

核黄素-紫外线 A 照射加速巩膜交联治疗豚鼠实验性近视

徐海铭 刘辉 余洁 贺金晶

310014 杭州, 杭州医学院附属人民医院 浙江省人民医院眼科

通信作者: 刘辉, Email: omegahui@gmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.10.006

【摘要】 **目的** 评估口服核黄素联合脉冲和持续紫外线 A(UVA)照射加速巩膜交联对实验性豚鼠进展性近视的治疗作用以及对巩膜生物力学和组织学改变作用。**方法** 30 只 4 周龄豚鼠按照随机数字表法分为空白对照组、非交联组、传统交联组、脉冲光加速交联组和持续光加速交联组, 每组均为 6 只。3 个组巩膜交联组豚鼠均连续服用核黄素和维生素 C 3 d 后, 进行右眼近视眼建模和 UVA 照射。照射参数分别为传统交联组波长 370 nm, 功率为 0.67 mW/cm², 连续照射 1 h; 脉冲光加速交联组波长 370 nm, 功率为 10 mW/cm², 共照射 8 min, 脉冲模式为 1 s 开/1 s 关; 持续光加速交联组波长 370 nm, 功率为 10 mW/cm², 连续照射 4 min。非交联组仅接受右眼近视眼建模, 但未服用核黄素及维生素 C, 也不接受 UVA 照射; 空白对照组不接受任何处理。分别测量 5 个组基线及建模后的屈光度和眼轴长度。2 周后颈椎脱臼法处死豚鼠, 摘除右眼行巩膜生物力学和组织病理学检查。**结果** 实验 2 周后, 与空白对照组相比较, 非交联组眼轴明显伸长, 近视屈光度明显增加, 巩膜最大载荷及最大应力显著下降, 巩膜胶原纤维粗细不均匀, 部分溶解, 巩膜 Collagen 1A 及 TIMP-2 阳性染色减少, MMP2 阳性染色增加, 提示近视建模成功。传统交联组、脉冲光加速交联组和持续光加速交联组, 交联组豚鼠眼球眼轴长度短于非交联组, 和近视屈光度明显高于非交联组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); 3 个交联组豚鼠眼球最大载荷值及最大应力值均高于非交联组[最大应力: (2.20±0.03)、(2.67±0.05)、(2.41±0.04) Mpa vs. (1.30±0.02) Mpa; 最大载荷: (1.93±0.03)、(2.33±0.28) 和 (1.91±0.03) P vs. (1.54±0.06) P], 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); 巩膜组织病理学检查显示脉冲光加速交联组和持续光加速交联组巩膜胶原纤维粗细均匀, 更接近空白对照组巩膜形态。免疫组织化学染色显示, 与非交联组比较, 3 个组交联组巩膜 Collagen1A 阳性染色均增多, 脉冲光加速交联组和持续光加速交联组 MMP2 阳性染色减少及 TIMP-2 阳性染色增加。**结论** 口服核黄素联合脉冲和持续 UVA 照射加速巩膜交联可以通过增强巩膜生物学强度, 有效地阻止豚鼠实验性近视的进展。

【关键词】 核黄素; 紫外线 A; 巩膜交联; 近视; 豚鼠

基金项目: 浙江省医药卫生科技项目省部共建重点项目 (2018273482); 浙江省医药卫生科技项目 (2018233958); 浙江省中医药科技计划项目 (2016ZA033); 浙江省公益技术应用研究计划实验动物研究项目 (2015C37132)

Pulsed and continuous accelerated scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet A irradiation for the prevention of myopia progression in a guinea pig model Xu Haiming, Liu Hui, Yu Jie, He Jinjing

Department of Ophthalmology, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Zhejiang Provincial People's Hospital

Corresponding author: Liu Hui, Email: omegahui@gmail.com

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of oral administration of riboflavin combined with pulsed and continuous light accelerated scleral cross-linking on the histological and biomechanical properties of sclera in a guinea pig model to control the progression of myopia. **Methods** Thirty 4-week-old guinea pigs were divided into 5 groups, or the control group, non cross-linking group, conventional cross-linking group, pulse light cross-linking group and continuous light cross-linking group with 6 guinea pigs in each group. Three cross-linking groups were administered 0.1% riboflavin solution with vitamin C by gavage from 3 days before modeling to modeling process. The conventional cross-linking group underwent cross-linking with 1 hour of (ultraviolet A (UVA) exposure at 0.67 mW/cm²,

