

不同交联方法对离体猪巩膜交联效果的比较

吴元 杨松霖 李海丽 晏晓明 宋凡

【摘要】 背景 研究表明化学交联剂可加强巩膜胶原的强度,但交联效果受不同交联方法的影响。
目的 研究不同交联方法对猪巩膜化学交联效果的影响。方法 离体 4 h 以内的新鲜猪眼球 70 只分为 5 个组,分别用全眼球交联法和巩膜条带交联法在质量分数 1% 京尼平溶液、体积分数 1% 戊二醛溶液或 PBS 中 37 ℃ 水浴 40 min。交联后每组取 10 个 10 mm×4 mm 的颞侧巩膜条带于 Instron5848 型微力测试仪下进行拉伸实验,测定巩膜组织的弹性模量和拉伸应力;每组其他的 4 个样本于水浴箱内测试巩膜组织的最大热收缩温度。结果 机械力学实验结果表明,1% 京尼平溶液处理后,全眼球交联法巩膜条带的弹性模量值为(8.98±1.81)MPa,而巩膜条带交联后的值是(10.85±1.83)MPa,前者约为后者的 82.8%,两种交联方法的巩膜弹性模量值间的差异有统计学意义($t=3.375, P=0.003$);1% 戊二醛溶液处理后,全眼球交联法巩膜条带的弹性模量值是(12.78±2.91)MPa,巩膜条带交联后的值是(18.25±5.16)MPa,前者约为后者的 70.0%,两种交联方法间的差异有统计学意义($t=4.007, P=0.001$)。在 5%、10%、15% 和 20% 的应变条件下,全眼球交联法巩膜组织的拉伸应力分别为巩膜条带交联法的 54.9%~90.1%,均明显弱于巩膜条带交联法,差异均有统计学意义($P<0.05$)。热力学实验表明,1% 京尼平处理后全眼球交联法巩膜的热收缩温度为(68.8±0.9)℃,巩膜条带交联法为(74.8±1.3)℃,两种交联方法间的差异有统计学意义($t=11.129, P=0.000$)。1% 戊二醛处理后全眼球交联法巩膜的热收缩温度为(73.3±0.9)℃,巩膜条带交联法为(79.3±1.3)℃,两种交联方法间的差异有统计学意义($t=11.112, P=0.000$)。结论 不同交联方法对猪巩膜化学交联后的力学效果存在影响,巩膜条带交联后巩膜的交联强度略好于全眼球交联。

【关键词】 巩膜; 交联; 胶原; 全眼球交联法; 巩膜条带交联法

Effect of collagen crosslinking on porcine sclera with different methods WU Yuan, YANG Song-lin, LI Hai-li, YAN Xiao-ming, SONG Fan. Department of Ophthalmology, First Hospital of Peking University, Key Laboratory of Vision Loss and Restoration, Ministry of Education, Beijing 100034, China
Corresponding author: YAN Xiao-ming, Email: yanxiaoming7908@163.com

【Abstract】 **Background** Chemical crosslinking agent can be used to strengthen the intensity of sclera tissue, but the intensity of the sclera may be influenced by different crosslinking methods. **Objective** The aim of this study was to compare the effectiveness of collagen crosslinking on porcine sclera between whole-eye crosslinking method and scleral strip crosslinking method. **Methods** Whole-eye crosslinking or sclera strip crosslinking was performed on 70 fresh porcine eyeballs in five groups using 1% genipin, 1% glutaraldehyde or PBS respectively for 40 minutes. After crosslinking, 10 sclera strips with 10 mm×4 mm from the temporal lateral were prepared in every group for the stress-strain measurement using a Instron5848 microtester, and the other 4 scleral strips in each group were extracted for the thermal shrinkage temperature test. **Results** Biomechanical property test revealed that the elastic modulus value of sclera strips reduced by 70.0%–82.8% in the whole-eye crosslinking method group compared with scleral strip crosslinking method group after treated with 1% genipin ((8.98±1.81) MPa vs. (10.85±1.83) MPa, $t=3.375, P=0.003$) and 1% glutaraldehyde ((12.78±2.91) MPa vs. (18.25±5.16) MPa, $t=4.007, P=0.001$); The tensile stress of whole-eye crosslinking method group was 54.9%–90.1% of scleral strips method group, showing significant decline after crosslinked of whole-eye in 5%, 10%, 15% and 20% strain conditions (all $P<0.05$). Thermomechanics test showed that the thermal shrinkage temperature was lower in the whole-eye crosslinking group compared with scleral strip crosslinking group after treated with both 1% genipin ((68.8±0.9)℃ vs. (74.8±1.3)℃,

