

脱细胞角膜材料的生物相容性研究

吴连胜 陈建苏 徐锦堂 丁勇 郑佩娥 徐国风 黄慧研

Experimental study on histocompatibility after xenogeneic acellular feline lamellar keratoplasty

Wu Liansheng, Chen Jiansu, Xu Jintang, Ding Yong, Zheng Pei'e, Xu Guofeng, Huang Huiyan. Research Room of Ophthalmology, Key Laboratory of Regenerative Medicine of Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract Objective The present study was to explore the histocompatibility, graft survival time and inflammatory response after xenogeneic acellular cat lamellar keratoplasty onto rabbits. **Methods** Twenty-four healthy 18-week-old male New Zealand white rabbits were as receptors and randomly divided into three groups: group A received cat-rabbit acellular xenogeneic lamellar keratoplasty; group B underwent cat-rabbit xenogeneic lamellar keratoplasty; group C was rabbit-rabbit corneal allograft lamellar keratoplasty. The diameter of the donor graft was 9 mm and the diameter of receipt bed was 8 mm. The inflammatory response and survival of graft were observed for 3 months. Histological and ultrastructure examination was performed at the 1st, 2nd and 3rd month under the optical microscope and scanning electron microscope, respectively, and the percentages of CD4⁺/CD8⁺ from rabbit periphery blood were detected at the 7th, 15th and 30th day after the surgery. **Results** The inflammation index was 2.38 ± 1.506 , 1.75 ± 1.488 and 1.25 ± 1.282 in the 1st month in group A, B and C without significant difference among three groups ($P > 0.05$), and that in the 2nd month was significantly different between group A and group B (5.83 ± 1.722 vs 2.50 ± 1.517) or between group A and group C (5.83 ± 1.722 vs 2.50 ± 1.378) ($P < 0.05$). In the 3rd month, the inflammation index was remarkably higher in group A compared with group B and group C (6.50 ± 0.774 vs 2.50 ± 1.291 , 6.50 ± 0.774 vs 2.75 ± 0.957) ($P < 0.05$). No significantly differences were found in activation rates of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells upon surgery time and among different groups ($P > 0.05$) based on two-way ANOVA. Histological sections showed that the inflammatory reaction was more slight in group B and group C than group A three months after operation. Corneal epithelial cells were stratificated and cellular boundary were tightly opposed, but epithelial defect was displayed in group A. **Conclusion** The biocompatibility of the acellular cat corneal lamellar is relatively poorer than that of the fresh cat cornea. A similar status occurs in corneal immune reaction between acellular corneal lamellar and fresh one of cat.

Key words cornea; acellular biomaterial; lamellar keratoplasty; xenogeneic keratoplasty; immunoreaction

摘要 目的 研究异种脱细胞猫角膜板层角膜移植术后的组织相容性。 **方法** 24 只 18 周龄的健康新西兰白兔随机平均分成 3 组: A 组为脱细胞猫角膜材料→兔板层移植组, B 组为猫→兔异种新鲜角膜植片板层移植组, C 组为兔→兔同种异体新鲜角膜植片板层移植组。用扫描电镜观察术后不同时期术眼角膜的组织病理学改变, 抽取兔血测定 CD₄⁺/CD₈⁺ T 细胞百分比。 **结果** 术后 1 个月 3 个组间角膜植片炎症反应指数组间比较差异均无统计学意义; 2 个月 A 组与 B 组、A 组与 C 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 个月 A 组与 B 组、A 组与 C 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 个月组间术后同期 7、15、30 d 兔外周血 CD₄⁺ T 细胞和 CD₈⁺ T 细胞活化率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。组织切片显示术后 3 个月内, B、C 两组角膜植片炎症反应轻, 植片内皮细胞吸收, 组织结构基本正常。A 组角膜植片炎症反应显著, 结构较紊乱, 新生血管增生。扫描电镜可见 B、C 2 组角膜上皮结构基本正常, 细胞连接较好。A 组扫描电镜可见有上皮缺损。 **结论** 脱细胞处理的异种猫角膜移植后生物相容性较新鲜角膜差, 免疫反应无显著差异。

