

# 壳聚糖静电纺丝膜对兔球结膜损伤的促修复作用

郑玉强 王卓实 徐玲 王连嵩 何伟

110034 沈阳, 辽宁何氏医学院 沈阳何氏眼科医院(郑玉强、王卓实、徐玲、何伟); 110034 沈阳, 辽宁何氏医学院药学系化学教研室(王连嵩)

通信作者: 何伟, Email: 18742471251@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.02.006

**【摘要】 目的** 评价壳聚糖/明胶静电纺丝膜对球结膜损伤后组织的促修复作用及抗瘢痕化作用。

**方法** 利用静电纺丝技术制备壳聚糖/明胶静电纺丝膜, 采用钨灯丝扫描电子显微镜观察静电纺丝膜纤维表征。采用随机数字表法将 30 只新西兰白兔随机分为模型组、羊膜修复组和静电纺丝膜修复组, 每组 10 只。各组实验兔右眼均接受手术切除 6 mm×8 mm 的球结膜, 用弱酸灼伤损伤部位和角膜缘, 制备兔球结膜损伤动物模型, 羊膜修复组和静电纺丝膜修复组均于术中在伤口处结膜与巩膜之间平铺生物膜。分别于术后 4、8、14、28 d 行裂隙灯显微镜检查, 观察兔眼手术伤口炎症反应及球结膜修复情况。**结果** 扫描电子显微镜下可见静电纺丝膜纤维呈立体网状结构, 与生物羊膜空间结构相似, 纺丝直径均匀, 为 0.1~0.5 μm。裂隙灯显微镜下观察发现, 术后 4 d 各组兔实验眼均未见明显炎症反应; 术后 8 d 模型组兔眼球结膜水肿、糜烂, 黏性分泌物较多, 羊膜修复组和静电纺丝膜修复组兔球结膜轻度充血; 术后 14 d 模型组兔球结膜水肿、充血, 羊膜修复组和静电纺丝膜修复组兔球结膜均未见炎症反应; 术后 28 d 模型组兔球结膜可见新生血管, 羊膜修复组和静电纺丝膜修复组兔球结膜完全修复。组织病理学观察结果显示, 模型组兔眼在术后 4 d 时伤口处球结膜组织游离, 术后 8 d 球结膜根部贴附巩膜, 术后 14 d 球结膜组织增厚, 术后 28 d 大量纤维组织填充伤口, 结膜上皮化。羊膜修复组兔眼术后 4 d 羊膜贴附于巩膜与球结膜之间, 术后 8 d 羊膜开始消融, 术后 14 d 纤维组织生长且球结膜上皮化, 术后 28 d 球结膜组织修复, 瘢痕组织填充较少。术后 4 d 静电纺丝膜修复组可见静电纺丝膜孵育于结膜与巩膜之间, 静电纺丝膜消融, 术后 8 d 球结膜上皮沿巩膜长入损伤部位, 术后 14 d 结膜下组织生长, 术后 28 d 结膜完全修复。**结论** 与单纯球结膜损伤缝合相比, 羊膜或壳聚糖/明胶静电纺丝膜修补对损伤的球结膜有促进修复的作用, 且可减轻组织瘢痕化, 壳聚糖/明胶静电纺丝膜的促组织修复作用优于羊膜。

**【关键词】** 球结膜损伤; 结膜重建; 生物材料; 壳聚糖; 明胶; 静电纺丝膜; 羊膜; 动物模型

**基金项目:** 辽宁省自然科学基金项目 (2014020153); 沈阳市科技局计划项目 (F13-081-200)

## Promoting repair effects of chitosan/gelatin electrospinning membrane implantation on rabbit conjunctival injury

Zheng Yuqiang, Wang Zhuoshi, Xu Ling, Wang Liansong, He Wei

He University, He University Eye Hospital, Shenyang 110034, China (Zheng YQ, Wang ZS, Xu L, He W); Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, He University, Shenyang 110034, China (Wang LS)

