· 实验研究 ·

细菌纤维素膜作为生物支架构建组织工程角膜上皮的可行性研究

曹静洁　张琛　赵少贞　万怡灶　胡达
300384 天津医科大学眼科医院
通信作者：赵少贞，Email：zhaosz1997@sina.com
DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.006

【摘要】 **背景**　目前角膜移植仍是治疗严重角膜疾病的主流方法，但角膜供体的不足使角膜移植疗法的应用受到限制。组织工程角膜上皮为角膜移植研究提供了新的途径，其中组织工程角膜的支架研究也是研究热点之一。细菌纤维素膜已作为生物材料广泛用于医药领域，其在组织工程角膜的支架研究方面的应用值得关注。 **目的**　以细菌纤维素膜作为支架，研究体外培养的兔角膜上皮细胞在细菌纤维素膜上生长情况，评估细菌纤维素膜的生物相容性。 **方法**　收集 1 月龄的新西兰白兔角膜上皮组织，采用组织块培养法对角膜上皮细胞进行培养和传代，采用免疫荧光技术检测细胞中 CK-3 的表达对培养的细胞进行鉴定。将第 2 代兔角膜上皮细胞消化后分别接种于细菌纤维素膜和培养皿，光学显微镜下观察和比较两组细胞的生长情况。于接种后第 3 天角膜上皮细胞在细菌纤维素膜上贴壁达到融合时加入 10 ml 含 5 μl 钙黄绿素-AM+20 μl 溴乙非啶同二聚体的无菌 PBS（LIVE/DEAD 细胞活性毒性检测），评估 2 种培养法细胞的活性率。细菌纤维素膜上培养的细胞固定后，扫描电子显微镜下检查角膜上皮细胞的表面超微结构。 **结果**　兔角膜上皮细胞原代培养后 1 周左右细胞生长良好，呈铺路石样排列并融合，免疫荧光检测显示培养的细胞 CK-3 表达阳性。接种于细菌纤维素膜上的细胞生长状态良好，呈圆形或椭圆形，呈铺路石样排列，LIVE/DEAD 染色后活细胞细胞核呈绿色荧光，细胞存活率为 100%。扫描电子显微镜下细菌纤维素膜上培养的兔角膜上皮细胞呈椭圆形，可见膜表面丰富的页状突起、丝状伪足及细胞间连接，并可观察到处于分裂相的细胞。上皮细胞通过丝状伪足紧密贴附于细菌纤维素膜。 **结论**　兔角膜上皮细胞在细菌纤维素膜上生长状态良好，细菌纤维素膜有较好的生物相容性，可作为构建组织工程角膜上皮的一种新型生物学材料。

【关键词】 角膜上皮/细胞学；组织工程；组织支架/微生物；生物相容材料；细胞培养；兔；细菌纤维素

基金项目： 国家自然科学基金青年基金项目（81200663）

Feasibility of bacterial cellulose membrane as biological scaffold for construction of tissue engineering corneal epithelium

Cao Jingjie, Zhang Chen, Zhao Shaozhen, Wan Yizao, Hu Da
Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China
Corresponding author: Zhao Shaozhen, Email: zhaosz1997@sina.com

[**Abstract**] **Background**　Corneal transplantation is a primary method for the treatment of serious corneal diseases, but its application is limited because of the shortage of corneal donor. The study on tissue engineering corneal epithelium provides a new approach to corneal transplantation, and the biological scaffold materials for tissue engineering corneal epithelium is an issue of increasing concern. Bacterial cellulose membrane has been used in medical field, but its application in tissue engineering corneal epithelium deserves more researching. **Objective**　This study was to evaluate the biocompatibility of bacterial cellulose membrane as a biological scaffold of tissue engineering corneal epithelium. **Methods**　Corneal epithelium was isolated from 1 month-old New Zealand White rabbit. Corneal epithelial cells were cultured using explant method and identified by detecting the CK-3 expression using immunofluorescence technique. The second generation cells were inoculated on bacterial cellulose membrane and culture plate, respectively, and the growth status of the cells were examined and compared under the optical

