

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103007349 A

(43) 申请公布日 2013.04.03

(21) 申请号 201210539314.X

(22) 申请日 2012.12.13

(71) 申请人 吉林省拓华生物科技有限公司

地址 136000 吉林省四平市铁西区南迎宾街
89号

(72) 发明人 毕薇薇 姜丽君

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限
公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

A61L 27/36(2006.01)

A61L 27/54(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法。具体而言,本发明利用足月剖腹产产妇废弃的羊膜制备了负载间充质干细胞的大面积的羊膜贴片。本发明为面积较大的烧伤和褥疮患者的治疗提供了有效的支持,具有广阔的应用前景。

1. 一种负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其包括如下步骤:

1)将取自足月剖宫产产妇的废弃羊膜用 PBS 洗净,然后用 0.5-5.0g/L 的胰蛋白酶消化去除羊膜表面的上皮细胞,

2) 选取厚度为 1-4mm 的玻璃板,切割打磨成能放入直径 15-25cm 的培养皿中的大小,

3) 将稍大于上述玻璃板的羊膜铺在玻璃板上,多余部分内折,使表面尽量平整,用细胞刮刀反复刮几次去除残留细胞,将膜片连同玻璃板一同放入培养皿内,浸泡在 α -MEM 培养基或者 DMEM 培养基中,上皮面向上,4℃ 保存备用,

4) 将培养好的干细胞以 $0.5-2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于上述处理好的羊膜上,培养至细胞贴壁,再加入 10-50mL 含 10-20% 血清的 α -MEM 培养基或 DMEM 培养基,细胞长满后待移植应用。

2. 根据权利要求 1 所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其特征在于所述大面积指面积在 145cm^2 之上,优选地,所述大面积指面积在 180cm^2 以上、 200cm^2 以上、 250cm^2 以上或 300cm^2 以上。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其特征在于步骤 2) 所述玻璃板的厚度为 1.5mm,优选地,所述玻璃板不进行硅烷化处理。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其特征在于步骤 2) 所述玻璃板的形状为圆形、方形、长方形,优选地,所述玻璃板的形状为圆形;优选地,所述玻璃板的大小与培养皿的大小尽量接近,以铺上羊膜后能置入培养皿为限;优选地,所述玻璃板的边缘进行打磨处理,以确保光滑、平整、无毛刺或玻璃渣;优选地,所述玻璃板的一面可以固定有大小小于所述玻璃板大小的突起物,以用于辅助固定羊膜,优选地,所述突起物为玻璃或聚丙烯材质,优选地,所述突起物为与玻璃板呈同心圆的圆形突起物或形成平面且使玻璃板平稳地水平置于培养皿中的至少 3 个栓状突起物。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其特征在于所述干细胞是间充质干细胞,优选地,所述干细胞是脐带源间充质干细胞。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其特征在于所述培养皿的直径为 18cm;优选地,所述培养皿为玻璃透明培养皿或聚苯乙烯透明培养皿。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其特征在于步骤 1) 中用 2.5g/L 的胰蛋白酶消化羊膜表面的上皮细胞;优先地,步骤 4) 中干细胞的接种量为 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$,更优选地,步骤 4) 中先加入少量 α -MEM 培养基,在细胞生长至贴壁后再加入 10-20ml 含 10-20% 血清的 α -MEM 培养基。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其特征在于所述干细胞是第三代脐带源间充质干细胞。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法获得的负载干细胞的大面积羊膜贴片。

10. 根据权利要求 1-8 任一项所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法获得的负载干细胞的大面积羊膜贴片在制备治疗大面积褥疮或烧伤的医用材料中的用途。

负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法及利用该方法获得的负载干细胞的大面积羊膜贴片,以及所述负载干细胞的大面积羊膜贴片在制备治疗大面积褥疮或烧伤的医用材料中的用途。

