

角膜胶原蛋白交联的研究进展

王江维, 沈政伟, 姜黎

作者单位: (430070) 中国湖北省武汉市, 广州军区武汉总医院眼科准分子中心

作者简介: 王江维, 湖北中医药大学在读硕士研究生, 研究方向: 屈光学。

通讯作者: 沈政伟, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 准分子中心. sheneye@qq.com

收稿日期: 2014-01-20 修回日期: 2014-03-26

Recent advancement of corneal collagen cross linking

Jiang-Wei Wang, Zheng-Wei Shen, Li Jiang

Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Correspondence to: Zheng-Wei Shen, Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China. sheneye@qq.com

Received: 2014-01-20 Accepted: 2014-03-26

Abstract

• Cornea is one of the important structure for the eye. It is transparent and locats about 1/6 before fiber membrane. Collagen arrangement is orderly and lets the light through. Because of the special arrangement of collagen, it makes transparent state. Thus it can be seen the important role of corneal collagen. Now we reviewed the distribution of collagen, physiological function, changes of corneal collagen cross-linking, clinical use and security as follows.

• KEYWORDS: corneal; collagen; corneal collagen cross-linking; keratoconus

Citation: Wang JW, Shen ZW, Jiang L. Recent advancement of corneal collagen cross linking. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(5):832-834

摘要

角膜是眼球重要的结构之一,呈透明状态,约占纤维膜的前1/6。它所含的胶原蛋白排列规则,可以让光线通过,正是因为胶原蛋白特殊的排列方式,才使角膜拥有良好的透明状态。由此可见胶原蛋白对角膜的重要作用,现在本文就胶原蛋白在角膜中的分布、生理功能、角膜交联术后的变化和临床运用、安全性综述如下。

关键词: 角膜; 胶原; 角膜交联术; 圆锥角膜

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.12

引用: 王江维, 沈政伟, 姜黎. 角膜胶原蛋白交联的研究进展. 国

际眼科杂志 2014;14(5):832-834

0 引言

角膜具有透明、无血管和具有很强的屈光能力的特点,其表面光滑、质地坚韧并有弹性,而角膜的这些特点依赖于有规律的细胞外基质转换。胶原纤维是角膜基质中最丰富的结构大分子。因此,当角膜出现病变时,胶原纤维也会受到损伤,比如角膜扩张病变就是其中之一。角膜胶原交联术(corneal collagen cross-linking, CCL)是用于治疗角膜扩张的一种新方法,它应用光化学原理来增强角膜韧度,阻止角膜病变进展,使病变处于稳定状态而现已广泛应用于临床,如角膜胶原交联术被用到传染性角膜炎、角膜溃疡、圆锥角膜及屈光手术后引起的角膜扩张等多种角膜疾病的治疗,并取得了较理想的临床疗效。本文简要概括了角膜胶原蛋白的分布、功能、原理、交联后的变化、临床运用及安全性等方面。

1 角膜胶原蛋白的分布和功能

胶原是构成角膜框架的主要成分,是大分子物质,占角膜干质量的70%^[1],胶原纤维具有韧性大、抗拉力强的特点,维持角膜形状^[2],是维持角膜张力的决定因素。在角膜基质中,I型胶原占胶原总量的64%,主要分布在基质中,上皮层和内皮细胞层也有分布^[3]。其为粗横纤维,呈网状排列,起支架作用^[4]。II型胶原分布在前弹力层和基质层,它是三螺旋结构。III型在角膜中分布较少^[5],II型,III型胶原蛋白影响结缔组织中胶原束的组成。IV型胶原主要分布在前弹力层和后弹力层,它的作用是稳定细胞形态^[6]。V型胶原在前弹力层和上皮细胞层分布,角膜的透明性受V型和I型胶原相互作用的影响^[7]。VI型胶原为丝状结构,分布于基质,在胶原纤维间起连接作用,稳定角膜基质,其对维持角膜机械张力起主要作用。

2 紫外光核黄素角膜交联术

紫外光核黄素角膜交联术是 Seiler 等于 1998 年发明的一种技术,它是一种创新的方法增加角膜基质机械和生物化学稳定性^[8-11]。角膜交联术已经证明在角膜生物力学强度增加 328.9%^[12]。它利用紫外线 A 和核黄素使胶原之间交联,角膜相邻原胶原之间产生共价键,增强角膜的生物力学稳定性。它的原理是光敏剂核黄素在 370nm 波长紫外光 A 作用下,核黄素分子被激发到三线态,产生以单线态氧为主的活性氧族。活性氧族可以与各种分子发生反应,诱导胶原纤维的氨基(团)之间发生化学交联反应(II型光化学反应),从而增加了胶原纤维的机械强度和抵抗角膜扩张的能力^[13]。紫外线波长 370nm 被用于 CCL,是因为核黄素在此波长有一个吸收峰。Seiler 等将交联术用于阻止圆锥角膜的进展和角膜扩张的治疗^[14]。为了弄清胶原蛋白经过紫外线核黄素角膜交联术后发生了哪些变化,可以用免疫组化和 HE 染色的方法进行观察。