Corresponding author: He Wei, Email: 18742471251@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the promoting repair effects of chitosan/gelatin electrospinning membrane implantation on conjunctival injury. **Methods** Chitosan/gelatin electrospinning membrane was prepared using electrospinning technique, and the general characteristics of the membrane was examined under the scanning electron microscope. Conjunctival injury models were established in the right eyes of 30 New Zealand white rabbits by surgical resection of 6 mm×8 mm bulbar conjunctiva, burns of weak acid at injury site and then randomized into model group, human amniotic membrane (AM) implanted group and electrospinning membrane implanted group. AM or electrospinning membrane was interlayerly implanted between conjunctiva and sclera during operation according to grouping. The inflammatory response and histopathological change at injury site were examined by slit lamp microscope and optical microscope in 4, 8, 14 and 28 days after surgery. The use and care of the animals followed by code of ethics for animal experiments at the animal experiment center of He University. **Results** Chitosan/gelatin electrospinning membrane presented with a crosslinked network structure like AM, with the nano-microstructure of 0.1–0.5 μm fibre. No obvious inflammatory symptom was seen in the experimental eyes of various groups in 4 days after operation. In 8 days after operation, conjunctival edema and erosion were found in the model group, and slight conjunctival congestion was exhibited in the eyes of AM implanted group and electrospinning membrane implanted group. In 14 to 28 days after operation, conjunctival edema and new blood vessels were seen in the model group, and the conjunctivas were well recovered in the AM implanted group and electrospinning membrane implanted group. Histopathological examination showed dissociation, attaching, thickening and epithelization of injured conjunctivas

gradually in the model group from 4 to 28 days after operation. In the AM implanted group, attaching of AM was in 4 days, melting of AM was in 8 days, epithelization of injured conjunctivas was in 14 days and renovation of conjunctivas was in 24 days after operation, and a rapid repairing procedure was found in the electrospinning membrane implanted group under the optical microscope. **Conclusions** Compared with the self-repairing process of conjunctival injury, implantation of chitosan/gelatin electrospinning membrane or AM can speed up the renovation of injured conjunctivas, and the effects of chitosan/gelatin electrospinning membrane are better than those of AM in promoting conjunctiva repair and inhibiting scarring.

**[Key words]** Injury, conjunctival; Conjunctival reconstruction; Biomaterials; Chitosan; Gelatin; Electrospinning chitosan membrane; Amniotic membrane; Disease models, animal

**Fund program:** National Natural Science Foundation of Liaoning Province (2014020153); Science and Technology Plan Project of Shengyang (F13-081-200)

结膜是由复层柱状上皮和少量结缔组织形成的透明薄膜,其与外界接触,易受外界各种因素刺激和微生物感染。结膜疾病主要表现为结膜炎、化学烧伤、热烧伤、结膜溃疡等,如不及时治疗可影响视力,甚至致盲。严重的球结膜烧伤或溃疡一直是眼科的棘手问题,目前主要的治疗方法为生物羊膜或自体球结膜移植<sup>[1-4]</sup>。作为一种与人眼结膜组织结构相似的异体生物膜,羊膜具有很好的支持细胞生长的作用,是一种比较理想的医用生物辅料<sup>[5-6]</sup>。然而,目前羊膜来源有限,不同个体来源的羊膜差异较大,标准很难统一,且其具有传播疾病或病原体的潜在风险,制备和保存方法也比较繁琐<sup>[7]</sup>,因此探索一种安全、有效、来源广泛、能够标准化生产的生物修复膜对于相关眼病的防治研究具有重要意义。静电纺丝是高分子流体经静电雾化的特殊形式聚集成微小射流在高温下固化形成的纤维,静电纺丝膜具有独特的微观结构和适宜的力学性能,为生物组织工程支架、缓释材料等的研究提供了理想的平台<sup>[2,8-9]</sup>。此外,研究表明壳聚糖是一种生物相容性好、抑菌能力强、免疫原性低的骨架材料<sup>[10-11]</sup>,目前在医学领域制备壳聚糖/明胶静电纺丝膜复合材料已成为研究热点,但其在眼科的应用尚属于起步阶段。本研究中利用静电纺丝技术制备壳聚糖/明胶静电纺丝膜并分析其表征,探讨其在兔球结膜缺损修复中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康无眼疾新西兰白兔 30 只,雌雄不限,体质量为 2.5~3.0 kg,由中国北方眼科疾病动物平台(辽宁何氏医学院)提供,实验期间在清洁环境下饲养。实验动物的使用遵循辽宁何氏医学院动物实验中心动物实验伦理守则。本研究方案经辽宁何氏医学院眼科动物实验伦理审查委员会审核批准(批文号:2016012001)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 壳聚糖/明胶静电纺丝膜的制备与检测