背景技术

[0002] 皮肤是人体与外界环境接触的屏障,不仅起保护、分泌、代谢和感觉等作用,而且参与免疫反应和维持机体内环境的稳定。截至目前,严重创伤和大面积烧伤患者的皮源缺乏一直是临床亟待解决的难题。组织工程皮肤产品开发的成功,使人工皮肤的研究实现了质的飞跃。目前,已经上市并应用于临床的组织工程皮肤产品有Dermagraft[®]和ActivSkin[®]等,有一定的临床效果,但仍有一些不足之处而且价格非常昂贵。

[0003] 现有技术中关于组织工程皮片制备的方法主要有:

[0004] 1、以成纤维细胞作为滋养层,培养人表皮细胞膜片,其脆性大,移植成功率低。

[0005] 2、以胶原做支架,种植干细胞,构建组织工程化复合皮肤治疗皮肤溃疡。

[0006] 3、用从胎儿脐带血中获取的血管原始祖细胞分化的内皮细胞构建的皮肤替代物,可以促进有免疫缺陷的患者皮损部位血管化的形成。

[0007] 4、以包皮为细胞来源,采用消化法获得角质化细胞、成纤维细胞和黑素细胞,构建组织工程皮肤。

[0008] 早期的烧伤创面覆盖可以限制细菌生长、预防感染、防止水分及电解质的丢失。自体皮肤移植是治疗烧伤的首选,但是对于大面积烧伤,自体皮肤不能满足需求,而异体皮肤能引起明显的免疫排斥。因而,组织工程化皮肤的研究已成为生命科学研究领域的热点之一。

[0009] 人羊膜为半透明的薄膜,无血管、神经和淋巴管,有多种促进细胞增殖的营养成分,不表达人类白细胞抗原,具有抗微生物作用和较好的粘附性。目前已有用羊膜移植物治疗眼表损伤疾病的报道。但现有技术多采用直接剥离的羊膜,无任何处理。有的研究者在所述羊膜上负载了自体骨髓间充质干细胞。由于眼部面积较小,所以负载细胞的羊膜贴片很容易进行制备。但大面积负载细胞的羊膜贴片的制备由于受容器限制和其浸泡在培养基中的表面不平整,细胞不易生长,进而使其应用受到限制。

[0010] 以往研究的组织工程皮肤覆盖物不仅价格昂贵,而且技术操作繁琐,有一定的技术难度并且成本造价较高。本发明要解决上述应用方面的不足,制备一种操作简单、使用方便、成本低且应用效果好的皮肤缺损修复贴片。由于脐带源间充质干细胞有多项分化潜能,能分化为上皮细胞,且羊膜与脐带为孕妇生产后的废弃物,患者自愿捐献不存在伦理问题。因此,如果能以简便方法制备负载间充质干细胞的大面积的羊膜贴片,将对大面积烫伤等皮肤疾病的治疗提供可资使用的基础材料,具有重要的经济意义和社会意义。

发明内容

[0011] 因此,本发明的技术目的是找寻可以获取大面积羊膜贴片的方法。

[0012] 因此,本发明的第一方面涉及一种负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法,其包括如下步骤:

[0013] 1)将取自足月剖宫产产妇的废弃羊膜用PBS洗净,然后用0.5-5.0g/L的胰蛋白酶消化去除羊膜表面的上皮细胞,

[0014] 2)选取厚度为1-4mm的玻璃板,切割打磨成能放入直径15-25cm的培养皿中的大小,

[0015] 3)将稍大于上述玻璃板的羊膜铺在玻璃板上,多余部分内折,使表面尽量平整,用细胞刮刀反复刮几次去除残留细胞,将膜片连同玻璃板一同放入培养皿内,浸泡在 α -MEM培养基或者DMEM培养基中,上皮面向上,4℃保存备用,

[0016] 4)将培养好的干细胞以 $0.5-2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于上述处理好的羊膜上,培养至细胞贴壁,再加入10-50mL含10-20%血清的 α -MEM培养基或DMEM培养基,细胞长满后待移植应用。

[0017] 其中,所述大面积指面积在 145cm^2 之上,优选地,所述大面积指面积在 180cm^2 以上、 200cm^2 以上、 250cm^2 以上或 300cm^2 以上。

