

壳聚糖基角膜细胞载体的制备及其细胞相容性

高兴爽, 刘万顺, 韩宝芹, 位晓娟

中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003

摘要: 为探讨羟丙基壳聚糖基共混膜作为组织工程技术中角膜细胞培养载体的可行性, 分别制备了羟丙基壳聚糖/硫酸软骨素、羟丙基壳聚糖/明胶/硫酸软骨素以及羟丙基壳聚糖/氧化透明质酸/硫酸软骨素三种共混膜。测定其透光率、含水量和蛋白吸附性能; 在共混膜上培养兔角膜上皮细胞, 通过观察角膜上皮细胞在不同载体膜上的生长状态、贴附情况, 测定细胞活性以及上清液中乳酸脱氢酶的活性, 研究三种壳聚糖基载体膜片与角膜上皮细胞的相容性。膜片理化性质测定结果表明三种共混膜片具有良好的透明度, 适宜的含水量和较强的蛋白吸附性能; 细胞相容性实验结果表明羟丙基壳聚糖/明胶/硫酸软骨素共混膜对细胞的损伤最小, 有利于细胞在膜上的贴附和生长, 表现出良好的细胞相容性, 有望作为角膜细胞载体体外构建组织工程化角膜。

关键词: 壳聚糖, 载体, 角膜上皮细胞, 细胞相容性

Preparation and Cytocompatibility of Chitosan-based Carriers of Corneal Cells

Xingshuang Gao, Wanshun Liu, Baoqin Han, and Xiaojuan Wei

College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: To study the possibility of using hydroxypropyl chitosan-based blend membranes as carriers of corneal cells in tissue engineering, we prepared three kinds of blend membranes labeled hydroxypropyl chitosan/chondroitin sulfate, hydroxypropyl chitosan/gelatin/chondroitin sulfate and hydroxypropyl chitosan/oxidized hyaluronic acid/chondroitin sulfate. The transparency, water content and ability of protein adsorption of the blend membranes were measured. To evaluate the cytocompatibility of the blend membranes with corneal epithelial cells, rabbit corneal epithelial cells were cultured on the surface of the carrier membranes. The morphological characteristics, cell adhesion, cell proliferation and the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the media were investigated. Three kinds of blend membranes had good optical transmittance, suitable water content and ability of protein adsorption. The results showed that the less injury was made to corneal epithelial cells by the hydroxypropyl chitosan/gelatin/chondroitin sulfate blend membrane than the others. This kind of membrane was favor of the growth and adhesion of corneal epithelial cells. The hydroxypropyl chitosan/gelatin/chondroitin sulfate blend membrane is a promising carrier of corneal cells and can be used in reconstruction of tissue engineered cornea.

Keywords: chitosan, carrier, corneal epithelial cell, cytocompatibility

Received: November 26, 2007; **Accepted:** January 3, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (Nos.2006AA02A132, 2007AA091603).

Corresponding author: Wanshun Liu. Tel: +86-532-82032105; E-mail: WanshunLiu@hotmail.com

国家“十一五”863项目(Nos. 2006AA02A132, 2007AA091603)资助。

角膜是眼球光学系统的重要组成部分,因各种疾患或创伤引起的角膜病变,可导致患者视力下降甚至致盲。有资料表明,临床上角膜疾患占眼科所有疾病的40%,其中80%可以通过角膜移植术恢复透明^[1]。但角膜供体来源的短缺和移植后免疫排斥反应的发生是困扰医生和患者的最大问题。随着组织工程技术的发展和角膜细胞组织培养方法的建立,构建组织工程角膜进行移植来治疗角膜盲成为研究的一个热点。迄今为止,被研究用作角膜细胞培养贴附载体的材料包括:异体角膜片、明胶薄膜、水凝胶膜、胶原基质、可降解聚合物膜、羊膜以及后弹力层膜等^[2-7],但降解速度过慢或过快,机械强度不足以及免疫原性等问题,制约了其用于临床的深入研究。因此,研制一种适合角膜细胞贴附生长,具有良好组织相容性和生物降解性的移植载体已成为目前研究的重点。