3 角膜组织交联术后的变化

3.1 角膜组织电镜观察 术后1d,术区基质中仅偶见基质细胞,角膜上皮细胞和基质细胞均可见大量凋亡细胞^[15]。Marine 等通过实验证实交联后3d角膜组织大量水肿,角膜上皮已经愈合^[16]。交联1wk后,角膜透明度和厚度重新恢复正常,前基质仍然缺乏细胞核,后基质细胞核的数量显著低于未受损伤的角膜内细胞核的数量,在后基质存在高度反光的纺锤体,虽然内皮细胞已经愈合,但细胞密度仍然很低。另外,还有人对兔眼角膜做过交联术实验,证实角膜胶原纤维直径比术前加粗,这些改变是处理过程中形态学的改变,增加了生物力学的稳定性^[17],并且在300 μm 深度有一分界线^[18]。角膜交联可以导致角膜细胞损坏,但6mo后这些细胞又会重新增殖。

3.2 角膜组织 HE 染色 夏毓^[19]实验研究表明交联后1d紫外光照射区角膜上皮缺损,基质层胶原纤维水肿模糊,正常的板层结构消失。术后3d去上皮紫外光/核黄素组角膜上皮近完全覆盖,但仅有1~2层角膜上皮细胞。上皮细胞呈扁平圆形,体积较正常对照组角膜上皮细胞稍大。角膜上皮细胞与下方基质层粘连不甚紧密,有少量上皮细胞与其下基底层之间有细小裂隙。基质层胶原纤维水肿、增厚,浅基质层基质细胞数量减少,深基质层纤维细胞亦变大,呈纺锤形。基质层内有较多的中性粒细胞和淋巴细胞浸润。可见纤维细胞排列紊乱,浅基质纤维排列紊乱,失去板层结构。

3.3 角膜组织免疫组织化学 术后7d和4mo角膜基质见部分细胞 α -SMA染色呈阳性,术后4mo角膜基本保持正常厚度,角膜基质细胞和上皮细胞凋亡数量显著减少。分析证明交联术后胶原纤维的直径增加,大部分发生在角膜前基质300 μm 内^[20,21]。交联术后1wk,角膜透明度和厚度重新恢复正常,前基质仍然缺乏细胞核。国内李刚^[15]对兔角膜行角膜交联,并行免疫组化,原位末端标记法,术后1d角膜上皮细胞和基质细胞均可见大量凋亡细胞。术后7d角膜基质细胞和上皮细胞凋亡数量均较术后1d减少。交联后1wk免疫组织化学染色显示角膜上皮细胞、后基质细胞和内皮细胞内均有细胞增殖。1wk后还发现细胞从未处理区向处理区移动,角膜上皮完整,并且在DAPI和PI染色形态学正常,但前基质仍然有很大改变,没有发现DNA和RNA染色阳性,另外,免疫组化还发现基质细胞和内皮细胞增殖,在基底上皮一些ki-67免疫反应细胞核,说明上皮仍然再生,在基质内Ki-67染色阳性。Rita等对10例圆锥角膜患者进行交联术发现正常角膜没有出现TUNEL染色阳性,圆锥角膜和交联后的角膜出现前基质中度凋亡细胞,Ki-67染色发现正常角膜和圆锥角膜相比在交联后角膜增殖显著增加。正常角膜交联后CD34阳性,角膜细胞均匀的分布在角膜基质,圆锥角膜免疫反应性不协调的缺失。免疫组织化学对I型胶原分析可知角膜交联术后胶原纤维直径显著增加。Salomon等实验进行TUNEL染色显示交联第1d和第3d角膜细胞坏死和凋亡,在第1d接近交联区的角膜缘有炎症细胞存在,并且 α -SMA阳性,表明肌纤维的存在。在3~5d之间交联周围 α -SMA染色阳性增加,交联区域没有细胞一直持续5wk。由此可见,胶原蛋白交联导致早期水肿,角膜细胞凋亡坏死,炎症细胞在交联区出现,在角膜基质细胞转变成肌纤维细胞,前基质纤维凝结,角膜细胞损伤,细胞核移位,炎症细胞也许对圆锥角膜和角膜交联的免疫反应有