[0018] 优选地,步骤2)所述玻璃板的厚度为1.5mm,优选地,所述玻璃板不进行硅烷化处理。

[0019] 优选地,步骤2)所述玻璃板的形状为圆形、方形、长方形,优选地,所述玻璃板的形状为圆形;优选地,所述玻璃板的大小与培养皿的大小尽量接近,以铺上羊膜后能置入培养皿为限;优选地,所述玻璃板的边缘进行打磨处理,以确保光滑、平整、无毛刺或玻璃渣;优选地,所述玻璃板的一面可以固定有大小小于所述玻璃板大小的突起物,以用于辅助固定羊膜,优选地,所述突起物为玻璃或聚丙烯材质,优选地,所述突起物为与玻璃板呈同心圆的圆形突起物或形成平面且使玻璃板平稳地水平置于培养皿中的至少3个栓状突起物。

[0020] 优选地,所述干细胞是间充质干细胞,优选地,所述干细胞是脐带源间充质干细胞。

[0021] 优选地,所述培养皿的直径为18cm;优选地,所述培养皿为玻璃透明培养皿或聚苯乙烯透明培养皿。

[0022] 优选地,步骤1)中用2.5g/L的胰蛋白酶消化羊膜表面的上皮细胞;优先地,步骤4)中干细胞的接种量为 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$,更优选地,步骤4)中先加入少量 α -MEM培养基,在细胞生长至贴壁后再加入10-20ml含10-20%血清的 α -MEM培养基。

[0023] 优选地,所述干细胞是第三代脐带源间充质干细胞。

[0024] 本发明的第二方面涉及根据上述第一方面所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法获得的负载干细胞的大面积羊膜贴片。

[0025] 本发明的第三方面涉及根据上述第一方面所述的负载干细胞的大面积羊膜贴片的制备方法获得的负载干细胞的大面积羊膜贴片在制备治疗大面积褥疮或烧伤的医用材料中的用途。

[0026] 换言之,本发明利用细胞组织工程技术,用自行发明制作的支持物将羊膜固定平整,将人脐带源间充质干细胞种植在人羊膜表面,制备负载干细胞的大面积的人羊膜贴片治疗大面积的皮肤缺损,实现了促进创面愈合的预期目的。

[0027] 本发明的有益效果在于,根据本发明的技术方案制备的负载脐带源间充质干细胞的羊膜贴片不仅面积相比于现有产品大大增加,而且经过显微镜下的形态学观察发现,所述干细胞在羊膜上生长良好。经免疫荧光染色发现,羊膜贴片上的细胞表达间充质干细胞的表面标志物 CD44 和 CD90。

[0028] 虽然现有技术中也有在 3cm 直径的羊膜上用硝酸纤维素膜作支架贴于基底面,制成贴片用于眼角膜损伤的报道,但该膜片较小,不能覆盖面积大的皮肤缺损。截至目前,还没有在直径为 10cm 以上的大羊膜贴片上种细胞的报道。因为细胞贴壁生长的一个条件是需要将要贴壁的表面光滑平整,而羊膜在无支持物的情况下浸到培养液中时,会由于浮力而被泡起,造成表面较多褶皱,使细胞不易贴壁并进而影响其生长和增殖。同时,羊膜应该能容易且平整地固定在支持物上,并置于细胞培养皿中。为了使获得的负载干细胞的大面积羊膜贴片在应用时能尽量完整且紧密地与创面贴合,在将羊膜原片固定在支持物上时应尽量保持羊膜原片的平整和完整。为此,所述支持物的边缘应平整、光滑、无突起的毛刺或玻璃渣,所述支持物的一面可以固定有用于辅助固定羊膜原片的突起物,所述突起物应使支持物可以稳定地置于培养皿中。