将壳聚糖/明胶(质量比为 6:1)溶解于三氟乙酸/二氯甲烷(体积比为 9:1)溶液中,采用 KH-1103 型静电纺丝仪(北京富友马科技有限责任公司)制备静电纺丝膜。静电纺丝喷嘴直径为 0.7 mm,正负电极之间的距离为 7~10 cm,正负电压差为 50 kV,接收器转速设定为 120 r/min,喷头平移速度为 0.2 mm/s,纺丝空间温度为 70 ℃,相对湿度为 40%,参照文献<sup>[7-8]</sup>描述的方法以连续静电纺丝技术制备静电纺丝膜,得到静电纺丝膜后用体积分数 3% 戊二醛溶液蒸汽交联,真空干燥(100 ℃),用环氧乙烷灭菌后备用。取静电纺丝膜样品,表面喷金、固定,钨灯丝扫描电子显微镜(S-3800,日本日立公司)下观察静电纺丝膜纤维表面形态。

**1.2.2 球结膜损伤模型的制备及动物分组** 将 30 只实验兔采用随机数字表法分为模型组、羊膜修复组和静电纺丝膜修复组,每组 10 只。均取右眼为实验眼,以 0.2 ml/kg 的剂量肌内注射速眠新 II 注射液进行麻醉,采用盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉,碘伏冲洗结膜囊。参照文献<sup>[12-13]</sup>的方法,手术切除外直肌与上直肌间 6 mm×8 mm 的球结膜组织和 4 mm×5 mm 的结膜下筋膜组织,暴露巩膜,局部用棉签蘸取 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(1 ml)进行处理,然后切除 6 mm×8 mm 巩膜缘组织,缝合 4 个角结膜与浅层巩膜,作为伤口的标记;羊膜修复组在制备模型过程中将 10 mm×10 mm 羊膜平铺于伤口处,羊膜边缘铺垫于结膜下,生物羊膜与结膜和浅层巩膜缝合固定;静电纺丝膜修复组动物术中用 10 mm×10 mm 壳聚糖/明胶静电纺丝膜平铺于伤口处结膜下,静电纺丝膜与结膜和浅层巩膜缝合固定。术后用氧氟沙星滴眼液点眼,每天 2 次,连续 3 d。

**1.2.3 裂隙灯显微镜下观察球结膜修复情况** 各组实验兔分别于术后 4、8、14、28 d 行裂隙灯显微镜检查,观察兔眼术后伤口是否存在红肿、分泌物增多等炎症反应。

**1.2.4 球结膜伤口的组织病理学检查** 分别于术后 4、8、14、28 d 戊巴比妥钠过量麻醉处死实验兔并摘取



实验眼眼球,质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,二次取材眼球结膜损伤修复部位,4% 多聚甲醛溶液中二次固定 24 h。经乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡切片,行苏木精-伊红染色,光学显微镜下检查球结膜手术部位的形态学变化。