临床价值。

4 临床运用

4.1 传染性角膜炎与角膜溃疡 在角膜炎过程中,一些酶在溃疡中起很大作用,比如胃蛋白酶、胶原酶和胰蛋白酶,交联术可以增强角膜组织对抗酶的作用。研究表明:交联后的角膜分别在第5,13,14d出现溶解,所以能制止角膜炎。Moren等^[21]对一位由于配戴角膜接触镜引起角膜溃疡的女性进行治疗,排除单纯疱疹病毒、细菌和棘阿米巴感染,患者最佳矫正视力为0.02,开始应用广谱抗生素治疗1mo,角膜溃疡继续发展。因患者对常规治疗无效,给予CCL治疗。治疗中患者疼痛减轻、坏死物质大量减少、溃疡迅速愈合,几天内角膜上皮开始恢复,1mo后上皮都已愈合,2mo后溃疡基本治愈,治疗9mo,最佳矫正视力为20/30。另外,Micelli Ferrari等^[22]对1例感染革兰阴性菌女性患者进行角膜交联疗法,既往糖尿病病史,右眼疼痛、畏光、异物感1wk,常规抗生素治疗无效。使用角膜交联疗法后第1d,角膜溃疡即形成瘢痕组织,1mo后角膜水肿消退,溃疡基本愈合,症状消失。在标准治疗参数下,当角膜厚度低于400 μm 时,紫外光/核黄素交联可致使角膜内皮细胞凋亡,表现为角膜水肿。因此对于角膜厚度小于400 μm 的角膜溃疡应避免使用。由此可见,在传染性角膜炎和角膜溃疡治疗中,交联术可以作为顽固病例中传统治疗的辅助方法。

4.2 圆锥角膜 圆锥角膜是退行性的角膜疾病,呈循序渐进发展。圆锥角膜病变时,角膜进行性变薄、扩张,病理进程中会出现近视和散光,它是双眼原发性病变,很多患者最终需要角膜移植。目前治疗圆锥角膜的方法有配戴框架眼镜、硬性角膜接触镜、角膜基质环植入术和角膜移植术。角膜交联术是近年来兴起的一种治疗圆锥角膜、准分子激光术后的角膜扩张及难治性角膜溃疡、角膜炎等角膜疾病的新疗法。通过370nm波长的紫外线A照射浸染了感光剂核黄素的角膜胶原纤维,诱导角膜胶原纤维发生交联增加其机械强度和抵抗角膜扩张的能力。角膜交联后,增加了胶原纤维抵抗角膜扩张的能力和机械强度。用生物力学测量装置进行治疗后对交联前后角膜硬度对比,显示角膜硬度增加了330%,杨氏模量为1.8MPa。Vinciguerra等^[23]报告了角膜交联术在治疗40例儿童圆锥角膜的效果,年龄9~18岁,发现角膜曲率的下降,视觉提高,没有出现并发症。Caporossi等^[24]临床研究发现,CCL术后裸眼视力及CDVA分别提高3.6行和1.66行,角膜地形图显示平均角膜曲率降低了2.1D,散光量是下降的。李刚^[15]对圆锥角膜患者进行CCL12mo后发现患者裸眼视力和最佳视力分别提高,最大曲率和散光量比术前降低,但角膜厚度与术前相比无统计学差异,大量试验证明交联术对圆锥角膜有较好治疗效果。

5 安全性

Gautam等^[25]对一位36岁接受交联术感染微孢子虫的男性患者观察,术后出现眼红、疼痛等角膜炎症状,结果显示角膜上皮缺损和多个间质浸润。给予常规抗生素治疗,6wk后视力恢复正常。角膜交联术由于感染引起的角膜炎常规治疗效果良好。Eberhard等认为首先去除角膜上皮^[26],然后在紫外线照射前,先行核黄素渗透30min,核黄素在其中起光敏剂和紫外线阻断剂的作用,紫外线辐照度为3mW/cm²,必须同质,波长在370nm,角膜基质厚度至少在400 μm 。在这个标准下,角膜内皮、晶状体、视网膜

不会受到损伤。Spoerl 等^[27]研究表明角膜交联术未出现其他交联因子(如戊二醛)的缺点,例如角膜瘢痕、角膜失代偿和毒性作用。此外,实验表明,通过红外温度始终保持相对稳定,在引起热损伤的域值温度始终保持相对稳定,在引起热损伤的域值温度之下,65%~70%紫外光被表层 200 μm 角膜基质所吸收,交联治疗的紫外光能很小,约 0.65J/cm²(0.36mW/cm²),远远低于可以引起白内障的能量水平 70J/cm²,在交联术中 A 波紫外光(UVA),而引起白内障损伤的波长为 290~320nm 的 B 波紫外光(UVB),对视网膜损害的波长在 400~1400nm 之间,最小辐射强度为 4.3mW/cm²,大部分紫外光在通过角膜后被角膜基质和核黄素吸收,从而达到视网膜的辐射能量很小,因而角膜交联术不会对角膜基质深层结构、内皮层、晶状体、视网膜造成伤害。深层结构和内皮层受影响不大。角膜交联术在临床运用中是安全、有效的。

