

# 共聚焦显微镜下干眼症患者角膜形态变化的诊断价值初探

刘庆言<sup>1,2</sup> 陈晓宇<sup>3</sup> 李晶<sup>2</sup> 杨阳<sup>2</sup> 柯根杰<sup>1</sup>

**摘要** 目的 应用共聚焦显微镜观察干眼症患者的角膜形态改变。方法 运用日本 Nidek 公司共聚焦显微镜 (Confoscan 4.0) 对正常人群和干眼症患者各 50 例 (100 只眼) 的中央区角膜上皮细胞的密度和异型性、上皮神经纤维形态、朗格汉斯细胞的浸润和内皮细胞密度进行观察,并对结果进行统计学分析。结果 共聚焦显微镜观察下,干眼症患者和正常人群的角膜中央区表层鳞状上皮细胞、翼状上皮细胞、上皮基底层的细胞密度比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。干眼症患者的中央区角膜上皮细胞异型性增多 ( $t = 14.3$ ,  $P < 0.01$ ),少量细胞呈激活状态,上皮神经纤维明显增粗,走行紊乱,伴朗格汉斯细胞浸润,内皮细胞计数和形态差异无统计学意义。结论 共聚焦显微镜可以从细胞层面实时、无创观测干眼症患者的角膜形态的改变,根据角膜上皮细胞细胞密度和异型性、上皮神经纤维形态、朗格汉斯细胞浸润等病理变化直观识别和诊断干眼症。

**关键词** 共聚焦显微镜;干眼症;角膜上皮细胞;神经纤维;朗格汉斯细胞

中图分类号 R 777.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-1025-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.018

干眼症是由于泪液本身性质、数量或流体力学异常而引起的泪膜不稳定和(或)眼表损害,从而导致眼部不适及视功能受损的一类临床症状<sup>[1]</sup>,是眼科常见病,近年来逐渐引起眼科医师的重视。据统计,全世界可能有 30%~50% 的人群患有不同程度的干眼<sup>[2]</sup>,我国的发病率在 21%~30%<sup>[1]</sup>,是患者来眼科就诊最常见的原因之一,现代人的生活方式,经常使用手机、电脑、空调等,导致干眼症的发病率越来越高<sup>[3]</sup>,以往对干眼的诊查手段主要有角膜染色检查、泪液分泌检测、干眼仪检查等从宏观

角度观察患者的眼表改变<sup>[4]</sup>。共聚焦显微镜是近来应用于临床上的眼科设备之一,其可对活体角膜进行无创、实时的观察<sup>[5]</sup>,分辨率高至 1  $\mu\text{m}$ 。共聚焦显微镜能够直接观察到角膜内各种细胞的形态结构和改变,得到类似病理切片的图像,可以在细胞水平观察活体角膜的病理生理情况,对角膜疾病的诊断和治疗有很大的帮助。该研究选取门诊各 50 例 (100 只眼) 干眼患者与正常人群,利用共聚焦显微镜对比观察角膜形态学改变,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取 2016 年 6 月~9 月就诊于眼科门诊的干眼症患者和正常人群各 50 例 (100 只眼),分为干眼组与正常组进行对比。干眼症患者纳入标准:① 具有明显干眼症状中的至少一项,如:眼部干燥感、异物感、灼热感、眼红、畏光、流泪、视疲劳、视物模糊、烟雾环境耐受差;② 泪膜破裂时间 (break up time of tear film, BUT)  $< 10$  s;③ 泪液分泌试验 (schirmer i test, SIt)  $< 10$  mm/5 min。所有患者经过普通视力检查、裂隙灯眼前节检查和问诊后,排除先天性无泪腺、自身免疫性及内分泌疾病、全身结缔组织患者,排除具有眼部手术史 (如:白内障、青光眼、近视矫正手术等)、外伤史患者,排除存在眼部活动性病变 (包括炎症、圆锥角膜等) 者,排除眼底病患者、小睑裂及眼窝深陷不能良好配合完成检查者。正常对照组纳入标准:① 无上述描述的各项干眼症状;② BUT  $> 10$  s;③ SIt  $> 10$  mm/5 min。所有检查向患者详细告知并取得其同意。