近年来,壳聚糖(Chitosan)作为一种新型的组织工程材料越来越受到人们的重视,它作为载体培养上皮细胞、内皮细胞和软骨细胞等已有大量报道。以壳聚糖复合胶原、硫酸软骨素、透明质酸钠等制成的共混膜亦在角膜组织构建研究中得到应用^[8-12]。然而,壳聚糖植入角膜后炎症反应较重,有炎症细胞浸润和新生血管长入,而且降解时间较长,因此,若要以壳聚糖作为构建角膜的载体,则需在结构上做进一步化学改性,以提高其生物相容性^[13]。羟丙基壳聚糖(Hydroxypropyl chitosan, HPCTS)是由环氧丙烷与壳聚糖进行醚化反应而制得的一种水溶性壳聚糖衍生物,体内外降解实验表明,与壳聚糖膜相比,具有更好的生物降解性和生物相容性^[14]。Yamamura^[15]等将HPCTS用于血管移植物的构建并取得较好的实验结果,然而HPCTS在角膜支架中的应用尚未见报道。

为研究HPCTS作为组织工程技术中角膜细胞培养载体的可行性,本课题组做了大量的筛选和改进工作。本研究以硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, CS)、氧化透明质酸(Oxidized hyaluronic acid, OHA)和明胶(Gelatin, Gel)为辅料,与HPCTS进行共混,制备出3种共混膜,研究并比较这些膜片与角膜上皮细胞的相容性,为其在组织工程角膜支架方面的应用提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新西兰兔(0.5 kg左右,购于青岛市药品检验所), HPCTS(本实验室制备并纯化, MW=35 000), CS(本实验室制备并纯化, MW=10 000), Gel(北京科昊达生物技术发展有限公司), OHA(本实验室制备并纯化, 氧化度约5%), 生物可降解交联剂(本实验室制备并纯化), F12 细胞培养基(美国, Gibco 公司), DMEM 培养基(美国, Gibco 公司), 新生牛血清(新西兰, Hyclone 公司), 氢化可的松(上海第一生化医药公司), bFGF(暨南大学周长忍教授提供), 青霉素钠、硫酸链霉素(石家庄制药集团有限公司), 胰酶(美国, Gibco 公司), 海洋生物活性提取物(本实验室制备并纯化), 四甲基偶氮唑盐(MTT, 美国, Sigma 公司), 乳酸脱氢酶测试盒(南京建成生物工程公司), 牛血清白蛋白(国产, 华晟生物); 氢氧化钠、醋酸钾、氢氧化钾、乙醇, 均为分析纯试剂。

1.2 主要仪器

HF Safe 760S 生物安全柜(上海力申), HF90 CO₂ 细胞培养箱(上海力申), IX 70 Olympus 倒置显微镜(日本 Olympus), Multiskan Mk3 型酶标仪(芬兰雷勃), TU1800 型紫外可见分光光度计(北京普析)。

1.3 三种 HPCTS 共混膜的制备

1.3.1 HPCTS-CS 共混膜的制备

取 HPCTS 0.8 g, 加入 40 mL 三蒸水, 搅拌至完全溶解; 加入一定量 0.2% 的 CS 溶液, 搅拌使其充分混合均匀; 加入醋酸钾 0.8 g, 搅拌溶解后, 调溶液 pH 至 10, 加入一定量的交联剂, 搅拌均匀, 胶液采用流延法制膜, 于 40°C 下干燥。干燥膜片用蒸馏水浸泡洗涤至中性, 制成 HPCTS-CS 膜片, 记为 1#膜。

1.3.2 HPCTS-Gel-CS 共混膜的制备

取 HPCTS 0.8 g, 加入 40 mL 三蒸水, 搅拌至完全溶解; 加入一定量 0.2% 的 CS 溶液和 2% 的 Gel 溶液, 搅拌使其充分混合均匀; 其余步骤同 1.3.1, 干燥膜片用蒸馏水浸泡洗涤至中性, 制成 HPCTS-Gel-CS 膜片, 记为 2#膜。

1.3.3 HPCTS-OHA-CS 共混膜的制备

取 HPCTS 0.8 g, 加入 40 mL 三蒸水, 搅拌至完全溶解; 加入一定量 0.2% 的 OHA 溶液和 0.2% 的 CS 溶液, 搅拌使其充分混合均匀; 其余步骤同 1.3.1,

