

角巩膜胶原交联中核黄素渗透性的研究进展

张学敏 张丰菊

【摘要】 紫外线 A/蓝光-核黄素胶原交联法能显著提高角巩膜组织胶原纤维的机械强度,核黄素在胶原交联中既是光敏剂,也是保护剂,其在眼组织内的含量直接影响着胶原交联的效果与眼组织的安全。而核黄素在角巩膜内的含量受多种因素影响,并且需要合理的检测方法来判断,现将对以上两方面进行阐述。

【关键词】 核黄素; 渗透性; 角膜; 巩膜; 胶原交联

Research progress in riboflavin permeability in corneal and scleral collagen cross-linking

Zhang Xuemin, Zhang Fengju. Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital of Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Science Key Lab, Beijing 100730, China

Corresponding author: Zhang Fengju, Email: wxw93@hotmail.com

【Abstract】 Ultraviolet A and blue lights in riboflavin cross-linking are effective approaches to increase the mechanical and biochemical rigidity of collagen fibers. The effect of cross-linking and the safety of the eye are affected by riboflavin, which acts as a photosensitizer and protective agent. The riboflavin content in the cornea and sclera relates to many factors and needs to be detected by reasonable methods. This article focuses on the two methods mentioned above.

【Key words】 Riboflavin; Permeability; Cornea; Sclera; Collagen cross-linking

核黄素($C_{17}H_{20}N_4O_6$, 376 相对分子质量)即维生素 B₂, 其磷酸盐形式即 5'-核黄素磷酸钠常被应用于与紫外线 A (ultraviolet A, UVA)/蓝光联合诱导的胶原交联。在眼科领域, 角膜组织的紫外线 A-核黄素胶原交联法已被用于治疗圆锥角膜等一系列角膜疾病, 而巩膜组织的紫外线 A/蓝光-核黄素胶原交联也被证明可增强巩膜的生物力学强度, 有望成为治疗和预防进行性近视引起的巩膜扩张的新方法。紫外线 A/蓝光-核黄素胶原交联的基本原理是光敏剂核黄素在紫外线 A 或蓝光作用下, 被激发到三线态, 产生以单线态氧为主的活性氧族, 从而诱导胶原纤维的氨基(团)之间发生化学交联反应, 增加胶原纤维的机械强度^[1]。在交联过程中, 核黄素不仅起着光敏剂的作用, 而且由于核黄素能够提高激发光的吸收率, 对于保护角膜内皮及眼内其他结构也有重要意义^[2]。因此, 眼组织内核黄素的含量直接影响着胶原交联的效果与眼组织的安全, 同时眼组织内核黄素的含量又需要合理的检测方法来判断。现就角巩膜组织内核黄素含量的影响因素及检测方法进行阐述。

1 核黄素在角膜内的渗透

传统的角膜紫外线 A-核黄素交联的方法为: 先去除中央角膜上皮, 然后用 0.1% 的等渗性核黄素溶液(含 20% 右旋糖

酐)滴眼 5 min, 最后采用波长为 370 nm, 强度为 3 mW/cm² 的 UVA 照射 30 min, 其间定时在角膜表面滴加核黄素溶液以防角膜干燥^[3]。在此方法基础上, 多项研究对其进行调整或进一步实验, 发现以下几个因素影响核黄素在角膜内的含量。

1.1 角膜上皮

角膜上皮以其细胞间的紧密连接形成屏障, 对相对分子质量大于 100 的物质造成阻碍, 从而减慢了核黄素在角膜中的弥散^[4], 因此标准的角膜 UVA-核黄素交联采用去除角膜上皮的方法。但另一方面, 去除角膜上皮会带来一系列并发症, 如术后疼痛、角膜感染、haze 等^[5], 而且由于圆锥角膜以角膜进行性变薄为特征, 很多患者去除上皮后角膜厚度低于 400 μm, 即低于安全交联厚度, 角膜内皮会受到损伤^[6]。基于以上原因, 跨上皮角膜交联的方法被提出。