## 1.2 共聚焦显微镜检查

**1.2.1 设备及技术参数** 共聚焦显微镜 (Confocal microscopy 4.0, 日本 Nidek 公司),放大 1 000 倍;水浸式物镜的扫描范围为 340  $\mu\text{m} \times 255$   $\mu\text{m}$ ;景深 8  $\mu\text{m}$ ,侧像分辨率为 1~2  $\mu\text{m}$ ,物镜与角膜的距离为 1.98  $\mu\text{m}$ ;扫描频率为 20 Hz;每次扫描 350 幅图。扫描厚度 700  $\mu\text{m}$ ,背景相对暗度为 10 dB,确保物镜有恒定的扫描速度。

**1.2.2 操作步骤** 爱尔凯因滴眼液点眼进行表面麻醉,置开睑器。患者下颌及前额固定于检查托架

2017-02-09 接收

基金项目:安徽省公益性技术应用研究联动计划项目 (编号:15011d04025)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学附属医院眼科,合肥 230001

<sup>2</sup>安徽省第二人民医院眼科,合肥 230041

<sup>3</sup>安徽医科大学组织胚胎学教研室,合肥 230032

作者简介:刘庆言,男,医师,硕士研究生;

柯根杰,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: kegenjie@163.com

上。在 40 倍水浸式圆锥状物镜表面涂卡波姆凝胶，将镜头轻缓前移，使凝胶与角膜中央区接触，镜头与角膜间的距离为 1.98 mm，当显示器视屏中央清晰显示中央区角膜细胞时摄录图像，筛选需要的图像存盘。

**1.2.3 图像分析** 应用 Z-scan 获取同等厚度下所拍摄的图像，在设备自带的 NAVIS 图像分析软件统计中央区角膜上皮细胞、内皮细胞密度及细胞异型性比例，并对上皮神经纤维的形态及朗格汉斯细胞浸润进行观察分析，为防止计数误差，采取两名医师双盲检查。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行分析，数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。对两组中央区角膜上皮细胞密度和异型性、内皮细胞密度进行统计分析，观察上皮神经纤维形态和朗格汉斯细胞浸润，将两组数值之间统计学差异应用配对 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 患者的基本情况** 干眼组和正常组各男 10 例，女 40 例，干眼组年龄 40 ~ 52 (44.80 ± 3.22) 岁，正常组年龄 38 ~ 50 (43.90 ± 4.51) 岁，两组年龄差异无统计学意义。与正常组比较，干眼组 BUT 及 SIt

明显缩短 (*P* < 0.01)，见表 1。

表 1 干眼组与正常组患者的临床资料 (*n* = 100  $\bar{x} \pm s$ )

项目	干眼组	正常组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄 (岁)	44.80 ± 3.22	43.90 ± 4.51	1.62	0.11
BUT (s)	6.52 ± 1.48	12.82 ± 1.65	-28.42	<0.01
SIt (mm/5 min)	4.81 ± 1.24	13.32 ± 2.02	-35.90	<0.01

**2.2 角膜上皮细胞变化** 干眼组中央区角膜上皮细胞，包括表层鳞状上皮细胞、翼状上皮细胞、上皮基底层细胞的细胞密度均较正常组明显下降 (*P* < 0.05)，干眼组细胞异型性比例明显较正常组增高 (*P* < 0.01)，在图片放大 1 000 倍下进行细胞计数，见表 2。

**2.3 镜下病理表现** 共聚焦显微镜观察可见干眼组中央区角膜上皮各层上皮细胞排列紊乱，表层鳞状上皮细胞排列呈疏松的蜂窝状，细胞核较大，明显突出，反光增强。部分细胞呈现激活状态，可见异常发亮的脱落细胞，见图 1A1~3、B1~3。

干眼组患者的中央区角膜上皮神经纤维明显增粗，走行紊乱，排列密集或疏松，分叉增多，部分神经纤维的连续性欠佳，可见中央区上皮神经纤维处伴有朗格汉斯细胞浸润，见图 1A4、B4。

正常组与干眼组患者的中央区角膜内皮细胞密度和形态未见明显差异，见图 1A5、B5。

表 2 干眼组与正常组中央区角膜上皮各层细胞密度对比 (*n* = 100  $\bar{x} \pm s$ )