6 展望

目前,国内外科研工作者已经对角膜胶原蛋白和对其进行交联术后的研究已经上升到一定的高度,比如精微分子结构,交联后的结构变化,并在此基础上运用到临床。经典紫外光/核黄素角膜交联术作为一种新兴治疗方法,必然存在一定的局限性。目前许多问题还未解决,后续的研究工作应致力于对紫外光/核黄素角膜交联方法的改进和完善,以及进一步寻找更有效、安全的角膜交联方法,让更多患有角膜疾病,渴望通过这项技术改善生活质量的患者从中受益,需要医疗工作者的共同努力。

参考文献

- 1 Winkler M, Chai D, Kriling S, et al. Nonlinear optical macroscopic assessment of 3-D corneal collagen organization and axial biomechanics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):8818-8827
- 2 Jester JV, Winkler M, Jester BE, et al. Evaluating corneal collagen organization using high-resolution nonlinear optical microscopy. *Eye Contact Lens* 2010;36(5):260-264
- 3 Tsuchiya S, Tanaka M, Konomi H, et al. Distribution of specific collagen types and fibronectin in normal and keratoconus corneas. *Jpn J Ophthalmol* 1986;30(1):14-31
- 4 Sakura T, Minoru T, Hiroshi K, et al. Distribution of specific collagen types and fibronectin in normal and keratoconus corneas. *Am J Ophthalmol* 1985;30(2):14
- 5 Epstein EH Jr, Munderloh NH. Isolation and characterization of CNBr peptides of human 3 collagen and tissue distribution of 2 and 3 collagens. *J Biol Chem* 1975;250(24):9304-9312
- 6 Ben-Zvi A, Rodrigues MM, Krachmer JH, et al. Immunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea. *Curr Eye Res* 1986;5(2):105-117
- 7 Ahoadi AJ, Jakobiec FA. Corneal wound healing: cytokines and extracellular matrix proteins. *Int Ophthalmol Clin Ocul Trau* 2002;42(3):13-24
- 8 Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue.

Exp Eye Res 1998;66(1):97-103

- 9 Sporn E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2004;29(1):35-40
- 10 Sporn E, Seiler T. Techniques for stiffening the cornea. *J Refract Surg* 1999;15(6):711-713
- 11 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
- 12 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
- 13 Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007;26(4):385-389
- 14 Wollensak G, Spoerl E, Reber F, et al. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment *in vitro*. *Ophthalmic Res* 2000;35(6):324-328
- 15 李刚. 核黄素-紫外线 A 胶原交联对角膜胶原纤维重塑及生物力学稳定性的影响. [博士学位论文]. 北京:军医进修学院 2012
- 16 Hovakimyan M, Guthoff R, Knappe S, et al. Short-Term corneal response to cross-linking in rabbit eyes assessed by *in vivo* confocal laser scanning microscopy and histology. *Cornea* 2011;30(2):196-203
- 17 Mencucci R, Marini M, Paladini I, et al. Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clin Exper Ophthalmol* 2010;38(1):49-56
- 18 Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus new hope. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17(4):356-360
- 19 夏毓. 紫外光/核黄素角膜胶原交联的实验研究. [博士学位论文]. 上海:上海交通大学 2011
- 20 Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, et al. Collagen fiber in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004;23(5):503-507
- 21 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
- 22 Micelli Ferrari T, Leozappa M, Lomso M, et al. Links escherichia coli keratitis treated with ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking: a case report. *Eur J Ophthalmol* 2009;19(2):295-297
- 23 Vinciguerra P, Albe E, Frueh BE, et al. Two year corneal cross-linking results in patients younger than 18 years with documented progressive keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2012;154(3):520-526
- 24 Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, et al. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study. *J Cataract Refract Surg* 2006;32(5):837-845
- 25 Gautam, Jhanji V, Satpathy G, et al. Microsporidial keratitis after collagen cross-linking. *Ocul Immunol Inflamm* 2013;21(6):495-497
- 26 Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, et al. Corneal cross-linking and safety issues. *Open Ophthalmol J* 2011;11(5):14-16
- 27 Spoerl E, Huhle M, Kasper M, et al. Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking. *Ophthalmologe* 1997;94(12):902-906