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.02.015

基金项目:北大医院青年基金项目

作者单位:100034 北京大学第一医院眼科 视觉损伤与修复教育部重点实验室(吴元、杨松霖、李海丽、晏晓明); 100190 北京,中国科学院力学研究所 LNM(宋凡)

通信作者:晏晓明, Email: yanxiaoming7908@163.com

$t = 11.129, P = 0.000$) and 1% glutaraldehyde ($(73.3 \pm 0.9)^\circ\text{C}$ vs. $(79.3 \pm 1.3)^\circ\text{C}$, $t = 11.112, P = 0.000$).

Conclusions Different crosslinking methods have an influence on the efficacy of collagen crosslinking on porcine sclera. Sclera strip crosslinking offers a better crosslinking intensity for sclera.

[Key words] Sclera; Crosslinking; Collagen; Whole-eye crosslinking; Scleral strip crosslinking

巩膜力学的改变导致眼轴的延长是高度近视进展的主要原因。以往因缺乏有效阻止巩膜强度减弱的手段以阻止眼球壁的变薄,高度近视尚无理想的治疗方法。目前,一种可以加强巩膜胶原纤维强度的治疗技术——胶原交联技术正在兴起^[1]。作为胶原纤维交联剂,戊二醛和京尼平的交联作用已得到证实^[1-3]。理论上,球后注射化学交联剂可以加强巩膜的强度,从而阻止高度近视的进展,但现阶段一些探索性的巩膜交联研究中多将巩膜制作成巩膜条浸泡在化学交联剂中进行交联^[1,4]。多项研究显示,以这种方法交联后,巩膜组织的内外表面同时得到交联,巩膜的生物力学特性可以得到有效提高,然而临床操作中,通过球后注射交联剂首先使得巩膜外表面得以交联,与巩膜条带浸泡法交联的过程不完全相同,目前虽有研究认为上述两种不同的交联方法对交联效果存在影响^[2],但其影响的程度尚未见报道。本研究对离体猪巩膜进行交联,比较全眼球交联与巩膜条带浸泡交联对巩膜交联效果的影响,并用不同的交联剂互相印证,为进一步的实验研究提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

取离体 4 h 以内的猪眼球 70 只,分别用质量分数 1% 京尼平和体积分数 1% 戊二醛进行交联,分到两种交联剂中的眼球再分为全眼球交联组和巩膜条交联组,另选一组眼球未用任何交联剂处理,作为阴性对照组,每组 14 只猪眼球。

1.2 方法

1.2.1 巩膜条的制备 取猪眼球,沿后极部向角巩膜缘方向、以颞侧赤道部为中心,取 $10\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 大小颞侧巩膜条。每只眼球取 1 条巩膜条。

1.2.2 巩膜交联处理 无交联剂处理组:制作巩膜条样本浸入 PBS 溶液中, 37°C 下恒温水浴 40 min; 1% 京尼平组和 1% 戊二醛组猪眼采用两种不同的交联方法进行交联。第一种方法是将眼球完整地浸泡入交联剂中,模拟球后注射时交联剂自外向内交联过程的方法,即全眼球交联法。第二种方法采用传统的离体交联法,将巩膜制成统一尺径的巩膜条,完全浸泡入交联剂中进行交联,即巩膜条交联法。所有样本均在 37°C 下