the pulse light cross-linking group received a pulsed-light accelerated crosslinking for 8 minutes (1 second on/1 second off) of UVA exposure at 10 mW/cm^2 , and the continuous light accelerated cross-linking group was crosslinked with continuous-light accelerated crosslinking at 10 mW/cm^2 for 4 minutes. The same procedure was conducted on the non cross-linking group without UVA irradiation and 0.1% riboflavin solution before modeling and modeling process. No any intervene was carried out in the control group. Retinoscopy and the axial length measurement were performed before and after experiment. The animals were euthanized 2 weeks after experiment and then biomechanical and histopathological examinations of scleras were conducted. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** Myopia models were established with an increased axial length and myopic diopter 2 weeks after myopic modeling process. Axial length in the non cross-linking group was longer than that of the control group at 2 weeks, with a significant difference between them ($P < 0.01$). The myopic Diopter in the non cross-linking group was significantly increased in comparison with the control group at 2 weeks ($P < 0.01$). Compared with myopic eyes in the non cross-linking groups, axial length, diopter and strain assessment values were decreased significantly in three scleral cross-linking groups (all at $P < 0.01$). The sclera ultimate load and stress assessment in the conventional cross-linking group, pulse light cross-linking group, continuous light cross-linking group were significantly higher than those in the non-cross-linking group Max stress: $[2.20 \pm 0.03]$, $[2.67 \pm 0.05]$, $[2.41 \pm 0.04]$ Mpa vs. $[1.30 \pm 0.02]$ Mpa; Max load: $[1.92 \pm 0.03]$, $[2.33 \pm 0.28]$, $[1.91 \pm 0.03]$ P vs. $[1.54 \pm 0.06]$ P (all at $P < 0.01$). Collagenous tissue of the scleras in the pulse light cross-linking group and continuous light cross-linking group was similar in appearance to the control group. In addition, MMP2 expression of pulse light cross-linking group and continuous light cross-linking group was significantly increased, and TIMP-2 expression showed a reduce. **Conclusions** Pulsed and continuous light accelerated scleral cross-linking using oral administration of riboflavin and riboflavin UVA irradiation can effectively prevent the myopia development by increasing scleral biomechanical strength in guinea pig.

[Key words] Riboflavin; Ultraviolet A; Scleral cross-linking; Myopia; Guinea

Fund program: Medical scientific Research Foundation of Zhejiang Province of China (2018273482); Medical scientific Research Foundation of Zhejiang Province of China (2018233958); Chinese Medicine Scientific Research Foundation of Zhejiang Province of China (2016ZA033); Experimental Animal Science Project of Science Technology Department of Zhejiang Province of China (2015C37132)

随着全球近视人群数量的上升,近视导致的视觉损害已经成为现代社会的公共健康问题。美国近视发生率超过 30%^[1],中国近视发生率逐年增高,15~25 岁人群近视发生率超过 75%^[2]。近视可并发多种眼部器质性病变,如黄斑病变、孔源性视网膜脱离、青光眼及视网膜萎缩等,严重影响视觉质量。近视的发生与长期近距离用眼和遗传等因素有关,但是确切的发生机制仍未完全阐明。近年来研究认为,巩膜重塑在近视的发展中发挥重要作用,先天及后天因素可导致巩膜代谢异常,在眼压的作用下变薄和扩张,而近视眼的巩膜纤维变性和重塑主要发生在赤道部^[3]。光敏剂核黄素和紫外线 A (ultraviolet A, UVA) 照射可诱导巩膜交联反应,使巩膜硬度增加^[4-5]。局部巩膜浸润核黄素联合巩膜照射诱导 UVA-核黄素巩膜交联反应可增强豚鼠的巩膜机械硬度,从而有效阻止近视进展^[6]。本课题组前期的研究首次用一种无创巩膜交联方法进行相关研究发现口服核黄素联合 UVA 照射可增加金属蛋白酶组织抑制剂 2 (tissue inhibitor of

metalloproteinase 2, TIMP2) 的表达,抑制巩膜中金属溶解蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 表达,增强巩膜硬度,阻止豚鼠近视的进展^[7]。传统的巩膜交联治疗所需的 UVA 照射时间较长^[8],限制了巩膜交联的临床应用,优化的交联方法值得探讨。本研究通过动物实验验证口服核黄素联合 UVA 加速巩膜交联反应,缩短巩膜交联时间探讨核黄素-UVA 加速巩膜交联治疗对近视眼的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 30 只健康清洁级 4 周雌性豚鼠 (由浙江医学科学院动物实验中心提供)。实验动物的饲养和使用遵守国家科学技术部颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 MMP2、TIMP2 (上海睿铂赛公司)。聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethyl methacrylate, PMMA) 镜片 (上海新康隐形眼镜有限公司); 带状检影

