

# 紫外光核黄素诱导角膜交联治疗感染性角膜炎的研究进展

郝兆芹, 吴洁, 宋金鑫

**基金项目:**西安市科技计划项目[No. SF1207(1)]  
**作者单位:**(710002)中国陕西省西安市第一医院眼科医院 陕西省眼科研究所  
**作者简介:**郝兆芹,女,毕业于西安交通大学,硕士,主治医师,研究方向:眼表及角膜病的诊断和治疗。  
**通讯作者:**郝兆芹. glmxinjing@163.com  
**收稿日期:**2012-12-25 **修回日期:**2013-05-16

## Current advance in treatment of infective keratitis by UVA-Riboflavin cross-linking

Zhao-Qin Hao, Jie Wu, Jin-Xin Song

**Foundation item:** Xi'an Science and Technology Supported Project [No. SF1207(1)]

No. 1 Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Zhao-Qin Hao. No. 1 Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. glmxinjing@163.com

Received: 2012-12-25 Accepted: 2013-05-16

### Abstract

• Corneal collagen cross-linking (CXL) is the latest corneal shape technology applied in clinic. CXL can increase corneal rigidity after collagen cross-linking used ultraviolet A. CXL also can increase the mechanical and biochemical stability of the stroma tissue and prevent the progression of corneal expansion and the refractory corneal ulcer.

• **KEYWORDS:** corneal collagen cross-linking; riboflavin; ultraviolet A; infective keratitis

**Citation:** Hao ZQ, Wu J, Song JX. Current advance in treatment of infective keratitis by UVA-Riboflavin cross-linking. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1134-1136

### 摘要

角膜交联(corneal collagen cross-linking, CXL)技术是一种近年来兴起的应用于临床最新的角膜成形技术。它通过A段紫外光和感光剂核黄素,诱导角膜基质内胶原纤维相互交联而提高角膜硬度,增强角膜基质的力学和生物化学稳定性,从而阻止圆锥角膜等角膜扩张性和难治性角膜溃疡等角膜疾病的进展。

**关键词:** 角膜交联;核黄素;紫外光A;感染性角膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.19

**引用:**郝兆芹,吴洁,宋金鑫.紫外光核黄素诱导角膜交联治疗感染性角膜炎的研究进展.国际眼科杂志 2013;13(6):1134-1136

### 0 引言

感染性角膜炎是主要的致盲性眼病之一,不但发病率和致盲率高,严重者还可摧毁眼球。病原体包括细菌、真菌、病毒、衣原体、棘阿米巴以及梅毒螺旋体等。主要依靠药物治疗,但常因病情迁延不愈和反复发作,治疗效果不佳,严重感染时只能靠角膜移植来控制感染和保眼球治疗,但角膜材料有限,不能满足广大角膜病患者的需要,很多患者最终只能进行根治性眼球手术,眼科学者们一直渴望能找到新的、有效的治疗感染性角膜炎的方法。角膜交联技术的出现给角膜疾病的治疗带来了新的曙光。

### 1 角膜交联疗法的治疗原理

角膜交联疗法的基本原理是使用370nm波长的紫外光A照射感光剂核黄素,使核黄素激发为三线态,产生以单线态氧为主的活性氧簇,后者进一步与各种分子相互作用,诱导胶原纤维的氨基之间发生化学交联反应(Ⅱ型光化学反),在纤维间形成共价键连接<sup>[1]</sup>。角膜的生物力学属性取决于胶原纤维、胶原纤维束和它们的空间结构组成,所以交联后增加了胶原纤维的机械强度和抵抗角膜扩张的能力。

选择核黄素是因为其有多重作用:(1)被紫外光A激发成产生活性氧簇(ROS)的三重态即单态氧、超氧阴离子基团和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,ROS和各种分子反应诱导桥接胶原纤维氨基之间的化学共价键发生物理交联,从而加固角膜胶原基质。(2)吸收紫外光A辐射能并阻止其对角膜内皮、晶状体和视网膜的损害<sup>[2]</sup>。(3)可提高角膜组织对紫外光A的吸收率。选择波长为370nm紫外光A是因为在此波段核黄素吸收达高峰<sup>[3]</sup>,穿透率低,仅有7%的紫外光A穿透角膜,可避免对角膜内皮、晶状体和视网膜的损害。

