

异种猪 - 兔角膜基质透镜植入可行性及安全性评价

张晶¹, 周春阳², 于嘉², 李辰¹, 周跃华^{1,2*}

¹北京茗视光眼科, 北京

²成都中医药大学附属银海眼科, 四川 成都

收稿日期: 2022年11月26日; 录用日期: 2022年12月16日; 发布日期: 2022年12月29日

摘要

目的: 本研究通过探究异种猪兔角膜基质微透镜作为植入材料的可行性, 为角膜微透镜的个性化定制提供了实验基础。方法: 取20只猪角膜基质微透镜植入新西兰白兔角膜基质囊袋中, 均选右眼为实验组, 一组10只眼联合角膜交联(CXL组), 另一组10只眼为非CXL组, 每个时间段(一周, 一个月, 3个月, 6个月和1年)每组取两只实验兔进行研究, 另选3只新西兰白兔作为空白对照组。裂隙灯检查兔眼角膜的透明度并照相, 病理组织切片分析HE染色、免疫组化及超微电镜结果, 观察术后1年猪兔异种角膜基质微透镜植入后的排斥反应和愈合反应, 探究异种微透镜作为基质植入材料的可行性。结果: 异种猪 - 兔角膜基质透镜植入CXL组和非CXL组术后1年内不同时间点分别观察结果显示: 除一例非CXL组兔眼角膜混浊外, 其余19例裂隙灯检查兔眼角膜透明, 未见新生血管; 眼前节照相可见透镜居中透明; HE染色植入的微透镜与周围基质组织之间的边界明显, 角膜全层未见明显炎性细胞浸润和新生血管形成; 免疫组化CXL组和非CXL组均未观察到I型胶原异常高表达。术后1年CXL组微透镜中I型胶原蛋白的表达较植床明显减少, 也较非CXL组微透镜中I型胶原蛋白表达少; 电镜结果两组植入的微透镜内的胶原纤维排列与对照组相似, 胶原纤维在分界处呈梭形且不规则。结论: 异种猪兔角膜微透镜植入可行, 猪兔角膜组织相容性好, 未见排斥反应。

关键词

角膜基质透镜植入, 角膜交联, 异种移植

The Safety and Feasibility of Xenogeneic Intrastromal Lenticule Inlay in a Pig-to-Rabbit

Jing Zhang¹, Chunyang Zhou², Jia Yu², Chen Li¹, Yuehua Zhou^{1,2*}

*通讯作者。

¹Beijing Ming Vision and Ophthalmology, Beijing

²Eye School of Chengdu University of TCM, Eye Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu Sichuan

Received: Nov. 26th, 2022; accepted: Dec. 16th, 2022; published: Dec. 29th, 2022

Abstract

Purpose: To evaluate the safety and feasibility of xenogeneic intrastromal lenticule inlay in a pig-to-rabbit with different interventions. **Method:** Twenty New Zealand white rabbits were divided evenly into experimental group and control group (10 rabbits each group). Corneal intrastromal pockets were made by femtosecond laser, and corneal stromal lenticules extracted from porcine eyes were implanted into rabbit eyes. Corneal collagen crosslinking (CXL group) and non-CXL treated (Non-CXL group) were all performed in right. Two rabbits from each group were euthanized at 1 week, 1 month, 3 months, 6 months and 1 year after surgery, respectively. Another 3 New Zealand white rabbits were selected as the control group. The structural changes of corneas after lenticule implantation were observed by hematoxylin-eosin staining and transmission electron microscopy. Corneal healing and rejection reactions were observed using immunohistochemistry and immunofluorescence staining. **Results:** The results showed that except for one case of xenogeneic porcine-rabbit corneal stromal lenticule was epinephelos in non CXL group, the cornea of the other 19 cases were transparent without cell infiltration by slit lamp examination. Corneal collagen was arranged regularly, the boundary between implanted lenticules and surrounding stroma was clear, and no inflammatory cell infiltration was detected under light microscopy. The collagen fibers at the junction were fusiform while fibers inside the lenticules are arranged regularly. Collagen I inside the implanted lenticules was arranged regularly, and there was no obviously high expression of collagen in both CXL and non-CXL groups. **Conclusion:** Pig-to-rabbit intrastromal lenticule xenotransplantation is safe and feasible. Implanted lenticules are compatible with surrounding tissue, with stable wound healing and no rejection reaction.