镜(苏州医疗器械厂);A型超声(无锡康宁医疗公司);UVA灯(常州长江医学设备公司);INSTRON-5544力学实验机(美国英斯特朗试验设备贸易有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 按照随机数字表法将30只豚鼠随机分为5组,每组6只。空白对照组:不进行任何处理;非交联组:只接受近视建模;传统巩膜交联组:核黄素每餐剂量20 mg,维生素C每餐剂量100 mg,1日3餐,连续服用3 d,建模后行UVA照射,波长为370 nm,功率为0.67 mW/cm²,连续照射1 h;脉冲UVA照射加速巩膜交联组:核黄素每餐剂量20 mg,维生素C每餐剂量100 mg,1日3餐,连续服用3 d,建模后行UVA灯照射,波长370 nm,功率为10 mW/cm²,连续照射8 min,脉冲模式为1 s开/1 s关;持续UVA加速巩膜交联组:核黄素每餐剂量20 mg,维生素C每餐剂量100 mg,1日3餐,连续服用3 d,建模后行UVA照射,波长370 nm,功率为10 mW/cm²,连续照射4 min。

1.2.2 豚鼠近视模型的建立 参考文献[7]的方法建立豚鼠近视模型。豚鼠连续服用或不服用核黄素和维生素C 3 d,将-10 D PMMA 镜片固定于豚鼠右眼连续14 d,去除镜片。

1.2.3 屈光度和眼轴测量 采用带状检影进行屈光度测量。豚鼠结膜囊滴加质量分数1%托吡卡胺滴眼液3次,每次间隔10 min。用带状检影镜在距离眼球0.67 m处以0.5 D的间隔分别行水平及垂直子午线上的带状光检测。采用A型超声成行眼轴测量。豚鼠结膜囊滴加质量分数0.4%盐酸丁氧普鲁卡因液后,测定右眼眼轴长度,以手动模式连续测量10次,取其平均值,精确到0.01 mm。两者测量均于核黄素服用前、光照处理14 d后进行检测。

1.2.4 巩膜生物机械特性检测 每组豚鼠脊椎脱臼法处死后,摘出右侧眼球,去除表面筋膜组织,后极部巩膜剪成规则15 mm×4 mm长方形条带制成巩膜试件。在INSTRON-5544力学实验机上行生物力学实验。拉伸强度试验:载荷幅度为0.005~0.040 N,加载速度为0.5 mm/min,载荷、伸长随时间的变化均由与力学实验机相连的计算机自动记录。拉伸破坏试验:以加载速度1 mm/min逐渐增加应力,直至试件被拉断,并记录此时的极限载荷、极限应力及极限应变。

1.2.5 巩膜常规组织学病理检查 取各实验组眼球组织,置于质量分数10%甲醛中固定48 h,石蜡包埋切片,行苏木精-伊红染色。

1.2.6 免疫组织化学法检测巩膜中TIMP2及MMP2表达 将石蜡切片运用免疫组织化学二步法染色检测

巩膜组织MMP2及TIMP2的表达。将石蜡切片60℃烤片2 h,脱蜡复水,体积分数3% H₂O₂灭火内源性过氧化物酶,滴加封闭血清,每张切片加入1:200的稀释一抗50 μl,4℃过夜孵育,每张切片加入50 μl二抗工作液,室温湿盒孵育10~15 min,DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。细胞质内出现棕黄色染色为阳性。光学显微镜下观察鼻侧巩膜。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件(美国IBM公司)进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经Kolmogorov-Smirnov检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计,各组眼轴长度、屈光度、巩膜生物力学检测结果的豚鼠总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠一般情况

空白对照组豚鼠饮食、饮水、运动及大小便正常;非巩膜交联豚鼠在近视成模后饮食、饮水及大小便正常,但逐渐出现运动减少;传统巩膜交联、脉冲光加速巩膜交联及持续光加速巩膜交联组豚鼠运动接近空白对照组,饮食、饮水及大小便正常。