关键词 角膜; 脱细胞生物材料; 板层角膜移植; 异种角膜移植; 免疫反应

分类号 R 779.65 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0359-05

本课题为国家自然科学基金(30371519)、广东省科技计划项目(2006B35801003, 2007B031001005)、暨南大学侨办重点学科(51205004)资助
作者单位: 510632 广州, 暨南大学医学院眼科研究室 再生医学教育部重点实验室[(吴连胜, 现在东莞市凤岗镇雁田广济医院 523690)、陈建苏、徐锦堂], 病理教研室(郑佩娥); 510632 广州, 暨南大学附属第一临床医学院眼科(丁勇); 510632 广州, 广东冠昊生物科技有限公司(徐国风、黄慧研)

通讯作者: 陈建苏 (Email: chenjiansu2000@163.com)

严重的角膜病变和角膜损伤引起的角膜盲是主要的致盲性眼病之一,目前治疗角膜盲的手术方式以同种异体角膜移植为主,但角膜供体资源在我国仍较为缺乏。异种角膜材料来源比较广泛,由于异种角膜材料源自生物体,生物相关性好。此外,它来源广泛、具有天然的角膜组织结构、适合角膜移植。但它属于异种角膜,种系相差较大,免疫原性较强,异种角膜移植排斥反应是造成移植失败的主要原因。王智崇等^[1]研究认为角膜内皮的免疫原性最强,角膜上皮次之,角膜基质最弱。因此,众多研究者开始尝试应用脱细胞角膜材料进行角膜移植。为探索新的角膜移植材料及预防方法,本实验应用猫角膜全厚板层脱细胞处理,组织内加入胶原交联剂,形成一种新的组织工程角膜支架材料,板层移植在兔角膜上,以观察猫角膜(脱细胞处理)对兔板层角膜移植的炎症反应,评价猫角膜支架材料组织相容性及免疫相容性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

角膜供体与受体 健康雄性 18 周龄新西兰大白兔(购于广东省动物中心)28 只,体重 2.0 kg;其中 24 只用于受体,4 只用于供体。猫(15~30 d,体重 0.25~0.35 kg),用于供体。手术前通过裂隙灯显微镜检查,受体双眼角膜透明、无新生血管、房水清透、虹膜纹理清晰。猫角膜脱细胞由广东冠昊生物科技有限公司制作,取出猫角膜(全层)用磷酸盐缓冲液(phosphate puffer sodium, PBS)充分漂洗后,进行以下脱细胞处理:(1)应用高反应活性环氧化物(水溶性,长链结构上不含醚或酯链)作动物组织的交联固定剂,进行角膜胶原交联固定;(2)应用化学方法,封闭免疫基团和特殊位置的基团,改变胶原、多肽的特异构象;(3)应用复合酶(胰蛋白酶等)、表面活性剂(曲拉通等)化学方法脱细胞。经上述处理后的角膜植片放入无水甘油中保存,备用。

1.2 方 法

1.2.1 分组 将 24 只新西兰大白兔随机分成 3 组:A 组为脱细胞猫角膜材料→兔板层移植组;B 组为猫→兔异种新鲜角膜植片板层移植组;C 组为兔→兔同种异体新鲜角膜植片板层移植组,每组 8 只。植片均为角膜全层植片。

1.2.2 实验操作 常规麻醉及开睑,3%戊巴比妥钠按 1.5 mL/kg 耳缘静脉注射+氯丙嗪 12.5 mg/kg 肌内注射。待麻醉生效后将兔固定于手术台上。全身麻醉成功后左侧卧位,倍诺喜滴眼液点右眼 2 次。右眼术野常规消毒,

铺无菌洞巾,开睑器开睑,用 3-0 缝线固定上下直肌。

(1)供体角膜基质片的制备 将猫处死,无菌条件下摘除眼球。用庆大霉素(2 000 U/mL)PBS 液冲洗消毒猫眼球 20 min,直径 9.0 mm 的环钻直接在供体眼球上钻取供体角膜移植片,剪刀完成全层植片离断(离断时,剪刀向角膜面倾斜 30°~45°,制出的角膜植片边缘呈楔形板层,更有利于创口平整对合),植片内皮面朝上置于玻璃皿内,备用。脱细胞角膜材料内皮面朝上置于角膜冲切枕上,用直径 9.0 mm 的环钻钻取供体角膜移植片。植片置于玻璃培养皿中,保持较干燥状态,备用。