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

microscope. The cell activity/toxicity test was performed by LIVE/DEAD cell staining kit at the third day after inoculation to evaluate the survival rate. The ultrastructure of the cell surface was examined under the scanning electron microscope. The study was performed in accordance with the ARVO Statement. **Results** Rabbit corneal epithelial cells grew well 1 week after primarily cultured with a cobblestone-like appearance and positive response for CK3 antibody. The cells on the bacterial cellulose membrane presented a round shape and regular arrangement and showed the green fluorescence for LIVE/DEAD test, with the survival rate 100%. Abundant leafy protrusion, microvilli and intercellular junction were seen under the scanning electron microscope. In addition, mitosis phase of cells and many filopodia between the cells and bacterial cellulose membrane were also exhibited. **Conclusions** Rabbit corneal epithelial cells can grow well in bacterial cellulose membrane. Bacterial cellulose membrane has good biocompatibility, indicating that bacterial cellulose membrane can be used as new biological material for tissue engineering corneal epithelium.

[**Key words**] Epithelium, corneal/cytology; Tissue engineering; Tissue scaffolds/microbiology; Biocompatible materials; Cells, cultured; Rabbits; Bacterial cellulose

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81200663)

眼外伤、感染性角膜炎以及遗传性角膜病等均是致盲角膜病，角膜病是全球第二大致盲眼病，仅次于白内障。角膜移植仍是治疗角膜盲的主要方法，但目前角膜移植疗法存在较多局限性，如角膜植片供体不足、移植失败、免疫排斥反应等[1-2]。因此，组织工程角膜的研究受到越来越多的关注，构建组织工程角膜上皮为角膜盲患者提供了新的治疗途径。组织工程角膜上皮的体外重建除了需要理想的种子细胞外，支架材料也是至关重要的。组织工程支架是种子细胞生长、增生及分化的载体，必须满足材料透明、有良好的生物相容性、有合适的降解速率、无毒性且有一定韧性的要求。目前应用于组织工程角膜上皮的支架材料较多，但都存在不同程度的缺陷。细菌纤维素膜是一种天然的纳米生物材料，具有纯度高、弹性模量高、生物相容性良好、透明度高、可降解等特点，已用于人造皮肤、医用敷料以及组织工程等研究并取得了很大进展[3-6]，但其在角膜组织工程中的研究鲜有报道。本研究中以细菌纤维素膜作为支架材料进行组织工程角膜上皮研究，探讨其作为组织工程角膜上皮支架的可行性及应用前景。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　健康 1 月龄新西兰白兔 20 只，购于北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物的使用和喂养遵循美国 ARVO 声明。

1.1.2　主要试剂　DMEM 培养液、PBS、标准胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰酶替代物(美国 Gibico 公司)；CK3 免疫荧光试剂盒(美国 Abcam 公司)；LIVE/DEAD 染色试剂盒(美国 Biovision 公司)。细菌纤维素膜由天津大学材料科学与工程学院提供。

1.2　方法

1.2.1　兔角膜上皮细胞的培养及鉴定　取 1 月龄幼兔肌内注射氯胺酮和盐酸赛拉嗪注射液($V_{氯胺酮}$: $V_{盐酸赛拉嗪}$ = 6 : 4)进行麻醉，剂量为 0.3 ~ 0.4 ml/kg，然后用空气栓塞法处死，摘取眼球，浸泡于 D-Hanks 液中[含青霉素 100 U/ml(商品单位)，链霉素 100 μg/ml]，4 ℃冰盒保存运送至细胞培养室。无菌条件下用培养液冲洗眼球 3 次，用角膜剪沿角膜缘分离角膜并将角膜分成 4 等份，解剖显微镜下用有齿镊分离角膜上皮组织，用角膜剪将角膜上皮剪成 1 mm×1 mm 的组织块并接种于培养皿，加入含有体积分数 5% FBS 的 DMEM 培养液，置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养，次日上皮细胞从组织块中爬出后每 2 天换液 1 次。选取第 2 代角膜上皮细胞用于实验，按照 CK-3 免疫荧光试剂盒说明书行免疫荧光检测以鉴定细胞。

1.2.2　细菌纤维素膜上培养的角膜上皮细胞细胞活性/毒性测定　采用钙黄绿素-AM(calcein-AM)/溴乙非啶同二聚体(ethidium homodimer, EH)染色法对培养的细胞进行活性测定。取第 2 代兔角膜上皮细胞消化后分别接种到细菌纤维素膜和培养皿，次日于光学显微镜下观察细胞是否贴壁，待接种后第 3 天角膜上皮细胞在细菌纤维素膜上贴壁并达到融合时加入现配的荧光染液(5 μl 钙黄绿素-AM+20 μl EH 溶于 10 ml 无菌 PBS)，暗室内室温下孵育 20 min，PBS 洗涤，荧光显微镜下观察并拍照。培养皿中的角膜上皮细胞及乙醇灭活的角膜上皮细胞分别作为活细胞及死亡细胞的阳性对照。