Keywords

Intrastromal Lenticule Inlay, Corneal Cross-Linking, Xenotransplantation

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

角膜基质微透镜植入联合角膜交联(Corneal collagen crosslinking, CXL)治疗圆锥角膜, 虽然能使薄角膜的圆锥角膜患者得到救治, 但并不能矫正高度的近视散光。如果植入的透镜能同时矫正高度近视散光, 圆锥角膜患者的视觉和生活质量将会大大提高。因此, 探索一种相容性好, 又能制作成不同屈光度的透镜值得进行挑战和尝试。

目前, 角膜微透镜材料除了来源于 SMILE 手术的人体角膜组织透镜, 还有处于研制阶段的人工材料透镜[1] [2]。人工材料透镜最早为树脂玻璃镜片, 后来发展为聚砜材料、还有目前处于临床试验阶段的水凝胶透镜和全氟聚醚透镜等。随着新型材料的应用, 越来越多不同材质的人工材料透镜开始运用到临床试验。由于人工材料透镜系人工制作, 可根据不同患者的屈光状态生产出不同度数和型号大小的透镜,

同时可批量生产以满足数量需求, 矫正屈光度的预测性好。如果患者术后屈光状态发生改变, 透镜可随时取出或更换[3]。但是由于对透镜材料和制作工艺的要求较高, 而且研发和生产成本昂贵[4]; 至今人工角膜的应用仍处于临床试验阶段, 还需要更多的证据证实其远期的矫治效果和安全性。

因此, 本研究提出采用异种猪-兔角膜基质透镜作为透镜材料的探索研究。异种角膜基质透镜是一种生物材料, 具有以下特点: 角膜基质的抗原性很小, 发生细胞免疫和体液免疫的概率都很低; 同时异种角膜基质是一种生物材质材料, 本身具有上皮增生和组织修复的能力, 与供体组织可以相互交融, 基质纤维结构可以重新长入, 同时角膜神经也可重新生长; 最重要的一点, 异种角膜可以根据要求设计不同大小, 不同厚度, 不同直径, 不同屈光度及散光, 个性化的定制适合受体的不同型号。根据上述优点, 如果异种角膜基质植入有望替代人体角膜基质植入, 其可根据不同患者的屈光状态个性化设计角膜植片大小和厚度, 同时矫正离焦与散光, 提高术后视觉质量。

但是要想把异种角膜基质微透镜应用于临床, 还需解决一些问题: **异种角膜基质植入后, 如何避免受主的排斥反应? 供片胶原组织的代谢, 是永存还是逐渐被受主所取代?** 以上这些问题唯有通过动物模型的建立及相关基础研究, 才能明确。本研究将猪角膜基质作为供体植入于兔角膜基质囊袋中, 通过建立两种不同干预方式下的猪-兔异种角膜基质植入模型, 观察比较不同干预措施下异种角膜微透镜植入后受体角膜伤口愈合反应、角膜形态改变、排斥反应, 以期获得最佳的异种角膜基质植入方案。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

实验动物选取成都中医药大学动物实验中心 23 只 8~10 周龄, 体重 2.0 千克到 3.0 千克之间的健康雌性新西兰大白兔以及 20 只 2 月龄, 体重 10~15 kg 健康小型猪。本研究中的所有动物, 均为发育正常的健康动物, 无过度肥胖、消瘦, 皮肤破损, 毛发异常。动物实验的具体操作过程已通过成都中医药大学学校伦理委员会审查, 实验流程符合学校相关规定及章程。

2.2. 实验分组

取 20 只猪角膜基质微透镜植入新西兰白兔角膜基质囊袋中, 均选右眼为实验组, 平均分为 2 组, 一组 10 只眼联合角膜交联(CXL 组), 另一组 10 只眼为非 CXL 组, 每个时间段(一周, 一个月, 3 个月, 6 个月和 1 年)每组取两只实验兔进行研究, 另选 3 只新西兰白兔作为空白对照组。

2.3. 实验方法

2.3.1. 供体猪角膜基质的准备

将取出的猪眼球置于平衡盐溶液中浸泡 10 分钟。将猪眼固定于眼球固定器上, 操作时保证无菌环境。Zeiss 显微镜下, 用机械刮匙刮除猪角膜上皮及前弹力层, 用角膜板层刀(Moria, 法国)制备厚度大约 200 μm 的猪角膜基质层, 即为需要植入的基质微透镜。将制备好的透镜置于无菌器皿内, 点数滴生理盐水浸泡保持湿润, 并遮盖防止污染。

2.3.2. 角膜基质透镜植入的手术方法

术前一周, 所有兔眼均采用左氧氟沙星滴眼液点双眼, 每日四次抗感染治疗。手术日采用腹腔注射 8% 的水合氯醛来麻醉新西兰白兔(每公斤体重 0.4~0.5 克麻醉剂)。在全身麻醉后, 然后将兔子放在手术台上并采用绑带法确保不动, 并选择右眼作为微透镜植入眼。

采用 Visumax 飞秒激光仪制作开口位于兔角膜上方的囊袋, 开口大小为 3 mm, 直径为 7.0 mm, 角膜帽厚度为 120 μm , 将核黄素(Avedro 公司, 美国)浸润过的猪角膜基质微透镜植入兔眼的角膜囊袋中,

平铺后用平衡液冲洗, 调整微透镜位置, 使其位于角膜中心。

CXL 组右侧兔眼继续采用快速跨上皮角膜交联的模式, 即先采用 0.25% 核黄素溶液裂解液(美国 Avedro 公司, 型号: VibeXRapid)浸润角膜组织 4 分钟, 再采用 0.25% 核黄素溶液(美国 Avedro 公司, 型号: VibeXRapid)浸润角膜 6 分钟。随后采用角膜交联机(美国 Avedro 公司, 型号: KXL)发出 365 nm 紫外光(45 mW/cm^2)按 1:1 时间比例间断持续照射 5 分钟 20 秒(总能量 7.2 J/cm^2)。非 CXL 组兔眼不采用角膜交联法。术毕, 双眼用典必殊眼膏涂眼一次。