(2)植床制作 在手术显微镜下用 8.0 mm 环钻在植床定位刻切深度约 3/4 或至后弹力层,以剪刀钝性分离深板层角膜,至切口缘再潜行分离植床侧角膜 0.5~0.75 mm,沿切口环形剪除板层角膜瓣。

(3)移植 将供体同种异体兔、异种猫或脱细胞角膜材料全厚角膜移植片内皮面向下植入兔角膜植床。用 10-0 进口尼龙线连续缝合 16 针,将植片固定于植床。

1.2.3 治疗与观察 术毕,球结膜下注射庆大霉素注射液 1 万单位,地塞米松注射液 1.5 mg,50%高渗葡萄糖滴入术眼。缝合术眼上下眼睑。术后送回动物饲养室饲养。A、B、C 3 组术后均给予 50%葡萄糖点眼每日 2 次,复方氯霉素滴眼液每日 3 次点右眼。用药时间均为 6 周。术后裂隙灯显微镜下观察角膜透明度、角膜新生血管并测量其长入植片的长度、植片存活情况。数码相机摄下角膜移植眼表照片,观察时间为 3 个月并记录。参照 Holland 等^[2]制定的评分标准进行术后炎症反应的评分和统计,将炎症反应的体征分为 3 类:植片透明度、水肿程度、新生血管,每类又分为 0~4 级。据此计算总分,对炎症反应程度进行量化评估。以角膜混浊、水肿和新生血管 3 项评分之和为炎症反应指数。术后 7、15、30 d 抽取兔血测定 CD₄⁺T 细胞/CD₈⁺T 细胞含量百分比。术后 1、2、3 个月 3 组各处死 2 只动物后,立即摘除眼球,剪下边缘带 1 mm 巩膜组织的受体角膜植片,分成两半,一半置于 40 g/L 甲醛液中固定、石蜡包埋,苏木精-伊红染色观察。另一半置于 2.5%戊二醛溶液中固定,用扫描电镜观察。

1.3 统 计 学 方 法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学处理。测试指标的数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Levene 法对各组测量数据进行方差齐性检验,表明方差均齐。3 个组角膜移植后的平均炎症反应指数比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验,3 个组

和各时间点的 CD₄⁺T 细胞、CD₈⁺T 细胞活化率 (%) 比较采用两因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后体征

术后半月内, A、B、C 3 个组植片全部存活并保持透明, 未观察到明显感染、层间积血及积液、崩线情况出现, 新生血管少, 3 个组炎症反应指数比较, 差异无统计学意义。在 3 个月内, A 组植片角膜上皮部分生长, 但反复脱落(图 1); B、C 2 组角膜上皮生长良好(图 2), 部分植片术后 20 d 开始

出现局限性炎症反应, 角膜植片出现炎症反应的部位多位于创缘缝线有松动部位。3 个组角膜植片在 3 个月内炎症反应指数差异有统计学意义(表 1)。各组病例出现炎症反应的时间分别为, A 组第 22、24、28、35、38、45 d 各 1 例, 共 6 例; B 组 25 d、35 d 各 1 例, 共 2 例; C 组 34 d 1 例。

表 1 3 组角膜移植后不同时间平均炎症反应指数($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The mean inflammatory index in different postoperation time in 3 groups($\bar{x} \pm s$)

Group	Inflammatory index in different postoperation time					
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d
A	1.25 ± 0.46	2.38 ± 1.50	4.82 ± 1.94	5.83 ± 1.72	6.25 ± 0.96	6.50 ± 0.57 ^b
B	1.00 ± 0.92	1.75 ± 1.48	2.33 ± 1.21 ^b	2.50 ± 1.51 ^b	2.25 ± 1.50 ^b	2.50 ± 1.29 ^b
C	0.75 ± 0.78	1.25 ± 1.28	1.83 ± 1.47 ^b	2.50 ± 1.37 ^b	2.50 ± 1.00 ^b	2.75 ± 0.95 ^b
F	0.808	1.245	6.284	9.302	14.460	20.657
P	0.459	0.308	0.010	0.002	0.002	0.000

