

角膜基质透镜植入联合角膜胶原交联术后角膜生物力学改变的体外研究

申笛 张娜 孙西宇 韦伟

西安市第一医院 西安市眼科医院 陕西省眼科研究所, 西安 710002

韦伟为西安交通大学基础医学院在职博士研究生, 西安 710018

通信作者: 韦伟, Email: 32691402@qq.com

【摘要】 目的 研究离体猪眼行异体角膜基质透镜植入 (SLAK) 联合角膜胶原交联术 (CXL) 后角膜生物力学的变化。方法 获取 5~7 月龄杜洛克猪死亡后 3 h 内的猪眼 139 只。选取其中 24 只猪角膜, 采用随机数字表法分为正常对照组、SLAK 组、CXL 组、SLAK-CXL 组, 采用单轴拉伸试验检测各组抗拉强度和弹性模量; 选取 100 只离体猪角膜, 分为 SLAK 组、SLAK 联合核黄素浸泡 (RNF) 组 (SLAK-RNF 组)、分别交联供体受体后 SLAK 组 (CXL-CXL-SLAK 组)、SLAK 联合单纯紫外线 A (UVA) 照射组 (SLAK-UVA 组)、SLAK-CXL 组, 采用搭接剪切试验检测各组最大力搭接剪切强度; 选取 15 只离体猪角膜, 分为 SLAK 组、SLAK-RNF 组、SLAK-CXL 组, 采用苏木精-伊红染色和 Masson 染色观察各组受体基质角膜及供体基质透镜的超微结构; 采用裂隙灯显微镜和角膜地形图仪 Sirius 观察正常对照组、SLAK 组、CXL 组、SLAK-CXL 组受试眼的临床体征。结果 单轴拉伸试验结果显示, 正常对照组、SLAK 组、CXL 组和 SLAK-CXL 组在 50% 应变下的抗拉强度分别为 (0.60±0.15)、(0.45±0.19)、(1.56±0.27)、(1.22±0.24) MPa, 弹性模量分别为 (2.01±0.69)、(1.69±0.52)、(4.16±1.28)、(3.82±0.68) MPa, 总体比较差异均有统计学意义 ($F=29.39, 11.01$, 均 $P<0.001$), 其中 CXL 组和 SLAK-CXL 组抗拉强度和弹性模量均明显高于正常对照组和 SLAK 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.001$)。搭接剪切试验结果显示, SLAK 组、SLAK-RNF 组、CXL-CXL-SLAK 组、SLAK-UVA 组、SLAK-CXL 组搭接剪切强度总体比较差异有统计学意义 ($F=18.45, P<0.001$), 其中 SLAK-RNF 组、CXL-CXL-SLAK 组搭接剪切强度明显低于 SLAK 组, SLAK-UVA 组明显高于 SLAK 组, SLAK-CXL 组明显高于 CXL-CXL-SLAK 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。苏木精-伊红染色和 Masson 染色结果显示, 各组胶原纤维排列有序。SLAK-CXL 组前部基质和基质透镜胶原纤维直径和胶原纤维化面积占比均大于 SLAK 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。裂隙灯显微镜和角膜地形图结果显示, SLAK 组和 SLAK-CXL 组植入的透镜与受体吻合, 透镜边界可见, 透明度降低, 其周围基质明显水肿。结论 SLAK-CXL 可在增加角膜厚度的同时增加角膜生物力学强度, 这可能是交联使基质纤维直径及面积增加的结果。但术后角膜有轻微水肿, 交联不能使透镜与受体角膜之间即刻结合。

【关键词】 角膜胶原交联; 角膜生物力学; 角膜基质透镜植入联合角膜胶原交联术; 基质透镜

基金项目: 陕西省重点研发计划 (2025SF-YBXM-085); 西安市卫生健康委员会青年培育项目 (2026qn13)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20260121-00038

In vitro study on corneal biomechanical changes after corneal stromal lenticule implantation combined with corneal collagen cross-linking

Shen Di, Zhang Na, Sun Xiyu, Wei Wei

Xi'an First Hospital, Xi'an Eye Hospital, Shaanxi Institute of Ophthalmology, Xi'an 710002, China

Wei Wei is an on-the-job doctoral student at the School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710018, China

Corresponding author: Wei Wei, Email: 32691402@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes in corneal biomechanics of isolated porcine eyes after stromal lenticule addition keratoplasty (SLAK) combined with corneal collagen cross-linking (CXL). **Methods** A

total of 139 porcine eyes from 5- to 7-month-old Duroc pigs were collected within 3 hours after death. Twenty-four eligible eyes were selected and divided into a normal control group, SLAK group, CXL group and SLAK-CXL group, and the tensile strength and elastic modulus of each group were detected via uniaxial tensile test. One hundred eligible eyes were assigned to the SLAK group, SLAK combined with riboflavin soaking (RNF) group (SLAK-RNF group), SLAK after cross-linking of both donor and recipient group (CXL-CXL-SLAK group), SLAK combined with simple ultraviolet A (UVA) irradiation group (SLAK-UVA group), and SLAK-CXL group, and the maximum lap shear strength of each group was measured via the lap shear test. The remaining 15 eligible eyes were divided into SLAK group, SLAK-RNF group and SLAK-CXL group, and the ultrastructure of recipient corneal stroma and donor stromal lens in each group was observed by hematoxylin-eosin staining and Masson staining. Slit-lamp microscope and Sirius corneal topographer were used to observe clinical features of the tested eyes in the normal control group, SLAK group, CXL group and SLAK-CXL group. All experiments were performed in compliance with the guidelines specified in the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The experimental protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of Xi'an Jiaotong University Health Science Center (No. XJTUAE2024-2042).