于相应交联剂中恒温水浴 40 min,全眼球交联法浸泡后制作巩膜条带备测。

1.2.3 巩膜机械力学的测量 每组巩膜条中 10 条用于力学测试,测试工具为 Instron5848 型微力测试仪。调整负载传感器量程为 $\pm 5\text{ N}$, 巩膜条样本两端各 2.5 mm 固定于材料测试夹,中间 5 mm 为初始拉伸长度,用游标卡尺测量巩膜样本的中心厚度。输入上述相关数据后,在零应力状态下将巩膜条样本匀速向两边拉伸,拉伸速度为形变 1 mm/min ,拉伸的终止条件为形变达 20%。记录测试样本的弹性模量;分别记录巩膜样本应变 5%、10%、15% 和 20% 时(即巩膜条长度增加 1 mm 时)的拉伸应力值。测量全程于 25°C 、相对湿度 40% 的实验室环境下完成。

1.2.4 巩膜的热力学测量 每组巩膜条中 4 条用于热力学测试,测试工具为自动加热水浴箱。将塑料直尺固定于水浴箱底做读数标准,并取温度计置于水浴箱内做温度校准。设 50°C 为起始加热温度。将巩膜条样本置于水浴箱底,取数码相机每分钟拍摄照片记录巩膜条样本形变的过程,并记录实时温度。加热的速度为 1°C/min ,终末加热温度为 82°C 。加热完毕后读取记录照片,并记录每个测试巩膜条样本的最大收缩温度(T_m)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组样本均数经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机两水平实验设计,全眼球交联法与巩膜条带交联法间猪巩膜组织弹性模量值、不同应变条件下的拉伸应力值、热收缩温度的差异比较均采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种交联方法猪巩膜机械力学性质的比较

2.1.1 弹性模量的改变 无交联剂处理组巩膜的弹性模量为 $(5.49 \pm 0.60)\text{ MPa}$, 1% 京尼平组全眼球交联法巩膜的弹性模量为巩膜条带交联法巩膜的 82.8%, 差异有统计学意义($t = 3.375, P < 0.05$), 1% 戊二醛组全眼球交联法巩膜的弹性模量为巩膜条带交联法的 70.0%, 差异有统计学意义($t = 4.007, P < 0.05$)(表 1)。

表 1 不同交联方法下猪巩膜弹性模量的改变($\bar{x}\pm s$, MPa)

交联方法	样本量	1% 京尼平组	1% 戊二醛组
全眼球交联法	10	8.98±1.81	12.78±2.91
巩膜条带交联法	10	10.85±1.83	18.25±5.16
<i>t</i>		3.375	4.007
<i>P</i>		0.003	0.001

(独立样本 *t* 检验)

2.1.2 拉伸应力及应力-应变曲线的改变 无交联剂处理组猪巩膜 5%、10%、15%、20% 形变下的平均拉伸应力分别为(0.21±0.19)、(0.51±0.31)、(0.91±0.28)、(1.30±0.33)N, 应力-应变曲线较对照组变陡(图 1, 2)。形变 5%、10%、15%、20% 时, 1% 京尼平组全眼球交联法巩膜的拉伸应力分别为巩膜条带交联法的 54.9%、80.0%、81.3%、88.5%。4 种形变条件下两种交联方法间巩膜拉伸应力的差异均有统计学意义(*t*=2.375、3.102、2.875、2.189, *P*<0.05)(表 2)。形变 5%、10%、15%、20% 时, 1% 戊二醛组全眼球交联法巩膜的拉伸应力为巩膜条带交联法的 90.1%、87.7%、90.1%、89.3%, 两种交联方法间巩膜拉伸应力的差异均有统计学意义(*t*=1.987、2.211、2.237、

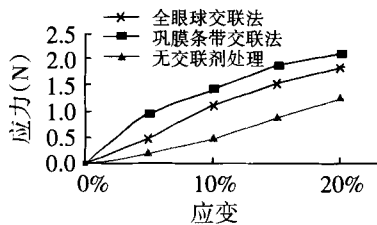


图 1 1% 京尼平组不同交联方法交联后巩膜拉伸应力的变化

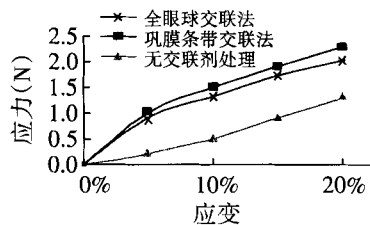


图 2 1% 戊二醛组不同交联方法交联后巩膜拉伸应力的变化

表 2 1% 京尼平组两种交联方法间不同应变条件下巩膜拉伸应力的比较($\bar{x}\pm s$, N)