2008 年, Bottos 等^[7]以猪眼角膜为研究对象, 发现按照传统方法可以增强角膜的强度, 但在保留上皮的情况下没有效果。2011 年, Bottos 等^[8]进一步研究发现, 角膜上皮使胶原交联的效果减弱的原因不是因为限制紫外光的透过, 而是因为阻碍了核黄素的渗透。Baicchi 等^[9]对保留上皮及去上皮组人角膜基质内的核黄素浓度进行定量测定, 发现 2 组核黄素浓度计量单位相差 1 000 倍^[9]。Hayes 等^[10]以猪眼角膜为研究对象, 发现角膜有损伤但上皮基底膜完整组与完整去上皮组比较, 基质内核黄素不能达到有效浓度, 交联作用减弱。Smaras 等^[10]对猪眼角膜采用网格状去上皮的方法, 与完整去上皮组比较, 发现基质内核黄素的吸收量少且不均匀; Yuen 等^[11]也得到类似结论。以上各项研究均表明了完整去除角膜上皮对

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.03.015

基金项目: 国家自然科学基金(81070763); 北京市教育委员会科技计划重点项目(KZ20130025027)

作者单位: 100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室

通信作者: 张丰菊, Email: wxw93@hotmail.com

于 UVA-核黄素交联的重要性。

在保留角膜上皮的跨上皮交联中,角膜上皮的厚度会影响核黄素的渗透,有研究发现,由于猪眼角膜上皮厚约 100 μm ,是人角膜上皮厚度的 2 倍,因此猪眼角膜上皮对核黄素的阻碍作用更强^[1]。

1.2 促渗剂

由于角膜上皮对核黄素渗透的屏障作用,多项研究在跨上皮角膜交联中采用促渗剂如苯扎氯铵、EDTA、氨基丁三醇等,以达到松解角膜上皮间紧密连接的目的。

2009 年, Wollensak 和 Iomdina^[2]将浓度为 0.005% 的苯扎氯铵应用于兔眼跨上皮角膜胶原交联,结果表明苯扎氯铵-跨上皮组增强角膜强度作用是去上皮组的 1/5。Koppen 等^[3]以圆锥角膜患者为研究对象,交联术后 6、12、18 个月复查地形图,发现跨上皮应用 0.005% 苯扎氯铵组在稳定圆锥角膜方面不如去上皮组。由于以上研究中采用的苯扎氯铵均不是推荐的 0.02% 浓度, Kissner 等^[4]将 0.02% 浓度的苯扎氯铵应用于兔眼跨上皮角膜胶原交联,发现核黄素吸收系数与经典去角膜上皮组无差异,且 2 组在加强角膜强度的作用上无差异。另外,研究还对应用 0.02% 苯扎氯铵和 0.04% 苯扎氯铵的跨上皮角膜交联组进行了比较,发现交联效果无差异,鉴于苯扎氯铵有一定的毒性,因此,较高浓度如 0.04% 的苯扎氯铵不推荐使用。

伍腾飞^[5]将 0.5% 的 EDTA 溶液在核黄素预浸润前 1 h 应用于兔眼跨上皮角膜胶原交联,核黄素点眼 30 min 后测定角膜基质内核黄素含量为 $(2.04 \pm 0.25) \mu\text{g/g}$,而去上皮组及跨上皮但无 EDTA 组分别为 $(23.54 \pm 1.61) \mu\text{g/g}$ 和 $(1.44 \pm 0.06) \mu\text{g/g}$ 。结果表明 EDTA 能够促进核黄素在角膜内的渗透,但其作用仍不能代替去上皮。

除了以上应用一种促渗剂的情况,也有研究联合应用多种促渗剂作用于上皮完整的角膜。Leccisotti 和 Islam^[6]以圆锥角膜患者为研究对象,联合苯扎氯铵和 EDTA 应用于跨上皮角膜胶原交联,取得较好的临床疗效。Filippello 等^[7]对圆锥角膜患者联合应用 EDTA 和氨基丁三醇作用于跨上皮角膜交联,结果发现胶原交联有效且安全。

1.3 点药时间

关于核黄素在角膜内的渗透深度与时间的关系, Spoerl 等^[8]将去除角膜上皮的兔眼暴露于核黄素,5 min 后房水即开始着色。Boxer 等^[9]发现在保留角膜上皮的情况下,对圆锥角膜患者用核黄素溶液分别点眼 6、14、30 min 后,核黄素渗入角膜的部位分别为上皮层、中部基质、角膜全层。