术后常规用药: 术后一月内, 每日用 0.1% 氟米龙滴眼液点右眼每日四次抗非特异性炎症治疗、左氧氟沙星滴眼液点右眼(4 次/天)抗感染治疗。

2.4. 实验指标观察

2.4.1. 术后角膜评估

裂隙灯检查: 术后第 1 天、1 周、1 月、3 月、6 月及 1 年, 在裂隙灯下分别观察双眼眼前段情况, 评估实验眼镜片是否混浊、双眼囊袋植床的透明度, 评估双眼角膜水肿、血管化程度, 计算角膜排斥指数。

眼前段照相: 术后第 1 天、1 周、1 月、3 月、6 月及 1 年, 拍摄眼前段照相。

2.4.2. 病理切片

术后各观察点(分别为术后 1 周、1 月、3 月、6 月及 1 年), 每个时间点按上述处死动物方法分批处死新西兰兔, 每次每组两只兔子。

取兔眼球后, 首先, 采用眼科剪将全层角膜沿角膜缘环形剪开, 平衡盐溶液冲洗去掉血液及异物, 浸泡于甲醛固定液中。下一步, 对已固定好的角膜组织进行石蜡包埋, 之后组织切片(按照 $5 \mu\text{m}$ 厚度), 切片时注意切到角膜基质透镜植入的部分选为标本使用。制片完成后保存于 4°C 冰箱, 用于 HE 染色和免疫组化。HE 染色: 主要观察角膜基质内胶原纤维的排列形式是否与空白对照组一致。角膜基质内有无成纤维细胞, 植入的猪角膜透镜与周边的兔角膜基质交界处细胞形态与胶原的排列, 有无炎症细胞浸润等。

免疫组化: 本研究中分别检测两组角膜 I 型胶原蛋白的水平分析愈合反应。I 型胶原蛋白参与细胞黏附和增殖过程, 与生长和组织修复有关。

2.4.3. 透射电镜

先对本标本采用 3% 戊二醛预固定, 然后用 1% 四氧化锇固定。第二步, 脱水: 丙酮逐级脱水, 脱水机浓度梯度为 30% → 50% → 70% → 80% → 90% → 95% → 100% (100% 浓度变化 3 次); 浸润包埋: 将脱水后的样品连续通过脱水剂和环氧树脂(型号 Epon812), 比例为 3:1、1:1、1:3, 每步 30~60 分钟插入浸润过的样品块入适当的模具。用嵌入溶液填充它。然后将其加热并聚合以形成固体基质(嵌入块), 为下一个主题做好准备。超薄切片制备: 用超薄切片机制备约 50 nm 厚的超薄切片后, 漂浮在刀槽液面上。然后鱼去铜网。双染法: 先用醋酸双氧铀染色, 再用柠檬酸铅染色。室温染色 15~20 分钟, 透射电镜 JEM-1400PLUS 观察。

3. 实验结果

3.1. 兔眼表情况及角膜透明度观察

以术前所有实验兔眼表的情况作为阴性对照, 观察术后 CXL 组和非 CXL 组兔实验眼、对照眼的表情况, 观察有无眼前节刺激症状、结膜有无充血水肿、是否存在炎症反应。

术后 1 周内, 所有实验兔在观察时间内均未见眼睑痉挛(0 症状), 未见结膜充血水肿(0 症状), 未见

炎症反应(0 症状)。因此, 本研究显示猪-兔异种角膜透镜植入术后眼前节情况良好, 无明显刺激症状, 术源性不良反应术后一周即完全消退。

术后 1 年的观测时间内, 19 只实验眼透镜植片均如术前透明, 无排斥, 仅非 CXL 组 1 眼在术后 3 个月时出现角膜的混浊, 并且有新生血管(图 1)。术后一周内双眼角膜均可见轻度水肿, 少量角膜上皮缺损, 一周后恢复。在对所有兔眼排斥反应的评估中, 术后 1 年内, 19 只实验兔眼未达到排斥反应的水平。仅 1 只兔眼出现排斥反应。

