

· 论著 ·

· 生物力学 ·

# 核黄素/紫外线 A 诱导的胶原交联对兔和人巩膜生物力学性能的影响

张亚丽 李志伟 牟国营 刘蕾

**【摘要】** 目的 比较兔和人巩膜核黄素/紫外线 A 交联前后的生物力学性能。方法 实验研究。取 8 只成年新西兰大白兔和 8 只新鲜离体成人眼,沿矢状位方向平均分为两半,一半作为对照,一半作交联试件。交联的参数设置:0.1%核黄素溶液滴眼,每 3 min 1 次,共 5 次;紫外线波长 365 nm;能量密度 3 mW/cm<sup>2</sup>;照射时间 40 min。生物力学测试指标:极限应力、8%应变条件下的应力和弹性模量。应用 *t* 检验对交联前后的生物力学指标进行统计分析。结果 8%应变时兔和人巩膜应力分别为 (359±305)kPa 和 (1 079±646)kPa;极限应力分别为 (3 830±2 870)kPa 和 (4 450±1 120)kPa;弹性模量分别为 (4 460±4 090)kPa 和 (14 310±8 560)kPa。交联后兔巩膜在应力、极限应力和弹性模量上均有显著性提高( $t=3.07, 3.50, 3.04, P<0.05$ );而人巩膜交联前后的生物力学指标差异均无统计学意义。结论 人巩膜生物力学性能高于兔,胶原交联可显著增加兔巩膜生物力学性能,而在相同条件下人巩膜交联前后生物力学强度无改变。

**【关键词】** 生物力学; 巩膜; 核黄素; 紫外线; 胶原交联

**Comparison of biomechanical properties of rabbit and human sclera after riboflavin/ultraviolet A collagen crosslinking** Zhang Yali\*, Li Zhiwei, Mu Guoying, Liu Lei. \* Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Jinan, Jinan 250001, China  
Corresponding author: Mu Guoying, Email: mgyeyes@163.com

**【Abstract】 Objective** To compare the biomechanical properties of rabbit and human sclera before and after riboflavin/ultraviolet A (UVA) collagen crosslinking. **Methods** Experimental study. Eight rabbits and 8 human eyeballs were included. The eyes were bisected, one half was cross-linked with riboflavin/UVA (photosensitizer; 0.1% riboflavin drops for 15 minutes, UVA: 3 mW/cm<sup>2</sup>, 365 nm, and 40 minutes) and the other half served as control. Biomechanical properties testing consisted of ultimate stress, stress and Young's modulus at 8% strain. Data were analyzed using *t* test. **Results** In untreated rabbit and human sclera, Young's modulus at 8% strain was (4 460±4 090)kPa and (14 310±8 560)kPa, the stress was (359±305)kPa and (1 079±646)kPa, the ultimate stress was (3 830±2 870)kPa and (4 450±1 120)kPa. In rabbit sclera, the stress, ultimate stress and Young's modulus were significantly increased by riboflavin/UVA crosslinking ( $t=3.07, 3.50, 3.04, P<0.05$ ). The biomechanical properties of human sclera were not statistically affected by crosslinking. **Conclusion** Human sclera has a higher biomechanical stiffness than rabbit sclera. With the same irradiation dose, riboflavin/UVA crosslinking increases the biomechanical stiffness of rabbit sclera, but not human sclera.

**【Key words】** Biomechanics; Sclera; Riboflavin; Ultraviolet; Collagen crosslinking

核黄素/紫外线 A (ultraviolet A, UVA) 诱导的角膜交联术可以显著增强角膜生物力学性能,在治疗圆锥角膜、角膜膨隆上取得良好效果<sup>[1-3]</sup>;巩膜组织主要成分为胶原纤维, Wollensak 和 Spoerl<sup>[4]</sup>对离体

人巩膜行核黄素/UVA 胶原交联,证实其可以提高巩膜生物力学性能。在病理性近视眼,随着屈光力的逐渐加大,巩膜持续性变薄,生物力学性能逐渐降低,能否利用胶原交联技术提升巩膜生物力学性能,阻止或延缓近视发展是目前研究热点。我们采用兔眼巩膜交联的参数<sup>[5]</sup>对人巩膜进行交联,比较交联前后生物力学参数变化,并与兔巩膜进行对比。

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1674-845X.2014.05.005

作者单位: 250001 济南市第二人民医院近视激光中心(张亚丽、刘蕾); 250021 济南, 山东省立医院眼科(李志伟、牟国营)

通信作者: 牟国营, Email: mgyeyes@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 实验标本

健康成年新西兰纯种大白兔 8 只,雌雄各半,体质量 2.0~2.5 kg,无眼部疾病[实验动物许可证号:SCXK(鲁)20090013]。8 只新鲜离体成人眼,所有巩膜均于角膜移植后获得,捐献者年龄为 28~43 岁,身体健康,无眼部疾病。所有眼球交联前后均于 4 ℃湿房保存,并于取材 12 h 内完成核黄素/UVA 胶原交联。本实验通过了本院伦理委员会的论证和同意。