Results The tensile strength of the normal control group, SLAK group, CXL group and SLAK-CXL group at 50% strain was (0.60 ± 0.15) , (0.45 ± 0.19) , (1.56 ± 0.27) and (1.22 ± 0.24) MPa, respectively, and the elastic modulus was (2.01 ± 0.69) , (1.69 ± 0.52) , (4.16 ± 1.28) and (3.82 ± 0.68) MPa, respectively, showing statistically significant differences ($F = 29.39, 11.01$; both $P < 0.001$). The tensile strength and elastic modulus of the CXL group and SLAK-CXL group were significantly higher than those of the normal control group (all $P < 0.001$). There was a significant overall difference in lap shear strength among the SLAK group, SLAK-RNF group, CXL-CXL-SLAK group, SLAK-UVA group and SLAK-CXL group ($F = 18.45, P < 0.001$). The lap shear strength of the SLAK-RNF group and CXL-CXL-SLAK group was significantly lower than that of the SLAK group, and the lap shear strength of the SLAK-UVA group was significantly higher than that of the SLAK group, and the lap shear strength of the SLAK-CXL group was significantly higher than that of the CXL-CXL-SLAK group (all $P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining and Masson staining results showed that the collagen fibers in each group were arranged orderly. The diameter of collagen fibers and the proportion of collagen fibrosis area in the anterior corneal stroma and stromal lenticule in the SLAK-CXL group were greater than those in the SLAK group, and the differences were statistically significant (both $P < 0.05$). Slit lamp microscope and corneal topography results showed that the implanted lenticule in the SLAK group and SLAK-CXL group was anastomosed with the recipient, with a visible lens boundary, reduced transparency, and obvious edema in the surrounding stroma.

Conclusions SLAK-CXL can increase corneal thickness and corneal biomechanical strength, which may result from cross-linking increasing the diameter and area of matrix fibers. However, slight corneal edema may occur after surgery, and cross-linking can not achieve immediate bonding between the lenticule and the recipient cornea.

[Key words] Corneal collagen cross-linking; Corneal biomechanics; Stromal lenticule addition keratoplasty combined with corneal collagen cross-linking; Stromal lenticules

Fund program: Key Research and Development Program of Shaanxi Provincial Science and Technology Plan Project (2025SF-YBXM-085); Youth Cultivation Project of Xi'an Health Commission (2026qn13)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20260121-00038

角膜基质透镜植入术 (stromal lenticule addition keratoplasty, SLAK) 是近年来快速发展的一种角膜移植手术, 其以飞秒激光近视手术中获得的角膜基质透镜为供体, 植入远视、散光或角膜扩张性疾病 (包括圆锥角膜) 患者的角膜基质囊袋中, 以改善患者视力、角膜曲率与厚度^[1-5]。考虑到角膜移植的需求巨大, 但供体数量仍有限, 而角膜屈光性透镜取出术获取的角膜基质透镜不仅数量充足, 而且能够在体内保留其结构特性和功能^[6], 其透光率、生物力学性能和光学反

射特性均优于人工角膜等其他角膜移植物产品^[7-8]。

然而, 对于诸如圆锥角膜这种进行性、扩张性角膜疾病, 其发病机制包括角膜进行性变薄及角膜生物力学功能减退等^[9-12]。从理论上讲, 植入透镜能增加角膜厚度, 但无法改善角膜生物力学参数, 甚至可能会进一步使其恶化^[13]。角膜胶原交联术 (corneal collagen cross-linking, CXL) 是通过紫外线 (ultraviolet A, UVA) 照射使核黄素光敏化, 进而诱导角膜基质胶原纤维交联的过程^[14-15]。该过程可改变角膜生物力学特性, 导

致角膜硬度增加^[16-18]。近年来, CXL 已成为公认的抑制角膜生物力学下降的治疗方法^[19-20], 但其开展受角膜厚度的限制^[11]。

基于以上认识, 本研究假设 SLAK 联合 CXL (SLAK-CXL) 在增加角膜厚度的同时可以提升角膜生物力学强度, 从而达到稳定圆锥角膜等扩张性角膜疾病进展的效果。此外, 该术式可减少角膜移植后的护理问题和高额医疗费用^[21]。近年来, 本课题组及国内外相关研究团队的临床病例研究发现, SLAK-CXL 可有效阻止角膜扩张, 改善视力^[22], 成为治疗角膜扩张性疾病的新策略。关于 SLAK-CXL 术后角膜结构的具体变化, 以及供体透镜经交联处理后是否可以与受体基质有效黏附, 这些问题目前尚未明确。因此, 本研究旨在通过体外猪角膜 SLAK-CXL 模型, 探索术后角膜生物力学的变化及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪角膜来源 5~7 月龄杜洛克猪死亡后 3 h 内的猪眼 139 只, 购自西安方欣食品有限公司。所有实验均按照视觉和眼科研究协会关于在眼科和视觉研究中使用动物的声明指南进行。实验方案经西安交通大学医学部生物医学伦理委员会批准 (批文号: XJTUAE2024-2042)。

1.1.2 主要试剂及仪器 0.1% 核黄素 (VibeX Xtra, 美国 Avedro 公司); 固定液 (G2350)、苏木精-伊红染色试剂 (G1120)、Masson 染色试剂 (G1340, 北京索莱宝科技有限公司)。超声波测厚仪 (U930S, 重庆里博仪器有限公司); 数显游标卡尺 (110-203, 桂林广陆数字测控有限公司); 万能拉力试验机 (CMT1103, 广东三思科技有限公司); 数字病理系统 (3D HISTECH, 匈牙利 Panoramic MIDI 公司); 裂隙灯显微镜 (SLM-6E, 重庆康华瑞明科技有限公司); 角膜地形图仪 Sirius (意大利 CSO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 手术方法 (1) SLAK 囊袋制备及透镜制作均由同一位熟练角膜移植术的眼科医师于手术显微镜下完成。以视轴为中心, 用 5.5 mm 环形角膜标记器轻压角膜, 形成压痕, 标记基质囊

袋分离边界, 同时在角膜 12 点位用无菌记号笔描记宽度为 3 mm 的侧切切口轮廓。预先用深度规校准手动板层刀头, 使其暴露长度为 150 μm ; 取 15° 角膜侧切刀, 对准角膜 12 点位的预标记切口位置, 使刀头与角膜表面呈 45° 角斜行刺入, 严格控制进刀深度至角膜基质层 150 μm 平面, 制作长度为 3 mm 的斜行自闭性切口, 避免切穿浅层上皮或因进刀过深损伤深层基质。随后将宽度为 3 mm 的钝头角膜基质隧道分离刀从切口伸入, 沿 150 μm 基质平面, 平行于角膜表面向四周钝性潜行分离, 直至完全覆盖 5.5 mm 标记边界, 操作全程需动作轻柔, 若遇阻力应及时调整进刀角度, 避免穿破囊袋前后壁; 分离完成后用平衡盐溶液 (balanced salt solution, BSS) 冲洗囊袋, 清除残留基质碎屑。将供体角膜片固定于角膜剖切枕, 上皮面朝上, 用 5 mm 环形角膜标记器标记中央剖切范围, 用深度规校准手动板层刀, 设定剖切深度为 (300±50) μm 后, 沿标记边缘, 平行于角膜表面匀速进行板层剖切, 切取直径 5 mm 的圆形基质透镜。用超声波测厚仪测量透镜中央及周边 4 个位点的厚度, 确认厚度误差在 ±50 μm 范围内, 不符合要求则重新剖切; 合格的透镜置于 BSS 中暂存, 明确标记正反面, 避免植入时倒置。(2) CXL 0.1% 核黄素 VibeX Xtra 采用囊袋内给药方式, 分别浸泡角膜基质透镜与受体角膜 10 min, 将角膜基质透镜植入基质囊袋后, 采用波长 370 nm, 照射强度 30 mW/cm² 的 UVA 照射 20 min, 总能量 36 J/cm² (图 1)。