1.2.3　扫描电子显微镜观察细菌纤维素膜培养的角膜上皮细胞　将第 3 代兔角膜上皮细胞消化后接种到

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

细菌纤维素膜上，将构建的组织工程角膜上皮标本用质量分数 2.5% 的戊二醛固定 24 h，PBS 漂洗 3 次，然后用质量分数 1% 锇酸固定 2 h，乙醇梯度脱水，再经醋酸异戊酯置换，CO_2 临界真空干燥，经 BAL-TEC 离子溅射后进行扫描电子显微镜检测，观察角膜上皮细胞的生长情况、细胞表面的超微结构以及细菌纤维素膜的生物相容性。

2　结果

2.1　体外培养的兔角膜上皮细胞的生长状态及鉴定结果

角膜上皮细胞于培养第 2 天开始从组织块边缘贴壁爬出，细胞呈圆形，培养后 3 d 细胞生长速度较快，培养 1 周左右细胞基本爬满培养皿（图 1A）。光学显微镜下观察细胞生长良好，细胞呈铺路石状，细胞彼此融合。免疫荧光检测显示培养的细胞 CK-3 表达阳性（图 1B ~ D）。

2.2　细菌纤维素膜上角膜上皮细胞的形态及活性

将兔角膜上皮细胞接种到细菌纤维素膜上后观察，角膜上皮细胞在细菌纤维素膜上生长状态良好，细胞呈圆形或椭圆形，排列紧密，呈铺路石样（图 2）。LIVE/DEAD 染色后，活细胞呈绿色，死亡细胞呈红色荧光，定位于细胞核。细菌纤维素膜上的角膜上皮细胞存活率为 100%（图 3）。

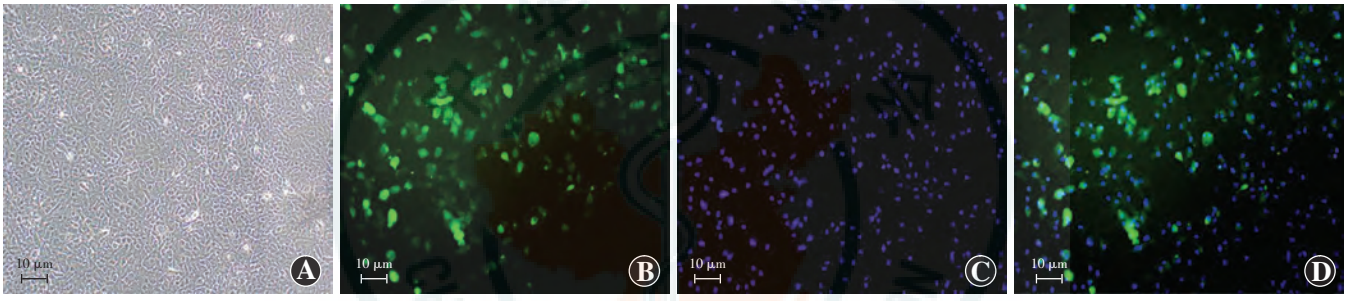
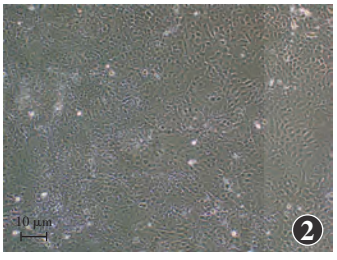
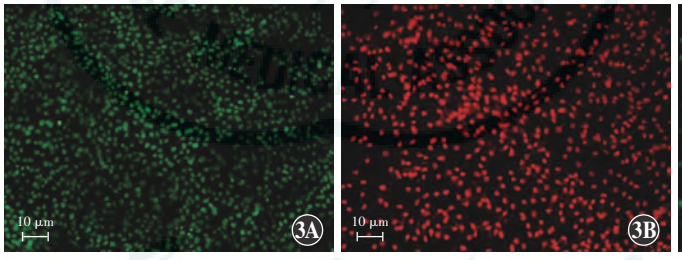


