

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810047793.7

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 11 月 12 日

[11] 公开号 CN 101302486A

[51] Int. Cl. (续)

C12R 1/02 (2006.01)

[22] 申请日 2008.5.21

[21] 申请号 200810047793.7

[71] 申请人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路
1037 号

[72] 发明人 杨 光 付丽娜 何 峰 周 平
余龙江

[74] 专利代理机构 华中科技大学专利中心

代理人 曹葆青

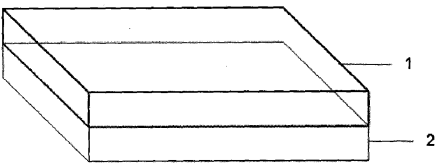
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

木醋杆菌及用其制备纳米纤维素皮肤组织修
复材料的方法

[57] 摘要

本发明提供一种木醋杆菌菌株及通过它制备纳
米纤维素皮肤组织修复材料的方法。制备方法如
下：首先将保藏在斜面上的木醋杆菌 (Acetobacter
xylinum Y05, CCTCC M 207163) 制成摇瓶种子，静
态培养获得纳米纤维素膜。再将培养好的膜分离纯
化，然后与天然多糖 (壳聚糖等) 和蛋白质 (胶原蛋
白、丝素蛋白等) 复合制成。这种纳米修复材料具
有良好的生物相容性，与人体皮肤相近的柔韧性和
强度，还具有良好的可塑性和弹性，可适合于各种
不规则伤口表面，并且能够长久保持水分等，可以
用作临床上烧伤、慢性皮肤溃疡等皮肤损伤或缺损
的皮肤替代物和医用敷料等。



1、木醋杆菌 *Acetobacter xylinum* Y05，其菌种保藏号为 CCTCC M207163。

2、一种通过权利要求 1 所述的木醋杆菌制备纳米纤维素皮肤组织修复材料的方法，依次包括以下步骤：

(1) 将保藏在斜面上的木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M207163) 于斜面培养基进行活化，取活化好的菌种接种于液体培养基，放置在摇床上进行培养，获得种子；

(2) 将培养得到的种子和液体培养基放入 250mL~1L 的发酵瓶进行接种，种子占液体培养基体积的 5~15%，然后在 25~35℃ 温度条件下静置培养 72~336 小时，获得纳米纤维素膜；

(3) 将纳米纤维素膜在蒸馏水中浸泡 2~4 天，再将其放入质量浓度为 1~2% 的 NaOH 溶液中煮沸 30~120 分钟，再用双蒸水浸泡 2~4 天，然后浸于质量浓度为 20~80% 的酒精中，在 0~8℃ 的温度条件下保存；

(4) 将保存的纳米纤维素膜放入盛有蒸馏水的容器中，高温高压灭菌，灭菌后将其浸入由天然多糖或蛋白质或者其结合制成的复合溶液，复合溶液的质量浓度小于 50%，静置 8~48 小时，获得纳米纤维素皮肤组织修复材料。

3、根据权利要求 2 所述的新型纳米皮肤组织修复材料，其特征在于，所述斜面培养基包括质量百分比 5~10% 的葡萄糖，1~2% 的酵母粉，2~4% 的碳酸钙，2~4% 的琼脂；液体培养基包含质量百分比 5~15% 的葡萄糖，1~2% 的酵母粉和 2~4% 的碳酸钙，其初始 pH 值为 3.0~6.0。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的新型纳米皮肤组织修复材料，其特征在于，所述天然多糖为壳聚糖，蛋白质为胶原蛋白或者丝素蛋白或者

其结合。

5、根据权利要求 4 所述的新型纳米皮肤组织修复材料，其特征在于，所述壳聚糖、胶原蛋白和丝素蛋白的质量比为 0.5~1：1：0.5~1。

6、根据权利要求 2 所述的新型纳米皮肤组织修复材料，其特征在于，所述步骤（3）在用蒸馏水和双蒸水浸泡过程中每隔 8~24 小时换一次水。

木醋杆菌及用其制备纳米纤维素皮肤组织修复材料的方法

技术领域

本发明涉及木醋杆菌菌株及通过它制备纳米细菌纤维素膜的方法。

技术背景

我国每年烧伤、溃疡病人大约 1500 万人，其中需要移植皮肤治疗的将近 1000 万人，市场总容量为 $3.88 \times 10^4 \text{ m}^2$ 。巨大的市场潜力为皮肤组织工程产业化提供了广阔的市场前景。