1.2.2 力学性能检测

1.2.2.1 单轴拉伸试验 检测各组抗拉强度和弹性模量 取 24 只离体猪角膜, 采用随机数字表法分为正常对照组、SLAK 组、CXL 组和 SLAK-CXL 组, 每组 6 只,

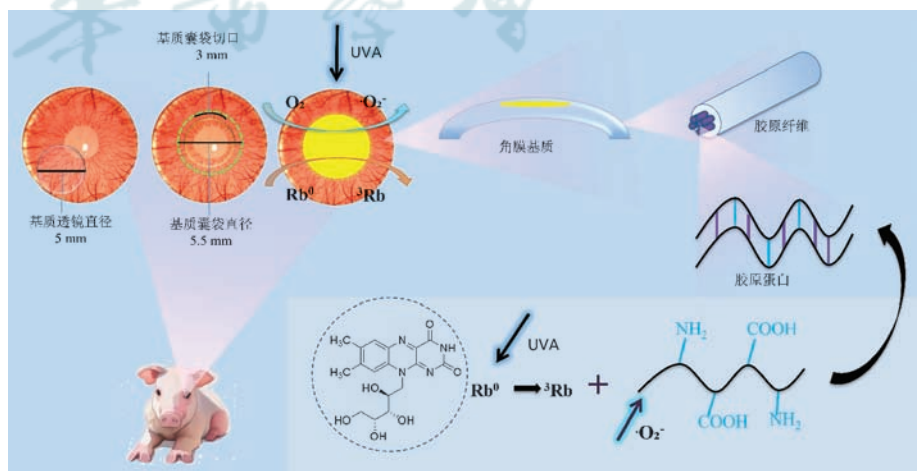


图 1 SLAK-CXL 手术示意图及原理 SLAK: 角膜基质透镜植入术; CXL: 角膜胶原交联术; UVA: 紫外线 A

Figure 1 Schematic illustration and mechanism of SLAK surgery SLAK: stromal lenticule addition keratoplasty; CXL: corneal collagen cross-linking; UVA: ultraviolet A

其中正常对照组不接受任何手术干预;SLAK 组仅实施基质囊袋制备+异体基质透镜植入;CXL 组仅实施标准上皮保留型 CXL;SLAK-CXL 组实施 SLAK 联合 CXL 手术。(1)力学试件制备 所有组干预完成后统一计时,全程 20 min 浸润在 BSS 中操作;沿角膜长轴裁剪为宽度 10 mm、长度约 20 mm 的条状试件,确保试件中央完全覆盖透镜移植区;用数显游标卡尺测量试件中央宽度(记为横截面长),超声波测厚仪测量试件中央厚度(记为横截面宽),计算原始横截面积,原始横截面积=横截面长×横截面宽,试件制备全程避免脱水、机械牵拉损伤。(2)单轴拉伸测试 将条状试件两端夹持于万能拉力试验机夹具,夹持端垫湿滤纸避免滑脱,预加载应力设为 0.01 N 以消除试件松弛。首先以 1 mm/min 速度完成 3 次 0~10%应变的预调循环,消除角膜黏弹性滞后效应;预调结束后以 10 mm/min 恒定位移速度匀速拉伸至 50%应变水平,试验机自动记录全程力-位移曲线,测试过程中持续滴加 BSS 保持试件湿润,剔除滑脱、断裂于夹持区的无效样本,补测后保证每组有效样本量为 6(图 2)。(3)力学参数计算 基于采集的力-位移数据计算核心力学指标。50%应变抗拉强度=试件达 50%应变时的线应力/试件原始横截面积;弹性模量=试件达 50%应变时的线应力/50%应变。

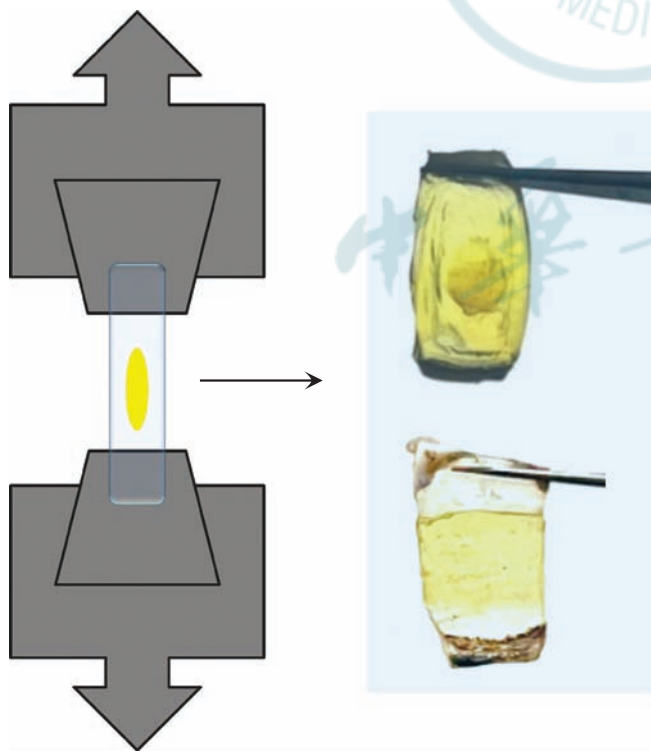


图 2 单轴拉伸试验及搭接剪切试验样品的准备和操作示意图
Figure 2 Schematic illustration of sample preparation and operation procedures for uniaxial tensile test and lap shear test