## 2 结果

### 2.1 静电纺丝膜的表面超微结构

扫描电子显微镜下可见静电纺丝膜具有空间立体网状结构,制备的静电纺丝膜纤维直径均匀,为直径 0.1~0.5 μm 的纳米纤维,呈纵横交叉排列(图 1)。

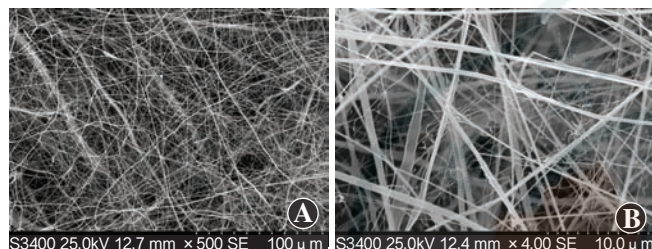


图 1 扫描电子显微镜下静电纺丝膜表征 A:×500 B:×4 000

### 2.2 术后不同时间点各组兔球结膜手术部位表现

裂隙灯显微镜下可见,术后 4 d,3 个组兔眼球结膜轻度充血,局部组织无糜烂,结膜囊无分泌物。术后 8 d,模型组兔结膜充血明显,局部轻微水肿,结膜伤口处轻微糜烂,可见黏稠状分泌物;羊膜修复组兔球结膜无明显充血,组织轻微水肿,无分泌物,羊膜平整;静电纺丝膜修复组兔球结膜无明显充血,结膜轻微水肿,无分泌物,静电纺丝膜平整。术后 14 d,模型组兔充血减轻,结膜水肿消失,糜烂组织愈合,无分泌物;羊膜修复组羊膜吸收,球结膜轻度充血,无分泌物;静电纺丝膜修复组静电纺丝膜吸收,球结膜水润,略显黄色,无分泌物。术后 28 d,模型组兔球结膜轻微隆起,新生血管增生明显;羊膜修复组球结膜组织结构完整;静电纺丝膜修复组球结膜修复完整。3 个组兔球结膜均于术后 8 d 开始修复,模型组兔球结膜修复过程较慢,手术部位周围轻微水肿,具有较多的黏性分泌物;羊膜修复组和静电纺丝膜修复组球结膜修复过程较快(图 2)。