交联方法	样本量	不同应变条件下巩膜拉伸应力			
		5%	10%	15%	20%
全眼球交联法	10	0.52±0.21	1.12±0.30	1.53±0.30	1.87±0.35
巩膜条带交联法	10	0.95±0.31	1.41±0.28	1.88±0.24	2.12±0.35
<i>t</i>		2.375	3.102	2.875	2.189
<i>P</i>		0.035	0.020	0.030	0.045

(独立样本 *t* 检验)

表 3 1% 戊二醛组两种交联方法间不同应变条件下巩膜拉伸应力的比较($\bar{x}\pm s$, N)

交联方法	样本量	不同应变条件下巩膜拉伸应力			
		5%	10%	15%	20%
全眼球交联法	10	0.91±0.13	1.31±0.26	1.73±0.38	2.04±0.33
巩膜条带交联法	10	1.01±0.33	1.50±0.22	1.92±0.31	2.30±0.29
<i>t</i>		1.987	2.211	2.237	1.545
<i>P</i>		0.040	0.038	0.035	0.049

(独立样本 *t* 检验)

1.545, *P*<0.05)(表 3)。

2.2 猪巩膜热力学性质的改变

无交联剂处理组最大热收缩温度为(58.8±1.3)℃, 各交联处理组的最大热收缩温度上升(表 4), 1% 京尼平全眼球交联法组热收缩温度较 1% 京尼平巩膜条带交联法组约低 6℃, 两组的最大热收缩温度的差异有统计学意义(*t*=11.129, *P*<0.05); 1% 戊二醛全眼球交联法组较 1% 戊二醛巩膜条带交联法组约低 6℃, 两组的最大热收缩温度的差异有统计学意义(*t*=11.112, *P*<0.05)。

表 4 不同交联方法下猪巩膜的热收缩温度改变($\bar{x}\pm s$, °C)

交联方法	样本量	1% 京尼平组	1% 戊二醛组
全眼球交联法	4	68.8±0.9	73.3±0.9
巩膜条带交联法	4	74.8±1.3	79.3±1.3
<i>t</i>		11.129	11.112
<i>P</i>		0.000	0.000

(独立样本 *t* 检验)

3 讨论

化学交联剂可以通过诱导巩膜胶原纤维之间化学键的连接而形成有效交联, 从而增强巩膜组织的生物力学强度。以往对巩膜化学交联的研究采用的是将巩膜制成统一尺径的巩膜条完全浸泡于交联剂中进行交联的方法, 本研究尝试将眼球完整地浸泡于交联剂中, 模拟球后注射时交联剂自外向内交联过程的全眼球交联法进行交联, 并比较两种方法的交联效果。巩膜条带离体交联法和全眼球交联法作为不同的实验方法, 其交联剂进行交联的过程不同, 理论上二者的交联效果可能存在差异。本研究在将其他条件控制一致的基础上比较两种交联方式交联后巩膜组织的生物力学强度和热力学性质的变化。

弹性模量是评价组织材料力学性质的指标, 为材料应力和相关应变的比值, 代表材料抵抗弹性变形的能力。当材料的强度增大时, 其弹性模量增大, 在相同形变下的拉伸应力也随之增加。巩膜主要由 I 型、III 型胶原纤维构成, 这些胶原纤维的排列在不同部位并不相同, 在角膜缘和后极部主要为环形排列(以后极部为圆心的圆周方向), 其余部位为沿子午线纵向排列(自后极部向角巩膜缘方向)^[5], 本研究中测试的巩膜

弹性模量为巩膜纵向排列纤维的弹性模量,统一取以赤道部为中心的巩膜条,此处巩膜厚度均一、纤维排列规则。热收缩温度是另一个反映生物材料交联特性的指标。随着温度的升高(2~3℃),生物材料会短时间内剧烈收缩,这个温度被称为热收缩温度^[6],热收缩是原胶原蛋白变性所致。材料或组织的交联程度越强,热收缩温度越高。