2.2 建模前后各组豚鼠眼轴长度和屈光度比较

建模前,各组豚鼠基线眼轴长度及屈光度比较差异均无统计学意义(均*P*>0.05)。建模后2周后,与空白对照组比较,非交联组、传统交联组、脉冲光加速交联组及持续光加速交联组眼轴长度和近视屈光度均明显增加,差异均有统计学意义(均*P*<0.05),豚鼠近视眼模型成功建立。

与非交联组比较,3个交联实验组豚鼠眼球眼轴及近视屈光度值的明显降低,差异均有统计学意义(均*P*<0.05)(表1)。

表1 建模前和建模后2周各组豚鼠眼轴及屈光度比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | 建模前 | | 建模后2周 | |
|------------|-----|--------------|------------|-------------------------|--------------------------|
| | | 眼轴长度 (mm) | 屈光度 (D) | 眼轴长度 (mm) | 屈光度 (D) |
| 空白对照组 | 6 | 7.85±0.15 | +3.04±0.04 | 8.02±0.16 | +2.85±0.10 |
| 非交联组 | 6 | 7.95±0.13 | +2.99±0.13 | 10.48±0.15 ^a | -2.95±0.13 ^a |
| 传统交联组 | 6 | 7.90±0.09 | +2.92±0.14 | 8.89±0.06 ^{ab} | -1.87±0.05 ^{ab} |
| 脉冲光加速交联组 | 6 | 8.02±0.07 | +2.86±0.15 | 8.71±0.20 ^{ab} | -1.82±0.82 ^{ab} |
| 持续光加速交联组 | 6 | 7.84±0.07 | +3.00±0.15 | 9.30±0.11 ^{ab} | -2.11±0.47 ^{ab} |
| <i>F</i> 值 | | 0.511 | 0.298 | 40.111 | 676.735 |
| <i>P</i> 值 | | 0.728 | 0.876 | 0.000 | 0.000 |

注:与空白对照组比较,^a*P*<0.05;与非交联组比较,^b*P*<0.05

2.3 各组豚鼠巩膜机械性能相关参数比较

与空白对照组比较,非交联组、传统交联组、脉冲光加速交联组和持续光加速交联组最大载荷和最大应力显著减小,最大应变显著增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。3 个巩膜交联组豚鼠巩膜最大载荷、最大应力值及最大应变值明显低于非交联组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 2)。

表 2 各组豚鼠巩膜生物力学检测结果($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | 最大荷载(P) | 最大应力(Mpa) | 最大应变(%) |
|----------|-----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白对照组 | 6 | 2.55±0.03 | 2.89±0.04 | 36.79±0.55 |
| 非交联组 | 6 | 1.54±0.06 ^a | 1.30±0.02 ^a | 53.67±0.41 ^a |
| 传统交联组 | 6 | 1.93±0.03 ^{ab} | 2.20±0.03 ^{ab} | 43.27±0.47 ^{ab} |
| 脉冲光加速交联组 | 6 | 2.33±0.28 ^{ab} | 2.67±0.05 ^{ab} | 38.69±0.59 ^{ab} |
| 持续光加速交联组 | 6 | 1.91±0.03 ^{ab} | 2.41±0.04 ^{ab} | 41.83±0.40 ^{ab} |
| F 值 | | 118.046 | 257.835 | 178.285 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与非交联组比较,^b $P < 0.05$

2.4 各组豚鼠巩膜组织形态学表现

空白对照组巩膜结构胶原纤维排列整齐,密集,粗细均匀,厚度正常。非交联组巩膜胶原纤维粗细不均匀,有部分溶解,巩膜厚度偏薄。3 个巩膜交联组和空白对照组相比无明显差异。脉冲光加速交联组和持续光加速交联组巩膜胶原纤维粗细均匀,更接近空白对照组的巩膜形态,传统交联组巩膜胶原纤维虽排列整齐,但巩膜胶原纤维排列稀疏。