图 1　培养的兔角膜上皮细胞的形态及鉴定（标尺 = 10 μm）　A：兔角膜上皮细胞原代培养后 1 周，细胞逐渐融合，生长旺盛　B：免疫荧光检测显示培养的细胞 CK3 表达阳性，细胞质呈绿色荧光（FITC）　C：免疫荧光检测显示细胞核染色为蓝色（PI）　D：B 图与 C 图的合成图





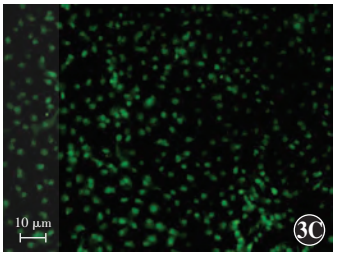


图 2　接种后的角膜上皮细胞形态（标尺 = 10 μm）　兔角膜上皮细胞接种于细菌纤维素膜后细胞生长状态良好　**图 3　LIVE/DEAD 染色后荧光显微镜下观察**（calcein-AM/EH　标尺 = 10 μm）　A：培养皿中的活性角膜上皮细胞呈绿色荧光　B：培养皿中乙醇灭活的死亡上皮细胞呈红色荧光　C：细菌纤维素膜上的上皮细胞均呈绿色荧光，细胞存活率为 100%

2.3　细菌纤维素膜上培养的兔角膜上皮细胞的超微结构

扫描电子显微镜下细菌纤维素膜上培养的兔角膜上皮细胞呈椭圆形，与正常角膜上皮细胞形态相似，可见膜表面丰富的页状突起（图 4A）、丝状伪足及细胞间连接（图 4B），并可观察到处于分裂相的细胞（图 4C），细胞生长活跃。角膜上皮细胞通过丝状伪足紧密贴附于细菌纤维素膜。

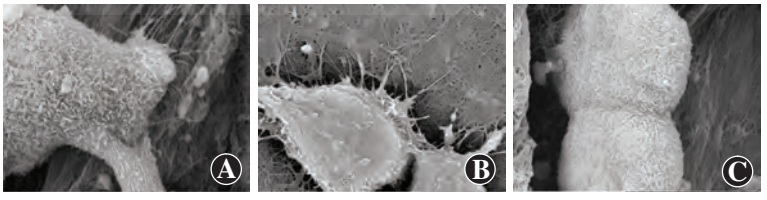


图 4　扫描子显微电镜下细菌纤维素膜上培养的兔角膜上皮细胞形态　A：细胞呈椭圆形，表面有丰富的叶状突起（×9 000）　B：细胞表面有丰富的丝状伪足及细胞间连接（×6 000）　C：细菌纤维素膜上处于分裂期的细胞（×10 000）

3　讨论

角膜供体来源的匮乏仍然是角膜移植术治疗严重角膜疾病的难题，组织工程角膜研究是解决角膜供体的主要方法之一。目前作为组织工程角膜上皮构建的支架材料有很多，如胶原及其复合材料、羊膜、脱细胞角膜基质、壳聚糖、人工合成高分子材料等，但其都存

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

在许多问题。胶原、壳聚糖等材料的生物相容性良好，但其力学性能欠佳，且降解速度过快。脱细胞角膜基质、羊膜等来源于体内，其机械性能和生物相容性都很好，但是存在着来源不规范、有传播疾病的风险及制备工艺不成熟等缺点，还有一些高分子生物合成材料的降解产物有细胞毒性，不利于细胞的生长。因此，寻找适宜的支架材料是角膜组织工程研究的热点之一。