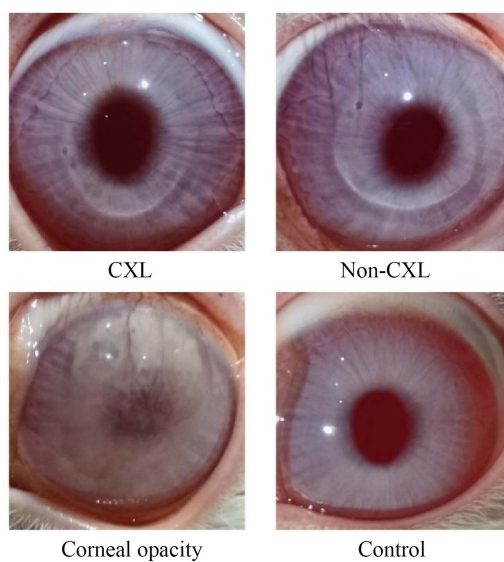


Figure 1. Images of corneas after xenogeneic intrastromal lenticule inlay

图 1. 猪角膜基质微透镜植入新西兰白兔角膜基质层术后眼前节照像

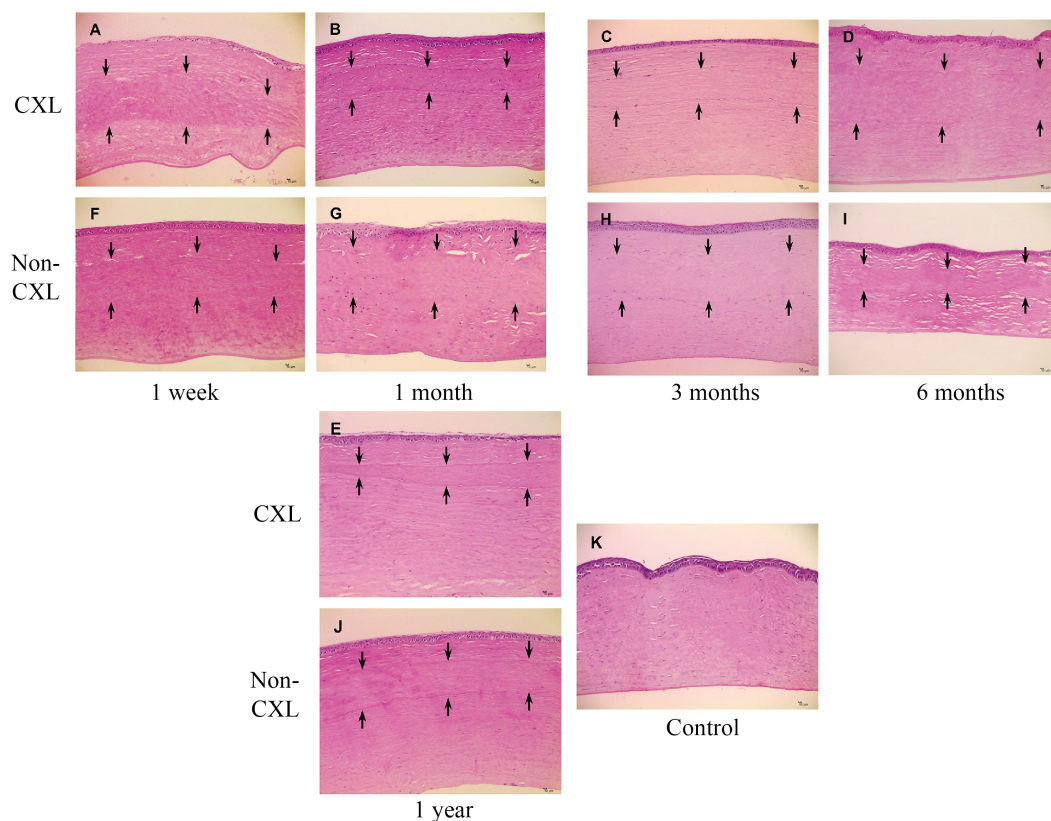
上方分别为猪-兔角膜基质微透镜植入联合角膜交联眼和猪-兔角膜基质微透镜植入眼, 可见猪植片位于兔角膜中央, 植片清亮透明, 无细胞浸润, 无新生血管。

下方左图为术后 3 月猪-兔角膜基质微透镜植入眼中唯一 1 例角膜混浊图片, 可见角膜混浊, 虹膜组织窥不清, 角膜上有新生血管长入; 右图为空白对照组。

3.2. HE 染色

术后第 1 周、1 月、3 月、6 月和 1 年, 以对照眼作为阴性对照, 分别对 CXL 组、非 CXL 组双眼兔角膜切片进行 HE 染色。观察两组不同干预手段的透镜植入组的植片是否移位、溶解, 兔角膜基质有无纤维排列紊乱以及胶原纤维肿胀断裂, 全层角膜有无炎症细胞浸润, 有成纤维细胞的大量增殖, 有无新生血管出现。

术后一年内 HE 染色可见角膜基质胶原纤维排列规则。植入的微透镜与周围基质组织之间的边界明显, 但交界处的胶原排列稍不规则。角膜全层未见明显炎症细胞浸润和新生血管形成(图 2)。术后 1 个月, 植入的微透镜与周围组织的交界处以及微透镜内有少量成纤维细胞。随着角膜基质微透镜植入时间的延长, 成纤维细胞的数量逐渐减少, 术后 6 个月微透镜与周围组织的交界处几乎没有成纤维细胞出现。在光学显微镜下, CXL 组和非 CXL 组的兔角膜结构大致相同, 无明显差异(图 2)。植入的异种猪-兔角膜微透镜与兔角膜基质相容性好, 无明显溶解或排斥反应。