干燥膜片用蒸馏水浸泡洗涤至中性,制成 HPCTS-OHA-CS 膜片,记为 3#膜。

1.4 三种共混膜的几个理化性质的测定

1.4.1 透光率

将膜片用水充分浸泡后剪成 1 cm 宽的长条,平整紧密地贴在比色皿内壁,加水,以不贴膜的比色皿加水调零后,测定膜片在不同波长(400 nm、500 nm、600 nm、700 nm、800 nm)下的透光率。

1.4.2 含水量

将膜片切成直径为 1.5 cm 圆片,浸入水中 48 h 后取出,用滤纸轻轻吸去表面多余水分,测得湿重为 W_1 ,然后将湿膜于 105°C 干燥至恒重,置于干燥器中冷却后,称其干重为 W_2 。根据下式计算膜片的含水量:

$$\text{含水量} = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$$

1.4.3 蛋白吸附性能

将面积为 0.95 cm² 的共混膜置于 4 mL 0.05% 牛血清白蛋白溶液中,37°C 保温 24 h 后,用考马斯亮蓝法^[16]测定溶液中蛋白质的含量,以此表征膜片对蛋白质的吸附能力。

1.5 兔角膜上皮细胞的培养

1.5.1 细胞培养液的制备

基础培养基为 DMEM/F12 (1:1),使用时加新生牛血清、双抗液、氢化可的松、生长因子以及本实验室提取的海洋生物活性物质,其浓度分别为:新生牛血清 20%,青霉素钠 100 u/mL,硫酸链霉素 100 u/mL,氢化可的松 1 μmol/mL, bFGF 50 ng/mL,海洋生物活性提取物 100 μg/mL。

1.5.2 兔角膜上皮细胞的原代培养和传代

无菌摘取新西兰兔眼球,去除冗余组织,用无菌生理盐水冲洗干净后,在含 2000 u/mL 硫酸庆大霉素的无菌生理盐水中浸泡 20 min。超净台中沿角膜缘取下角膜,小心翻转角膜,将内皮层向下铺在无菌的六孔白瓷板上,加 0.25% 的胰蛋白酶室温下消化 2 min,立即用含 20% 新生牛血清的 DMEM/F12 培养基终止反应。将角膜剪成 1 mm × 1 mm 大小的组织块,上皮层向下将组织块贴附于 25 mL 的细胞培养瓶中。37°C, 5% CO₂, 饱和湿度的条件下培养 8 h,然后加入 20% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基 2 mL,相同条件下继续培养。

待原代细胞铺满细胞培养瓶时,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化进行传代,调整细胞浓度为 $(1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5)$ / mL,然后将细胞悬液分别加至 2 个培养瓶中,

37°C, 5% CO₂ 条件下进行培养,1~2 d 细胞大部分贴壁后更换培养液。每日倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.6 兔角膜上皮细胞与 HPCTS 共混膜的相容性

1.6.1 三种共混膜的处理

环钻钻取直径为 1.1 cm 的膜片,依次用 25%、50% 和 75% 的乙醇浸泡处理,每次 3 h,然后将膜片分装至无菌瓶中,加入 75% 的乙醇中消毒 48 h 后,用 D-Hank's 冲洗浸泡,每 10 h 换液 1 次,重复 3 次后置于无菌 D-Hank's 中 4°C 保存备用。

1.6.2 三种共混膜细胞相容性的比较

取第 2 代细胞消化制成 (5×10^5) / mL 的细胞悬液。将处理好的膜片铺于 48 孔板中,然后小心加入细胞悬液,每孔 200 μL。以细胞直接接种在培养板上的生长情况作为对照。37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每 3 d 换液 1 次。

(1) 角膜上皮细胞在不同共混膜上生长的形态学观察: 将兔角膜上皮细胞接种在不同共混膜上后,用倒置显微镜定期观察并记录细胞在膜上的生长形态。

(2) 角膜上皮细胞乳酸脱氢酶活性的测定: 将兔角膜上皮细胞接种在不同共混膜上培养 72 h、144 h 及 192 h 后,取上清液,根据试剂盒方法测定培养液中乳酸脱氢酶的活性,以评价不同载体膜片对角膜上皮细胞的毒性。

(3) 角膜上皮细胞在 3 种共混膜上生长活性的测定: 以 MTT 法分别测定角膜上皮细胞在不同共混膜上生长 96 h、168 h 及 216 h 后在 490 nm 处的光吸收值,以评价细胞在不同载体膜片上的生长活性。