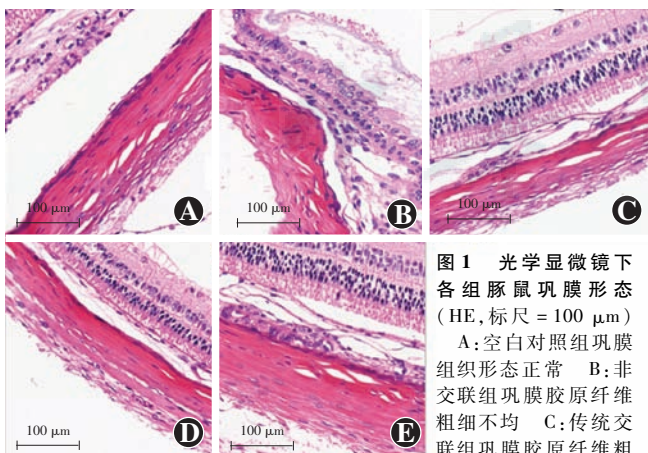


图 1 光学显微镜下各组豚鼠巩膜形态(HE,标尺=100 μm)
A:空白对照组巩膜组织形态正常 B:非交联组巩膜胶原纤维粗细不均 C:传统交联组巩膜胶原纤维粗细均匀 D:脉冲光加速交联组巩膜胶原纤维排列整齐 E:持续光加速交联组巩膜胶原纤维粗细均匀

2.5 各组豚鼠巩膜组织中 TIMP2 和 MMP2 表达

空白对照组巩膜组织中 MMP2 表达阴性,而 TIMP2 表达为强阳性。非交联组与空白对照组相比则

完全相反,巩膜组织中 MMP2 表达强阳性,TIMP2 表达阴性。3 种巩膜交联组中,脉冲光加速交联组和持续光加速交联组巩膜组织中 MMP2 表达均为弱阳性,传统交联组 MMP2 表达呈中度阳性。TIMP2 的表达刚好相反,脉冲光加速交联组和持续光加速交联组的巩膜组织 MMP2 的表达均为中等阳性,传统交联组呈现弱阳性(图 2)。

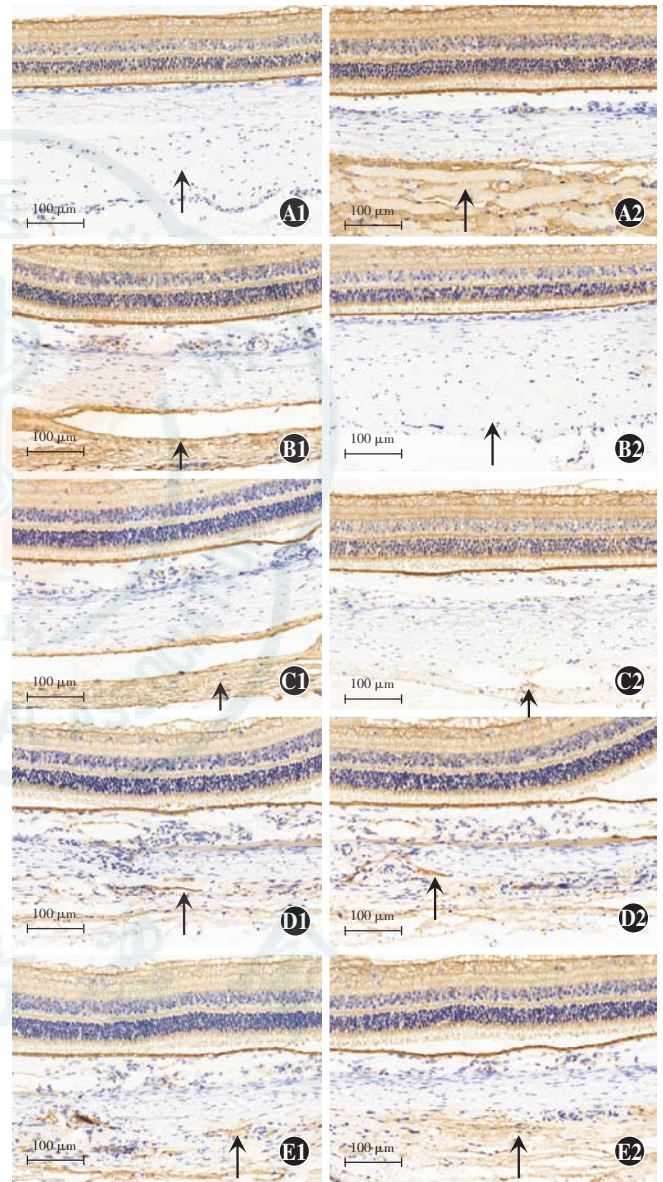


图 2 MMP2 和 TIMP2 在 5 个组豚鼠巩膜组织中的表达(DAB,标尺=100 μm) A1:空白对照组 MMP 染色阴性 A2:空白对照组 TIMP2 染色强阳性 B1:非交联组 MMP 染色强阳性 B2:非交联组 TIMP2 染色阴性 C1:传统交联组 MMP 染色中等阳性 C2:传统交联组 TIMP2 染色弱阳性 D1:脉冲光加速交联组 MMP 染色中等阳性 D2:脉冲光加速交联组 TIMP2 染色中等阳性 E1:持续光加速交联组 MMP 染色中等阳性 E2:持续光加速交联组 TIMP2 染色中等阳性