^bP < 0.05 vs respective group A (One-way ANOVA, LSD-t test)

Group A: cat-rabbit acellular xenogeneic lamellar keratoplasty group B: cat-rabbit xenogeneic lamellar keratoplasty group C: rabbit-rabbit corneal allograft lamellar keratoplasty

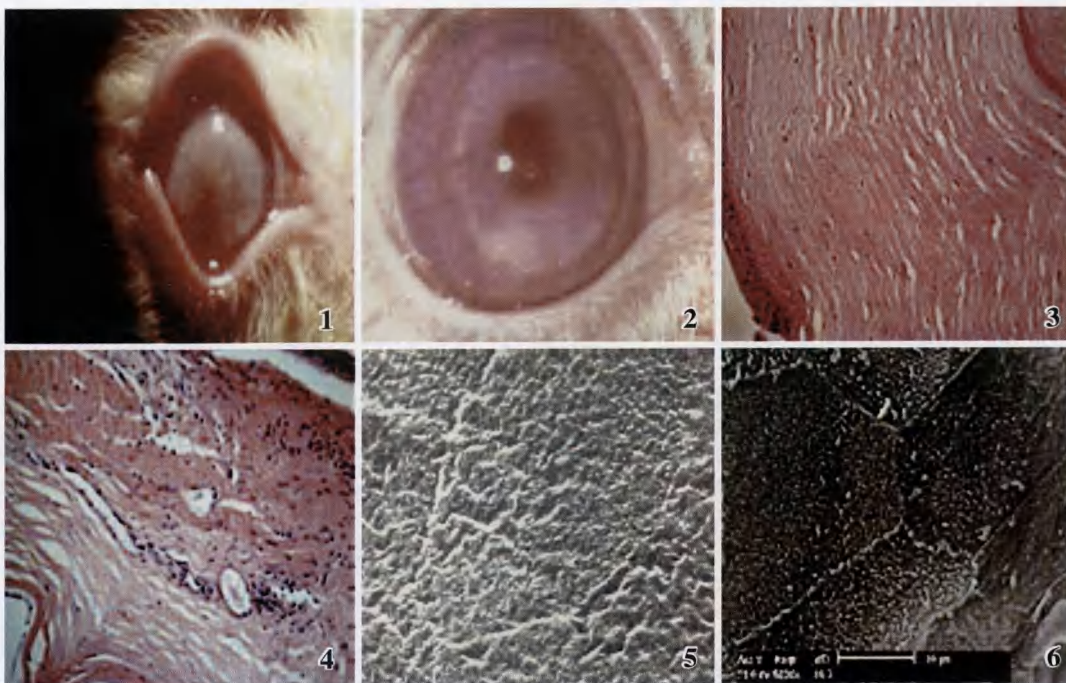


图 1 A 组移植术后 3 个月时可见角膜混浊和新生血管形成 图 2 B 组(拆线后)角膜移植 3 个月时可见植片透明, 上皮生长良好 图 3 光镜下 B 组移植术后 2 个月可见植片上皮排列整齐、基质层纤维排列规则紧密(×200) 图 4 光镜下 A 组移植术后 2 个月可见植片上皮排列不整齐、基质层纤维排列紊乱, 基质炎症细胞浸润(×200) 图 5 扫描电镜下 B 组移植术后 2 个月, 角膜上皮绒毛较多, 细胞连接较好, 角膜上皮排列紧密、规则(×15 000) 图 6 扫描电镜下 A 组移植术后 2 个月, 植片上皮绒毛较少, 上皮结构紊乱或消失, 排列不规则, 细胞间连接不规则(×10 000)