关于核黄素在角膜内的含量与时间的关系, Spoerl 等^[2]发现在同一深度的角膜基质内,核黄素浓度随作用时间的延长而增加,且趋势逐渐平缓,在应用核黄素 30 min 后,角膜内核黄素基本达到饱和。为进一步探索核黄素预浸润的合理时间, Baiocchi 等^[4]对人眼去除角膜上皮后分别预浸润核黄素 5、15、30 min,然后对角膜基质内核黄素进行定量测定,发现随着核黄素应用时间的延长,角膜基质内核黄素浓度逐渐提高,而为了能安全、有效地开展胶原交联,核黄素的预浸润时间至少要 10 min。除此之外,该实验还对跨上皮的核黄素浸润进行了研究,结果发现在保留角膜上皮的情况下,随预浸

润时间的延长基质内核黄素浓度变化不大,30 min 后其浓度仍极低。对于核黄素的不同预浸润时间的胶原交联效果, scarcelli 等^[20]以猪眼为研究对象,发现在去除角膜上皮后,与预浸润 30 min 核黄素组相比,预浸润 5 min 核黄素组的增强角膜强度作用降低约 30%。

1.4 核黄素溶液性质

传统的胶原交联中采用的是等渗性核黄素右旋糖酐溶液,但由于右旋糖酐具有高黏滞性,一定程度上会阻碍药物通透角膜上皮^[21],而且由于有的圆锥角膜患者角膜厚度低于 400 μm ,这就使胶原交联无法安全进行,因此有研究尝试应用不含右旋糖酐的低渗性核黄素溶液,以期利用低渗性达到使角膜基质肿胀的目的,从而使角膜偏薄的患者有可能接受胶原交联的治疗。

2011 年, Raiskup 和 Spoerl^[22]对去除角膜上皮的圆锥角膜患者应用低渗性核黄素溶液,平均角膜厚度由 337 μm 增加为 451 μm ,术后 1 年内屈光度和角膜形态稳定,且没有发现基质瘢痕等并发症。Rosetta 等^[23]也采用低渗性核黄素溶液,同样证明胶原交联安全有效。2012 年, Raisup 等^[24]证明对于跨上皮交联,应该用低渗性核黄素溶液代替传统的右旋糖酐溶液,以便形成渗透梯度,增加角膜的渗透性。

低渗性核黄素的应用虽有优点,但也可能存在问题。Wollenk 等^[25]对核黄素右旋糖酐溶液与低渗性核黄素 NaCl 溶液进行研究,发现,2 种溶液在角膜表面形成的液膜厚度分别为 70、40 μm ,液膜破裂时间分别为 22 min、90 s。由于低渗性核黄素溶液的液膜薄,且破裂时间短,对 UVA 的吸收系数降低,因此存在着交联过程中紫外光损伤角膜内皮的风险。另有研究进一步证明,应用低渗性核黄素溶液后,虽有部分液体进入胶原纤维内,但角膜的肿胀几乎完全是因为液体进入胶原纤维间所致,这就使核黄素的保护作用降低,因此临床上应用低渗性核黄素溶液要慎重^[26]。有研究报道,角膜基质厚度至少 330 μm 才可以利用低渗性核黄素安全进行胶原交联^[27]。

除了关于低渗性核黄素溶液的研究,有报道核黄素的甲基纤维素溶液由于在角膜表面形成的液膜稳定性好也可以用于角膜胶原交联^[25]。另外,不同浓度的核黄素溶液也被应用于胶原交联,有研究发现,0.5% 的核黄素溶液相比以往的 0.1% 的核黄素溶液更能提高角膜内核黄素的含量,从而提高交联的安全性^[28]。另外,也有研究提出,当预浸润的核黄素浓度低于 0.15% 时,交联后角膜强度随核黄素浓度的增加而增加,但核黄素高于此浓度后,由于其对激发的阻挡作用,交联角膜的强度不再增加^[29]。