3 讨论

巩膜由致密纤维胶原组织组成,构成眼球的外壁。

人类的巩膜组织中,胶原纤维占巩膜总重量的 90%,主要由 I 型胶原纤维构成。研究发现,近视常伴发巩膜胶原纤维的减少,胶原纤维直径和密度的改变,巩膜厚度减少,巩膜金属溶解蛋白酶激活^[3,9]。因而,从理论上讲,阻止巩膜的扩张和变薄是阻止近视进展的有效方法之一。近年来,越来越多的研究认为,巩膜交联可以增强动物眼及人眼的巩膜的机械性能。核黄素-UVA 照射交联治疗的原理是光敏剂核黄素在 UVA 的照射下被激活进入三线态而产生活性氧,进而诱导胶原纤维发生交联反应,这种反应可以增加巩膜的机械性能,对抗胶原酶的作用,阻止巩膜胶原纤维的扩张,与圆锥角膜交联的作用相似^[10-12]。

传统核黄素联合 UVA 巩膜交联治疗是每次光照 1 h,耗时较长,限制了该治疗在临床上的应用。Bunsen-Roscoe 定律证明,交联反应的光化学反应取决于组织所吸收的 UVA 总能量,其生物学效应和组织所吸收的总能量成正比^[13-14]。根据此理论,我们可通过增加 UVA 的照射功率和减少曝光时间来加速交联反应。光化学交联反应时,核黄素浸润过的角膜组织发生快速氧气消耗,而当关闭 UVA 后 3~4 min,组织内的氧水平可补充并恢复到初始水平。有氧环境下,交联反应 UVA 照射 10~15 s 后组织基质内的胶原在光化学反应产生的活性氧的作用下激活光氧化反应,这种反应和 II 型光化学反应一致。10~15 s 后,组织内氧损耗,组织内光化学反应转为以 I 型为主,造成严重的视网膜损伤^[15]。故脉冲 UVA 照射理论上可重启 II 型光化学反应,使交联反应中获得更多的活性氧,并使脉络膜、视网膜组织的光损失明显减轻。已有研究认为,胶原交联反应中氧是主要的驱动因素,脉冲光加速以及持续光加速角膜交联反应在治疗圆锥角膜上均安全及有效^[16-18]。与连续光加速交联反应相比,脉冲光加速交联反应可优化交联术中氧浓度的稳定性,从而改善术后功能。我们的研究结果显示,对于近视眼豚鼠模型,口服维生素 C 和核黄素联合 UVA 照射巩膜交联照射可显著改善巩膜的生物学结构及机械性能,减缓眼轴及近视屈光度的增长,从而延缓近视发展,其中口服核黄素联合脉冲或持续 UVA 照射加速巩膜交联组抑制作用较强,所需治疗时间较短,有望取代传统的巩膜交联治疗。

近视发展过程中巩膜发生重塑,伴随 MMPs 和 TIMPs 水平的变化。视觉信号可能通过调节 MMPs 和 TIMPs 来控制巩膜重塑、巩膜生物力学性质、眼轴延长及眼球的屈光状态。目前认为 MMP2 的高表达和 TIMP2 的低表达可以促进近视的发展。Yang 等^[19]报

道在形觉剥夺豚鼠近视眼模型巩膜中 MMP2 表达明显增加,MMP2 的增加往往导致巩膜基质丢失进而影响巩膜生物力学。我们的研究提示,3 个巩膜交联组巩膜内 MMP2 均表达下降,而 TIMP2 则明显上升,提示巩膜交联可以调节巩膜内 MMP2 和 TIMP2 来抑制近视发展。本研究中发现无论是脉冲光加速还是持续光加速巩膜交联,巩膜组织的 MMP2 的表达下降和 TIMP2 的表达上升均传统巩膜交联组更为明显,巩膜胶原形态也更接近正常巩膜胶原,这些结果均提示加速巩膜交联组对巩膜重塑的影响更大,但具体的机制还需进一步研究。