对 II/III 度烧伤、难治性皮肤溃疡等大面积皮肤缺失病例，由于皮损面积大，皮下组织结构破坏严重，临床治疗非常困难，病人常难度过休克关和感染关。早期使用人体皮肤封闭创面，减少体液丢失，防止病原微生物入侵，可挽救病人生命，并有助于创面愈合，同时为组织细胞的再生修复提供支撑和微环境。但由于人体皮肤来源极为有限，大多数情况下无法应用。因此，研制新型人工皮肤用于烧伤烫伤及难治性溃疡病的治疗，具有非常广阔的临床实用价值和科学研究意义。

自 20 世纪 80 年代以来，有科学家先后研制出多种人工真皮，如来源于异体或异种皮的无细胞真皮基质、以胶原为主要原料经冷冻干燥后形成的海绵状胶原膜，此外，还有透明质酸膜、聚乳酸膜等，其基本特点是可诱导自体的组织细胞浸润生长，形成新的、结构规则的真皮样组织，从而重建真皮层。20 世纪 90 年代以来，医学界已成功将复合皮用于大面积深度烧伤创面的修复，节省了伤者自体皮源，提高了就治率。但是，由于复合皮制作费用十分昂贵且移植后存活率只有 50% 左右，距大规模临床应用还有距离。

总之，虽然有各种人造皮肤的出现，但有些问题依然没有得到很好的解决。例如，在伤口愈合后，会形成纤维状的疤痕，而植皮的结果就是在皮肤的结合部位出现疤痕。在愈合的过程中，细胞之间的生长和分

化缺乏正确的诱导，植入的细胞，和新生细胞及周边的健康细胞之间的生长不同步，因而无法产生或无法正常地产生皮肤的附属物，如毛囊，黑色素细胞，汗腺等。这就会严重影响皮肤愈合后的美观和功能。同时，这些人造皮肤不便于使用，必须拥有专门技术的人员才能正确的使用。这也对于其推广也产生了一定的影响。细菌纤维素是一种新型生物医用工程材料，具有特异的结构和优异的性能，对其形成机制和制备工艺的研究是纳米材料科学领域的前沿课题之一。细菌纤维素纤维除具有高纯度、高结晶度、高聚合度的基本特质外，它还是自然界中最精细的纳米纤维，“纳米效应”使其具有高吸水性、高保水性、对液体和气体的高透过率、高湿态强度等特性。

目前国内外陆续报道了人工皮肤的研究，例如：1）申请日 2002.05.09，申请号 02117585.3，授权公告日 2003.11.19，专利号 CN 02117585.3 的中国专利申请文件“一种人工皮肤及其制备方法与应用”采用 I 型动物胶原和自体骨髓间充质干细胞制备人工皮肤，但其强度不高，且工艺复杂，成本较高；2）申请日 2002.01.16，申请号 02100072.7，授权公告日 2002.08.14，专利号 CN02100072.7 的中国专利申请文件“以壳多糖或其衍生物为基质网架的复层人工皮肤”采用壳多糖多孔网架为基质材料，但其柔性较低，不能较好地改进材料的力学性能；3）申请日 2002.12.04，申请号 02151020.2，授权公告日 2004.06.16，专利号 CN02151020.2 的中国专利申请文件“以异种或异体骨基质明胶为支架构建的组织工程人工皮肤”采用异种或异体骨基质明胶为支架制备了和正常人体皮肤相似的组织结构特征的人工皮肤，但是异种或异体来源的材料可能引发感染或排异；4）申请日 2004.12.28，申请号 200410081608.8，授权公告日 2006.07.05，专利号 CN200410081608.8 的中国专利申请文件“一种纳米壳聚糖人造皮肤及其制造方法”获得的纳米壳聚糖人造皮肤具有三维网络结构，但是其持水性较差，不能为伤口提供一个长久湿润的有利环境；