### 2 角膜生物力学改变

CXL可明显提高角膜硬度和机械强度,主要是引起角膜前300μm胶原纤维的直径增粗,而对于后部基质影响不大。Kohlhaas等<sup>[4]</sup>和Wollensak等<sup>[5]</sup>对猪眼和人眼进行CXL治疗后,观察到在一定应力下角膜紧张度提高了5%,此现象仅出现在前部角膜基质,后部基质无明显改变。原因在于紫外光通过基质时迅速衰减和核黄素吸收紫外光主要在前部基质,65%~70%的紫外光被表层200μm的角膜所吸收,而只有20%左右的紫外光被后部200μm角膜所吸收。研究<sup>[6]</sup>表明离体猪角膜交联后出现额外的I型胶原多聚体,其分子量≥1000kD,该胶原直径增宽,并且对热变性、胃蛋白酶及巯基乙醇稳定,增强了胶

原的生物学稳定性。角膜交联后浅层及中间基质的细胞先被破坏,随后逐渐出现角膜细胞的再生,增强了基质的机械强度。有实验证实<sup>[4]</sup>,经紫外光核黄素交联治疗后的猪角膜硬度增加 71.9%,人角膜硬度增加 328.9%。

### 3 角膜超微结构改变

角膜基质层厚约 500 $\mu\text{m}$ ,占角膜厚度 90%,主要由胶原纤维、粘合物和角化细胞组成。基质的胶原纤维很规则、均匀,形成约 200 ~ 250 个胶原纤维束薄板,层层紧密相叠。人类角膜中的胶原主要是 I 和 VI 型胶原,其他还有 III, V, VII, VIII 型胶原。I 型胶原为粗横纤维,呈网状排列,构成基质的支架,VI 型胶原为丝状结构,在胶原纤维间起连接作用,二者对维持角膜机械张力起主要作用。Wollensak 等<sup>[7]</sup>对离体兔角膜经过 CXL 治疗 4h 后,其角膜基质 50 $\mu\text{m}$  处的胶原纤维直径较对侧未处理眼增加 12.2%,角膜基质 350 $\mu\text{m}$  处的胶原纤维直径较对侧未处理眼增加 4.6%。对于同一治疗眼,其前部基质胶原纤维直径较后部增加 9.3%。这一超微结构的改变正是 CXL 疗法提高角膜机械强度的解剖学基础。Wollensak 等<sup>[8]</sup>还发现经 CXL 治疗 3d 的兔角膜基质细胞发生凋亡,内皮细胞可见,250 $\mu\text{m}$  前基质细胞凋亡区可见蜂窝状水肿,其周边可见弥漫性水肿,角膜厚度比正常增加 100% 以上,1wk 后基质细胞开始增生,4 ~ 6wk 基质基本恢复正常。蜂窝状水肿可能为随光线增强所看到的交联边界,交联的网状形式可能加强了角膜的弹性。Dhaliwa 等<sup>[9]</sup>发现经 CXL 治疗后 2wk,角膜基质约 300 $\mu\text{m}$  处出现大量球样高反光区,呈一明显分界线,此分界线约位于角膜中央厚度的 60%;周边角膜厚度的 30%。角膜 300 $\mu\text{m}$  前的细胞见破坏,未发现组织病理学改变。由此可以凭借这条分界线,辨别治疗后紫外交联深度及有效度。Wang<sup>[10]</sup>在活体鼠角膜进行 CXL 治疗后,取下角膜经过免疫组织化学及 Western-blot 分析后发现角膜中央出现细胞凋亡,角膜出现无细胞区,死亡细胞的数量决定于照射时间。角膜基质细胞和抗原提呈细胞的丢失,提示可以预防免疫反应,可能对降低角膜移植术后供体角膜的排斥反应、保持供体存活有重要意义。

### 4 角膜生物学活性的改变及耐酶性的改变

正常角膜内含有各种酶,例如磷酸酯酶、淀粉酶、三磷酸腺苷酶、胆碱酯酶、胶原酶等,这些酶在上皮和内皮细胞内含量较基质多。角膜在受到病原体感染后,含酶量和种类显著增多。细菌和真菌可以产生各种酶类,从而降解人的角膜胶原纤维,导致角膜溶解。研究发现,CXL 能显著增强角膜抵抗各种酶的消化能力。Spoerl 等<sup>[11]</sup>研究了交联后角膜耐酶性的改变,对 60 个离体猪眼球经紫外光核黄素照射 30min,然后取下角膜分别经过胃蛋白酶、胰蛋白酶和胶原酶消化,角膜分别在第 13d、第 5d 和第 14d 出现溶解,而未交联的角膜分别在第 6d、第 2d、第 6d 出现溶解。表明经过 CXL 治疗的角膜对抗各种酶消化作用的能力显著加强,可应用于角膜溃疡的治疗。