综上所述,对于近视豚鼠模型,口服核黄素联合不同模式的 UVA 照射的巩膜交联反应均可以增强巩膜的机械学性能,减少眼轴及近视屈光度的增长,减少 MMP-2 及增加 TIMP-2 的表达,从而成功地延缓近视进展,其中口服核黄素联合脉冲或持续 UVA 照射加速巩膜交联对近视进展的抑制效果较为明显。我们还需对核黄素-UVA 照射加速巩膜交联治疗近视眼的长期效果及眼部安全性进行进一步研究。

利益声明:本文所有作者无潜在的利益冲突

参考文献

- [1] Vitale S, Ellwein L, Cotch M F, et al. Prevalence of refractive error in the United States, 1999-2004 [J]. Arch Ophthalmol, 2008, 126 (8): 1111-1119.
- [2] Holden B, Sankaridurg P, Smith E, et al. Myopia, an underrated global challenge to vision: where the current data takes us on myopia control [J]. Eye (Lond), 2014, 28 (2): 142-146. DOI: 10.1038/eye.2013.256.
- [3] McBrien NA, Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia [J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(3): 307-338.
- [4] 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 (2): 193-198. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2008.01229.x.
- [5] Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera [J]. J Cataract Refract Surg, 2004, 30 (3): 689-695. DOI: 10.1016/j.jcrs.2003.11.032.
- [6] Liu S, Li S, Wang B, et al. Scleral cross-linking using riboflavin UVA irradiation for the prevention of myopia progression in a guinea pig model: blocked axial extension and altered scleral microstructure [J/OL]. PLoS One, 2016, 11 (11): e0165792 [2016-08-12]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829051. DOI: 10.1371/journal.pone.0165792.
- [7] Li X, Wu M, Zhang L, et al. Riboflavin and ultraviolet A irradiation for the prevention of progressive myopia in a guinea pig model [J]. Exp Eye Res, 2017, 165: 1-6. DOI: 10.1016/j.exer.2017.08.019.
- [8] Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin crosslinking of the cornea [J]. Cornea, 2007, 26 (4): 385-389. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3180334f78.
- [9] Rada J A, Shelton S, Norton TT. The sclera and myopia [J]. Exp Eye Res, 2006, 82 (2): 185-200.
- [10] Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O. Collagen cross-linking: current status and future directions [J/OL]. J Ophthalmol, 2012, 2012: 406850 [2018-08-19]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288005. DOI: 10.1155/2012/406850.
- [11] Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion [J]. Curr Eye Res, 2004, 29 (1): 35-40. DOI: 10.1080/02713680490513182.
- [12] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced

- collagen crosslinking for the treatment of keratoconus [J]. Am J Ophthalmol, 2003, 135(5): 620-627.
- [13] Schumacher S, Oeftiger L, Mrochen M. Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(12): 9048-9052. DOI: 10.1167/iovs.11-7818.
- [14] Brindley GS. The Bunsen-Roscoe law for the human eye at very short durations [J]. J Physiol, 1952, 118(1): 135-139.
- [15] Kamaev P, Friedman MD, Sherr E, et al. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(4): 2360-2367. DOI: 10.1167/iovs.11-9385.
- [16] Mazzotta C, Traversi C, Caragiuli S, et al. Pulsed vs continuous light accelerated corneal collagen crosslinking: *in vivo* qualitative investigation by confocal microscopy and corneal OCT [J]. Eye (Lond), 2014, 28(10): 1179-1183. DOI: 10.1038/eye.2014.163.
- [17] Peyman A, Nouralishahi A, Hafezi F, et al. Stromal demarcation line in pulsed versus continuous light accelerated corneal cross-linking for keratoconus [J]. J Refract Surg, 2016, 32(3): 206-208. DOI: 10.3928/1081597X-20160204-03.
- [18] Zhu Y, Reinach PS, Zhu H, et al. Continuous-light versus pulsed-light accelerated corneal crosslinking with ultraviolet-A and riboflavin [J]. J Cataract Refract Surg, 2018, 44(3): 382-389. DOI: 10.1016/j.jcrs.2017.12.028.
- [19] Yang SR, Ye JJ, Long Q. Expressions of collagen, matrix metalloproteinases-2, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in the posterior sclera of newborn guinea pigs with negative lens-defocused myopia [J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2010, 32(1): 55-59. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.01.014.