[0029] 同时,虽然理论上讲,厚度较大的支持物如玻璃板有利于将羊膜原片固定其上,但为避免对后续细胞培养的不利影响(厚度较大时,支持物容易干扰培养液的温度,且使培养皿中的有效培养基的体积减少,导致需要频繁更换培养液,既增加了污染的概率,又造成了不必要的操作),需要支持物的厚度处于恰当的范围。同时,为了保持足够的强度,以避免在将羊膜原片固定在支持物上损坏支持物,支持物的厚度也不能过低。经过多次的研究探索,本发明发现厚度在 1-4mm 范围内是可以接受的,而厚度为 1.5mm 的支持物为最佳选择。

[0030] 利用本发明所述的方法制备羊膜贴片时,细胞培养皿的大小可以根据需要进行选择。虽然废弃羊膜的大小受正常剖腹产胎儿大小的影响,但其大小普遍可达至少 500cm²。因此,本发明方法中使用的细胞培养皿的大小仅受此限制。

[0031] 本发明方法中所使用的干细胞并无硬性限制,但其至少应具有分化为上皮细胞的潜能并且无免疫原性。本发明方法中在羊膜上种植并培养干细胞的步骤并无严格限制,采用本领域的常规方法即可。

[0032] 综上,本发明通过使用康宁公司的玻璃透明培养皿,并用自行研制的玻璃板做支撑使羊膜表面光滑平整,从而使可种植细胞的羊膜片面积大大增加(如至少可达 145cm²),而且细胞生长扩增很好。本发明方法获得的种植干细胞的羊膜贴片为面积较大的烧伤和褥疮患者的治疗提供了有效的支持,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0033] 图 1 :显示干细胞从脐带组织扩增出(40 倍)。

[0034] 图 2 :显示刮去羊膜上残存的细胞。

[0035] 图 3 :显示长满间充质干细胞的羊膜贴片(100 倍 ×)。

[0036] 图 4 :显示 CD44 免疫荧光染色(200 倍)。

[0037] 图 5 :显示 CD90 免疫荧光染色(200 倍)。

[0038] 图 6 :显示脐带源间充质干细胞流式细胞术检测鉴定的结果。

具体实施方式

[0039] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明,本领域技术人员公知,在不背离本发明精神的情况下,可以对本发明做出许多修改,这样的修改也落入本发明的范围。

[0040] 下述实验方法如无特别说明,均为常规方法,所使用的实验材料如无特别说明,均可容易地从商业公司获取。

[0041] 实施例 1 负载干细胞的羊膜贴片的制备方法

[0042] 1、试剂与耗材:

[0043] a-MEM 培养基(Hyclone 公司),胰酶(Invitrogen 公司),胶原酶(Sigma 公司),PBS 缓冲液(国药集团),细胞培养皿(D=18cm, Corning 公司,玻璃材质,购自深圳瑞鑫达公司),细胞培养瓶(Corning 公司,聚苯乙烯材质),细胞刮刀(Corning 公司),免疫荧光染色实验用的抗体抗 CD44 和抗 CD90 及其同型对照购自美国 ebioscience 公司。

[0044] 2、设备:

[0045] 二氧化碳培养箱(美国 THERMO 公司 371 型),倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司 CKX41 型),大容量低速离心机(美国 THERMO 公司 Multifuge 4KR),流式细胞仪(美国 BD FACSCalibur),生物安全柜(北京东联哈尔仪器有限公司 BSC-1360IIA₂)。

[0046] 3、玻璃板制备方法:

[0047] 1) 取 1.5mm 厚的方玻璃一片,大小为 160mm X 160mm;

[0048] 2) 将带玻璃刀的橡胶吸盘固定于方形玻璃板的中心;

[0049] 3) 调节尺寸螺丝,固定尺寸螺丝于 80mm 处;

[0050] 4) 按住吸盘,用刀头划出一个圆圈,均匀用力,不可用力过猛,不可重复划圆;

[0051] 5) 取下带吸盘的玻璃刀,用普通玻璃刀沿圆圈外沿切割玻璃,均匀切割 6-8 刀;

[0052] 6) 用小木锤轻轻敲打圆圈外侧使圈外玻璃轻轻掉下来;