### 1.2 方法

1.2.1 取材 将新西兰大白兔处死后取出眼球,随机选一眼作为对照(未交联组),另眼取 10 mm×20 mm 大小的巩膜试件(交联组),行胶原交联。将人眼巩膜沿角膜至视神经方向平均分为两部分,一部分做对照(未交联组),另一部分做 10 mm×20 mm 大小的巩膜试件进行胶原交联(交联组)。

1.2.2 核黄素/UVA 胶原交联 照射前 15 min 开始在巩膜试件上滴 0.1%核黄素溶液,每 3 min 1 次,共 5 次。长波紫外仪(IROC Illumination system Version 1000,瑞士)能量密度检测,然后行交联。交联参数为:紫外线波长 365 nm、能量密度 3 mW/cm<sup>2</sup>、照射时间 40 min、照射距离 50 mm、光束直径为 9 mm,照射中每 3 min 滴 1 次 0.1%核黄素溶液。

1.2.3 巩膜生物力学测试(单向拉伸法测巩膜生物力学性能) 分别在未交联组和交联组巩膜上各取 2 条 3.5 mm×12.0 mm 条带,将巩膜条带垂直夹在 INSTRON 试验机上下两端的夹头上,间隔 4~6 mm。首先对条带进行预拉伸试验:在同一应力水平下加载-卸载多次,加载速度为 2 mm/min,终止条件为载荷>0.021 N,循环次数为 7 次,使应力-应变曲线逐渐趋于稳定。然后行巩膜条带拉伸破坏试验:以 2 mm/min 的加载速度逐渐增加负荷,终止条件为试件被拉断破坏。

应力=载荷/截面积,截面积=宽度×厚度,应变=位移/原长,最大应力=最大破坏载荷/截面积。其中宽度、厚度、原长用特制游标卡尺测量,载荷与位移为计算机给出数据。根据以上数据可描绘出应力-应变曲线(见图 1)。应力-应变曲线的顶点位置就是极限应力所在处。在该曲线上模拟 8%应变前的线段为一直线,计算其斜率值,即为弹性模量。

### 1.3 统计学方法

实验研究。所有计量资料均以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 SPSS 17.0 统计软件包处理数据,用配对 *t* 检验对胶原交联前后的测量值进行统计分析,采

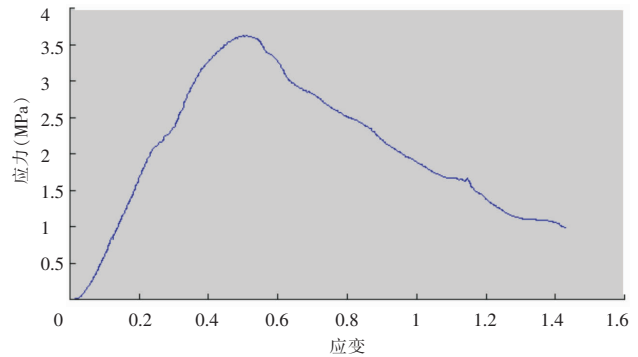


图 1 应力-应变曲线示意图

用独立样本 *t* 检验比较兔与人巩膜生物力学参数差异。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

在 8%应变条件下,对照组兔和人巩膜应力分别为(359±305)kPa 和(1 079±646)kPa;弹性模量分别为(4 460±4 090)kPa 和(14 310±8 560)kPa;显示人巩膜应力和弹性模量值显著高于兔巩膜,约为兔巩膜的 3 倍(见表 1),差异有统计学意义( $t=4.03$ 、 $4.15$ , $P<0.01$ )。兔和人巩膜极限应力分别为(3 830±2 870)kPa 和(4 450±1 120)kPa,其差异有统计学意义( $t=2.48$ , $P<0.05$ )。

实验组兔巩膜交联后的应力、极限应力和弹性模量分别为:(7 486±406)kPa、(8 130±3 990)kPa 和(9 510±5 230)kPa,较交联前均有提高,其差异均有统计学意义( $t=3.07$ 、 $3.50$ 、 $3.04$ , $P<0.05$ )。人巩膜交联后应力、极限应力和弹性模量分别为(1 259±582)kPa、(5 090±1 880)kPa 和(16 280±7 330)kPa,和交联前相比较,其差异均无统计学意义( $t=0.83$ 、 $1.16$ 、 $0.70$ , $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 兔和人巩膜生物力学参数的比较( $\bar{x}\pm s$ ,每组 16 个试件)