(收稿日期: 2018-05-10 修回日期: 2018-09-10)

(本文编辑: 杜娟)

· 临床经验 ·

手术显微镜共轴照明下反向巩膜钉镊点状 顶压技术在周边玻璃体切割术中的应用

陈春丽 季迅达 田恬 赵培泉

257000 东营胜利油田中心医院眼科(陈春丽, 现在天津医科大学眼科医院博士研究生);

200092 上海交通大学医学院附属新华医院眼科(季迅达、田恬、赵培泉)

通信作者: 赵培泉, Email: zhaopeiquan@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.10.007

基金项目: 家族性渗出性玻璃体视网膜病变新致病基因识别及机制研究

视网膜玻璃体切割术常需彻底清除周边玻璃体。术中周边视网膜表面玻璃体皮质残留可能起到纤维增生细胞或者其他病理细胞支架的作用, 从而导致严重的前部增生性玻璃体视网膜病变。前部增生性玻璃体视网膜病变是导致玻璃体视网膜手术失败的主要原因之一。然而, 对于有晶状体眼处理周边部玻璃体仍存在较大的挑战。部分患者为了实施周边玻璃体切割术甚至需要切除透明的晶状体, 使术眼丧失了调节能力, 严重影响患者视觉质量。目前应用可弯曲玻璃体切割头合并广角视野系统以及应用内窥镜可提高周边玻璃体切割术的安全性, 但是周边玻璃体切割术对于手术医师仍然是一个挑战^[1]。为了增加周边玻璃体和视网膜的可视性, 传统的巩膜顶压术(传统工具包括无菌棉签、斜视钩、顶压器, 反向巩膜钉镊)是提高周边玻璃体切割术安全性的方法^[2]。大部分玻璃体视网膜手术医师在行周边玻璃体切割术时需要助手协助顶压巩膜, 使得该操作过程繁琐并增加了术中医源性裂孔发生率。因此, 本研究中通过手术显微镜共轴照明系统, 利用巩膜反向钉镊(美国 STORZ 公司)顶端点状顶压巩膜来协助切除周边玻璃体, 可操作性强, 安全性高。

1 资料和方法

1.1 一般资料 采用回顾性研究设计, 纳入 2008—2017 年在上海交通大学附属新华医院行玻璃体视网膜手术的视网膜脱离患者 10 208 例, 年龄为 40 周~78 岁; 其中成人患者 6 431 例, 占 63%, 儿童患者 3 777 例, 占 37%; 成人患者中男 4 531 例, 女 1 900 例; 婴幼儿及儿童中男 2 317 例, 女 1 460 例。其中, 孔源性视网膜脱离占 16.6%、黄斑相关疾病占 11.1%、硅油眼占

11%、增生性糖尿病视网膜病变占 9.2%、复发性视网膜脱离占 7.8%。

1.2 方法 所有患者使用爱尔康玻璃体切割系统行(Alcon Laboratories, Fort Worth, TX)标准的巩膜三切口睫状体平坦部玻璃体切割术。无晶状体眼或者人工晶状体眼患者巩膜切口穿刺部位距离角巩膜缘 3.5 mm; 有晶状体眼患者巩膜切口穿刺部位距离角巩膜缘 4.0 mm。多次手术患者需术前行 UBM 检查, 以排除因多次玻璃体切除术后视网膜增生前移, 穿刺切口时误伤周边视网膜。灌注管置于颞下象限, 上方的 2 个巩膜切口交替使用。在广角视野系统下完成中央玻璃体及后极部玻璃体皮质的清除。行周边玻璃体切割术时, 关闭巩膜上方的一个切口, 且关闭眼内照明系统, 利用巩膜反向钉镊的顶端顶压位于玻璃体基底部的巩膜。通过上方的另外一个巩膜切口, 启动玻切后缓慢增加玻璃体切割负压, 位于对侧巩膜被顶压到眼球中央。周边视网膜和玻璃体被顶压到晶状体后囊后周边部, 通过手术显微镜共轴照明系统可清楚看到。对于有晶状体眼, 可先用 15° 穿刺刀行前房穿刺放液, 玻璃体切割头可以清除周边玻璃体而不易损坏到晶状体后囊, 对于无晶状体眼顶压下可以清晰的看到睫状突形态。Alcon constellation 与 Alcon ccurus 转速分别为 5 000 c/min 和 2 500 c/min。600/300 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 负压的参数设置下, 通过巩膜切口可以完全清除对侧的周边部玻璃体以及巩膜三切口附近的玻璃体皮质。清除周边部玻璃体时, 调整患者头位可获得更好的视野, 从而提高周边玻璃体切割术的安全性。当行上方周边部玻璃体切割术时, 嘱患者轻微下颌上抬。行下方周边部玻璃体切