Fig. 1 Graft opacities and neovascularization were seen in 3 months after surgery in group A Fig. 2 The graft was clear and growth of epithelium was well in 3 months after surgery in group B Fig. 3 The epithelium and stroma lamellae presented the regular arrangement in 3 months after surgery in group B under the optical microscope(×200) Fig. 4 The epithelial layer and stromal lamellae showed the irregular arrangement, and inflammatory cells infiltration was exhibited in 2 months after surgery in group A under the optical microscope(×200) Fig. 5 Obvious microvilli on the surface of cornea, epithelium, normal intercellular junction and regular epithelial arrangement were displayed in 2 months after surgery in group B under the scanning electron microscope(×15 000) Fig. 6 Less microvilli on the surface of corneal epithelium, abnormal intercellular junction and irregular epithelial arrangement were presented in 2 months after surgery in group A under the scanning electron microscope(×10 000)

2.2 组织病理学结果

3 个月内, 在无明显炎症反应 B 组、C 组的角膜植片上皮排列整齐, 基质层纤维排列规则、紧密、植片后弹力层与植床愈合紧密度随时间增加, 未见炎性浸润、小血管增生, 植片内皮细胞吸收(图 3); 出现炎症反应的角膜植片上皮排列紊乱, 基质层轻度水肿、增厚, 基质浸润细胞成分增多, 胶原纤维结构紊乱, 新生血管增生, 基质浸润细胞成分增多。

在有炎症反应 A 组发现角膜术后 1 个月(未生长上皮)基质层轻度水肿、增厚, 基质浸润细胞成分增多, 新生血管少量增

生,植片后弹力层与植床愈合不良,存在分离;术后2个月(未生长上皮)淋巴细胞浸润明显,新生血管增生明显,植片后弹力层与植床愈合不良,间隙较大(图4);术后3个月(未生长上皮),淋巴细胞浸润明显,成纤维细胞及新生血管增生明显,胶原纤维结构紊乱,植片后弹力层与植床愈合不紧密,间隙较大。

2.3 扫描电镜结果

B组、C组未发生明显炎症反应的实验个体第1、2、3个月植片角膜上皮结构基本正常。细胞连接较好,角膜上皮呈瓦楞状规则排列(图5);小部分发生明显炎症反应的实验个体,角膜上皮结构紊乱,排列不规则,术后第1、2、3个月的细胞连接无或不规则(图6)。A组实验个体未见明显上皮生长。

2.4 CD₄⁺T细胞、CD₈⁺T细胞活化率

表2的统计学分析结果显示:A、B、C3个组同期的CD₄⁺T细胞、CD₈⁺T细胞活化率(%)比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),3个组组间的CD₄⁺T细胞、CD₈⁺T细胞活化率(%),差异均无统计学意义($P > 0.05$),B组15d、30d CD₄⁺T细胞差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 术后不同时间兔外周血T淋巴细胞亚群CD₄⁺T、CD₈⁺T细胞活化率($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 2 The activation rate of CD₄⁺ and CD₈⁺ in rabbit blood after surgery($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	CD ₄ ⁺ activation rate			CD ₈ ⁺ activation rate		
		7 d	15 d	30 d	7 d	15 d	30 d
A	8	44.963 ± 4.555	45.200 ± 8.050	40.675 ± 5.400	9.138 ± 3.419	10.188 ± 4.842	12.450 ± 3.146
B	8	42.488 ± 3.475	47.113 ± 6.856	38.588 ± 7.445 ^b	11.963 ± 3.083	8.863 ± 4.199	12.413 ± 4.831
C	8	45.063 ± 5.918	45.963 ± 7.823	38.362 ± 7.100	14.288 ± 5.793	10.388 ± 4.264	12.575 ± 3.474

CD₄⁺: $F_{group} = 0.117, P = 0.890; F_{time} = 7.514, P = 0.001$; CD₈⁺: $F_{group} = 1.212, P = 0.304; F_{time} = 2.605, P = 0.081; ^bP < 0.05$ vs respective 15 d

3 讨论

异种角膜移植研究的主要目的:一是解决人类角膜移植的角膜材料来源紧缺问题,二是探索异种角膜移植片成活条件和防止免疫排斥问题。鼠类、鸡、鹅等角膜过小,较难满足实际临床需要;灵长类角膜属国家保护动物限制了其临床应用;猫的角膜形态结构和生物特性与人的比较接近且方便获得作为角膜供体材料^[3]。