### 5 对角膜溃疡的治疗

在感染性角膜疾病中,各种组织降解酶在病情发展中发挥了重要的作用,组织胶原酶在感染性角膜溃疡及非感

染性角膜溃疡如碱烧伤性角膜溃疡、Mooren 溃疡、风湿性溃疡,病毒性角膜溃疡中增加。研究表明交联所致的稳定的生物化学作用是由于胶原纤维之间三级结构的改变,交联后可阻止蛋白水解酶到达其特定酶解位点<sup>[12]</sup>,从而抑制胶原溶解。

Iseli 等<sup>[13]</sup>对常规抗生素治疗无效的 5 例角膜炎患者进行 CXL 治疗,发现 5 例患者全部达到临床治愈,门诊随访 9mo,病变均无发展。Micelli Ferrari 等<sup>[14]</sup>对 1 例大肠杆菌引起的角膜炎患者进行 CXL 治疗后,获得满意疗效。Moren 等<sup>[15]</sup>对一个由于配戴角膜接触镜引起单眼角膜溃疡的女性进行治疗,实验室检查排除单纯疱疹病毒、细菌和棘阿米巴感染,患者最佳矫正视力 (BCVA) 0.02,开始应用广谱抗生素治疗 1mo,角膜浸润性溃疡继续发展、角膜变薄。考虑患者对常规治疗无效后,给予 CXL 治疗。治疗过程中患者的疼痛减轻、坏死物质迅速减少、溃疡快速愈合,几天内角膜上皮开始恢复,1mo 后上皮完全长好,2mo 后溃疡基本恢复,治疗 9mo 后,BCVA 20/30。Al-Sabai 等<sup>[16]</sup>对 1 例抗生素治疗无效的假单胞菌引起的溃疡性角膜炎患者进行 CXL 治疗,病灶区形成了瘢痕,避免了角膜穿孔。以上病例充分表明 CXL 对感染性角膜炎的治疗有积极的影响,为感染性角膜炎的治疗开辟了新途径。

### 6 角膜交联术的安全性

目前用于交联的 A 波紫外光 (UVA) 波长为 370nm,能量约 5.4J/cm<sup>2</sup> (3mW/cm<sup>2</sup>) 低于紫外光对于角膜内皮细胞、晶状体和视网膜的损伤阈值,临床应用安全。CXL 疗法可能带来的不良反应主要包括紫外光照射引起的直接损伤和紫外光的光化学效应带来的间接损伤两个方面。紫外光直接损伤取决于波长、辐射度和照射时间,而间接损伤是由紫外光激发核黄素产生的自由基造成的。

Spoerl 等<sup>[17]</sup>研究发现自由基引起光损伤时,角膜细胞和内皮细胞的损伤阈值分别是 0.45, 0.35mW/cm<sup>2</sup>,高于交联后角膜内皮细胞的光损伤值 0.18mW/cm<sup>2</sup>。CXL 治疗中,由于大部分紫外光经过角膜后被角膜基质和核黄素吸收,照射时间短约 30min,能达到角膜内皮、晶状体和视网膜的辐射能量已很小。人晶状体只吸收 0.65J/cm<sup>2</sup> 紫外光 A,远低于其致白内障的阈值 70J/cm<sup>2</sup>,也远低于视网膜光感受器受损伤的阈值 81J/cm<sup>2</sup>。Wollensak 等<sup>[18]</sup>研究了 CXL 对角膜基质细胞和内皮细胞的损伤作用,发现兔眼经过交联后,在 300 $\mu\text{m}$  的角膜基质出现了细胞凋亡,且细胞凋亡的深度与辐射的强度呈正相关。在整个治疗过程中角膜温度都保持恒定,没有发现热灼伤;另一临床研究<sup>[19]</sup>也发现设定合适参数使交联发生在角膜 300 $\mu\text{m}$  处,共聚焦显微镜可以看到明显的分界线,可能是交联于非交联区光反射或折射率不同造成的,可以通过此线控制交联的深度。因此只有在角膜厚度大于 400 $\mu\text{m}$  时才考虑此疗法,因为只有足够的角膜基质厚度才可以保证角膜内皮细胞在治疗过程中不受损伤。