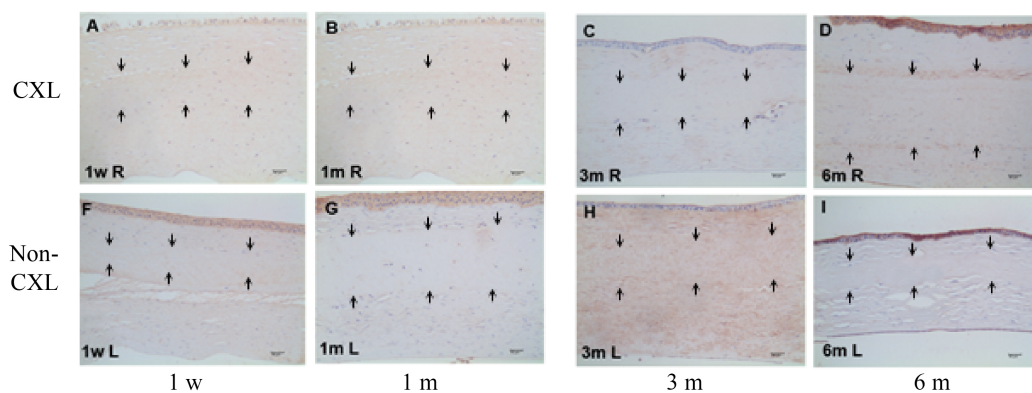
A-E 为微透镜植入联合交联法，分别为术后 1 周、1 月、3 月、6 月及 1 年的 HE 染色结果。F-J 为单纯微透镜植入术后 1 周、1 月、3 月、6 月及 1 年的 HE 染色结果，K 为空白对照组。

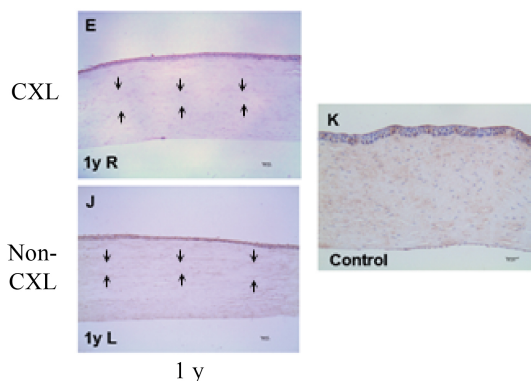
Figure 2. Hematoxylin-Eosin staining images postoperatively

图 2. 猪角膜微透镜植入新西兰白兔角膜基质后 HE 染色结果

3.3. 免疫组化

在术后不同时间点，分析兔角膜基质内植入角膜微透镜后全层 I 型胶原蛋白的表达。植入的猪角膜微透镜内的胶原纤维排列紧密有序。CXL 组和非 CXL 组均未观察到 I 型胶原异常高表达。来源于猪角膜的基质内微透镜和周围的兔角膜组织之间界限清晰。术后 1 年 A 组(CXL 组)微透镜中 I 型胶原蛋白的表达较植床明显减少，也较 B 组(非 CXL 组)微透镜中 I 型胶原蛋白表达少。交界处 I 型胶原蛋白未见高表达，植床的 I 型胶原蛋白表达和胶原纤维排列与空白对照眼相似(图 3)。



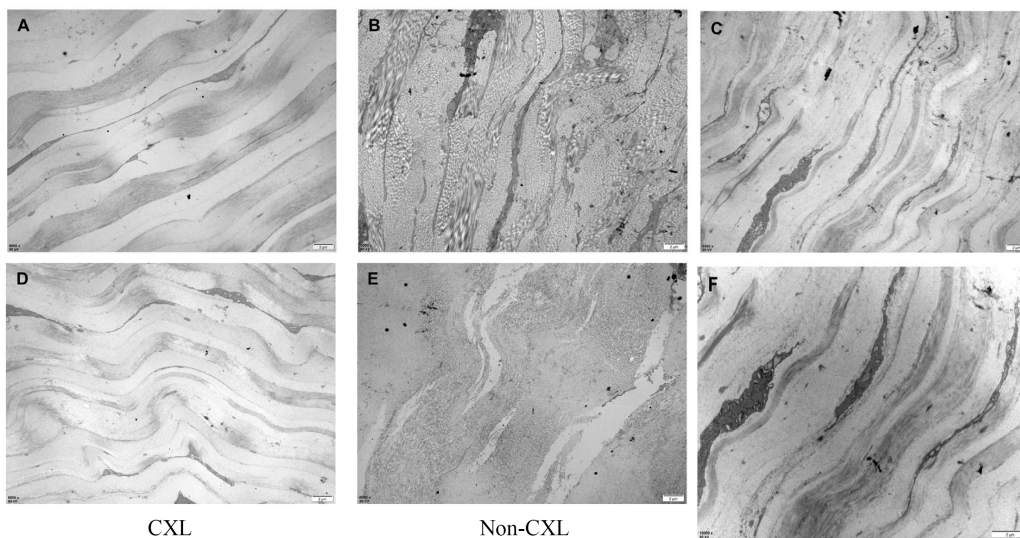


A-E 为微透镜植入联合交联法，分别为术后 1 周、1 月、3 月、6 月及 1 年的 HE 染色结果。F-J 为单纯微透镜植入法术后 1 周、1 月、3 月、6 月及 1 年的 HE 染色结果，K 为空白对照组。