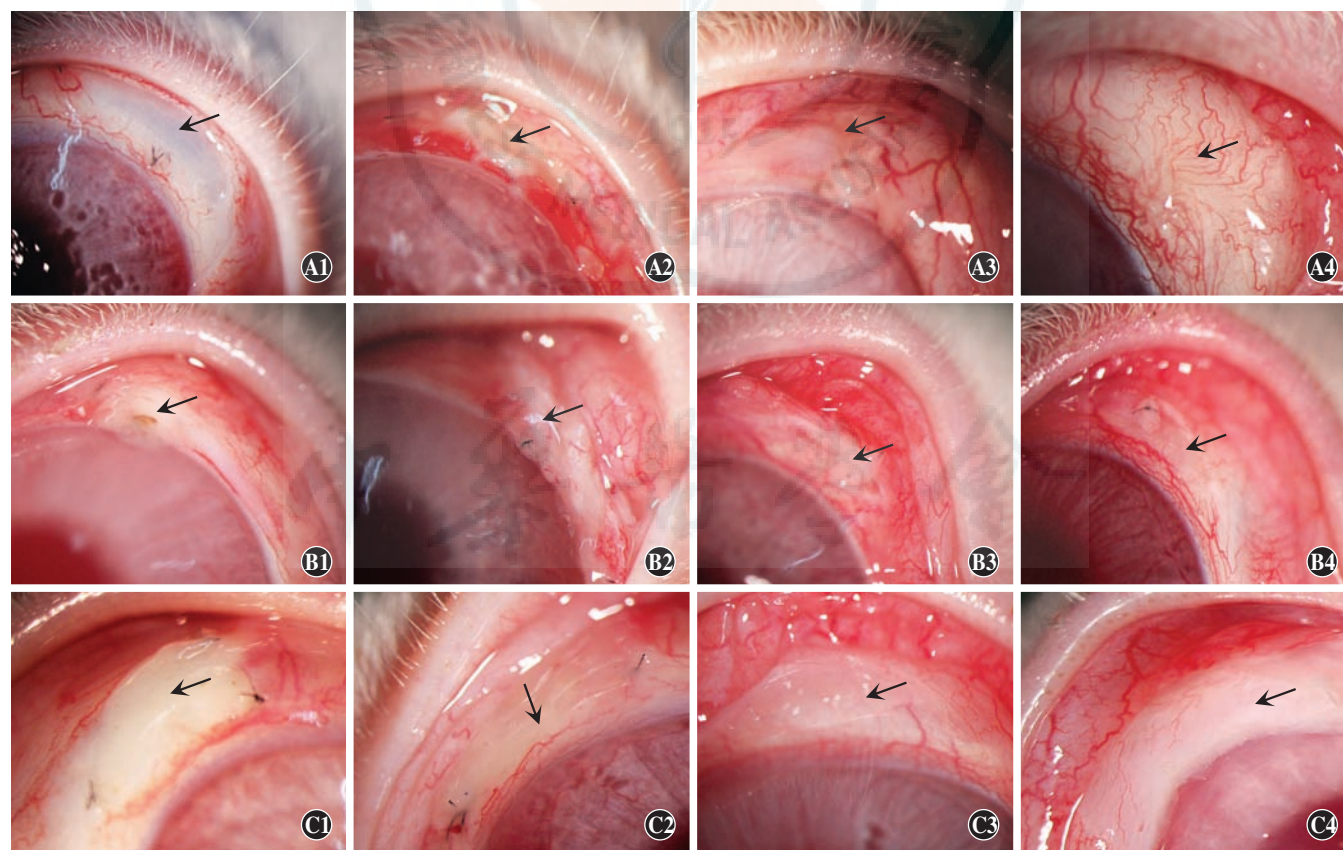


图 2 裂隙灯显微镜下各组兔眼手术部位球结膜修复情况 A1:术后 4 d 模型组兔实验眼结膜组织完整,轻度充血(箭头) A2:术后 8 d 模型组兔实验眼伤口处结膜糜烂(箭头) A3:术后 14 d 模型组兔实验眼结膜糜烂处愈合(箭头) A4:术后 28 d 模型组兔实验眼局部轻度隆起,无水肿(箭头) B1:术后 4 d 模型组兔实验眼伤口处结膜无明显炎症反应(箭头) B2:术后 8 d 羊膜修复组兔实验眼伤口处结膜轻度水肿(箭头) B3:术后 14 d 羊膜修复组兔实验眼结膜组织充血,无水肿(箭头) B4:术后 28 d 羊膜修复组兔实验眼结膜组织完整平复(箭头) C1:术后 4 d 静电纺丝膜修复组兔实验眼伤口处无明显炎症反应(箭头) C2:术后 8 d 静电纺丝膜修复组兔实验眼伤口处结膜轻度水肿(箭头) C3:术后 14 d 静电纺丝膜修复组兔实验眼伤口处结膜略显黄色,无明显炎症反应(箭头) C4:术后 28 d 静电纺丝膜修复组兔实验眼伤口处球结膜修复完整(箭头)



### 2.3 各组兔眼术后伤口处球结膜组织形态学变化

模型组兔眼在术后 4 d 时伤口处球结膜边缘开始上皮化,球结膜组织游离,与结膜下组织结合疏松;术后 8 d 球结膜根部贴附巩膜;术后 14 d 球结膜组织基本修复,但较为增厚,增生较为严重;术后 28 d 球结膜大量纤维组织填充伤口,结膜上皮化。羊膜修复组兔眼术后 4 d 羊膜贴附于巩膜与球结膜之间,周围结膜组织沿巩膜生长,上皮开始长入;术后 8 d 羊膜开始消

融,局部组织轻度纤维化;术后 14 d 纤维组织生长,球结膜上皮化;术后 28 d 球结膜组织修复,瘢痕组织填充较少,球结膜完全上皮化。静电纺丝膜修复组术后 4 d 可见静电纺丝膜贴附于结膜与巩膜之间,静电纺丝膜消融;术后 8 d 球结膜上皮沿巩膜长入损伤部位,上皮化速度较快;术后 14 d 结膜下组织生长;术后 28 d 结膜完成修复,轻度瘢痕化(图 3)。