[0053] 7) 用 200 目的细砂纸轻轻磨边,去除圆形玻璃板边缘的残余玻璃。最后获得的圆形玻璃板直径为 16cm,面积可达 200cm²;

[0054] 8) 用清水洗净,再用酒精浸泡 24hr 后用蒸馏水清洗 3 遍,晾干;

[0055] 9) 将玻璃板包装好后,高压灭菌待用。

[0056] 4、细胞提取:

[0057] 1) 原料来源:取足月剖宫产产妇的废弃的羊膜和脐带,经患者自愿捐献并知情同意。患者的肝炎病毒标志物、梅毒、HIV 检测均呈阴性;

[0058] 2) 操作步骤:

[0059] a) 脐带源间充质干细胞的分离和培养:

[0060] i) 无菌条件下取足月剖宫产健康胎儿的脐带(患者自愿捐献),进行病毒学检测,包括乙肝病毒、丙肝病毒、梅毒、艾滋病,结果均为阴性;

[0061] ii) 用 PBS 洗涤上述脐带组织,手术剪剪碎后根据本领域常规技术用胰酶和胶原酶进行消化,洗涤过滤,获得细胞悬液;

[0062] iii) 将上述过滤后的细胞悬液室温下 1000rpm 离心 5min,获得细胞沉淀;

[0063] iv) 用 a-MEM 细胞培养基重悬浮细胞沉淀并按 2×10^4 个/cm² 的密度接种到 T25 的培养瓶中,于 37°C、5%CO₂ 细胞培养箱中进行培养;

[0064] v) 定期换液,待细胞生长达到 80% 融合时传代,细胞得到扩增;

[0065] vi) 传至第 3 代备用,细胞形态参见图 1;

[0066] b) 人羊膜的处理和制备:

[0067] 无菌条件下钝性分离上述足月剖宫产产妇废弃的羊膜与绒毛膜,用含双抗(细胞培养用的标准浓度青霉素和链霉素)的 PBS 反复洗涤羊膜至无血迹。用 2.5g/L 胰蛋白酶消化去除羊膜表面的上皮细胞(37℃,30min),然后将该羊膜在上述自行研制的玻璃板上铺平,再用细胞刮刀反复刮几次,以尽量去除上皮细胞。将膜片连同玻璃板一同放入直径 18cm 的玻璃培养皿内,并浸泡在 α -MEM 培养基中(上皮面向上),4℃ 保存备用,其形态参见图 2;

[0068] c) 细胞种植:

[0069] 将上述获得的第 3 代脐带间充质干细胞消化后中和,细胞计数后按 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 个细胞的密度接种到无菌处理的羊膜上,加入 5ml 含 10% 血清的 α -MEM 培养基,置于 37℃、5% 的 CO_2 培养箱中,培养 4h 后细胞贴壁,再加入 15ml 含 10% 血清的 α -MEM 培养基,细胞长满后待用,其形态参见图 3;

[0070] 3) 检验结果

[0071] a) 利用免疫荧光染色检测羊膜贴片上间充质干细胞的表面标志物 CD44 和 CD90 的表达,结果为 90% 以上的细胞出现绿色荧光,表明 CD44 和 CD90 为阳性表达。结果参见图 4、图 5;

[0072] 免疫荧光染色的具体步骤为:

[0073] i) 从获得的羊膜贴片上剪下 3 片细胞贴片(大小为 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$) 并分别放置于载玻片上,一片染 CD44,一片染 CD90,一片染阴性对照(同型对照抗体);

[0074] ii) 加入 4% 的多聚甲醛固定细胞 10 分钟,吸去固定液,PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟;

[0075] iii) 细胞面朝上,放平整后于 37℃ 烤箱烤片至干;

[0076] iv) 用北京中杉金桥免疫细胞化学试剂盒进行检测;

[0077] b) 用流式细胞仪检测鉴定间充质干细胞的 CD44、CD105、CD34 和 HLA-DR 的表达情况,结果参见图 6;