1.2.2.2 搭接剪切试验检测各组最大力搭接剪切强度 取 100 只离体猪角膜,采用随机数字表法分为 SLAK 组、SLAK 联合核黄素浸泡(riboflavin soaking, RNF)组(SLAK-RNF 组)、SLAK-UVA 组、CXL-CXL-SLAK 组和 SLAK-CXL 组,每组 20 只,其中 SLAK 组仅完成基质囊袋制备+透镜植入;SLAK-RNF 组完成 SLAK 操作,仅予囊袋+透镜 RNF 10 min;SLAK-UVA 组完成 SLAK 操作,仅予 UVA 照射 20 min;CXL-CXL-SLAK 组为供体透镜、受体囊袋分别单独完成 RNF+UVA 照射后,再植入透镜;SLAK-CXL 组实施 SLAK 联合 CXL 手术。(1)试件制备 所有组干预完成后统一静置 20 min,全程浸润在 BSS 中操作,修除角膜周边多余组织,精确裁剪透镜与受体基质的重叠粘合区域为统一的 5 mm×10 mm 矩形,保证各组粘接面积完全一致,操作过程避免牵拉、挤压粘合界面,制备完成后立即送检,防止试件脱水。(2)搭接剪切试验 用无齿镊夹持试件边缘,将试件两端分别固定于万能拉力机夹具,一端夹受体基质层游离端,另一端夹供体透镜游离端,保证拉力方向与粘合面完全平行,夹持端垫湿滤纸避免滑脱,预加载 0.01 N 绷直试件消除松弛;首先以 1 mm/min 速度完成 3 次 0~10%应变的预调循环,消除角膜黏弹性滞后效应,随后以 10 mm/min 恒定位移速度匀速拉伸,直至透镜与受体基质完全剥离,测试过程中持续滴加 BSS 保持试件湿润;若出现试件滑脱、撕裂部位不在粘合界面的情况则判定为无效样本,予以补测,保证每组有效样本量为 20(图 2)。(3)参数计算 基于拉力机采集的力-位移曲线提取最大剥离力,计算核心指标,最大力搭接剪切强度(MPa)=最大剥离力(N)/预设统一粘接面积,其直接反映透镜与受体角膜基质的界面粘接强度。

1.2.3 组织学染色观察各组受体基质角膜及供体基质透镜的超微结构 取 15 只离体猪角膜,采用随机数字表法分为 SLAK 组、SLAK-RNF 组、SLAK-CXL 组,每组 5 只。所有组干预完成后立即取材,沿角巩膜缘剪取中央术区 10 mm 范围的角膜组织,去除虹膜、内皮等多余组织,立即投入固定液(甲醛:冰醋酸:80%乙醇体积比=1:1:8)中,4℃固定 24 h;后续按标准流程完成梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸蜡包埋,取角膜中央术区矢状面连续切片,切片厚度为 3 μm。所有切片统一脱蜡至水化后分别进行苏木精-伊红染色和 Masson 染色;苏木精-伊红染色常规流程染细胞核和细胞质,用于观察角膜全层结构、细胞分布及胶原纤维整体排布;Masson 染色按试剂盒标准流程操作,胶原纤维特异性呈蓝染,用于区分胶原与其他组织成分,

清晰显示胶原结构特征。采用 3D HISTECH Panoramic MIDI 数字病理系统对所有切片行全景扫描,统一扫描参数,分别采集受体基质层、供体透镜层、受体-供体交界面 3 个区域的 200、400 倍放大图像。采用 ImageJ 软件进行盲法定量分析:(1)胶原纤维直径 每张切片随机选取 10 个无褶皱高倍视野,每视野随机测量 50 根胶原纤维的横截面直径,取均值为该样本的纤维直径;(2)纤维化面积占比 对 Masson 染色图像进行阈值分割,计算蓝染胶原区域占总视野面积的比例,反映胶原增生程度;同时定性评价胶原纤维排列有序性、受体-供体界面融合情况。

1.2.4 临床评估 采用裂隙灯显微镜和角膜地形图仪 Sirius 断层成像观察正常对照组、SLAK 组、CXL 组和 SLAK-CXL 组透镜边界及在位情况,测量层间间隙宽度;检测全层角膜厚度、受体-透镜复合层厚度较基线的变化值,客观量化水肿程度;记录角膜前表面曲率、散光值变化,间接反映基质水肿、透镜对位对角膜规则性的影响。

1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 8.2 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组抗拉强度、弹性模量、搭接剪切强度总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验;各组前部基质和基质透镜胶原纤维直径、纤维化面积占比总体比较采用两因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验和 Sidak 多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组抗拉强度、弹性模量和最大力搭接剪切强度比较

单轴拉伸试验结果显示,正常对照组、SLAK 组、CXL 组和 SLAK-CXL 组在 50%应变下的抗拉强度分别为 (0.60 ± 0.15) 、 (0.45 ± 0.19) 、 (1.56 ± 0.27) 、 (1.22 ± 0.24) MPa,弹性模量分别为 (2.01 ± 0.69) 、 (1.69 ± 0.52) 、 (4.16 ± 1.28) 、 (3.82 ± 0.68) MPa,总体比较差异均有统计学意义 ($F = 29.39, 11.01$, 均 $P < 0.001$),其中 CXL 组和 SLAK-CXL 组抗拉强度和弹性模量均明显高于正常对照组和 SLAK 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$) (图 3)。各组应力-应变曲线见图 4。

搭接剪切试验结果显示,SLAK 组、SLAK-RNF 组、CXL-CXL-SLAK 组、SLAK-UVA 组、SLAK-CXL 组搭接剪切强度分别为 (0.181 ± 0.103) 、 (0.082 ± 0.048) 、 (0.090 ± 0.049) 、 (0.306 ± 0.118) 、 $(0.220 \pm$

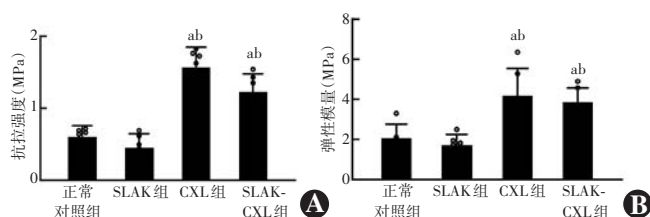


图 3 各组抗拉强度和弹性模量比较 $F = 29.39, 11.01$, 均 $P < 0.001$ 。与正常对照组比较, $^a P < 0.001$; 与 SLAK 组比较, $^b P < 0.001$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n = 6$) A: 抗拉强度 B: 弹性模量 SLAK: 角膜基质透镜植入术; CXL: 角膜胶原交联术