经脱细胞处理的角膜基质是生物新鲜组织经过化学方法处理,脱去组织中的所有细胞抗原、可溶性蛋白质和糖胺多糖等物质,其细胞成分能被有效去除,基质层在角膜三层结构中免疫原性最低,材料经处理后,免疫原性进一步降低^[1,4-5]。在其脱细胞处理过程中加

入胶原交联剂:(1)增加生物降解时间,使胶原对降解酶作用不敏感;(2)减少胶原吸水的能力;(3)降低可溶性;(4)增加胶原的纤维抗拉强度^[6]。

本组实验中A组与B、C2组角膜植片在1~3个月内炎症反应指数差异有统计学意义,A组植片角膜上皮部分生长,且反复脱落,而B组、C组角膜上皮生长良好,分析其原因:(1)脱细胞处理剂及交联剂的残留对上皮细胞的毒性作用。(2)基底膜在脱细胞过程中受损,早期半桥粒等黏附复合体不能较快形成,新生的上皮不能牢固黏附,在眼睑的反复摩擦下,新生上皮反复脱落。(3)在本实验脱细胞及基质交联过程中,基质变性受损,基质失去了对上皮细胞营养作用。上述因素影响上皮细胞生长、增生、分化或黏附,上皮反复脱落,导致材料的胶原成分外露。蛋白水解酶或感染作用于胶原,引起胶原过快降解,材料最终血管化、纤维化或溶解,角膜穿孔。相关研究表明完整的角膜上皮基底膜促进上皮的生长、移行修复。而基底膜缺损的角膜上皮化异常^[7-8]。

组织病理学显示A组植片后弹力层与植床愈合不良,愈合时间长;而B组、C组植片后弹力层与植床愈合好,时间短。1~2个月取材时也发现,A组植片拆线后部分植片与植床没有愈合,发生脱落,而B组、C组却无此现象。A组术后大部分基质浸润炎症性细胞成分较多,B组、C组角膜仅少数出现基质炎症浸润细胞。上述现象说明脱细胞猫角膜材料与受体角膜组织相容性差。推断可能在本实验脱细胞及基质交联过程中,基质胶原变性受损,失去了与受体角膜基质组织同源性的的重要特征,供体和受体角膜基质组织认同整合性差。相关研究也表明细胞外基质对角膜瓣与基质层之间的黏附起骨架作用,对角膜活性细胞的增生、迁移和黏附起促进作用^[9-10]。角膜基质细胞根据角膜功能,合成、降解胶原,使胶原纤维形成合适的角膜功能的构型,其他任何形式的胶原是无法替代角膜固有基质的功能^[11]。脱细胞和胶原交联处理后的角膜支架材料可能失去或减弱了这种作用或特性,导致脱细胞角膜材料与植床愈合缓慢延迟。

另外,异种猫角膜经去细胞和应用胶原交联剂处理后所形成的角膜支架材料理论上免疫原性降低,减

小、降低了特异性免疫应答攻击,但在本组实验中 A、B、C 3 组同期的 CD_4^+ T 细胞、 CD_8^+ T 细胞活化率(%),差异均无统计学意义。分析其可能原因:正常生理条件下的角膜具有免疫赦免特性。而这种特性易被炎症、水肿、创伤、及角膜新生血管破坏,本组实验中 50% 葡萄糖局部脱水作用消除了术后新鲜角膜植片的水肿^[12],提供了足够的角膜代谢糖源,提高了角膜生理储备,促进角膜创伤修复,促进了角膜细胞的生长、分化、增生和功能恢复,及角膜细胞与基质的正性双向交流关系,恢复了角膜的稳态环境,从而稳定了角膜免疫赦免的特性^[13],另外糖皮质激素的应用在一定程度上也抑制了角膜炎症反应,消除了角膜水肿,使得新鲜角膜植片易于成活。再者,在本组实验中 B 组和 C 组新鲜角膜植片内皮细胞吸收,并没有引起明显植片炎症反应,与贺焱等^[14]的研究结果一致,这种现象背后的机制有待更深入探讨。