2 结果

2.1 三种共混膜的理化性质

2.1.1 透光率

膜片的良好透明性是角膜细胞贴附载体的基本要求。从图 1 可以看出,3 种膜片在可见光范围内的透光率均大于 90%,与真实角膜接近,符合组织工程角膜支架的要求。同时膜片的透光率通常也是判断共混高分子相容好坏的辅助手段^[11],图 1 结果也说明 3 种膜片中的共混材料可以很好地相容,形成了结构均一,透明性好的共混膜。

2.1.2 含水量和蛋白吸附性能

载体材料的亲水性和蛋白吸附性能是影响材料细胞相容性的 2 个重要因素。材料含水量越高,则

亲水性越好。本试验所制备的 3 种共混膜的含水量较高,分别为 85.54%、81.77%和 79.62%,与含水量为 78%左右的人角膜基质^[17]较接近。共混膜对牛血清白蛋白的吸附量分别为 349.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、238.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 361.88 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,有较强的吸附能力,为细胞的贴附提供了良好的条件。

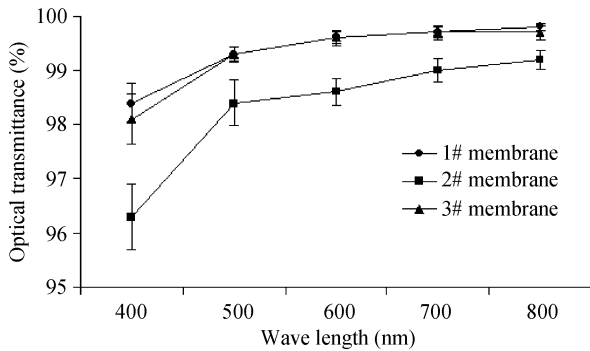


图 1 三种共混膜的透光率

Fig. 1 Optical transmittance of the blend membranes
Each point represents the mean \pm SD of three experiments

表 1 共混膜的含水量和蛋白吸附性能

Table 1 The water contents and abilities of protein adsorption of the blend membranes ($n=4$)

Blend membranes	Water content (%)	Protein adsorption ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1#	85.54 \pm 3.69	349.15 \pm 25.27
2#	81.77 \pm 2.81	238.75 \pm 19.71
3#	79.62 \pm 3.32	361.88 \pm 28.35

2.2 兔角膜上皮细胞在不同 HPCTS 共混膜上的形态观察

以倒置显微镜观察角膜上皮细胞在培养板及三种共混膜上的生长情况(见图 2~5),发现将角膜上皮细胞接种在不同配方共混膜上 24 h 后,已有大量细胞贴附在 2#膜上,细胞呈短梭形,胞体饱满(图 4a),而 1#和 3#膜上细胞数量较少,贴附较差,多呈圆形(图 3a,图 5a);48 h 后,2#上细胞生长状态较好,数目较多,伸出伪足贴壁生长,毗邻细胞连在一起。1#膜和 3#膜上细胞数量较少。96 h 后,2#膜上细胞呈密集生长状态,胞体呈狭长的梭形结构,基本长成单层(图 4b);1#膜和 3#膜上细胞数量较少,细胞生长状态较差(图 3b,图 5b)。144 h 时细胞已经在 2#膜上形成密集的单层,排列紧密,胞体呈梭形(图 4c)。3#膜上细胞胞体饱满,生长状态较好,长满整个膜片(图 5c)。而 1#膜上细胞状态虽然有所好转,但尚未长成单层(图 3c)。

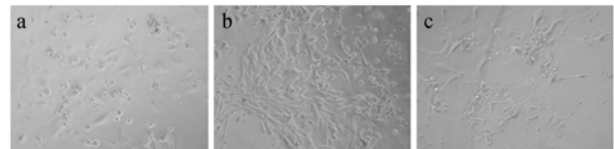


图 2 兔角膜上皮细胞在培养板上生长 24 h、96 h 和 144 h 后的形态

Fig. 2 The typical micrographs of rabbit corneal epithelial cells cultured on flask for 24 h (a), 96 h (b) and 144 h (c) ($\times 100$)