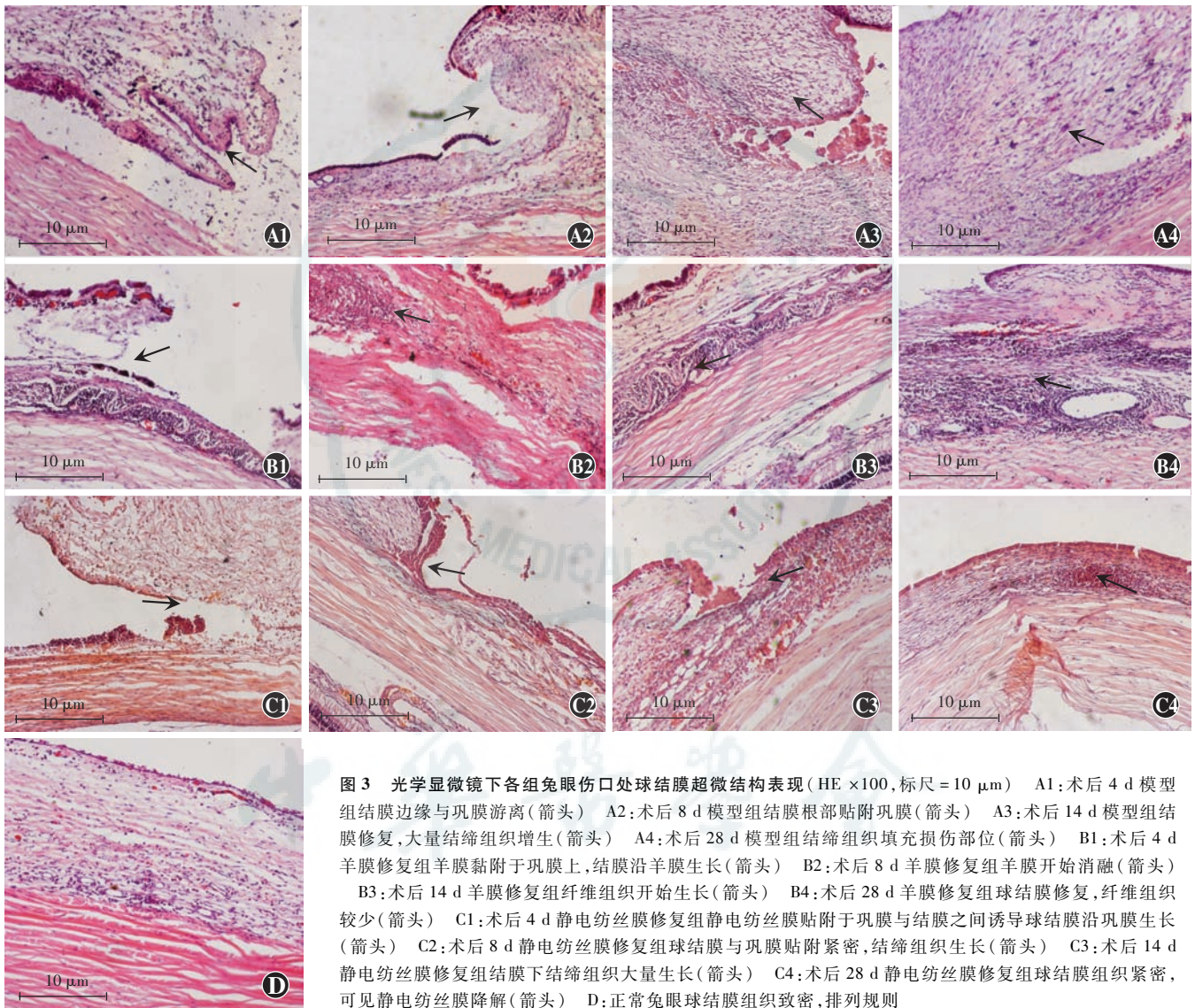


图 3 光学显微镜下各组兔眼伤口处球结膜超微结构表现(HE ×100,标尺=10 μm) A1:术后 4 d 模型组结膜边缘与巩膜游离(箭头) A2:术后 8 d 模型组结膜根部贴附巩膜(箭头) A3:术后 14 d 模型组结膜修复,大量结缔组织增生(箭头) A4:术后 28 d 模型组结缔组织填充损伤部位(箭头) B1:术后 4 d 羊膜修复组羊膜黏附于巩膜上,结膜沿羊膜生长(箭头) B2:术后 8 d 羊膜修复组羊膜开始消融(箭头) B3:术后 14 d 羊膜修复组纤维组织开始生长(箭头) B4:术后 28 d 羊膜修复组球结膜修复,纤维组织较少(箭头) C1:术后 4 d 静电纺丝膜修复组静电纺丝膜贴附于巩膜与结膜之间诱导球结膜沿巩膜生长(箭头) C2:术后 8 d 静电纺丝膜修复组球结膜与巩膜贴附紧密,结缔组织生长(箭头) C3:术后 14 d 静电纺丝膜修复组结膜下结缔组织大量生长(箭头) C4:术后 28 d 静电纺丝膜修复组球结膜组织紧密,可见静电纺丝膜降解(箭头) D:正常兔眼球结膜组织致密,排列规则

### 3 讨论

外伤、化学烧伤、自身免疫性疾病、感染、手术等均可造成结膜组织的损伤,结膜损伤后自行修复的最终结局是结膜瘢痕形成。目前,抗结膜瘢痕化的主要方法为结膜下注射 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、生物膜替代等,其中生物膜以其较好的生物相容性和较高的生物

