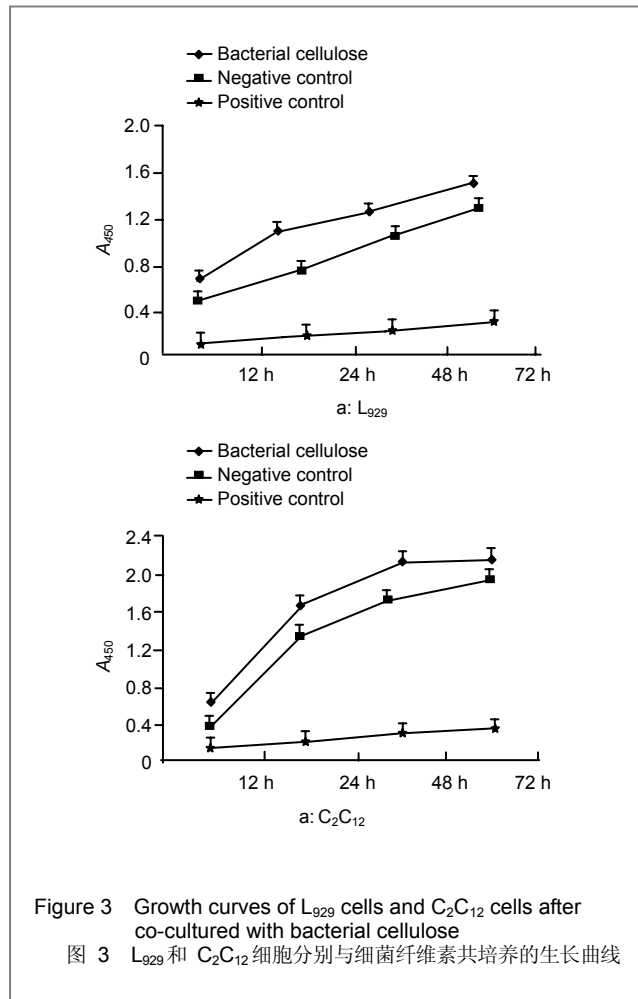


注: 实验组( $C_2C_{12}$ 或 $L_{929}$ 细胞与细菌纤维素共培养)、空白对照组(加了相应量培养液但未加入细胞)、阳性对照组(用含5%二甲基亚砜的培养液培养细胞)、阴性对照组(正常培养的细胞)。大部分 $L_{929}$ 细胞呈典型的长梭形, 生长良好; 由于 $C_2C_{12}$ 细胞生长较快, 细胞多呈梭形或多边形, 都有正常的分裂增殖现象; 并且实验组与阴性对照组无明显差异, 细胞形态良好; 随着培养时间的增长, 实验组细胞开始增多并有部分细胞会沿着支架材料表面生长, 阳性对照组细胞都出现了细胞状态变差、细胞膜通透性变大、细胞形态变圆甚至细胞裂解、死亡等现象。与细菌纤维素共培养的两细胞生长良好

Figure 2 Morphology of  $C_2C_{12}$  cells and  $L_{929}$  cells after co-cultured with bacterial cellulose for 48 h ( $\times 200$ )  
图 2  $C_2C_{12}$ 细胞和 $L_{929}$ 细胞分别与细菌纤维素共培养48 h后的形态变化 ( $\times 200$ )

**2.3  $C_2C_{12}$ 和 $L_{929}$ 细胞与细菌纤维素共培养的生长曲线** 由细胞的增殖实验测定可知,  $C_2C_{12}$ 和 $L_{929}$ 两种细胞接种后均能良好的生长、分裂、增殖, 实验组和阴性对照组随

时间延长细胞活性显著增加,且两组之间差异无显著性意义,见图3,它们各自的细胞相对增率 $\geq 100\%$ ,细胞毒性为0级;而阳性对照组的细胞毒性为4级。在24 h这个时间点上,实验组L<sub>929</sub>的细胞活性增长速率明显高于阴性对照组。对比a, b两图可以看到C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>比L<sub>929</sub>的细胞活性和增殖速度更高。以上结果说明纳米细菌纤维素对细胞生长没有抑制作用,属于合格无细胞毒性生物材料。



### 3 讨论

纤维素是自然界中已知的最丰富的生物聚合物。它是植物的重要组成成分,因此可以通过提取植物资源来获取纤维素,此外一些细菌也可以产生纤维素。细菌纤维素是葡萄糖以 $\beta$ -(1,4)-糖苷键连接而成的高分子聚合物,不含木质素和半纤维素,有很多植物纤维素所不具备的特点,比如良好的生物可降解性;高结晶度,高聚合度和非常一致的分子取向;极强的持水性和透水透气性,能吸收60-700倍其干质量的水分;更精细的纤维和网络结构,是目前最细的天然纤维

维<sup>[9-10]</sup>。

生物材料是组织工程发展的重点之一,由于材料多数直接与人体接触或进入体内与组织和细胞接触<sup>[11-12]</sup>,甚至会通过体液等循环进入体内器官<sup>[13]</sup>,因此必须具备良好的生物相容性而不引起毒性反应。L<sub>929</sub>细胞目前细胞毒性试验中最常用的一种,但随着生物材料的发展越来越复杂,单独采用L<sub>929</sub>细胞已不能满足检测的需要。根据不同的目的和要求方法与准则要不不断改进,如加入另一来源细胞做检测、改进活性检测方法,这样可使结果更客观和准确。