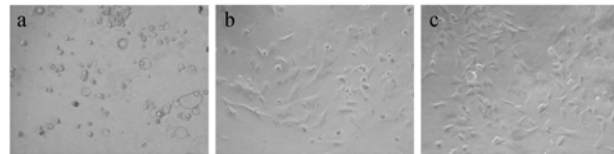


图 3 兔角膜上皮细胞在 1#共混膜上生长 24 h、96 h 和 144 h 后的形态

Fig. 3 The light micrographs of rabbit corneal epithelial cells cultured on 1# blend membranes for 24 h (a), 96 h (b) and 144 h (c) ($\times 100$)



图 4 兔角膜上皮细胞在 2#共混膜上生长 24 h、96 h 和 144 h 后的形态

Fig. 4 The light micrographs of rabbit corneal epithelial cells cultured on 2# blend membranes for 24 h (a), 96 h (b) and 144 h (c) ($\times 100$)

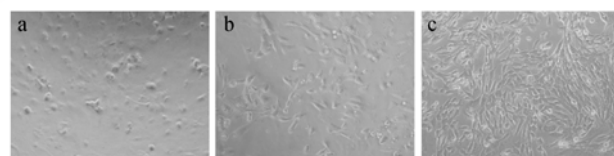


图 5 兔角膜上皮细胞在 3#共混膜上生长 24 h、96 h 和 144 h 后的形态

Fig. 5 The light micrographs of rabbit corneal epithelial cells cultured on 3# blend membranes for 24 h (a), 96 h (b) and 144 h (c) ($\times 100$)

2.3 角膜上皮细胞乳酸脱氢酶活性的测定

LDH 活性测定结果表明,培养早期,膜上细胞的生长状态和培养板上的细胞没有明显差别,且 LDH 释放量也没有显著性差异;但随着培养时间的延长,细胞逐渐适应膜片表面环境后,膜上细胞的生长状态较培养板上的要好,表明细胞膜完整性好,故 LDH 释放量低,其中 2#膜最佳,该结果与前面的形态学观察相一致。

2.4 角膜上皮细胞在不同共混膜上生长活性的测定

MTT 法测定角膜上皮细胞在各种共混膜上的生长活性见图 7。由图可以看出细胞在 3 种壳聚糖基

共混膜上的生长活性随着时间的增加而增高。在 1#膜上细胞的增殖能力最差, 贴附其上的细胞增殖较少, 2#膜上细胞的适应期最短, 增殖能力最强, 3#膜在膜片上的适应期较长, 但后期增殖较快。

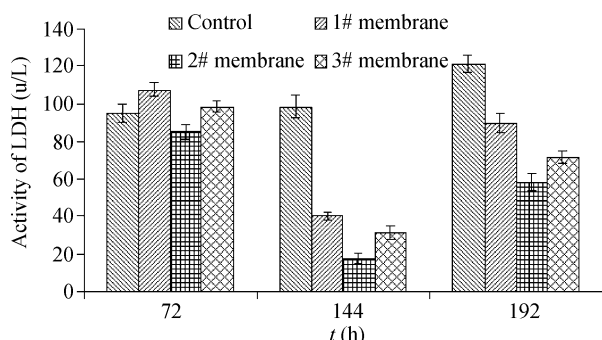


图 6 培养不同时间时培养基中乳酸脱氢酶活性变化
Fig. 6 The activity of LDH in used media of culturing cells on blend membranes for different time

Each point represents the mean \pm SD of six experiments

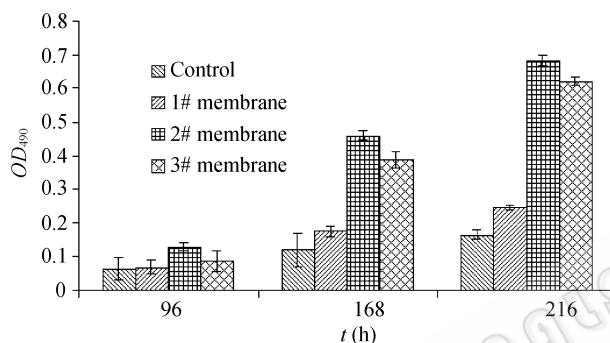


图 7 MTT 法测定角膜上皮细胞在不同共混膜上的生长活性

Fig. 7 The activity of corneal epithelial cells cultured on different blend membranes using MTT assay