Figure 3. Immunohistochemical Staining light microscopy images postoperatively
图 3. 猪角膜微透镜植入新西兰白兔角膜基质免疫组化结果

3.4. 电镜结果

透射电镜下观察兔角膜基质内猪微透镜植入的角膜超微结构。植入的微透镜与周围基质之间的边界清晰可见。植入的微透镜内的胶原纤维排列(图 4A, 图 4B)与对照组相似。胶原纤维在分界处呈梭形且不规则(图 4D, 图 4E), 与空白对照组不同, 空白对照组角膜全层有组织的胶原纤维(图 4C, 图 4F)。



A 和 B 显示植入的猪微透镜内胶原纤维的排列。D 和 E 显示植入的猪微透镜与兔基质组织的交界处有胶原纤维排列。C 和 F 为空白对照组。

Figure 4. Transmission electron microscopy images postoperatively
图 4. 猪角膜微透镜植入新西兰白兔角膜基质透射电镜图像

3.5. 并发症

在 20 只新西兰大白兔(实验组)中仅观察到 1 例角膜混浊。为探讨角膜混浊的原因, 取标本后对兔角膜进行光镜、电镜和免疫荧光染色。结果显示, 植入部位有大量炎性细胞浸润, 大部分植入的猪角膜微透镜溶解消失(图 5)。

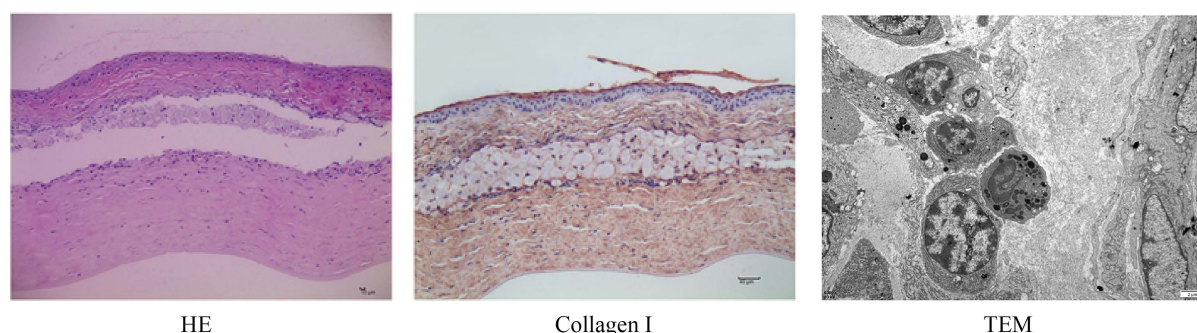


Figure 5. One case of corneal opacity
图 5.1 例混浊角膜的 HE、免疫组化和电镜结果

4. 讨论

人工合成或生物材料植入角膜基质层可有效改变人眼的屈光力，也是圆锥角膜、远视、老视和角膜穿孔的潜在治疗方法[5]。在飞秒激光出现之前，研究者采用机械显微角膜刀对受体的角膜进行板层角膜切除术制作囊袋，导致屈光效果不理想。在飞秒激光的辅助下，可以制作用于角膜微透镜植入的基质内袋，它比显微角膜刀制作的囊袋稳定性更好[6]。

微透镜材料的选择是角膜微透镜植入成功的关键因素之一。人工合成的材料可以根据不同的折射状态大规模生产。然而，人工角膜透镜植入可能会导致脂质沉积、角膜炎、溃疡、角膜血管化和生物相容性不良等问题。生产具有较高生物相容性的角膜微透镜的技术成本巨大，其长期安全性尚不清楚[7] [8]。目前有几项动物和临床研究已经证实，采用 SMILE 辅助的自体 and 同种异体角膜基质内微透镜植入可用于矫正远视和老视，以及治疗圆锥角膜、角膜扩张和穿孔[9] [10] [11] [12] [13]。然而，自体或异体角膜移植供体不能满足大规模的需求。而且，由于角膜组织不适合长期保存，供体和受体需要预先匹配，并尽快完成移植。因此，使用异种角膜基质微透镜植入可能是一种解决方案。以往的研究表明，猪角膜可能是异种板层角膜移植的理想来源[14] [15] [16]。基于以上几点，我们的研究提出了使用异种角膜基质内微透镜植入来扩大微透镜的来源，用于治疗屈光不正和其他眼表疾病，如圆锥角膜和角膜穿孔等。

在本研究中，我们首次在猪-兔模型中进行不同干预方式下的异种角膜基质内微透镜体植入的动物模型。在成功建立异种动物模型后，我们评估了该动物模型的可行性和安全性，重点是术后不同时间点的免疫组化、超微结构变化以及伤口愈合反应。结果表明，植入的微透镜与周围角膜基质相容性好，伤口愈合反应轻微，无明显排斥反应。