项目	干眼组	正常组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
表层鳞状上皮细胞 (个/mm <sup>2</sup> )	986.00 ± 282.00	1 327.00 ± 302.00	-8.25	<0.01
翼状上皮细胞 (个/mm <sup>2</sup> )	4 820.00 ± 420.00	5 018.00 ± 281.00	-3.92	<0.01
上皮基底层细胞 (个/mm <sup>2</sup> )	5 890.00 ± 821.00	6 211.00 ± 1 102.00	-2.34	0.02
细胞异型性比例 (%)	23.02 ± 12.01	5.32 ± 2.83	14.36	<0.01

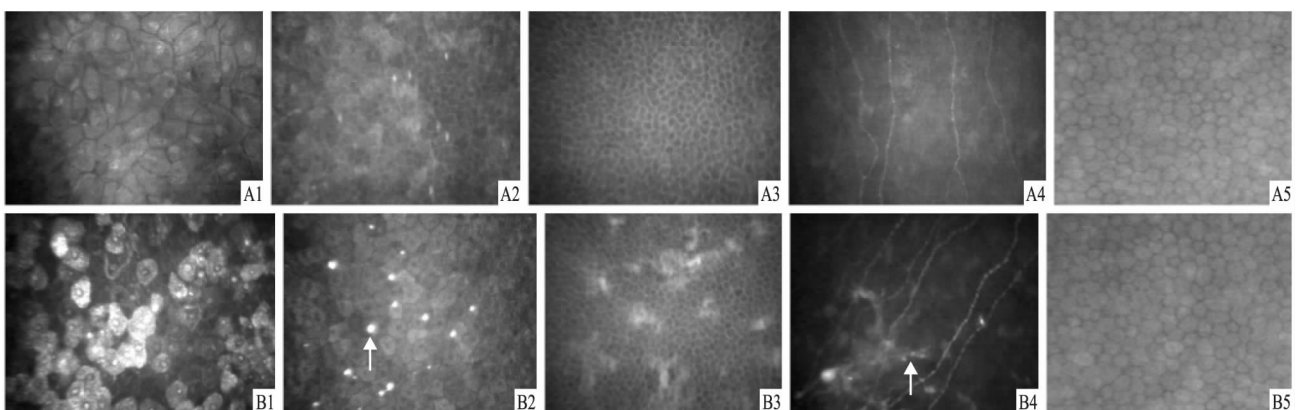


图 1 正常组和干眼组角膜各层在共聚焦显微镜下的表现 ×1 000

A: 正常组; B: 干眼组; 1: 中央区角膜上皮鳞状层; 2: 翼状层; 3: 基底层; 4: 中央区角膜上皮神经纤维; 5: 中央区角膜内皮细胞; B2 箭头所指处为激活细胞; B4 箭头所指处可见朗格汉斯细胞浸润

### 3 讨论

共聚焦显微镜是将裂隙光源聚焦到活体角膜很小的一个体积范围内,通过在 Z-scan 定位下快速扫描,实现对细胞和亚细胞结构进行实时观察<sup>[6]</sup>,在活体细胞水平直接观察角膜组织,被广泛应用于各种角膜病变,如感染性角膜病变、营养不良性角膜病变、角膜沉积物、上皮病变、内皮病变等<sup>[5]</sup>。

共聚焦显微镜的使用使得干眼检查手段更为丰富,从细胞层面实现了对干眼的形态结构的直观观察,对干眼症的诊断、治疗和病因的探索提供了新的手段。本研究利用共聚焦显微镜的实时、无创的优势对干眼症患者角膜形态学进行观察,从而进一步探索干眼病角膜病理生理变化。