[0078] c) 检测结果:

[0079] i) 免疫荧光染色后细胞膜着色明显,CD44 和 CD90 阳性率大于 90%;

[0080] ii) 流式细胞术检测的结果为所述细胞的 CD44 和 CD105 呈阳性,而 CD34 和 HLA-DR 呈阴性;

[0081] 上述结果均证实所获得的羊膜贴片上种植的为间充质干细胞且无免疫原性。

[0082] 本发明所用培养皿可以为市售的常用规格培养皿,也可是定制的大玻璃培养皿,这样就可以容纳更大的玻璃板。因为一张羊膜面积可达 500cm^2 ,因此,本发明所述制备的羊膜贴片的大小仅受限于羊膜的大小。

[0083] 如果用于治疗特大面积烧伤,可将本发明的羊膜贴片进行拼接贴敷。

[0084] 实施例 2 负载干细胞的羊膜贴片的使用效果

[0085] 病例 1: 吴某,男,36 岁,浅 II 度烧伤,背部烧伤面积为 200cm^2 左右。

[0086] 入院治疗时,局部创面常规清创处理,去除污物及脱落上皮并消毒。将羊膜根据损伤部位面积和形状进行修剪,然后将两块 120cm^2 左右的羊膜贴片的细胞面朝向烧伤创面,

边对边地放置,边缘互相重叠,以全部覆盖创面。盖上油沙,再用无菌干纱布覆盖并固定。5d后打开纱布,观察到损伤部位开始出现上皮化,更换新的羊膜贴片,直到第12d,烧伤部位基本愈合。全过程创面无感染。

[0087] 病例2:张某某,女,45岁,深II度烧伤,腹部面积为100cm²左右。

[0088] 治疗时,局部创面常规清创处理,去除污物及脱落上皮,去除水泡并消毒。将羊膜根据损伤部位面积和形状进行修剪,然后将一块130cm²左右的羊膜贴片的细胞面朝向烧伤创面,使羊膜与创面贴紧并覆盖整个创面,羊膜大于创缘约2~3cm。5d后打开纱布,观察创面,发现创面渗出较少,更换新的羊膜贴片,换药时,疼痛明显轻于未贴羊膜的烧伤病人。再隔5d,打开纱布,发现损伤部位开始出现上皮化,无感染。再次更换新的羊膜贴片。直到第16d,打开纱布,创面基本愈合。愈合后创面随访,愈合创面瘢痕增生少,色素沉着少。

[0089] 参考文献:

[0090] [1] Rheinwald J.G., Green H., Serial cultivation of strains of human epidermal Keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cell [J]. Cell, 1975, 6(3):331-334.

[0091] [2] 张兆清,余春艳,金岩,等. 复合骨髓间充质干细胞的组织工程皮肤治疗慢性难愈性溃疡探讨[J] 中国皮肤性病杂志,2006,20(4):211-213.

[0092] [3] Shepherd B. R., Emis D. R., Stim D. S., et al. Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell derived endothelial cells [J]. FASEB J, 2006, 20(10):1739-1741.

[0093] [4] 刘源,金岩,王新文,等. 构建含黑色素细胞组织工程皮肤的研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2003,17(6):501-503.

[0094] [5] Niknejad H., Peirovi H., Jorjani M., et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. Eur Cell Mater 2008, 29(15):88-99.

[0095] [6] Sasaki M., Abe R., Fujita Y., et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. J Immunol 2008, 180(4):2581-2587.

[0096] [7] Hino T., Sotozono C., Inatomi T., et al. Indications and surgical outcomes of amniotic membrane transplantation. Nihon Ganka Gakkai Zasshi. 2012Apr, 116(4):374-8.

[0097] [8] Boiko É. V., Churashov S. V., Chernysh V. F., Rud'ko A. S. Comparative evaluation of therapeutic efficacy of early amnion covering the cornea, temporary blepharorrhaphy and its combination in severe alkali burns of the eye in the experiment. Voen Med Zh. 2012 Apr, 333(4):34-40.