Figure 3 Comparison of tensile strength and elastic modulus among each group $F = 29.39, 11.01$, both $P < 0.001$. Compared with the normal control group, $^a P < 0.001$; compared with the SLAK group, $^b P < 0.001$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 6$) A: Tensile strength B: Elastic modulus SLAK: stromal lenticule addition keratoplasty; CXL: corneal collagen cross-linking

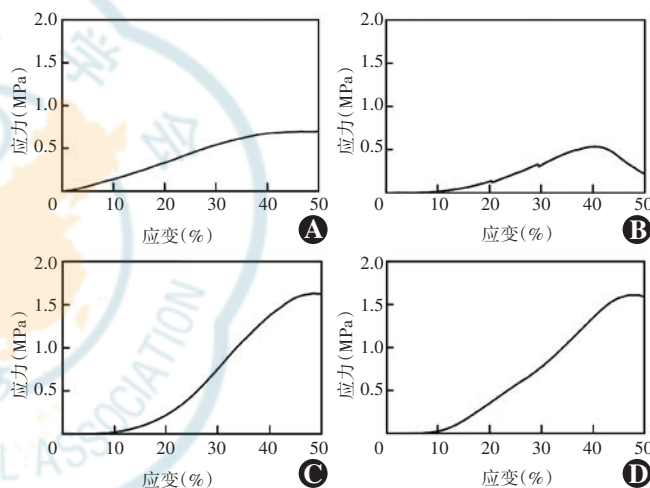


图 4 各组应力-应变曲线 A: 正常对照组 B: SLAK 组 C: CXL 组 D: SLAK-CXL 组 SLAK: 角膜基质透镜植入术; CXL: 角膜胶原交联术

Figure 4 Stress-strain curves of different groups A: Normal control group B: SLAK group C: CXL group D: SLAK-CXL group SLAK: stromal lenticule addition keratoplasty; CXL: corneal collagen cross-linking

0.140) MPa, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 18.45$, $P < 0.001$), 其中 SLAK-RNF 组和 CXL-CXL-SLAK 组搭接剪切强度明显低于 SLAK 组, SLAK-UVA 组明显高于 SLAK 组, SLAK-CXL 组明显高于 CXL-CXL-SLAK 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图 5)。

2.2 各组受体基质角膜及供体基质透镜的超微结构比较

苏木精-伊红染色和 Masson 染色结果显示, 各组胶原纤维排列有序。SLAK 组、SLAK-RNF 组和 SLAK-CXL 组前部基质胶原纤维直径分别为 (22.60 ± 2.70) 、 (22.00 ± 2.24) 、 (33.00 ± 6.16) nm, 基质透镜纤维直径分别为 (25.40 ± 2.19) 、 (25.40 ± 3.51) 、 (36.00 ± 3.67) nm, 各组胶原纤维直径总体比较差异有统计学

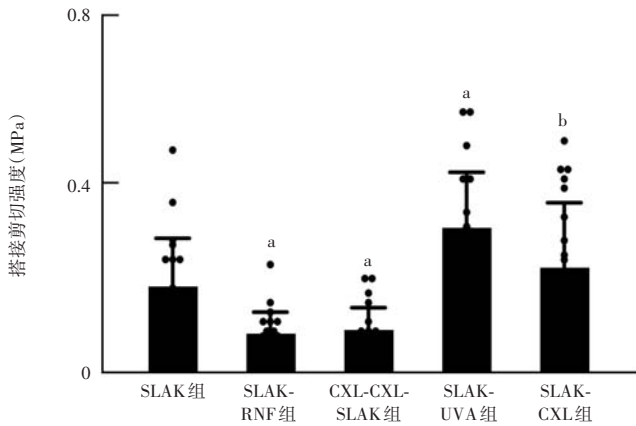


图5 各组搭接剪切强度比较 $F = 18.45, P < 0.001$ 。与 SLAK 组比较, $^a P < 0.05$; 与 CXL-CXL-SLAK 组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n = 20$) SLAK: 角膜基质透镜植入术; CXL: 角膜胶原交联术; RNF: 核黄素浸泡; UVA: 紫外线 A

Figure 5 Comparison of lap shear strength among different groups $F = 18.45, P < 0.001$. Compared with the SLAK group, $^a P < 0.05$; compared with the CXL-CXL-SLAK group, $^b P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 20$) SLAK: stromal lenticule addition keratoplasty; CXL: corneal collagen cross-linking; RNF: riboflavin soaking; UVA: ultraviolet A

意义 ($F_{\text{组别}} = 28.06, P < 0.001$), 其中 SLAK-CXL 组前部基质和基质透镜胶原纤维直径均大于 SLAK 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。不同部位胶原纤维直径总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{部位}} = 5.23, P = 0.03$)。SLAK 组、SLAK-RNF 组和 SLAK-CXL 组前部基质胶原纤维化面积占比分别为 (34.02 ± 5.17)%、(43.96 ± 7.39)%、(63.32 ± 10.02)%, 基质透镜胶原纤维化面积占比分别为 (38.87 ± 5.83)%、(47.14 ± 9.17)%、(58.13 ± 11.38)%, 各组胶原纤维化面积占比总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 21.04, P < 0.001$), 其中 SLAK-CXL 组前部基质和基质透镜胶原纤维化面积占比均大于 SLAK 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。不同部位胶原纤维化面积占比总体比较差异无统计学意义 ($F_{\text{部位}} = 0.09, P = 0.76$) (图 6)。