1.5 新技术手段

Dong 和 Zhou^[30]利用飞秒激光在兔角膜基质内制作囊袋后注入核黄素溶液,交联有效且术后恢复快。Alio 等^[31]以圆锥角膜患者为研究对象,采用基质囊袋内注入核黄素与传统去上皮方法作比较,发现 2 组术后视力、像差等无差异。樊郑军^[32]用离子导入的方法,成功使核黄素通过角膜上皮进入角膜实质层。原越等^[33]进一步证明离子导入法可以加速核黄素在角膜内的渗透。以上研究均为保留上皮的交联疗法提供了新思路。

1.6 其他

有研究表明,UVA-核黄素交联方法本身就可以降低角膜的通透性^[34-35],这一点也提出了在核黄素预浸润阶段就应该使其在角膜基质内达到有效浓度的必要性。

2 核黄素在巩膜内的渗透

2004年,Wollensak和Spoerl^[36]首次开展巩膜组织的紫外线A-核黄素交联,方法为:对暴露的巩膜组织给予0.1%的等渗性核黄素右旋糖酐溶液浸润10 min,然后波长370 nm的紫外线A照射30 min,其间定时滴加核黄素溶液以防巩膜干燥。除UVA之外,有研究证明蓝光也可用于巩膜胶原交联^[37]。最初巩膜胶原交联的治疗参数大多是参照角膜胶原交联的数据,但巩膜和角膜组织不管是在纤维的构成还是排列上都有区别,因此多项研究对巩膜交联的参数设置进行探索。已有报道证实巩膜对药物的通透性较好,兔巩膜和人巩膜可以穿透相对分子质量最大约150的分子^[38-39],猪巩膜可以穿透相对分子质量120的分子^[40]。核黄素作为小分子,其在巩膜内的渗透性可能受以下因素影响:

2.1 巩膜厚度

不同的物种巩膜厚度不同,人巩膜厚度赤道部位(0.40±0.15)mm^[36],而兔巩膜则为(0.39±0.11)mm^[41],猪巩膜为(0.80±0.17)mm^[36]。研究指出,由于巩膜厚度的差异,核黄素在人巩膜的渗透率高于猪巩膜2~3倍^[40]。另外,眼球不同部位巩膜厚度不同,由于巩膜前部、赤道部和后极部厚度的差异,药物的渗透系数也随厚度的增加而降低^[42]。对于巩膜的胶原交联,不同的研究者可能采用不同的物种以及不同的巩膜部位,对核黄素在巩膜内的渗透可能会产生影响。

2.2 点药时间

在巩膜交联中,不同的研究采用的核黄素预浸润时间有所不同,主要有5^[41]、10^[43]、15^[44]、20 min^[37]。Wang等^[45]对预浸润核黄素5、10、20、30 min的兔眼巩膜分别进行交联,发现巩膜强度随预浸润时间延长而增加,但20 min组和30 min组无统计学差异,因此提出在巩膜的胶原交联中,核黄素的预浸润时间应为20 min。

2.3 其他

另外,有研究表明胶原交联作用^[46]、眼内压^[39]、离体或活体^[47]等均有可能影响巩膜对药物的渗透性,这些因素在进行胶原交联实验时都需要考虑。

3 核黄素含量的判断

核黄素的一般检测方法有荧光光谱法、高效液相色谱法等^[48],而对于其在角巩膜内的渗透性,有研究采用以上方法,也有研究利用眼科专业设备来进行。

3.1 角膜内核黄素的检测

有研究提出,角膜基质内核黄素需达到15 μg/g的浓度才能安全、有效地开展胶原交联^[49]。核黄素在角膜内的渗透最为直观的检查方法为在裂隙灯显微镜下用蓝光进行观察,此方法可以看到角膜的不同层次,当前房水中有淡黄色的弥散光敏剂即证明核黄素透过角膜全层^[50]。另外,有研究用荧光素钠(相对分子质量为376 g/mol)在角膜组织中的弥散系数,

来估算核黄素的弥散过程,从而计算出不同深度基质中的核黄素浓度^[2]。有研究采用双光子显微镜观察核黄素在角膜内的渗透^[49]。也有研究用高效液相色谱法测定角膜内核黄素的含量^[51],该方法灵敏度高,准确性好,但由于角膜需要摘除,不适于在体的研究。