发明内容

本发明的目的在于提供一种木醋杆菌菌株，本发明的另一目的是提供一种通过木醋杆菌制备纳米纤维素皮肤组织修复材料的方法，通过该方法得到的皮肤组织修复材料具有良好的生物相容性、机械强度、柔韧性、透气性和持水性。

本发明提供的木醋杆菌于 2007 年 10 月 18 日在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC, 地址: 湖北省武汉市武汉大学)进行了保藏, 保藏号为 CCTCC M207163。

本发明通过木醋杆菌制备纳米纤维素皮肤组织修复材料的方法具体为:

(1) 将斜面保藏的木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M207163, 保藏地: 中国典型培养物保藏中心) 接种于斜面培养基进行活化, 取活化好的菌种接种于液体培养基, 放置在摇床上进行培养, 获得种子;

(2) 将培养得到的种子和液体培养基放入 250mL~1L 的发酵瓶进行接种, 种子占液体培养基体积的 5~15%, 然后在 25~35℃温度条件下静置培养 72~336 小时, 获得纳米纤维素膜;

(3) 将纳米纤维素膜在蒸馏水中浸泡 2~4 天, 再将其放入质量浓度为 1~2%的 NaOH 溶液中煮沸 30~120 分钟, 再用双蒸水浸泡 2~4 天, 然后浸于质量浓度为 20~80%的酒精中, 在 0~8℃的温度条件下保存;

(4) 将保存的纳米纤维素膜放入盛有蒸馏水的容器中, 高温高压灭菌, 灭菌后将其浸入由天然多糖或蛋白质或者其结合制成的复合溶液, 复合溶液的质量浓度小于 50%, 静置 8~48 小时, 获得纳米纤维素皮肤组织修复材料。

所述斜面培养基包括质量百分比 5~10%的葡萄糖, 1~2%的酵母粉, 2~4%的碳酸钙, 2~4%的琼脂; 液体培养基包含质量百分比 5~10%的葡萄糖, 1~2%的酵母粉和 2~4%的碳酸钙, 其初始 pH 值为

3.0~6.0。所述天然多糖为壳聚糖，蛋白质为胶原蛋白或者丝素蛋白或者其结合。新型纳米皮肤组织修复材料，所述壳聚糖、胶原蛋白和丝素蛋白的质量比为 0.5~1: 1: 0.5~1。用蒸馏水和双蒸水浸泡过程中每隔 8~24 小时换一次水。

本发明制备纳米纤维素皮肤组织修复材料过程中使用的设备简单，操作方法简便，成本低，这种新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的具有良好的生物相容性，与人体皮肤相近的柔韧性和强度，同时还具有良好的可塑性和弹性，可适合于各种不规则伤口表面，并且长久保持水分等优点，其次，材料所含有的成分在自然界中能够完全降解，不对环境产生污染，具有很高的社会效益和经济效益。

附图说明

图 1 为采取本发明得到的纳米纤维素皮肤组织修复材料结构示意图；

图 2 为本发明得到的纳米纤维素皮肤组织修复材料扫描电镜图，图 2 (a) 为成纤维细胞在纳米修复材料上的生长图(20kv, 8.6 μ m)，图 2 (b) 为纳米修复材料三维网络结构 (20kv, 7.5 μ m)；

图 3 为纳米纤维素皮肤组织修复材料的细胞生物相容性评价图，图 3 (a) 为空白对照组生长的成纤维细胞示意图，图 3 (b) 为接种在纳米修复材料上的成纤维细胞示意图；

图 4 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的动物生物相容性评价图，图 4 (a) 为空白对照组小鼠的病理组织切片示意图，图 4 (b) 为使用了纳米修复材料的小鼠的病理组织切片示意图。