2.3 各组眼前节结构和角膜地形图比较

裂隙灯显微镜观察结果显示, 正常对照组角膜全层透明、形态规则, 无水肿、混浊, 层间无异常间隙; CXL 组无透镜结构, 仅角膜基质浅层可见轻微雾状水

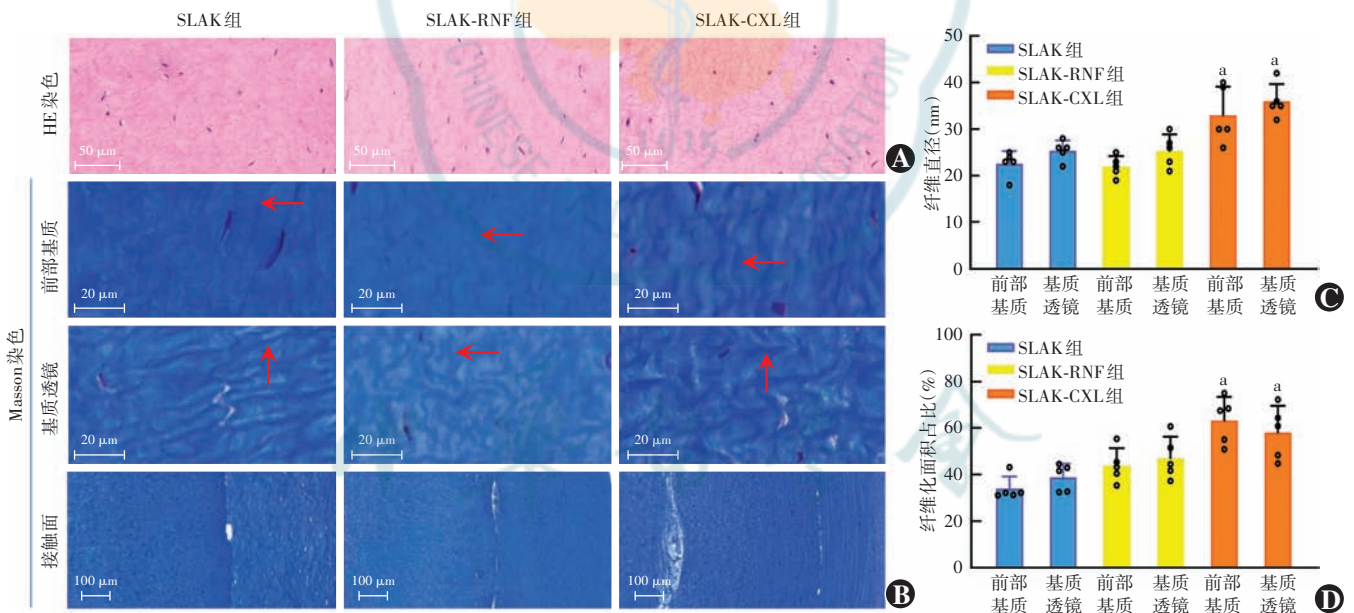


图6 各组受体基质角膜及供体基质透镜的超微结构比较 A: 各组苏木精-伊红 (HE) 染色图 ($\times 200$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) B: 各组 Masson 染色图 前部基质和基质透镜 $\times 500$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$; 供体受体接触面 $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$; 箭头所示为胶原纤维 C: 各组不同部位胶原纤维直径比较 $F_{\text{组别}} = 28.06, P < 0.001; F_{\text{部位}} = 5.23, P < 0.001; F_{\text{交互作用}} = 0.02, P = 0.98$ 。与 SLAK 组比较, $^a P < 0.05$ (两因素方差分析, Sidak 多重比较检验; $n = 5$) D: 各组不同部位胶原纤维化面积占比比较 $F_{\text{组别}} = 21.04, P < 0.001; F_{\text{部位}} = 0.09, P = 0.76; F_{\text{交互作用}} = 1.01, P = 0.38$ 。与 SLAK 组比较, $^a P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验; $n = 5$) SLAK: 角膜基质透镜植入术; CXL: 角膜胶原交联术; RNF: 核黄素浸泡

Figure 6 Comparison of ultrastructure between recipient stromal cornea and donor stromal lens in each group A: Hematoxylin-eosin (HE) staining images of each group ($\times 200$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) B: Masson staining images of each group The the anterior corneal stroma and stromal lenticule $\times 500$, scale bar = $20 \mu\text{m}$; The the donor-recipient interface $\times 100$, scale bar = $100 \mu\text{m}$. Arrows indicated collagen fibers C: Comparison of collagen fiber diameter at different sites in each group $F_{\text{group}} = 28.06, P < 0.001; F_{\text{site}} = 5.23, P < 0.001; F_{\text{interaction}} = 0.02, P = 0.98$. Compared with the SLAK group, $^a P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Sidak multiple comparison test; $n = 5$) D: Comparison of the proportion of collagen fibrosis area at different sites in each group $F_{\text{group}} = 21.04, P < 0.001; F_{\text{site}} = 0.09, P = 0.76; F_{\text{interaction}} = 1.01, P = 0.38$. Compared with the SLAK group, $^a P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test; $n = 5$) SLAK: stromal lenticule addition keratoplasty; CXL: corneal collagen cross-linking; RNF: riboflavin soaking

肿,无深层基质水肿表现;SLAK 组和 SLAK-CXL 组植入的供体透镜与受体基质囊袋对位吻合、贴合良好,透镜边界清晰可辨,透明度较正常对照组角膜下降,透镜周围基质可见明显水肿(图 7)。角膜地形图结果显示,正常对照组角膜全层信号均匀,结构规则无异常;SLAK 组浅基质层可见边界清晰的高反射透镜条带,透镜在位贴合,全层角膜增厚,提示基质水肿、透镜透明度下降;CXL 组浅基质轻度信号升高、厚度略增加;SLAK-CXL 组浅基质层高反射透镜清晰在位,全层角膜更明显增厚(图 8)。

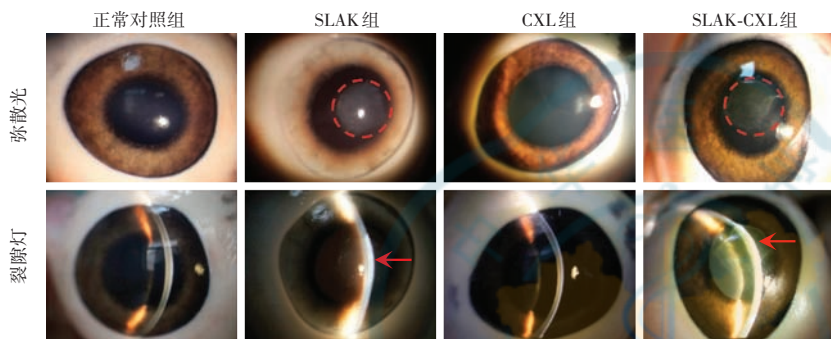


图 7 术后各组裂隙灯显微图像 箭头及圆圈指示植入的透镜植片 SLAK:角膜基质透镜植入术;CXL:角膜胶原交联术

Figure 7 Postoperative slit-lamp microscopy images of different groups Arrows and circles indicated the implanted stromal lens grafts SLAK: stromal lenticule addition keratoplasty; CXL: corneal collagen cross-linking