HE 染色和免疫组化能够对兔角膜标本在猪角膜透镜植入后发生的病理学变化进行对比和分析。我们首先观察对照组的正常兔角膜，对角膜上皮层与基底膜的细胞结构进行分析。然后再对本实验中两组植入猪角膜微透镜的兔角膜进行 HE 染色分析，观察联合紫外光/核黄素角膜胶原交联处理的角膜在细胞的结构上的变化，角膜上皮层与基底膜之间的连接的变化，观察角膜基质水肿、炎细胞浸润程度与位置。CD11b 是高度糖基化的 I 型跨膜糖蛋白，在介导细胞间黏附作用中起到了重要的作用。在角膜组织中，CD11b 能够合成角膜基质层中的胶原蛋白，并能够维持这些胶原成分，保持角膜的透明度与机械强度。本研究中，通过观察 2 个实验组是否会对角膜基质细胞造成损伤，损伤的程度及情况如何，对两种不同方式的异种角膜为微透镜植入联合紫外光核黄素角膜胶原交联的安全性进行分析和评估。

我们的结果显示，在术后不同时间点，光学显微镜下未检测到大量炎性细胞浸润，而在微透镜植入的早期阶段出现了微弱的纤维化反应。免疫组化染色显示，微透镜植入早期有轻微的炎症反应和纤维化反应，以 CD11b 和 α -SMA 为标志，但伤口愈合反应逐渐消失。移植早期发现的伤口愈合反应主要发生

在植入的异种微透镜与受体角膜基质周围组织的交界处。这些结果与之前关于自体 and 同种异体移植的研究结果相似[11] [12] [13]。早期纤维化反应的可能是, 由于制作角膜囊袋的手术过程导致受体角膜组织切削界面的损伤。虽然损伤不可避免, 但与用于制作移植板层角膜移植的旧技术相比, 伤口愈合反应已大大降低[17]。在飞秒激光的帮助下, 目前仅需一个小切口就可以形成角膜基质囊袋, 所以引起的伤口愈合反应程度较小且只在早期出现。

角膜交联技术是一种提高角膜组织生物力学稳定性的有效技术, 被广泛应用于圆锥角膜的治疗[18] [19]。在以往兔动物模型建立中, 与未交联治疗的角膜基质微透镜相比, 联合 CXL 的角膜基质微透镜回退更少, 恢复时间更短[20]。在本研究中, 我们证实 CXL 是一种安全可行的异种角膜基质内微透镜植入的联合治疗方法。此外, 我们还发现联合角膜交联可以减少早期炎症反应, 但同时 CXL 组的细胞凋亡相对较强。进一步的研究需要更大的样本量来确认联合 CXL 所引起的角膜愈合反应的变化, 同时需进一步研究来证实联合 CXL 后生物力学稳定性的改善。

实验组 20 只兔中仅有 1 只兔眼出现角膜混浊。光镜、电镜和免疫荧光染色结果表明, 角膜有严重的炎症反应, 并且植入的透镜组织溶解大部分。这可能是由于供者角膜携带的感染源所致。在我们的研究中, 从新鲜猪眼睛中提取用于异种移植的角膜基质微透镜, 并立即植入兔子的眼睛中。为了减少供体角膜微透镜引起感染的可能性, 猪角膜基质微透镜取出后应当做脱细胞处理, 即冷冻于-80 摄氏度一段时间[21] [22]。另一种可能性是, 感染是在手术过程或术后饲养过程中引起的。手术过程中要加强无菌操作, 动物饲养与喂食过程中要注意操作规范。

5. 结论

总之, 异种猪-兔角膜基质微透镜植入联合角膜交联是安全可行的, 猪角膜基质微透镜对兔角膜基质的生物相容性好, 可以作为角膜基质替代物。脱细胞的猪角膜基质未来可应用于异体角膜微透镜的植入治疗圆锥角膜, 角膜扩张等疾病, 甚至可以根据需求制作不同屈光度的角膜基质微透镜治疗屈光不正。进一步研究需要更大样本量和更长时间的观察来确定其长期安全性和有效性。