3.2 巩膜内核黄素的检测

对于核黄素在巩膜内含量的检测,目前研究较少。

综上所述,核黄素在角巩膜内的渗透受多种因素的影响,因此胶原交联过程需要考虑这些因素,同时由于巩膜内核黄素含量的判断还缺乏更详尽的报道,也为后续研究指出了方向。

参考文献:

- [1] Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2006, 17(4):356-360.
- [2] Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea[J]. *Cornea*, 2007, 26(4):385-389.
- [3] Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, et al. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA[J]. *Cornea*, 2004, 23(5):503-507.
- [4] Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, et al. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2009, 35(5):893-899.
- [5] 庞旭,彭秀军. 紫外光/核黄素角膜交联术后并发症及防治的研究进展[J]. *中国医师进修杂志*, 2013, 36(9):73-76.
- [6] Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, et al. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation in patients with thin corneas[J]. *Am J Ophthalmol*, 2012, 153(1):24-28.
- [7] Bottos KM, Dreyfuss JL, Regatieri CV, et al. Immunofluorescence confocal microscopy of porcine corneas following collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A[J]. *J Refract Surg*, 2008, 24(7):S715-S719.
- [8] Bottós KM, Schor P, Dreyfuss JL, et al. Effect of corneal epithelium on ultraviolet-A and riboflavin absorption[J]. *Arq Bras Oftalmol*, 2011, 74(5):348-351.
- [9] Hayes S, O'Brart DP, Lamdin LS, et al. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(4):657-661.
- [10] Samaras K, O'Brart DP, Douth J, et al. Effect of epithelial retention and removal on riboflavin absorption in porcine corneas[J]. *J Refract Surg*, 2009, 25(9):771-775.
- [11] Yuen L, Chan C, Boxer Wachler BS. Effect of epithelial debridement in corneal collagen crosslinking therapy in porcine and human eyes[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(11):1815-1816.
- [12] Wollensak G, Iomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2009, 35(3):540-546.
- [13] Koppen C, Wouters K, Mathysen D, et al. Refractive and topographic results of benzalkonium chloride-assisted transepithelial crosslinking[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2012, 38(6):1000-1005.
- [14] Kissner A, Spoerl E, Jung R, et al. Pharmacological modification of the epithelial permeability by benzalkonium chloride in UVA/Riboflavin corneal collagen cross-linking[J]. *Curr Eye Res*,