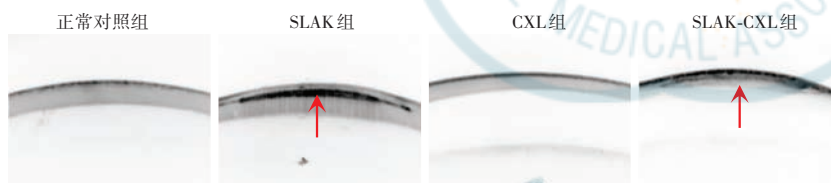


图 8 术后各组角膜地形图 箭头指示植入的透镜植片 SLAK:角膜基质透镜植入术;CXL:角膜胶原交联术

Figure 8 Postoperative corneal topography of different groups Arrows indicated the implanted stromal lens grafts SLAK: stromal lenticule addition keratoplasty; CXL: corneal collagen cross-linking

3 讨论

在临床中,约 50%圆锥角膜患者因角膜厚度不足而放弃 CXL^[23]。近年来,飞秒激光近视手术数量显著增加^[24]。手术产生的角膜基质薄透镜是一种安全的可镶嵌同种异物材料^[25-26],这使得通过 SLAK 重建角膜基质结构和功能的同时,解决角膜基质病变并改善角膜屈光状态这一设想成为可能。然而,目前尚无证据表明手术治疗进行性圆锥角膜的绝对有效性。本研究采用离体猪眼行 SLAK-CXL,观察其角膜生物力学改变、植入透镜与受体角膜之间的结合状态、角膜基质胶原纤维微观结构的变化及临床指标的恢复效果,以

期为圆锥角膜等扩张性角膜疾病的治疗提供参考。

为了测量角膜的整体生物力学强度,在植入透镜后,进行了单轴拉伸试验^[27-28]。结果显示,在应变 50%时,与正常对照组相比,SLAK 组角膜抗拉强度和弹性模量没有明显变化,CXL 组与 SLAK-CXL 组角膜抗拉强度、弹性模量明显增加,而 CXL 组与 SLAK-CXL 组差异无统计学意义,与 Zhang 等^[29]观点一致。此外,本研究探索了交联处理后,供体透镜与受体角膜之间是否会发生强烈的交联反应,从而增加接触面的粘度,结果显示 SLAK-UVA 组搭接剪切强度较 SLAK 组增加了约 1.5 倍。SLAK-CXL 组搭接剪切强度虽稍高,但与 SLAK 组比较差异无统计学意义。体外研究证明交联即刻完成后,供体与受体之间没有粘合。粘附力增加可能是由于水分减少后氨基酸非共价结合引起。另外,核黄素剂型具有水润作用,为了排除所有的干扰因素,搭接剪切试验进行了详细的控制变量分组,每个独立实验设计对照组略有区别。然而,在临床实践中,当植入的透镜在手术后 6 个月被移除时,有明显的剥落感,目前未找到病例报告或研究支持,需要在后续的体内实验中进一步验证。

此外,交联后猪角膜出现基质水肿,透明度降低。Scheimpflug 分析仪的结果表明,SLAK 组、SLAK-CXL 组透镜的透光度均降低。然而,CXL 组和 SLAK-CXL 组的角膜前基质透光率在交联后降低,与文献报道一致^[30]。但离体猪眼角膜地形图及前节光学相干断层扫描成像技术尚不成熟,本研究未做定量分析。基质胶原纤维决定角膜的透明度和强度^[26,31]。在本研究中,与 SLAK 组和 SLAK-RNF 组相比,SLAK-CXL 组胶原纤维化面积占比和纤维直径均增加。与文献报道的 CXL 术后胶原直径增加,间隙缩小一致^[32]。但也有研究报道交联反应后出现单位面积纤维数量减少,纤维间距增加^[26]。然而,本研究未观察到该现象,可能与交联方法、观察时间和物种不同有关。

本研究样本均取自离体猪眼角膜,缺少体内生化反应的参与,因此关于 SLAK-CXL 有效性的证据仍不充分。虽然本研究结果表明 SLAK-CXL 通过增加角膜厚度及胶原纤维直径改善了角膜生物力学强度,但还

需进一步的实验来阐明所涉及的具体生化反应机制,验证其对进展期圆锥角膜等疾病的安全性和有效性。此外,本研究测量角膜生物力学的方式较为单一,后续应开发更符合角膜生理特性的多向拉伸检测方法。

综上,本研究表明,SLAK-CXL 用于提高角膜生物力学强度是可行的。新鲜异体透镜在体内的安全性和透明度与天然角膜相似。SLAK-CXL 增加了角膜的弹性模量,但体外数据表明,该术式不能在供体与受体之间产生即时粘附。术后 SLAK-CXL 组受体角膜前表面和供体透镜的纤维着色面积和纤维直径增加。因此,SLAK-CXL 是增加角膜厚度并提高角膜生物力学强度的有效治疗策略,本研究为角膜过薄而无法进行常规 CXL 的患者实施 SLAK-CXL 手术提供了新的理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 申笛:实验设计、研究实施、数据采集、文章撰写;张娜:实验设计、数据统计分析;孙西宇:数据统计分析、作图;韦伟:研究指导、论文审阅及定稿