具体实施方式

本发明的木醋杆菌菌株筛选自木醋杆菌属，不产生芽孢，革兰氏阴性，生长的 pH 范围为 3.0~7.0，最适生长 4.0~6.0。该菌株的培养特征与生理生化特征如下：杆状细胞；可以利用葡萄糖，蔗糖和果糖等碳水化合物产酸；生长温度范围：20~40℃，最适温度 25~35℃；微耗氧生

长。该菌株的尺寸长约 $1\sim 5\mu\text{m}$ ，直径 600nm 左右，所形成的膜是三维纳米纤维组成的精密网络结构。

下面结合具体实施例对本发明做进一步详细阐述。

实施例 1

1. 纳米纤维素皮肤组织修复材料的基底膜制备

(1) 配制含有质量百分比 5% 的葡萄糖，1% 的酵母粉，2% 的碳酸钙，2% 的琼脂的斜面培养基。将斜面保藏的木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M207163) 于斜面培养基进行活化，取活化好的菌种接种于 250mL 的三角摇瓶中，在摇床上培养后作为一级种子，将一级种子接种于种子罐，经扩大培养后制成发酵生产用的种子培养物。

(2) 配制液体培养基，含葡萄糖 10%，添加 1% 的酵母粉和 2% 的碳酸钙，其初始 pH 值为 5.5，在 30°C 恒温条件下静态培养 7 天。

(3) 将培养好的纳米纤维素膜在蒸馏水中浸泡 2 天，再将其放入质量浓度为 1% 的 NaOH 溶液中煮沸 40 分钟，再用双蒸水浸泡 2 天。获得纳米纤维素膜，其结构如图 2 (b) 所示为纳米级三维网络结构。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的复合

配制 2% 浓度的胶原乙酸溶液， 4°C 保存。将壳聚糖溶于 0.5mol/L 的乙酸中，制得 2% 溶液。将蚕丝剪成小段，浸于 0.1 % 的 Na_2CO_3 溶液中， $98\sim 100^\circ\text{C}$ 处理 30 分钟，重复 3 次。在空气中晾干，然后用 $\text{CaCl}_2\cdot\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (摩尔比 1:2:8) 溶剂，于 $(70\pm 2)^\circ\text{C}$ 搅拌溶解，配制 2% 的丝素溶液。胶原：壳聚糖：丝素蛋白：纳米细菌纤维素比例为 2:2:1:5，加适量 NaOH 调溶液 pH 到 7.0，用 0.25 % 戊二醛溶液处理，制得新型纳米纤维素皮肤组织修复材料。

图 1 为采取本发明得到的纳米纤维素皮肤组织修复材料结构示意图，它由纳米纤维素基底膜 1 和天然多糖、蛋白等复合膜 2 两部分组成。

实施例 2

1. 纳米纤维素皮肤组织修复材料的基底膜制备

(1) 配制含有质量百分比 5% 的葡萄糖，1% 的酵母粉，2% 的碳酸

钙，2%的琼脂的斜面培养基。将斜面保藏的木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M 207163) 于斜面培养基进行活化，取活化好的菌种接种于 250mL 的三角摇瓶中，在摇床上培养后作为一级种子，将一级种子接种于种子罐，经扩大培养后制成发酵生产用的种子培养物。

(2) 配制液体培养基，含葡萄糖 12%，添加 1.5 %的酵母粉和 3%的碳酸钙，其初始 pH 值为 3.5，在 30℃恒温条件下静态培养 7 天。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的复合

配制 2%浓度的胶原乙酸溶液，4℃保存。将壳聚糖溶于 0.5mol/L 的乙酸中，制得 2%溶液。将蚕丝剪成小段，浸于 0.1 %的 Na_2CO_3 溶液中，98~100℃处理 40 分钟，重复 3 次。在空气中晾干，然后用 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (摩尔比 1:2:8) 溶剂，于 (70 ± 2) ℃搅拌溶解，配制 2%的丝素溶液。胶原：壳聚糖：丝素蛋白：纳米细菌纤维素比例为 1:2:1:6，加适量 NaOH 调溶液 pH 到 7.0，用 0.3 %戊二醛溶液处理，制得新型纳米纤维素皮肤组织修复材料。