本实验中选择戊二醛作为阳性对照。戊二醛是最强的化学交联剂,交联效果确切,可通过与氨基发生 Schiff 反应形成 Schiff 碱,2 个戊二醛分子的醛基官能团间发生醇醛缩合作用形成连接,使胶原纤维形成网状达到交联。研究显示戊二醛可以使巩膜组织的弹性模量增加到原来的 8 倍^[1]。京尼平是天然生物交联剂,生物毒性小,具有很好的临床应用前景。京尼平分子和氨基酸残基的自由氨基反应,生成环烯醚萜的氮化物,随后经过脱水作用,形成一个芳香族的单体,芳香族单体可以经由自由基反应的二聚作用而形成环状的分子间和分子内交联^[7-8],是一种较为温和的化学交联剂。本实验发现,不同的交联剂应用全眼球交联法交联后和巩膜条交联法交联后的交联效果均存在差异。

在上述的测量方法下,本研究发现全眼球交联法和巩膜条交联法对巩膜均有明显的交联效果,巩膜组织经交联作用后均出现巩膜的弹性模量上升、拉伸应力增加和热收缩温度升高,但是两种方法的交联效果并不一致。对两种方法进行比较,全眼球交联法较巩膜条交联法的效果略差,以巩膜的弹性模量为衡量单位,前者约为后者的 70.0%~82.8%。全眼球交联时,巩膜的外表面首先得到交联,而进行巩膜条交联时,测试样本同时存在外表面、内表面和侧向的多面同时得到交联。交联过程的不同可能是二者交联效果不

一致的原因。

本研究通过对两种巩膜交联方法的效果进行比较,证实巩膜条交联法的交联效果略好于全眼球交联法,巩膜条交联法的交联效果和球后注射交联剂产生的交联效果不一致。交联方法对交联效果存在一定影响,研究者在对巩膜组织进行化学交联研究时应考虑到这个差别。

值得注意的是,虽然本研究采用的全眼球交联法是模拟临床上的球后注射交联剂法,但研究是离体实验,无法考察在体研究中机体与交联剂的相互作用和影响,因此实验结果不能完全等同于临床应用的效果。

参考文献

- [1] Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera[J]. J Cataract Refract Surg, 2004, 30: 689-695.
- [2] Avila MY, Navia JL. Effect of genipin collagen crosslinking on porcine corneas[J]. J Cataract Refract Surg, 2010, 36: 659-664.
- [3] Sundararaghavan HC, Monteiro GA, Lapin NA, et al. Genipin-induced changes in collagen gels: correlation of mechanical properties to fluorescence[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 87: 308-320.
- [4] Paik DC, Wen Q, Airiani S, et al. Aliphatic beta-nitro alcohols for non-enzymatic collagen cross-linking of scleral tissue[J]. Exp Eye Res, 2008, 87: 279-285.
- [5] Ethier CR, Johnson M, Ruberti J. Ocular biomechanics and biotransport[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2004, 6: 249-273.
- [6] Loke WK, Khor E. Validation of the shrinkage temperature of animal tissue for bioprosthetic heart valve application by differential scanning calorimetry[J]. Biomaterials, 1995, 16: 251-258.
- [7] Sung HW, Hsu HL, Shih CC, et al. Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds[J]. Biomaterials, 1996, 17: 1405-1410.
- [8] Sung HW, Huang RN, Huang LL, et al. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 1999, 10: 63-78.

(收稿日期:2012-06-30)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对作者来稿中署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集分析与论证;(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改;(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者和通信作者的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)

不同交联方法对离体猪巩膜交联效果的比较

作者: [吴元](#), [杨松霖](#), [李海丽](#), [晏晓明](#), [宋凡](#), [WU Yuan](#), [YANG Song-lin](#), [LI Hai-li](#), [YAN Xiao-ming](#), [SONG Fan](#)

作者单位: [吴元, 杨松霖, 李海丽, 晏晓明, WU Yuan, YANG Song-lin, LI Hai-li, YAN Xiao-ming\(100034, 北京大学第一医院眼科视觉损伤与修复教育部重点实验室\)](#), [宋凡, SONG Fan\(中国科学院力学研究所LNM, 北京, 100190\)](#)

刊名: [中华实验眼科杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Experimental Ophthalmology](#)

年, 卷(期): 2013, 31(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_ykyj201302015.aspx