本实验采取了L<sub>929</sub>和C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>两种细胞作为检测标准和CCK-8法[WST-8, 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐]对材料细胞毒性进行评价。CCK-8是已被广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测法,它在电子载体的作用下被细胞线粒体中的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞水溶性结晶,细胞增殖越多越快,则颜色越深;细胞毒性越大,则细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶活性越低,反应颜色越浅。对于同种细胞,颜色的深浅和细胞数目呈线性关系<sup>[14]</sup>。与传统的MTT相比,WST-8具有更高的灵敏性和更宽的线性范围,且培养基里的酚红和血清对测定无明显影响。此实验结果显示,细菌纤维素对L<sub>929</sub>细胞和C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>细胞的黏附增殖、分化和分泌功能无明显影响,说明该材料无或低细胞毒性及良好的体外细胞亲和性。

与此同时,在细胞的生长状态观察实验中两种细胞种植于材料后,随着培养时间的延长,两种细胞数量都不断增加,生长状态良好,为长梭形或多边形;与正常培养条件下的细胞一样可以进行正常增殖。这表明细菌纤维素对细胞的形态结构和增殖没有明显影响。

以上结果表明,细菌纤维素具有良好的网状空间结构和体外生物相容性。良好的生物相容性是细菌纤维素作为组织工程材料的前提,但是长期植入体内的生物相容性如何尚需进一步研究<sup>[15]</sup>。

致谢:感谢中国药品生物制品检定所医疗器械检测中心徐建霞和王淑琴在实验上给予的帮助和支持。

### 4 参考文献

- [1] Chen YM, Xi TW, Zheng YD. Beijing Shengwu Yixue Gongcheng. 2008;27(5):541-546.  
陈艳梅,奚廷斐,郑裕东.骨组织工程支架材料及其相关的研究进展[J].北京生物医学工程,2008,27(5):541-546.

- [2] Wang HB, Luo SK. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2004; 8(20): 4063-4065.  
汪海滨, 罗盛康. 组织工程支架材料的研究现状[J]. 中国临床康复, 2004, 8(20):4063-4065.
- [3] Li J, Zhu P. Hecheng Xianwei. 2008; 37(6): 28-31.  
李静, 朱平. 木醋杆菌发酵生产细菌纤维素的研究[J]. 合成纤维, 2008, 37(6): 28-31.
- [4] Martínez-Sanz M, Lopez-Rubio A, Lagaron JM. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. Carbohydr Polym. 2011; 85(1): 228-236.
- [5] Gao C, Wan YZ, He F, et al. Keji Daobao. 2008; 26(22): 47-49.  
高川, 万怡灶, 何芳, 等. 细菌纤维素组织工程支架的仿生矿化研究[J]. 科技导报, 2008, 26(22): 47-49.
- [6] Zheng Q, Xi TW, Chen YM, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010; 14(3): 405-409.  
郑琪, 奚廷斐, 陈艳梅, 等. 纳米羟基磷灰石/细菌纤维素复合材料及其降解物的细胞相容性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(3): 405-409.
- [7] Zheng Q, Xi TW, Chen YM, et al. Yaowu Fenxi Zazhi. 2010; 30(7): 1389-1392.  
郑琪, 奚廷斐, 陈艳梅, 等. 细菌纤维素的生物相容性研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7): 1389-1392.
- [8] Cao XY, Weng GX, Xiao RD, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011; 15(21): 3834-3838.  
曹西迎, 翁国星, 肖荣冬, 等. 新型纳米纤维支架的细胞生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(21): 3834-3838.
- [9] Ha JH, Shah N, Ul-Islam M, et al. Bacterial cellulose production from a single sugar  $\alpha$ -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. Process Biochem. 2011; 46(1): 1717-1723.
- [10] Bae SO, Shoda M. Production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 67(1): 45-51.
- [11] Harmand MF. In vitro study of biodegradation of a Co-Cralloy using a human cell culture model. J Biomater Sci Polym Ed. 1995; 6(9): 809.
- [12] Hao HP. Beijing: Zhongguo Biaozhun Chubanshe. 2002: 100-101.  
郝和平. 医疗器械生物学评价标准实施指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 100-110.
- [13] Shvedova AA, Kisin E, Murray A, et al. Exposure of human bronchial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress and cytotoxicity. In: Proceedings of the Meeting of the SFRR Europe 2004, Ioannina, Greece. Philadelphia: Taylor & Francis Group, 2004: 91-103.
- [14] Tian ZH, Shen J, Ma XH, et al. Jiangsu Yiyao. 2009; 35(6): 654-656.  
田振华, 沈捷, 马向华, 等. 棕榈酸棕榈酯对人外周血单核细胞增殖的影响[J]. 江苏医药, 2009, 35(6): 654-656.
- [15] Wu ZF, Zhang X, Yi B, et al. Shipin yu Faxiao Keji. 2010; 46(1): 27-30.  
武志芳, 张霞, 易彬, 等. 新型生物材料细菌纤维素的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(1): 27-30.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 江苏省骨科临床医学中心资助项目。

**作者贡献:** 实验设计为第一、二、七作者, 资料收集与实验实施为第一、三、四作者, 实验评估为全部作者, 第七作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

#### 文章概要:

**文章要点:** 观察天然高分子材料细菌纤维素与细胞共培养的生物相容性。

**关键信息:** 细菌纤维素是一种新型天然高分子材料, 具有良好的三维网状结构和高持水性等独特性能。

**研究的创新之处与不足:** 将细菌纤维素与细胞在体外共培养, 采取公认标准的细胞毒性指标评价了细菌纤维素细胞的生物相容性。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。