实施例 3

1. 纳米纤维素皮肤组织修复材料的基底膜制备

(1) 配制含有质量百分比 10%的葡萄糖，1%的酵母粉，2%的碳酸钙，2%的琼脂的斜面培养基。将斜面保藏的木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M 207163) 于斜面培养基进行活化，取活化好的菌种接种于 250mL 的三角摇瓶中，在摇床上培养后作为一级种子，将一级种子接种于种子罐，经扩大培养后制成发酵生产用的种子培养物。

(2) 配制液体培养基，含葡萄糖 15%，添加 2%的酵母粉和 4%的碳酸钙，其初始 pH 值为 6.0，在 30℃恒温条件下静态培养 14 天。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的复合

配制 2%浓度的胶原乙酸溶液，4℃保存。将壳聚糖溶于 0.5mol/L 的乙酸中，制得 2%溶液。将蚕丝剪成小段，浸于 0.1 %的 Na_2CO_3 溶液中，98~100℃处理 30 分钟，重复 3 次。在空气中晾干，然后用 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (摩尔比 1:2:8) 溶剂，于 (70 ± 2) ℃搅拌溶

解，配制 2% 的丝素溶液。胶原：壳聚糖：丝素蛋白：纳米细菌纤维素比例为 1：1：1：6，加适量 NaOH 调溶液 pH 到 7.0，用 0.25 % 戊二醛溶液处理，制得新型纳米纤维素皮肤组织修复材料。

实施例 4

1. 纳米纤维素皮肤组织修复材料的基底膜制备

(1) 配制含有质量百分比 10% 的葡萄糖，1% 的酵母粉，2% 的碳酸钙，2% 的琼脂的斜面培养基。将斜面保藏的木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M 207163) 于斜面培养基进行活化，取活化好的菌种接种于 500mL 的三角摇瓶中，在摇床上培养后作为一级种子，将一级种子接种于种子罐，经扩大培养后制成发酵生产用的种子培养物。

(2) 配制液体培养基，含葡萄糖 10%，添加 2% 的酵母粉和 4% 的碳酸钙，其初始 pH 值为 5.5，在 30℃ 恒温条件下静态培养 7 天。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的复合

配制 2% 浓度的胶原乙酸溶液，4℃ 保存。将壳聚糖溶于 0.5mol/L 的乙酸中，制得 2% 溶液。将蚕丝剪成小段，浸于 0.1 % 的 Na₂CO₃ 溶液中，98~100 °C 处理 40 分钟，重复 3 次。在空气中晾干，然后用 CaCl₂·CH₃CH₂OH·H₂O (摩尔比 1：2：8) 溶剂，于 (70 ± 2) °C 搅拌溶解，配制 2% 的丝素溶液。胶原：壳聚糖：丝素蛋白：纳米细菌纤维素比例为 1：1：1：5，加适量 NaOH 调溶液 pH 到 7.0，用 0.25 % 戊二醛溶液处理，制得新型纳米纤维素皮肤组织修复材料。

实施例 5

1. 纳米纤维素皮肤组织修复材料的基底膜制备

(1) 配制含有质量百分比 10% 的葡萄糖，1% 的酵母粉，2% 的碳酸钙，2% 的琼脂的斜面培养基。将斜面保藏の木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M 207163) 于斜面培养基进行活化，取活化好的菌种接种于 1L 的三角摇瓶中，在摇床上培养后作为一级种子，将一级种子接种于种子罐，经扩大培养后制成发酵生产用的种子培养物。

(2) 配制液体培养基，含葡萄糖 12%，添加 1% 的酵母粉和 2% 的碳

酸钙，其初始 pH 值为 4.0，在 30℃ 恒温条件下静态培养 14 天。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的复合