组别	应力(kPa)	极限应力(kPa)	弹性模量(kPa)
兔巩膜	未交联组	359±305	3 830±2 870
	交联组	7 486±406	8 130±3 990
	<i>t</i> 值	3.07	3.50
	<i>P</i> 值	<0.05	<0.05
人巩膜	未交联组	1 079±646	4 450±1 120
	交联组	1 259±582	5 090±1 880
	<i>t</i> 值	0.83	1.16
	<i>P</i> 值	>0.05	>0.05

## 3 讨论

巩膜是一黏弹性生物组织,即介于固体与液体之间的凝聚体,在外力作用下,黏弹性组织产生弹性

变形,目前常用的评估黏弹性组织生物力学性能的指标是弹性模量和应力<sup>[4,6]</sup>,本研究应用 8% 应变的弹性模量来反映巩膜条带的弹性模量值。

巩膜是一致密、瓷白色的组织,药物可以很好地渗透入内,研究表明相对分子质量为 150 000 kDa 的分子可以有效穿透巩膜组织<sup>[7-8]</sup>,交联所用的核黄素相对分子质量为 456 000 Da,易于穿透渗入巩膜深层,药物在巩膜的渗透受组织表面情况、厚度、含水量等因素的影响,故核黄素在不同动物、不同部位巩膜的渗透能力有差异<sup>[7,9-10]</sup>。同时巩膜组织对紫外线具有良好的吸收能力,2004 年 Wollensak 和 Spoerl<sup>[4]</sup>对离体人巩膜进行核黄素/UVA 胶原交联,证实能显著提高其生物力学性能,其交联参数如下:0.1%核黄素溶液,紫外线波长 370 nm,能量密度 3 mW/cm<sup>2</sup>,照射时间 30 min,照射距离 1 cm。

本研究采用 Zhang 等<sup>[5]</sup>推荐的安全行兔眼巩膜交联的参数,证实核黄素/UVA 胶原交联可以显著提高兔巩膜的生物力学性能,其中弹性模量增加 113.2%~264.2%、极限应力增加 112.3%、应力增加 108.5%~261.8%,与之前的研究结果相符<sup>[6,11]</sup>。而同等实验条件下人眼巩膜交联前后生物力学指标无明显改变,认为与紫外线照射能量及交联部分巩膜占总厚度比例相关。能量方面,Wollensak 和 Spoerl 实验中所用的紫外线 A 照射仪为双头的照射仪 (Roithner Lasertechnik)<sup>[4,11]</sup>,在照射区域有能量重叠现象,即造成部分区域的能量密度可高达 6 mW/cm<sup>2</sup>,同时照射距离近,故总照射能量高;而本实验所用的紫外线 A 照射仪能量密度均一,照射区域均为 3 mW/cm<sup>2</sup>,总照射能量较低。交联厚度方面,对猪和人角膜交联研究发现交联的角膜厚度占总角膜厚度的比例越高,对整体角膜生物力学性能的影响越大<sup>[12]</sup>,人巩膜的厚度高于兔巩膜,所以交联部分厚度在兔巩膜所占的比例明显高于人巩膜,可能是导致本研究人和兔巩膜实验结果差异的重要原因。另外,I 型胶原纤维是产生胶原交联的主要蛋白,其含量与交联密切相关,不同动物巩膜 I 型胶原含量不同,即使在同等条件下交联,效果也有差异。

目前有关巩膜交联的研究较少,兔眼巩膜交联的最佳参数已基本确定,用于人眼交联效果不明显,适合人眼的治疗参数尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus[J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 135:620-627.
- [2] Vinciguerra P, Albé E, Frueh BE, et al. Two-year corneal cross-linking results in patients younger than 18 years with documented progressive keratoconus[J]. *Am J Ophthalmol*, 2012, 154:520-526.
- [3] Salgado JP, Khoramnia R, Lohmann CP, et al. Corneal collagen crosslinking in post-LASIK keratectasia[J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95:493-497.
- [4] Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2004, 30:689-695.
- [5] Zhang Y, Zou C, Liu L, et al. Effect of irradiation time on riboflavin-ultraviolet-A collagen crosslinking in rabbit sclera[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2013, 39:1184-1189.
- [6] Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, et al. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA[J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2005, 83:477-482.
- [7] Cruysberg LP, Nuijts RM, Geroski DH, et al. The influence of intraocular pressure on the transscleral diffusion of high-molecular-weight compounds[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46:3790-3794.
- [8] Ambati J, Canakis CS, Miller JW, et al. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41:1181-1185.
- [9] Nicoli S, Ferrari G, Quarta M, et al. Porcine sclera as a model of human sclera for in vitro transport experiments: histology, SEM, and comparative permeability[J]. *Mol Vis*, 2009, 15:259-266.
- [10] Olsen TW, Edelhauer HF, Lim JI, et al. Human scleral permeability. Effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36:1893-1903.
- [11] Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA)[J]. *Acta Ophthalmol*, 2009, 87:193-198.
- [12] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2003, 29:1780-1785.

(收稿日期:2014-03-31)

(本文编辑:毛文明)