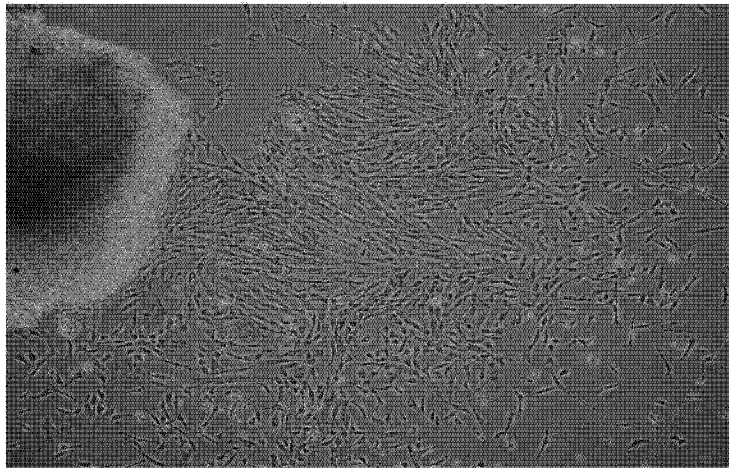


图 1

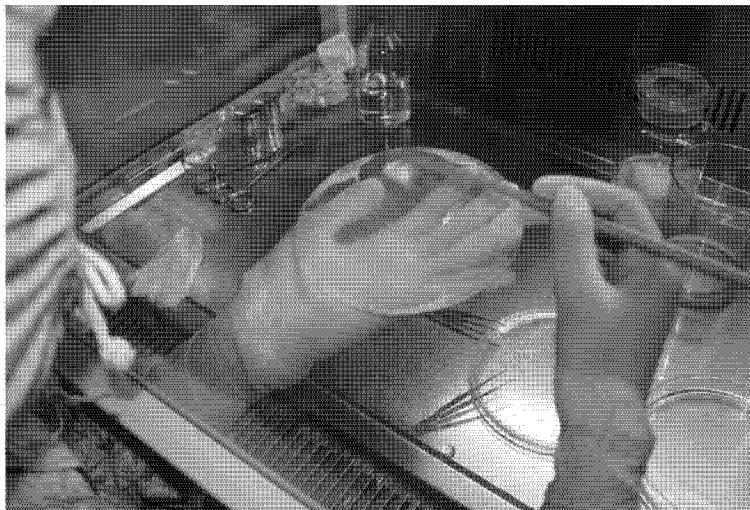


图 2

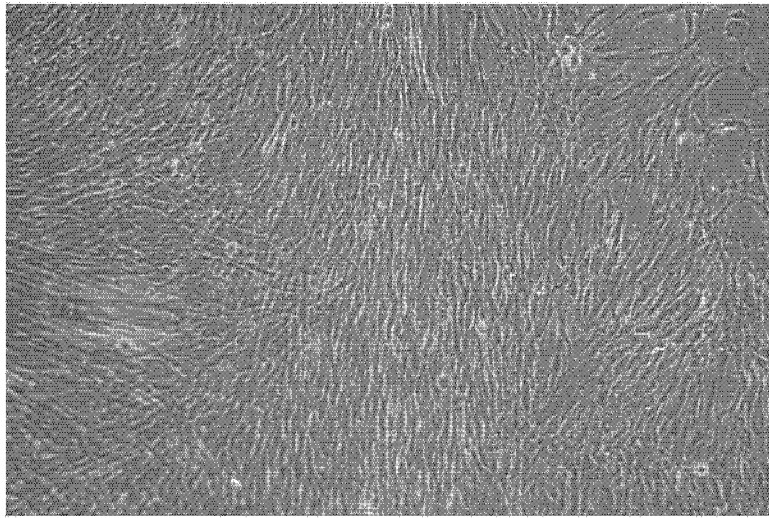


图 3

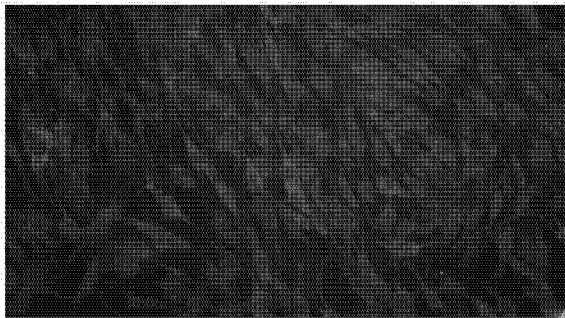


图 4

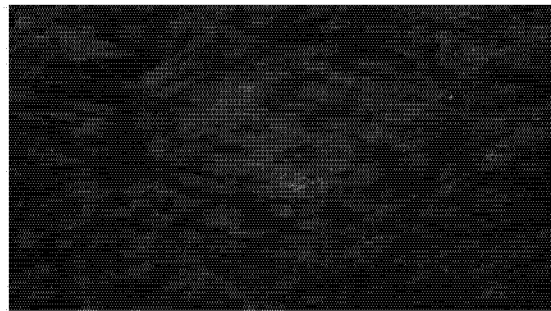
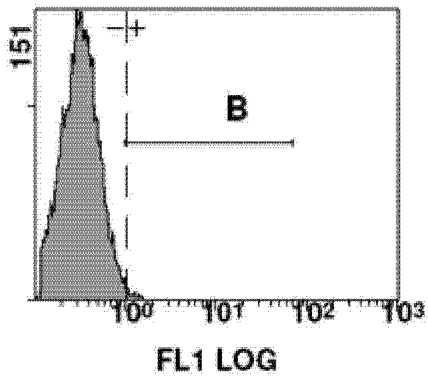