配制 2% 浓度的胶原乙酸溶液，4℃ 保存。将壳聚糖溶于 0.5mol/L 的乙酸中，制得 2% 溶液。将蚕丝剪成小段，浸于 0.1 % 的 Na_2CO_3 溶液中，98~100 °C 处理 30 分钟，重复 3 次。在空气中晾干，然后用 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (摩尔比 1 : 2 : 8) 溶剂，于 (70 ± 2) °C 搅拌溶解，配制 2% 的丝素溶液。胶原：壳聚糖：丝素蛋白：纳米细菌纤维素比例为 1 : 1 : 1 : 7，加适量 NaOH 调溶液 pH 到 7.0，用 0.2 % 戊二醛溶液处理，制得新型纳米纤维素皮肤组织修复材料。

实施例 6

1. 纳米纤维素皮肤组织修复材料的基底膜制备

(1) 配制含有质量百分比 10% 的葡萄糖，1% 的酵母粉，2% 的碳酸钙，2% 的琼脂的斜面培养基。将斜面保藏的木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M 207163) 于斜面培养基进行活化，取活化好的菌种接种于 500mL 的三角摇瓶中，在摇床上培养后作为一级种子，将一级种子接种于种子罐，经扩大培养后制成发酵生产用的种子培养物。

(2) 配制液体培养基，含葡萄糖 15%，添加 2% 的酵母粉和 4% 的碳酸钙，其初始 pH 值为 5.5，在 30℃ 恒温条件下静态培养 14 天。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的复合

配制 2% 浓度的胶原乙酸溶液，4℃ 保存。将壳聚糖溶于 0.5mol/L 的乙酸中，制得 2% 溶液。将蚕丝剪成小段，浸于 0.1 % 的 Na_2CO_3 溶液中，98~100 °C 处理 30 分钟，重复 3 次。在空气中晾干，然后用 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (摩尔比 1 : 2 : 8) 溶剂，于 (70 ± 2) °C 搅拌溶解，配制 2% 的丝素溶液。胶原：壳聚糖：丝素蛋白：纳米细菌纤维素比例为 1 : 1 : 1 : 9，加适量 NaOH 调溶液 pH 到 7.0，用 0.25 % 戊二醛溶液处理，制得新型纳米纤维素皮肤组织修复材料。

实施例 7

1. 纳米纤维素皮肤组织修复材料的基底膜制备

(1) 配制含有质量百分比 10%的葡萄糖, 1%的酵母粉, 2%的碳酸钙, 2%的琼脂的斜面培养基。将斜面保藏的木醋杆菌 Y05 (*Acetobacter xylinum* Y05, CCTCC M 207163) 于斜面培养基进行活化, 取活化好的菌种接种于 500mL 的三角摇瓶中, 在摇床上培养后作为一级种子, 将一级种子接种于种子罐, 经扩大培养后制成发酵生产用的种子培养物。

(2) 配制液体培养基, 含葡萄糖 15%, 添加 2%的酵母粉和 4%的碳酸钙, 其初始 pH 值为 5.5, 在 30℃恒温条件下静态培养 5 天。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料的复合

配制 2%浓度的胶原乙酸溶液, 4℃保存。将壳聚糖溶于 0.5mol/L 的乙酸中, 制得 2%溶液。将蚕丝剪成小段, 浸于 0.1 %的 Na_2CO_3 溶液中, 98~100 °C 处理 40 分钟, 重复 3 次。在空气中晾干, 然后用 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (摩尔比 1 : 2 : 8) 溶剂, 于 (70 ± 2) °C 搅拌溶解, 配制 2%的丝素溶液。胶原: 壳聚糖: 丝素蛋白: 纳米细菌纤维素比例为 1: 1: 1: 3, 加适量 NaOH 调溶液 pH 到 7.0, 用 0.25 %戊二醛溶液处理, 制得新型纳米纤维素皮肤组织修复材料。

试验 1 实施例 1 制得的纳米纤维素皮肤组织修复材料对小鼠成纤维细胞生长的影响

1. 小鼠成纤维细胞培养

配制动物细胞 DMEM 培养基 (Gibco 公司)。复苏冻存的 NIH/3T3 小鼠皮肤成纤维母细胞。稳定传代培养 3~6 代, 获得用于评价新型纳米纤维素皮肤组织修复材料生物相容性的细胞。检测纳米修复材料的细胞毒性, 并观察细胞生长情况。

2. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料细胞评价

将实施例 1 制备的纳米纤维素皮肤组织修复材料灭菌, 然后按 96 孔板的孔径大小剪成小圆片, 铺在孔板底部, 用 DMEM 培养基浸泡 12 小时后, 接种细胞。将含有 1×10^5 个/mL 的细胞悬液, 每孔加入 0.5mL, 接种到膜片上即每孔接种的细胞个数为 5×10^4 个。置于 37℃, 5% CO_2 培

养箱中培养 6 天后如图 2 (a) 所示, 细胞与材料的附着良好。对照组将细胞接种在培养皿内的盖玻片上, 同等条件下培养。如图 3 (a) 和 3 (b) 所示, 细胞毒性试验表明纳米修复材料的细胞毒性试验合格, 实验组的细胞增殖和粘附要好于对照组。

试验 2 实施例 1 制得的纳米纤维素皮肤组织修复材料对小鼠伤口愈合的影响

1. 新型纳米纤维素皮肤组织修复材料动物评价

实验前一天, 成年小鼠腹腔注射 10% 乌拉坦 (1~1.5g/kg), 粗剪去背部毛, 硫化钠脱去剩余鼠毛。小鼠腹腔注射麻醉后, 背部切开 20mm 的全层切口, 建立小鼠皮肤缺损模型。将实施例 1 制备的纳米纤维素皮肤组织修复材料灭菌, 然后剪成 20mm 的圆形。小鼠分为空白对照组和使用了纳米修复材料的实验组, 包扎固定好后单笼饲养。一周后肉眼可见, 实验组小鼠伤口愈合程度好于对照组。

2. 病理切片与组织观察

术后 1 周取出标本, 将标本 10% 中性福尔马林固定, 固定液体积为组织总体积的 7~10 倍。固定后经过水洗—硬化、脱水—透明—包埋—切片—HE 染色。

如图 4 (a) 和 4 (b) 所示, 小鼠实验和病理检测结果显示真皮内可见多数增生的成纤维细胞, 覆盖了纳米修复材料的创面表现出细胞分裂与组织再生的现象, 而且创面愈合明显快于未覆盖的对照组。此外, 对照组创面下可观察到明显的炎性细胞浸润, 主要为中性粒细胞及少量淋巴细胞, 炎性浸润波及表皮下、真皮和皮下肌层组织。覆盖了纳米修复材料的创面皮肤组织内也可见表皮下有部分炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主, 同时有少数淋巴细胞, 炎症比对照组明显减少, 显示了该材料在促进上皮组织快速愈合、降低感染发生率方面的初步疗效。

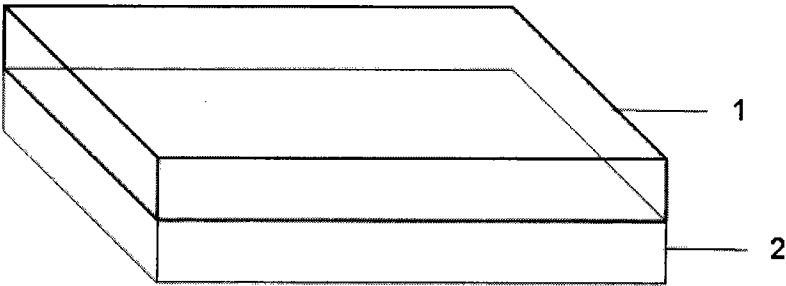
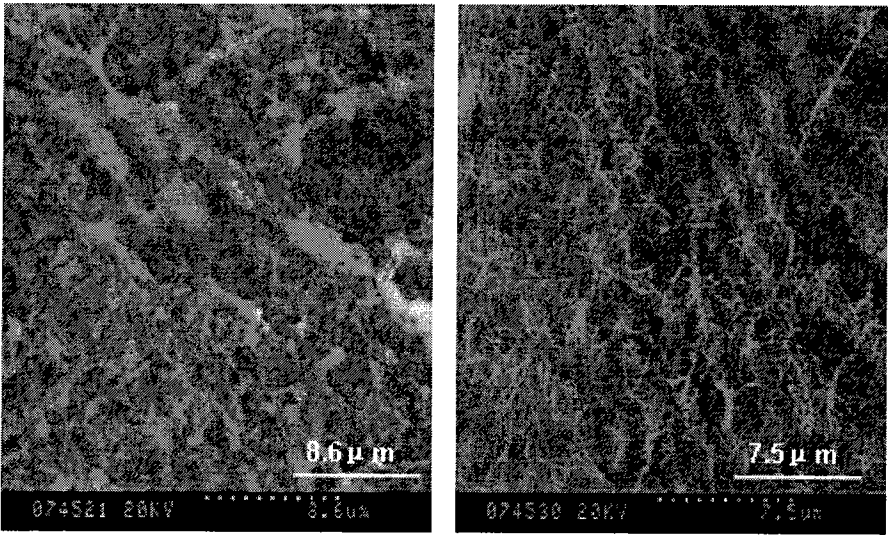