正常的表层上皮细胞排列疏松,边界清晰,呈多角形,以六边形为主,胞核明亮;翼状细胞呈多角形,细胞向侧面延伸变细,形似翼状,边界清晰,胞核反光较弱。基底细胞近似圆形,排列紧密,边界明亮,胞质和胞核反光弱。本研究显示,干眼组患者角膜中央区各层上皮细胞密度均较正常组明显减少,异型细胞比例增加明显,且差异有统计学意义,部分细胞呈现激活状态,这种表现在其他感染性角膜疾病中也会出现<sup>[7]</sup>,并非干眼症特异性改变。干眼症患者角膜上皮细胞密度减少、形态异常会造成上皮细胞过早或过多凋亡,与其慢性非特异性炎症有关,而上皮细胞的凋亡会造成患者角膜表面微绒毛减少,对泪膜的稳定性构成影响,泪膜由黏蛋白层、水液层和脂质层组成,形成一光滑的界面,对角结膜有保护、营养和润滑的作用,其最外层为睑板腺分泌的脂质层,在睑缘形成疏水屏障防止泪液外溢以及浆液性泪液蒸发<sup>[8]</sup>,泪膜层在瞬目后最厚,之后逐渐变薄并破裂,但如果缩短,就会出现干涩、异物感等相应临床症状,因为泪膜也参与屈光,这也能解释干眼症患者为何在长时间驾车、注视电子产品等状态下,会出现视物不清等症状。

角膜含有体内最密集神经末梢组织,其敏感性是皮肤的 200~300 倍<sup>[9]</sup>,三叉神经眼支的感觉神经纤维通过睫状长神经到达角膜缘,在此形成环形神经丛,在进入角膜后,神经干发出分支呈放射状分布于角膜基质层。神经纤维失去髓鞘向前穿行形成上皮神经丛,丰富的神经支配使得角膜知觉敏锐。同时,三叉神经和面神经介导泪腺分泌反射并表达泪腺源细胞因子,角膜神经在调节角膜知觉、维持角膜上皮细胞的正常生理学功能等方面起到了非常重

要的作用,角膜神经纤维丛的检查对探索许多眼病和神经病变有着重要意义,正常人角膜上皮神经排列较规则,平行走行,弯曲度小,少见分支,纤维之间的交联很少,而干眼组患者上皮神经纤维走行紊乱,分叉增多,部分呈现扭曲形态,甚至部分神经连续性中断,这种形态上的异常表现,是神经退行性改变的结果<sup>[10]</sup>,分叉增多也可以认为是一种神经再生,正是由于眼干所致的负反馈机制引起神经出芽状再生从而导致角膜神经形态的异常。这是干眼患者因角膜知觉减退而生理反射性泪液分泌减少的解剖基础。并会造成瞬目运动减少,从而形成泪液涂布异常和蒸发过快。而角膜神经损伤后再生是复杂的生物学反应,依赖神经元胞体、轴突和局部微环境的相互作用。神经纤维损伤在角膜疾病发生后出现,并可长期存在,因角膜神经对角膜上皮的内环境稳态的重要性,可以藉由共聚焦显微镜对角膜神经的形态变化判断患者全身神经性病变的严重程度,但年龄、病程长短等因素也会对角膜神经纤维形态产生影响,尤其是年龄因素,中老年人尤其是绝经后的女性因激素水平变化及紊乱更易引起干眼症,加之角结膜杯状细胞数量下降,球结膜松弛,睑板腺功能减低等,导致泪膜不稳,有报道称干眼症与年龄呈正相关性<sup>[11]</sup>。

朗格汉斯细胞起源于骨髓的树枝状细胞,起重要作用是在免疫过程中将抗原呈递给 T 淋巴细胞,也具有分泌炎症介质的作用,具有重要的免疫学意义,对朗格汉斯细胞形态进行观察对于角膜和角膜缘疾病的研究有重要意义。朗格汉斯细胞在基质层的浸润,也进一步证实干眼症是一种眼表慢性非特异性炎症性疾病,眼表的保护性免疫调节机制和促进炎症反应两者间的失衡进一步导致了组织的损伤<sup>[12]</sup>,2007 年国际干眼病专题研究会更新了干眼的定义,把炎症纳入干眼的范畴<sup>[13]</sup>,在干眼疾病的发展过程中,慢性炎症扮演了极其重要的作用,所以在干眼的治疗中,激素类滴眼液或非甾体类滴眼液可以有效改善患者眼表不适症状<sup>[14]</sup>,炎症细胞的浸润程度也可以作为干眼治疗效果的评估指标<sup>[15]</sup>。