近年来，细菌纤维素膜逐渐成为组织工程角膜支架研究的焦点。细菌纤维素膜最早是在 1886 年由 Brown 发现并报道[7]，它是由木醋杆菌等产生的天然生物纳米材料，是由超微纤维构成的天然的纤维网状结构，透明度高，有良好的生物相容性，无细胞毒性，机械性能好，亲水性强，含水量高达 73%，与天然角膜的含水量（78%）非常接近，对可见光具有良好的透光率，透光率可达 90% 以上，同时对紫外光有一定的吸收作用，目前已广泛应用到生物医学材料中，可用于制备医用敷料，促进伤口的快速愈合[8-9]。此外，细菌纤维素膜还可制备人工皮肤、药物载体材料、人造软骨、人造血管等。Wippermann 等[10]将中空的细菌纤维素植入猪体内代替其颈动脉，植入 3 个月后观察发现管状细菌纤维素的畅通率达到 87.5%，细胞平滑地向管腔内表面移行，发生内皮化，且无明显的排斥反应和炎症反应，验证了细菌纤维素在人造血管方面应用的可能性。Tazi 等[11]在细菌纤维素添加羟基磷灰石（hydroxyapatite，HA）制备细菌纤维素膜/HA 复合材料，并分别在单纯细菌纤维素膜上和细菌纤维素膜/HA 复合材料上接种成骨细胞，结果显示成骨细胞在细菌纤维素膜膜上生长良好，细胞能很好地黏附于细菌纤维素膜，细菌纤维素膜生物相容性良好，可促进成骨细胞的生长，证实细菌纤维素膜及其复合材料均可应用于骨组织工程支架材料。本研究中以细菌纤维素膜作为支架材料接种上皮细胞，初步构建了组织工程角膜，结果显示角膜上皮细胞在细菌纤维素膜上生长良好，与正常的上皮细胞生长情况相似。钙黄绿素-AM 是一种膜通透性的活细胞荧光染料，本身无荧光，活细胞内的酯酶能将钙黄绿素-AM 水解成具有荧光的钙黄绿素，将活细胞标记为绿色荧光，此外当细胞膜受损，细胞膜通透性增加时，溴乙非啶同二聚体进入细胞，与核酸结合，发出红色荧光。这 2 种物质可以鉴定活细胞和死亡细胞[12]。本实验选用 LIVE/DEAD 染色证实细胞存活率达 100%，且扫描电子显微镜结果显示接种的角膜上皮细胞超微结构正常，大量的微绒毛结构证实细胞结构和功能正常，细胞间通过伸出的丝状伪足相互连接，并且可以看到处于分裂时期的上皮细胞，说明细胞生长状态活跃。扫描电子显微镜结果还显示种植的角膜上皮细胞的丝状伪足与细菌纤维素膜紧密交联，细胞向膜内部凹陷并有内部生长的趋势，证实细菌纤维素膜的生物相容性好，细胞与细菌纤维素膜的结合紧密。

综上所述，细菌纤维素膜作为构建组织工程角膜上皮的支架材料是可行的，其良好的透明性、较好的生物相容性、对细胞无毒性、良好的强度和韧性等特点在生物支架材料的研究中具有很大的优势。本研究的结果为角膜组织工程支架材料的研究提供了新的思路和方法。

参考文献

[1] Shao Y, Yu Y, Pei CG, et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications[J]. Int J Ophthalmol, 2012, 5(4): 415-418. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.04.02.

[2] Mimura T, Amano S, Yokoo S, et al. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels[J]. Mol Vis, 2008, 14: 1819-1828.

[3] Ju C, Zhang K, Wu X. Derivation of corneal endothelial cell-like cells from rat neural crest cells in vitro[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(7): e42378[2015-03-20]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042378. DOI: 10.1371/journal.pone.0042378.

[4] Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, et al. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds[J]. Biomaterials, 2006, 27(2): 145-151.

[5] Stevens B, Yang Y, Mohandas A, et al. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008, 85(2): 573-582.

[6] Fu L, Zhang J, Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair[J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(2): 1432-1442. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.071.

[7] Brown AJ. On acetic ferment which forms cellulose[J]. J Chem Society, 1886, 49: 432-439.

[8] Fontana JD, de Souza AM, Fontana CK, et al. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1990, 24-25: 253-264.

[9] Kim J, Kim SW, Park S, et al. Bacterial cellulose nanofibrillar patch as a wound healing platform of tympanic membrane perforation[J]. Adv Healthc Mater, 2013, 2(11): 1525-1531. DOI: 10.1002/adhm.201200368.

[10] Wippermann J, Schumann D, Klemm D, et al. Preliminary results of small substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2009, 37(5): 592-596. DOI: 10.1016/j.ejvs.2009.01.007.

[11] Tazi N, Zhang Z, Messaddeq Y, et al. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules[J/OL]. AMB Express, 2012, 2(1): 61[2015-09-20]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3571908/. DOI: 10.1186/2191-0855-2-61.

[12] Chen Z, Xuguang S, Zhiqun W, Ran L. In vitro amoebacidal activity of photodynamic therapy on Acanthamoeba[J]. Br J Ophthamol, 2008, 92: 1283-1286. DOI: 10.1136/bjo.2007.134288.

（收稿日期：2015-10-29）

（本文编辑：尹卫靖　张宇）

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?