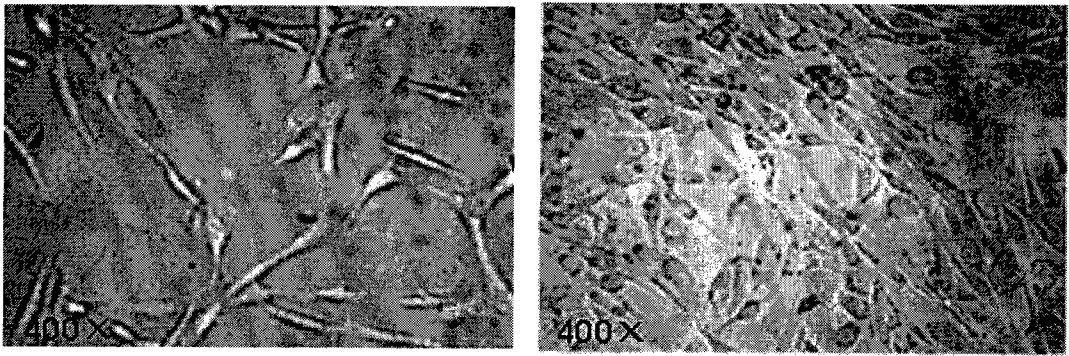
图 1



2 (a)

2 (b)

图 2



3 (a)

3 (b)

图 3

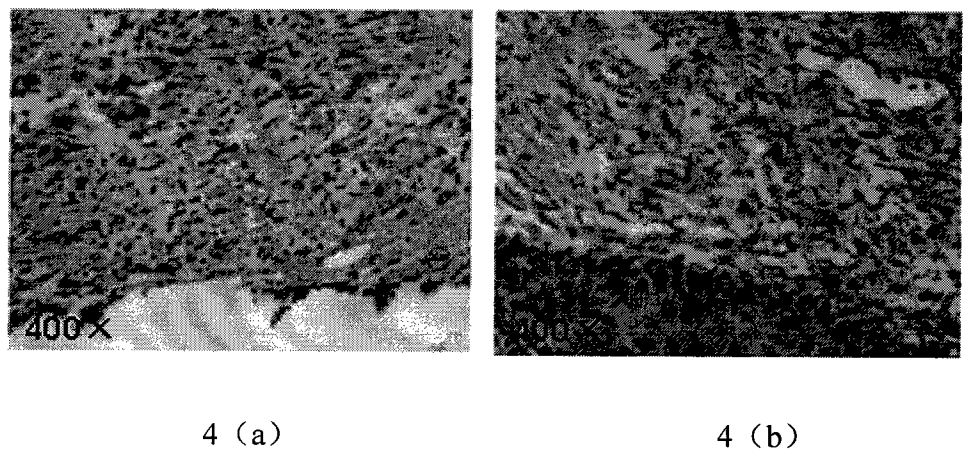


图 4