本研究结果显示,(1)本组实验免疫相容性无显著差异,板层角膜移植中异种角膜是否需要去细胞处理以降低免疫原性,有待更深入探讨;(2)经去细胞处理后的异种角膜其生物相容性变差,增加了感染和非特异性炎症的机会。因此,在对不同组织脱细胞处理过程中,应尽量注意研究脱细胞剂残留、交联剂残留对生物相容性的影响,角膜支架材料的光学性改进,改进脱细胞、胶原交联方法及其试剂。未来需要解决角膜支架材料免疫相容性的同时,提高其组织相容性问题。理想的脱细胞角膜不但可以用于板层角膜移植,而且可以作为组织工程角膜的支架材料,有更广阔的应用前景^[15]。

参考文献

- 1 王智崇,葛建,徐锦堂,等.角膜不同组织免疫源性分析[J].中华眼科杂志,2002,38(9):535-538
- 2 Holland EJ, Chan CC, Wetzig RP, et al. Clinical and immunohistologic studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model[J]. Cornea, 1991, 10(5): 374-380
- 3 Moore MB, Gebhardt BM, Verity SM, et al. Fate of lyophilized xenogeneic corneal lenticules in intrastromal implantation and epikeratophakia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1987, 28(3): 555-559
- 4 刘晓霞,陈建苏.角膜脱细胞基质的特性[J].广东医学,2005,26(11):1463-1464
- 5 房兴峰,赵靖,史伟云,等.脱细胞猪角膜基质的生物相容性与组织工程化兔角膜上皮移植的研究[J].中华眼科杂志,2008,44(10):934-942
- 6 李沁华.角膜组织工程的研究进展[J].中国修复重建外科杂志,2004,18(3):229-231
- 7 Nishida T. The cornea: stasis and dynamics[J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2008, 112(3): 179-212
- 8 Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, et al. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nano-structured substrates[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 10): 1881-1892
- 9 张婉琪,谢军谊,孙康.细胞外基质在 LASIK 术后角膜瓣黏附机制[J].国际眼科纵览,2006,30(2):91-93
- 10 李晓霞,陈建苏,李沁华,等.模拟微重力条件下兔角膜基质细胞在复合材料上的三维培养[J].眼科研究,2008,26(4):241-244
- 11 吴静,徐锦堂,赵松滨.培养角膜上皮移植的实验研究[J].中国实用眼科杂志,2001,19(3):178-191
- 12 吴连胜,陈建苏,徐锦堂,等.异种全厚板层角膜移植术后局部应用高渗葡萄糖的研究[J].眼外伤职业眼病杂志,2008,30(1):5-8
- 13 陈根云,吴静,徐锦堂,等.异种角膜基质异位植入后免疫病理学研究[J].眼科研究,2006,24(1):18-20
- 14 贺焱,孙秉基,种平,等.光学性全厚板层角膜移植术远期疗效的分析[J].中华眼科杂志,1998,34(1):11-13
- 15 Karamichos D, Lakshman N, Petroll WM. An experimental model for assessing fibroblast migration in 3-D collagen matrices[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2009, 66(1): 1-9

(收稿:2008-12-19 修回:2009-04-06)

(本文编辑:高红)

读者·作者·编者

英文参考文献著录的注意事项

按照我国出版物中的文后参考文献的著录规则,英文的参考文献主要涉及主要责任者、题名、版本、出版项(出版地、出版者、出版日期)、期刊名称、出版年、卷(期)和页码等信息。

1 主要责任者的著录方法

1.1 个人著者采用姓在前用全称,名在后用缩写的著录形式。一般来说,国外作者在发表文章时常采用名前姓后的形式,所以作者在著录参考文献时应注意交换原文中作者姓名的书写顺序。

1.2 姓名中若表示“小”或“几世”时,应将其放置于姓名最后,并用逗号隔开,如 Day FW, Jr.

1.3 西方人姓名中的 von, van, de, la 为姓的组成部分,当其移至前面时,首字母大小写均可,如 von Hindenberg P.

1.4 如姓名中出现复姓时,著录格式为夫姓-妇姓在前均用全称,名在后用缩写的形式。

1.5 著作方式相同的责任者不超过 3 人时,可全部照录。责任者超过 3 人时,只著录前 3 位责任者,其后加“et al”字样。

1.6 集体责任者,可直接按照著录来源著录,每个词的首字母大写。

(本刊编辑部)