活性而备受关注。研究表明,羊膜和生物视膜均具有球结膜修复作用和抗瘢痕化作用<sup>[14-15]</sup>,具有支撑组织生长的能力,可作为干细胞横向生长的支架而促进球结膜的平整修复,瘢痕化增生较少,为球结膜的修复提供了一种良好的组织敷料<sup>[16-17]</sup>。但是由于羊膜和生物视膜来源于异体动物,一方面其来源有限,另一方面其应用过程中存在着传播疾病、免疫原性等潜在风险,



同时其处理和保存过程要求较高,步骤繁琐。目前,临床上迫切需要新型抗瘢痕材料以解决上述难题,本研究中对球结膜损伤后壳聚糖静电纺丝膜的促球结膜修复和抗瘢痕化作用进行探讨。

本研究中发现,利用静电纺丝技术制备的壳聚糖静电纺丝膜具有网格状空间结构,与羊膜空间结构相似<sup>[18-19]</sup>,术后同时间点生物羊膜与壳聚糖静电纺丝膜对球结膜的修复作用相似,兔球结膜损伤后 28 d 静电纺丝膜组球结膜表皮恢复平整,仅有轻度瘢痕化现象,且可保持球结膜囊形态的完整,具有促进球结膜修复作用和抗瘢痕化作用,间接说明壳聚糖静电纺丝膜具有与生物羊膜相似的生物功能,可为周围组织的横向生长提供理想的支架,促进组织的生理性恢复,避免病理性恢复,而且壳聚糖静电纺丝膜的效果优于羊膜。壳聚糖静电纺丝膜中 90% 以上的成分为壳聚糖,而壳聚糖是天然碱性生物多糖,具有促进凝血、促进伤口愈合、促进伤口渗出物吸收及不易脱水收缩等特点。

综上所述,本研究结果表明壳聚糖/明胶静电纺丝膜对球结膜具有较好的修复作用,移植后在兔球结膜损伤后 28 d 时可见球结膜表皮恢复平整,仅有轻度瘢痕化现象,且可保持球结膜囊形态的完整。本研究的球结膜损伤造模和修复方法与球结膜修复的自然过程相似,且治疗操作简单,疗效较好,可为球结膜损伤的修复提供新的途径。