Each point represents the mean \pm SD of six experiments

3 讨论

随着细胞生物学、分子生物学、材料学、生物工程学等多学科的发展及交叉研究的深入, 组织工程化的角膜组织重建越来越表现出广阔的发展前景, 然而, 工程化角膜组织的研究刚刚起步, 尚面临许多难题: 首要的便是支架材料的生物相容性问题。目前报道的支架材料植入后大多存在以炎症细胞浸润和新生血管长入为显著特征的炎症反应, 尽管粘附在支架表面的巨噬细胞在材料的降解中起着关键作用, 但是他们在聚合物表面的存在可能导致支架复合物内细胞以及周围宿主组织的严重受损^[18]。即使降解产物无毒副作用, 也会限制它们的应用。另外, 材料的降解时间大多较长, 从而妨碍了新组织

的生成。因此, 寻找其它更好的组织工程角膜生物材料或复合材料成为当前研究的热点。

壳聚糖在组织工程角膜中的应用已有报道, 但炎症反应等不利因素同样限制了其进一步的应用。为改善壳聚糖的生物相容性, 我们对其进行了化学改性, 制备了相容性更好的 HPCTS 作为主体材料, 这在角膜支架的研究中尚未见报道。本研究采用了共混的方法制备了 3 种不同的 HPCTS 基共混膜, 并研究载体膜片与角膜细胞的相容性, 以期筛选出有应用价值的工程化角膜支架材料。

载体材料的亲水性和蛋白吸附性能是影响材料细胞相容性的两个重要因素。研究表明, 材料适宜的亲水性有利于细胞的贴附和铺展, 而亲水性太强或疏水性太强的表面均不利于细胞的黏附和伸展^[19]。为此, 我们通过控制交联度以改善膜片的亲水性, 并从仿生的角度选定与真实角膜含水量较接近的膜片作为实验对象。材料对蛋白的吸附性也是影响细胞贴附的重要因素, 研究发现, 当生物材料与血液、组织液以及含有血清的培养基接触时, 材料的表面会迅速地吸附一层蛋白分子, 然后才是细胞到达材料的表面^[20]。而本研究中 3 种膜片良好的蛋白吸附性为细胞贴附提供了前提。

实验中我们发现, 不同配方的 HPCTS 基载体膜片对角膜上皮细胞的相容性有较大的差别。与壳聚糖相似, 单纯的 HPCTS 膜带有大量正电荷, 有较强的吸附作用, 能使细胞很好地贴附, 但长期培养过程中会影响细胞的生长, 这一点在我们前期的实验中得到了证实。考虑到这一情况, 我们试图通过共混来改善材料的性质。研究结果表明, 2#组膜片上的细胞无论在形态还是活性上都显著优于另外两个实验组, 而且由上清液中 LDH 活性测定结果也可看出, 长时间培养时, 膜片对细胞并没有明显的毒性。分析原因, 我们推测: 明胶中含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)生物活性短肽, 这些序列使明胶可固定水分子形成螺旋结构, 有利于细胞表面粘附分子识别^[21]。而硫酸软骨素的引入不仅有利于改善膜片表面的电荷, 而且含有硫酸软骨素的载体可促进细胞分泌 II 型胶原和蛋白多糖^[22], 所以它的添加提高了载体膜片对角膜上皮细胞的相容性。因此, 角膜上皮细胞在 2#膜上的适应期较短, 能够很快地贴附, 并进入细胞周期。与 2#膜相比, 3#膜中氧化透明质

酸的加入, 效果显然没有明胶好, 尽管培养后期细胞仍能长成单层, 但细胞在膜片上的适应期较长, 难以满足临床的要求。

综上所述, 以羟丙基壳聚糖、明胶以及硫酸软骨素按一定比例制备出的共混膜片对角膜上皮细胞具有良好的相容性, 且无毒副作用, 为壳聚糖基组织工程化角膜支架的研究和开发提供了实验依据。然而工程化角膜的研究制备是一项系统而复杂的工作, 以上实验内容仅是我们探索过程中的一小部分, 还有很多工作尚需完成: (1)HPCTS 基速率支架的加工和理化性质的进一步优化; (2)工程化角膜的体外构建及移植实验; (3)支架降解和组织形成的匹配以及机理等。实验进展情况我们将在后续研究中予以报道。