参考文献

- Stodulka P, Randárová E, Slovák M, et al. Corneal stromal lenticule rotation for high astigmatism correction[J/OL]. *J Refract Surg*, 2025, 41(1): e5-e13 [2025-12-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39783820/>. DOI: 10.3928/1081597X-20241030-02.
- Shang J, Wang X, Xu H, et al. Correction of high astigmatism by autologous astigmatic lenticule reshaping and rotation[J/OL]. *J Refract Surg*, 2024, 40(8): e554-e561 [2025-12-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39120015/>. DOI: 10.3928/1081597X-20240701-01.
- Sun XY, Shen D, Chen HX, et al. Corneal surface changes after stromal lenticule addition keratoplasty combined with cross-linking for severe keratoconus[J]. *Int J Ophthalmol*, 2025, 18(6): 1003-1010. DOI: 10.18240/ijo.2025.06.05.
- Hüfner L, Augustin VA, Auffarth GU, et al. New tissue-additive procedures to improve vision in keratoconus[J]. *Ophthalmologie*, 2026, 123(2): 104-110. DOI: 10.1007/s00347-025-02370-z.
- 《角膜基质透镜移植手术技术规范专家共识(2025)》专家组, 中国民族卫生协会眼科学分会屈光学组和视光专家委员会. 角膜基质透镜移植手术技术规范专家共识(2025)[J]. *中华实验眼科杂志*, 2025, 43(12): 1081-1088. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250721-00234. Expert workgroup of Expert consensus on surgical techniques for corneal stromal lenticule transplantation (2025), Division of Refractive Surgery & Committee of Optometry Experts, Branch of Ophthalmology, China National Health Association. Expert consensus on surgical techniques for corneal stromal lenticule transplantation (2025)[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2025, 43(12): 1081-1088. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250721-00234.
- Tan DT, Dart JK, Holland EJ, et al. Corneal transplantation[J]. *Lancet*, 2012, 379(9827): 1749-1761. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60437-1.
- Fasolo A, Galzignato A, Pedrotti E, et al. Femtosecond laser-assisted implantation of corneal stroma lenticule for keratoconus[J]. *Int Ophthalmol*, 2021, 41(5): 1949-1957. DOI: 10.1007/s10792-021-01739-8.
- Nubile M, Salgari N, Mehta JS, et al. Epithelial and stromal remodeling following femtosecond laser-assisted stromal lenticule addition keratoplasty (SLAK) for keratoconus[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 2293. DOI: 10.1038/s41598-021-81626-5.
- Meyer JJ, Gokul A, Vellara HR, et al. Progression of keratoconus in children and adolescents[J]. *Br J Ophthalmol*, 2023, 107(2): 176-180. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-316481.
- Gomes JA, Rapuano CJ, Belin MW, et al. Global consensus on keratoconus diagnosis[J/OL]. *Cornea*, 2015, 34(12): e38-e39 [2025-12-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26426335/>. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000623.
- Gomes JA, Tan D, Rapuano CJ, et al. Global consensus on keratoconus and ectatic diseases[J]. *Cornea*, 2015, 34(4): 359-369. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000408.
- Dou S, Wang Q, Zhang B, et al. Single-cell atlas of keratoconus corneas revealed aberrant transcriptional signatures and implicated mechanical stretch as a trigger for keratoconus pathogenesis[J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 66. DOI: 10.1038/s41421-022-00397-z.
- Bonacci E, Vinciguerra R, Anastasi M, et al. Sequential customized phototherapeutic keratectomy after meniscus-shaped stromal lenticule addition keratoplasty in keratoconic eyes[J/OL]. *J Refract Surg*, 2025, 41(11): e1205-e1212 [2025-12-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41212957/>. DOI: 10.3928/1081597X-20250826-03.
- Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles[J]. *Ocul Surf*, 2013, 11(2): 65-74. DOI: 10.1016/j.jtos.2013.01.002.
- Sorkin N, Varssano D. Corneal collagen crosslinking: a systematic review[J]. *Ophthalmologica*, 2014, 232(1): 10-27. DOI: 10.1159/000357979.
- Krungkrapetch L, Assawaboonaydech A, Supajitgulchai D. Corneal biomechanical property changes following corneal collagen cross-linking in keratoconus: a systematic review and meta-regression analysis[J]. *Int Ophthalmol*, 2025, 45(1): 270. DOI: 10.1007/s10792-025-03617-z.
- Wittig-Silva C, Chan E, Islam FM, et al. A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: three-year results[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(4): 812-821. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.10.028.
- Hashemi H, Seyedian MA, Mirafab M, et al. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet A irradiation for keratoconus: long-term results[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(8): 1515-1520. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.01.012.
- Meiri Z, Keren S, Rosenblatt A, et al. Efficacy of corneal collagen cross-linking for the treatment of keratoconus: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cornea*, 2016, 35(3): 417-428. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000723.
- Nughays RO, Bazayd AS, Alshamekh LA, et al. Efficacy and safety of epi-on vs epi-off corneal cross-linking in corneal ectasia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Clin Ophthalmol*, 2025, 19: 1531-1541. DOI: 10.2147/OPHT.S508618.
- Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(5): 549-577. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.08.001.
- Ganesh S, Brar S. Femtosecond intrastromal lenticular implantation combined with accelerated collagen cross-linking for the treatment of keratoconus—initial clinical result in 6 eyes[J]. *Cornea*, 2015, 34(10): 1331-1339. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000539.
- Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea[J]. *Cornea*, 2007, 26(4): 385-389. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31803347f8.
- Jabbour S, Bower KS. Refractive surgery in the US in 2021[J]. *JAMA*, 2021, 326(1): 77-78. DOI: 10.1001/jama.2020.20245.
- Riau AK, Boey K, Binte M Yusoff NZ, et al. Experiment-based validation of corneal lenticule banking in a health authority-licensed facility[J]. *Tissue Eng Part A*, 2022, 28(1-2): 69-83. DOI: 10.1089/ten.TEA.2021.0042.
- Yu N, Chen S, Yang X, et al. Comparison of fresh and preserved decellularized human corneal lenticules in femtosecond laser-assisted intrastromal lamellar keratoplasty[J]. *Acta Biomater*, 2022, 150: 154-167. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.07.035.
- Chang SH, Mohammadvali A, Chen KJ, et al. The relationship between mechanical properties, ultrastructural changes, and intrafibrillar bond formation in corneal UVA/riboflavin cross-linking treatment for keratoconus[J]. *J Refract Surg*, 2018, 34(4): 264-272. DOI: 10.3928/1081597X-20180220-01.
- Hatami-Marbini H. Influence of microstructure on stiffening effects of corneal cross-linking treatment[J]. *J Refract Surg*, 2018, 34(9): 622-627. DOI: 10.3928/1081597X-20180718-01.
- Zhang J, Sun F, Hou J, et al. Safety and efficacy of stromal lenticule addition keratoplasty in the treatment of hyperopia: a retrospective study[J]. *BMC Ophthalmol*, 2025, 25(1): 400. DOI: 10.1186/s12886-025-04224-3.
- Li H, Zhao L, Wang F, et al. Natural cross-linker-stabilized acellular porcine corneal stroma for lamellar keratoplasty[J]. *Acta Biomater*, 2020, 114: 270-284. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.07.035.
- Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49: 1-16. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.001.
- Gulzar A, Yildiz E, Kaleli HN, et al. Ruthenium-induced corneal collagen crosslinking under visible light[J]. *Acta Biomater*, 2022, 147: 198-208. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.05.040.

(收稿日期:2026-01-21 修回日期:2026-04-24)

(本文编辑:施晓萌 骆世平)