参考文献

- [1] Izquierdo Jr., L., Rodríguez, A.M., Sarquis, R.A., Altamirano, D. and Henriquez, M.A. (2022) Intracorneal Circular Ring Implant with Femtosecond Laser: Pocket versus Tunnel. *European Journal of Ophthalmology*, **32**, 176-182. <https://doi.org/10.1177/1120672121994729>
- [2] Xie, R.Z., Evans, M.D. and Bojarski, B. (2006) Two-Year Preclinical Testing of Perfluoro-Polyether Polymer as a Corneal Inlay. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **47**, 574-581. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0872>
- [3] Yilmaz, O.F., Alagoz, N. and Pekel, G. (2011) Intracorneal Inlay to Correct Presbyopia: Long-Term Results. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, **37**, 1275-1281. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2011.01.027>
- [4] Qin, S., Zheng, S., Qi, B., Guo, R. and Hou, G. (2019) Decellularized Human Stromal Lenticules Combine with Corneal Epithelial-Like Cells: A New Resource for Corneal Tissue Engineering. *Stem Cells International*, **2019**, Article ID: 4252514. <https://doi.org/10.1155/2019/4252514>
- [5] Riau, A.K., Liu, Y.C., Yam, G.H.F. and Mehta, J.S. (2020) Stromal Keratophakia: Corneal Inlay Implantation. *Progress in Retinal and Eye Research*, **75**, Article ID: 100780. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100780>
- [6] Liu, R., Zhao, J., Xu, Y., et al. (2015) Femtosecond Laser-Assisted Corneal Small Incision Allogenic Intrastromal Lenticule Implantation in Monkeys: A Pilot Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**, 3715-3720. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15296>
- [7] Zhang, B., Xue, Q., Li, J.T., et al. (2019) 3D Bioprinting for Artificial Cornea: Challenges and Perspectives. *Medical Engineering & Physics*, **71**, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2019.05.002>
- [8] Sinha, M. and Gupte, T. (2018) Design and Evaluation of Artificial Cornea with Core-Skirt Design Using Polyhydroxyethyl Methacrylate and Graphite. *International Ophthalmology*, **38**, 1225-1233. <https://doi.org/10.1007/s10792-017-0586-3>

- [9] Nemcokova, M., Dite, J., Klimesova, Y.M., Netukova, M. and Studeny, P. (2022) Preservation of Corneal Stromal Lenticule: Review. *Cell and Tissue Banking*, **23**, 627-639. <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09990-0>
- [10] Zhang, T., Sun, Y., Liu, M., et al. (2015) Femtosecond Laser-Assisted Endokeratophakia Using Allogeneic Corneal Lenticule in a Rabbit Model. *Journal of Refractive Surgery*, **31**, 775-782. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20151021-07>
- [11] Zhao, J., Shen, Y., Tian, M., et al. (2017) Corneal Lenticule Allotransplantation after Femtosecond Laser Small Incision Lenticule Extraction in Rabbits. *Cornea*, **36**, 222-228. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001076>
- [12] Zhao, J., Liu, R., Shen, Y., et al. (2020) Two-Year Observation of Morphologic and Histopathologic Changes in the Monkey Cornea Following Small Incision Allogeneic Lenticule Implantation. *Experimental Eye Research*, **192**, Article ID: 107935. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.107935>
- [13] Liu, S., Wei, R., Choi, J., Li, M. and Zhou, X. (2021) Visual Outcomes after Implantation of Allogeneic Lenticule in a 100-m Pocket for Moderate to High Hyperopia: 2-Year Results. *Journal of Refractive Surgery*, **37**, 734-740. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20210730-02>
- [14] Choi, H.J., Kim, M.K., Lee, H.J., et al. (2011) Efficacy of Pig-to-Rhesus Lamellar Corneal Xenotransplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **52**, 6643-6650. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7273>
- [15] Li, A.P., Pan, Z.Q., Jie, Y., Sun, Y.J., Luo, F. and Wang, L. (2011) Comparison of Immunogenicity and Porcine-to-Rhesus Lamellar Corneal Xenografts Survival between Fresh Preserved and Dehydrated Porcine Corneas. *Xenotransplantation*, **18**, 46-55. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2011.00626.x>
- [16] Hara, H. and Cooper, D.K.C. (2011) Xenotransplantation—The Future of Corneal Transplantation? *Cornea*, **30**, 371-378. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181f237ef>
- [17] Liu, S., Zhang, X. and Zhou, X. (2022) Toric Lenticule Implantation for Correction of Hyperopia and Astigmatism Following Small Incision Lenticule Intrastromal Keratoplasty with the Triple Marking Method. *Journal of Refractive Surgery*, **38**, 82-88. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20211117-01>
- [18] Randleman, J.B., Khandelwal, S.S. and Hafezi, F. (2015) Corneal Cross-Linking. *Survey of Ophthalmology*, **60**, 509-523. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2015.04.002>
- [19] Ng, A.L.K., Chan, T.C.Y., Cheng, G.P.M., et al. (2016) Comparison of the Early Clinical Outcomes between Combined Small-Incision Lenticule Extraction and Collagen Cross-Linking versus SMILE for Myopia. *Journal of Ophthalmology*, **2016**, Article ID: 2672980. <https://doi.org/10.1155/2016/2672980>
- [20] Damgaard, I.B., Liu, Y.C., Riau, A.K., et al. (2019) Corneal Remodelling and Topography Following Biological Inlay Implantation with Combined Crosslinking in a Rabbit Model. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 4479. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39617-0>
- [21] Dupps, W.J. (2018) Intrastromal Lenticule Extraction for Refractive Correction: Can It Raise the Tide for Refractive Surgery? *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, **44**, 1059-1061. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2018.07.024>
- [22] Sun, Y., Zhang, T., Zhou, Y., et al. (2016) Reversible Femtosecond Laser-Assisted Endokeratophakia Using Cryopreserved Allogeneic Corneal Lenticule. *Journal of Refractive Surgery*, **32**, 569-576. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20160523-02>