对于大多数患者来说,角膜交联疗法是安全的,但仍有报道对圆锥角膜及屈光手术后患者进行 CXL 治疗后出现角膜上皮雾状混浊 (haze)、弥漫性板层角膜炎、单纯疱疹病毒性和虹膜炎、棘阿米巴性角膜炎、细菌性角膜炎等并发症。

## 7 前景与展望

紫外光核黄素角膜交联技术作为一种新兴的应用于临床的角膜成形技术越来越受到人们的关注。已在圆锥角膜及屈光性手术后角膜扩张的治疗方面获得了显著疗效。同时也对感染性角膜炎的治疗显示出明显效果。该方法相对安全、方法简单、费用低,将大大减少临床上角膜供体材料紧张的难题,为众多的感染性角膜炎患者带来福音。但对感染性角膜炎中的难治性真菌性角膜炎的治疗效果目前国内外尚无报道。另有研究<sup>[20]</sup>表明,巩膜突交联后硬度增加可降低视神经巩膜板对眼压升高的生物机械敏感性,可为青光眼患者视神经保护提供新的方法。尽管实验和临床研究已经初步证实了该疗法的作用机制和疗效,但其应用条件有限,对角膜厚度有严格的要求,在其产生治疗效果的同时亦出现了一些不良后果,对角膜膨胀性疾病形态发展变化还需要长期的随访观察。其作为一种新的治疗方法还不够完善,其远期疗效和安全性、对角膜理化性质的长期影响、对病原体的影响机制尚需进一步研究。

### 参考文献

- 1 Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007;26(4):385-389
- 2 Spoed E, Wollensak G, Dittert DD, et al. Thermomechanical behaviour of collagen cross-linked porcine cornea. *Ophthalmologica* 2004;218(2):136-140
- 3 潘红卫, 陈建苏. 紫外光核黄素交联治疗圆锥角膜的研究进展. *眼科研究* 2008;26(5):397-400
- 4 Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, et al. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg* 2006;32(2):279-283
- 5 Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2003;29(9):1780-1785
- 6 Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea* 2008;27(3):353-356
- 7 Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, et al. Collagen fiber diameter in the

rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004;23(5):503-507

- 8 Wollensak G, Herbst H. Significance of the lacunar hydration pattern after corneal cross linking. *J Fr Ophthalmol* 2009;32(1):1-7
- 9 Dhaliwa J, Kaufman SC. Corneal collagen cross-linking: a confocal, electron, and light microscopy study of eye bank corneas. *Cornea* 2009;28(1):62-67
- 10 Wang F. UVA/riboflavin-induced apoptosis in mouse cornea. *Br J Ophthalmol* 2008;92(2):268-271
- 11 Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Current Eye Research* 2004;29(1):35-40
- 12 Berman MB. Collagenase inhibitors: Rationale for their use in treating corneal ulceration. *Int Ophthalmol Clinics* 1975;15(4):49-66
- 13 Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, et al. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea* 2008;27:590-594
- 14 Micelli Ferrari T, Leozappa M, Lorusso M, et al. Links escherichia coli keratitis treated with ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking: a case report. *Eur J Ophthalmol* 2009;19:295-297
- 15 Moren H, Malmso M, Mortensen J, et al. Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking of the cornea for the treatment of keratitis. *Cornea* 2010;29(1):102-104
- 16 Al-Sabai N, Koppen C, Tassignon MJ. UVA/riboflavin crosslinking as treatment for corneal melting. *Curr Eye Res* 2010;35(8):715-721
- 17 Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Klin Monbl Augenheilkd* 2008;225(2):131-137
- 18 Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, et al. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea* 2004;23(1):43-49
- 19 Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea* 2006;25(9):1057-1059
- 20 Thornton IL, Dupps WJ, Roy AS, et al. Biomechanical effects of intraocular pressure elevation on optic nerve/lamina cribrosa before and after peripapillary scleral collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(3):1227-1233