- 2010,35(8):715-721.
- [15] 伍腾飞. HPLC 法测定兔角膜基质中核黄素含量的实验研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2013.
- [16] Leccisotti A, Islam T. Transepithelial corneal collagen cross-linking in keratoconus[J]. *J Refract Surg*,2010,26(12):942-948.
- [17] Filippello M, Stagni E, O'Brart D. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study[J]. *J Cataract Refract Surg*,2012,38(2):283-291.
- [18] Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, et al. Corneal cross-linking and safety issues[J]. *Open Ophthalmol J*,2011,5:14-16.
- [19] Boxer WB, Pinelli R, Ertan A, et al. Safety and efficacy of transepithelial crosslinking (C3-R/CXL)[J]. *J Cataract Refract Surg*,2010,36(1):186-189.
- [20] Scarcelli G, Kling S, Quijano E, et al. Brillouin microscopy of collagen crosslinking: noncontact depth-dependent analysis of corneal elastic modulus[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2013,54(2):1418-1425.
- [21] Meadows DL, Paugh JR, Joshi A, et al. A novel method to evaluate residence time in humans using a nonpenetrating fluorescent tracer[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2002,43(4):1032-1039.
- [22] Raiskup F, Spoerl E. Corneal cross-linking with hypo-osmolar riboflavin solution in thin keratoconic corneas[J]. *Am J Ophthalmol*,2011,152(1):28-32.
- [23] Rosetta P, Vinciguerra R, Romano MR, et al. Corneal collagen cross-linking window absorption[J]. *Cornea*,2013,32(4):550-554.
- [24] Raiskup F, Pinelli R, Spoerl E. Riboflavin osmolar modification for transepithelial corneal cross-linking[J]. *Curr Eye Res*,2012,37(3):234-238.
- [25] Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, et al. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking[J]. *J Cataract Refr Surg*,2010,36(1):114-120.
- [26] Hayes S, Boote C, Kamma-Lorger CS, et al. Riboflavin/UVA collagen cross-linking-induced changes in normal and keratoconus corneal stroma[J]. *PLoS One*,2011,6(8):e22405.
- [27] Hafezi F. Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea[J]. *Cornea*,2011,30(8):917-919.
- [28] 金男. 经上皮角膜胶原交联术治疗圆锥角膜的安全性、有效性研究[D]. 温州:温州医学院,2013.
- [29] Schumacher S, Mrochen M, Wernli J, et al. Optimization model for UV-riboflavin corneal cross-linking[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2012,53(2):762-769.
- [30] Dong Z, Zhou X. Collagen cross-linking with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket in rabbit corneas: 6-month results[J]. *Am J Ophthalmol*,2011,152(1):22-27.
- [31] Alio JL, Toffaha BT, Pinero DP, et al. Cross-linking in progressive keratoconus using an epithelial debridement or intrastromal pocket technique after previous corneal ring segment implantation[J]. *J Refract Surg*,2011,27(10):737-743.
- [32] 樊郑军. 应用离子导入法的核黄素紫外线角膜交联治疗 1 例[J]. *海军总医院学报*,2010,23(3):191-192.
- [33] 原越,张少斌,刘玉强,等. 跨上皮离子导入角膜胶原交联治疗玻璃体切割术后角膜上皮迁延不愈一例[J]. *中华眼底病杂志*,2014,30(2):207-208.
- [34] Stewart JM, Lee OT, Wong FF, et al. Cross-linking with ultraviolet-a and riboflavin reduces corneal permeability[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2011,52(12):9275-9278.
- [35] Tschopp M, Stary J, Frueh BE, et al. Impact of corneal cross-linking on drug penetration in an ex vivo porcine eye model[J]. *Cornea*,2012,31(3):222-226.
- [36] Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera[J]. *J Cataract Refract Surg*,2004,30(3):689-695.
- [37] Iseli HP, Spoerl E, Wiedemann P, et al. Efficacy and safety of blue-light scleral cross-linking[J]. *J Refract Surg*,2008,24(7):S752-S755.
- [38] Ambati J, Canakis CS, Miller JW, et al. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2000,41(5):1181-1185.
- [39] Cruysberg LPJ, Nuijts RMMA, Geroski DH, et al. The influence of intraocular pressure on the transscleral diffusion of high-molecular-weight compounds[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2005,46(10):3790-3794.
- [40] Nicoli S, Ferrari G, Quarta M, et al. Porcine sclera as a model of human sclera for in vitro transport experiments: histology, SEM, and comparative permeability[J]. *Mol Vis*,2009,15:259-266.
- [41] 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.
- [42] Miao H, Wu BD, Tao Y, et al. Diffusion of macromolecules through sclera[J]. *Acta Ophthalmol*,2013,91(1):e1-e6.
- [43] Choi S, Lee SC, Lee HJ, et al. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light[J]. *Laser Med Sci*,2013,28(5):1289-1296.
- [44] Zhang YL, Li ZW, Liu L, et al. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera [J]. *Biomed Res Int*,2014,2014:194204.
- [45] Wang MM, Zhang FJ, Qian XQ, et al. Regional Biomechanical properties of human sclera after cross-linking by riboflavin/ultraviolet A[J]. *J Refract Surg*,2012,28(10):723-728.
- [46] Stewart JM, Schultz DS, Lee OT, et al. Exogenous collagen cross-linking reduces scleral permeability: modeling the effects of age-related cross-link accumulation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2009,50(1):352-357.
- [47] 张亚丽. 巩膜核黄素/紫外线 A 胶原交联的实验研究[D]. 济南:山东大学医学院,2013.
- [48] Ziak L, Májek P, Hroboňová K, et al. Simultaneous determination of caffeine, caramel and riboflavin in cola-type and energy drinks by synchronous fluorescence technique coupled with partial least squares[J]. *Food Chem*,2014,159:282-286.
- [49] Kampik D, Ralla B, Keller S, et al. Influence of corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-a irradiation on excimer laser surgery[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2010,51(8):3929-3934.

(收稿日期:2014-10-29)

(本文编辑:毛文明)