## 参考文献

- [1] Xu J, Zhao JY, Xin R, et al. The effect of amniotic membrane transplantation on rabbit conjunctival surface reconstruction at the recovering stage of alkali burn [J]. *Int J Ophthalmol*, 2007, 7(3): 635-641.
- [2] 赵红, 韩建华, 林锦镛, 等. 壳聚糖膜在眼眶外伤早期修复中的作用 [J]. *中华眼科杂志*, 2008, 44(6): 554-557.  
Zhao H, Han JH, Lin JY, et al. Preliminary report on prevention of adhesion after orbital trauma by chitosan membrane [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2008, 44(6): 554-557.
- [3] 郝瑞, 赵堪兴. 生物可降解材料在眼科中的应用 [J]. *眼科研究*, 2008, 26(4): 317-320.  
Hao R, Zhao KX. Application of biodegradable material in ophthalmology [J]. *Chin Ophthal Res*, 2008, 26(4): 317-320.
- [4] 陈家祺. 眼前段严重烧伤活动期的手术治疗 [J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(1): 53-56.
- [5] 张美洪, 吴护平. 羊膜治疗部分眼表疾病的疗效观察 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2006, 24(2): 188-189.
- [6] 刘炳乾, 廖洪斐, 丁亚梅, 等. 兔结膜重建中羊膜细胞外基质、保存羊膜及自体结膜的比较 [J]. *国际眼科杂志*, 2007, 7(4): 983-986.  
Liu BQ, Liao HF, Ding YM, et al. Comparison of amnion extracellular matrix, frozen amnion membrane and autologous conjunctiva in rabbit conjunctival reconstruction [J]. *Int J Ophthalmol*, 2007, 7(4): 983-986.
- [7] Kim KW, Kim JC, Moon JH, et al. Management of complicated multirecurrent pterygia using multimicroporous expanded polytetrafluoroethylene [J]. *Br J Ophthalmol*, 2013, 97(6): 694-700. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2012-302784.
- [8] 陈怡粤, 王婷, 吴张松, 等. 利用电纺生物膜进行多细胞片层制备的方法研究 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2015, 21(4): 336-340. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1927.2015.04.009.
- Chen YY, Wang T, Wu ZS, et al. Preparation of multiple cell sheets with electrospun biofilms [J]. *Chin J Biomed Eng*, 2015, 21(4): 336-340. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1927.2015.04.009.
- [9] 郑玉强, 王卓实, 徐玲, 等. 曲安奈德/聚乳酸己内酯载药静电纺丝膜的抗兔眼滤过泡瘢痕化作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(7): 585-590. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.003.  
Zheng YQ, Wang ZS, Xu L, et al. Anti-scarring effects of triamcinolone acetamide/poly(lactic acid) caprolactone drug-loaded electrospinning film with trabeculectomy in rabbits [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(7): 585-590. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.003.
- [10] Elsabee MZ, Naguib HF, Morsi RE. Chitosan based nanofibers, review [J]. *Mater Sci & Engineer; C*, 2012, 32(7): 1711-726.
- [11] Liu Y, Park M, Shin HK, et al. Facile preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan/graphene oxide biocomposite nanofibers [J]. *J Indust & Engineer Chem*, 2014, 20(6): 4415-4420.
- [12] 周世有, 袁进, 陈龙山, 等. 新鲜和保存羊膜移植重建结膜眼表的临床对比研究 [J]. *眼科学报*, 2008, 24(1): 39-43.  
Zhou SY, Yuan J, Chen LS, et al. Fresh versus preserved amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction [J]. *Eye Sci*, 2008, 24(1): 39-43.
- [13] 柯碧莲, 邱孝芝, 张哲, 等. 羊膜移植重建结膜的组织学基础 [J]. *眼科研究*, 2004, 22(5): 459-462.  
Ke BL, Qiu XZ, Zhang X, et al. Histological basis of amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction [J]. *Chin Ophthal Res*, 2004, 22(5): 459-462.
- [14] 贾闪闪, 马科, 赵秀丽. 生物视网膜抑制结膜纤维瘢痕形成的实验研究 [J]. *眼科*, 2016, 25(3): 163-168.  
Jia SS, Ma K, Zhao XL. Experimental study of biological membrane inhibiting conjunctival fibrous scar formation [J]. *Ophthalmol CHN*, 2016, 25(3): 163-168.
- [15] 尹丹, 郭庆. 羊膜在眼科临床工作中的应用进展 [J]. *医学综述*, 2016, 22(11): 2152-2155. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2016.11.021.  
Yin D, Guo Q. Progress in the clinical application of amniotic membrane in ophthalmology [J]. *Med Recap*, 2016, 22(11): 2152-2155. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2016.11.021.
- [16] 丁勇, 徐锦堂, 陈建苏, 等. 兔角膜缘干细胞体外壳聚糖共混膜上培养的形态学观察 [J]. *眼科研究*, 2004, 22(3): 279-281.  
Ding Y, Xu JT, Chen JS, et al. Morphology of corneal limbal stem cell culture on chitosan scaffold surface in rabbit [J]. *Chin Ophthal Res*, 2004, 22(3): 279-281.
- [17] 曹静洁, 张琛, 赵少贞, 等. 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 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(2): 121-124. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.006.  
Cao JJ, Zhang C, Zhao SZ, et al. Feasibility of bacterial cellulose membrane as biological scaffold for construction of tissue engineering corneal epithelium [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(2): 121-124. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.006.
- [18] 钟金晟, 梅芳, 齐伟宏, 等. 聚乳酸/羟基磷灰石膜与人羊膜基质细胞联合构建骨组织工程细胞/支架复合体 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(8): 1345-1348. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.08.004.  
Zhong JS, Mei F, Qi WH, et al. Combination application of human amniotic mesenchymal cells and poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite membranes for construction of cells/scaffold complexes in bone tissue engineering [J]. *J Clin Rehabil Tissue Engineer Res*, 2012, 16(8): 1345-1348. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.08.004.
- [19] 王道源, 李舒梅, 林卡莉, 等. 新鲜羊膜、冻干羊膜、羊膜细胞外基质的形态研究 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2003, 21(10): 734-738.  
Wen DY, Li SM, Lin KL, et al. Comparisons on morphology among fresh and frozen amniotic membranes as well as amniotic extracellular matrix [J]. *Chin J Pract Ophthalmol*, 2003, 21(10): 734-738.

(收稿日期: 2017-07-11 修回日期: 2017-12-22)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)