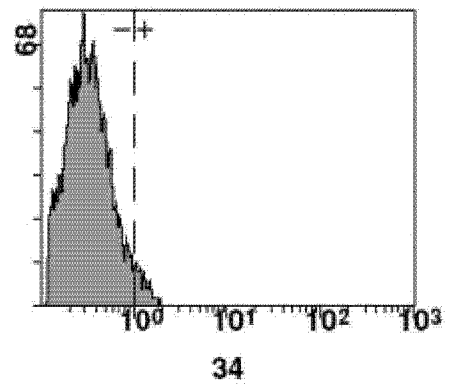


图 5

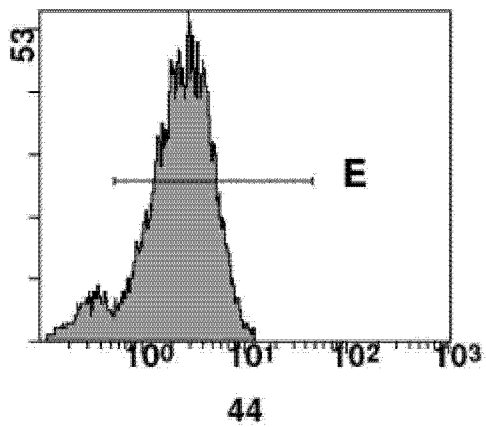
(F1)[A] 20090216-HLA-DR-N6.LMD : FL1



(F3)[A] 20090319-34-c'.LMD (F5)[B] 20



20090420-B2MP6-CD44.LMD (F3)



20090420-B2MP6-CD105.LMD : FL1

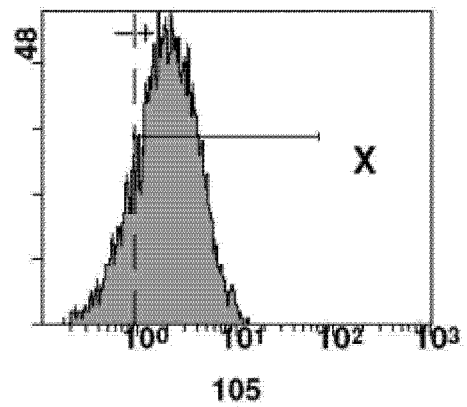


图 6