REFERENCES

- [1] Xie LX. Problems and strategies of corneal surgery in China. *Chin J Ophthalmol*, 2005, **41**(8): 702–704.
谢立信. 我国角膜手术的现状和发展策略. *中华眼科杂志*, 2005, **41**(8): 702–704.
- [2] Mohay J, Lange TM, Soltau JB, *et al.* Transplantation of corneal endothelial cells using a cell carrier device. *Cornea*, 1994, **13**(2): 173–182.
- [3] Orwin EJ, Hubel A. *In vitro* culture characteristics of corneal epithelial, endothelial and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*, 2000, **6**(4): 307–319.
- [4] Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, *et al.* Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, **45**(9): 2992–2997.
- [5] Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, *et al.* Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng*, 1999, **5**(3): 187–196.
- [6] Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, *et al.* Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, **45**(3): 800–806.
- [7] Engelmann K, Drexler D, Böhnke M. Transplantation of adult human and porcine corneal endothelial cells onto human recipients *in vitro*. Part I: cell culturing and transplantation procedure. *Cornea*, 1999, **18**(2): 199–206.
- [8] Nettles DI, Elder SH, Gilbert JA. Potential use of chitosan material as a cell scaffold for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*, 2002, **81**(6): 1009–1006.
- [9] Chen JS, Li QH, Xu JT, *et al.* Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs*, 2005, **29**(2): 104–113.
- [10] Ding Y, Xu JT, Chen JS, *et al.* Observation of rabbit keratocytes cultured on chitosan-collagen scaffold. *Recent Adv Ophthalmol*, 2004, **24**(2): 88–90.
- [11] Yao ZA, Han BQ, Liu WZ, *et al.* The properties of the chitosan-chondroitin sulfate blend membrane. *High Technol Lett*, 2004, **14**(9): 95–99.
姚子昂, 韩宝芹, 刘伟治, 等. 壳聚糖-硫酸软骨素共混膜性质的研究. *高技术通讯*, 2004, **14**(9): 95–99.
- [12] Chen LH, Liu WS, Han BQ, *et al.* Studies on the properties of chitosan/chondroitin sulfate blend film as corneal endothelial cell carrier and transplantation trail. *Chem J Chin Univ*, 2006, **28**(5): 880–884.
陈列欢, 刘万顺, 韩宝芹, 等. 角膜内皮细胞载体膜片的性质研究及移植试验. *高等学校化学学报*, 2006, **28**(5): 880–884.
- [13] Fu Y, Chen P, Fan XQ. Comparison of xenogenic corneal acellular matrix and chitosan carrier for reconstruction of biological cornea. *Chin Ophthal Res*, 2006, **24**(6): 561–564.
傅瑶, 陈苹, 范先群. 异种角膜脱细胞基质和几丁糖载体构建角膜基质层的比较. *眼科研究*, 2006, **24**(6): 561–564.
- [14] Liu TF, Qi QP, Sui H, *et al.* Study on biodegradability of hydroxypropylated chitosan with diverse degrees of substitution. *Chin J Mar Drugs*, 2004, **23**(1): 33–36.
刘天富, 戚秋鹏, 隋红, 等. 不同取代度的羟丙基壳聚糖生物降解性研究. *中国海洋药物*, 2004, **23**(1): 33–36.
- [15] Yamamura K, Sakurai T, Yano K, *et al.* Sustained release of basic fibroblast growth factor from the synthetic vascular prosthesis using hydroxypropyl chitosan acetate. *J Biomed Mater Res*, 1995, **29**(2): 203–206.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1-2): 248–254.
- [17] Thiagarajah JR, Verkman AS. Aquaporin deletion in mice reduces corneal water permeability and delays restoration of transparency after swelling. *J Biol Chem*, 2002, **277**(21): 19139–19144.
- [18] Lai JY, Hsiue GH. Functional biomedical polymers for corneal regenerative medicine. *React Funct Polym*, 2007, **67**(11): 1284–1291.
- [19] Van Wachem PB, Hoget AH, Beugeling T, *et al.* Adhesion of cultered human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials*, 1987, **8**(5): 323–328.
- [20] Kasemo B. Biological surface science. *Surf Sci*, 2002, **500**(1): 656–677.
- [21] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, *et al.* *In vitro* characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2005, **26**(36): 7616–7627.
- [22] Sechrist VF, Miao YJ, Niyibizi C, *et al.* GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res*, 2000, **49** (4): 534–541.