通过对共聚焦显微镜下角膜上皮细胞的密度和异型性、基质层神经纤维的形态、朗格汉斯细胞的浸润、内皮细胞密度等的研究和认识,并和正常角膜比较,对于进一步认识干眼症角膜病理生理变化有较高价值,同时对于进一步明确干眼症的病因,指导治疗和判断预后也有帮助。

## 参考文献

- [1] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 干眼临床诊疗专家共识 (2013年) [J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(1):73-5.
- [2] Alhatem A, Cavalcanti B, Hamrah P. *In vivo* confocal microscopy in dry eye disease and related conditions [J]. *Semin Ophthalmol*, 2012, 27(5-6):138-48.
- [3] 曾洁, 周渝姣, 张传宝. 环孢素 A 滴眼液治疗干眼症的作用机制和研究进展 [J]. 中国药业, 2014, 23(13):1-4.
- [4] 李凯, 王育良. 干眼的诊断进展 [J]. 临床眼科杂志, 2009, 17(6):571-3.
- [5] Shtein R M, Callaghan B C. Corneal confocal microscopy as a measure of diabetic neuropathy [J]. *Diabetes*, 2013, 62(1):25-6.
- [6] Benítez del Castillo J M, Wasfy M A, Fernandez C, et al. An *in vivo* confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(9):3030-5.
- [7] 赵波. 活体共焦显微镜在单纯疱疹病毒性角膜炎中的应用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(5):474-7.
- [8] 孟丽红. 眼科门诊干眼患病率的初步调查和健康指导 [J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(11):2005-6.
- [9] Alhatem A, Cavalcanti B, Hamrah P. *In vivo* confocal microscopy in dry eye disease and related conditions [J]. *Semin Ophthalmol*, 2012, 27(5-6):138-48.
- [10] Tuominen I S, Konttinen Y T, Vesaluoma M H, et al. Corneal innervation and morphology in primary, Sjögren syndrome [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(6):2545-9.
- [11] 原晓飞. 中老年人干眼症 302 例临床分析 [J]. 中国药物与临床, 2012, 12(9):1206-8.
- [12] Stern M E, Schaumburg C S, Pflugfelder S C. Dry eye as a mucosal autoimmune disease [J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(1):19-41.
- [13] Lemp M, Baudouin C, Baum J, et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop (2007) [J]. *Ocul Surf*, 2007, 5(2):75-92.
- [14] 马华贞. 妥布霉素地塞米松滴眼液治疗慢性睑缘炎性干眼的效果 [J]. 广东医学, 2014, 35(11):1768-70.
- [15] Villani E, Galimberti D, Del Papa N, et al. Inflammation in dry eye associated with rheumatoid arthritis: cytokine and *in vivo* confocal microscopy study [J]. *Innate Immun*, 2013, 19(4):420-7.

## A pilot research of confocal microscopy apply to diagnose the morphological changes of cornea in patients with dry eye

Liu Qingyan<sup>1,2</sup>, Chen Xiaoyu<sup>3</sup>, Li Jing<sup>2</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Ophthalmology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

<sup>2</sup>Dept of Ophthalmology, The Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei 230041;

<sup>3</sup>Dept of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the change of corneal morphology in patients with dry eye by confocal microscopy. **Methods** 100 eyes of 50 patients with dry eye and 100 eyes of 50 normal people were examined by confocal microscopy of Japan Nidek company. The density and atypia of central corneal epithelial cells, the form of subepithelial nerve fibers, the infiltration of Langerhans cells and the density of endothelial cells were observed. **Results** Confocal microscopy showed that there were significant differences in the cell density of squamous epithelium, pterygoid epithelium and epithelial basal cells in the central corneal area of the patients with and without dry eye ( $P < 0.05$ ). The atypia of central corneal epithelial cells of the patients with dry eye increased ( $t = 14.3$ ,  $P < 0.01$ ), and a small number of cells were activated, subepithelial nerve fibers became thicker and disordered, with Langerhans cells infiltrated, endothelial cell count and morphological difference were not statistically significant. **Conclusion** Confocal microscopy can be real-time, non-invasive observation of the corneal morphological changes in patients with dry eye, according to the corneal epithelial cell density and atypia, the form of subepithelial nerve fiber, the infiltration of Langerhans cells and other pathological changes, dry eye can be visualized and diagnosed.

**Key words** confocal microscopy; dry eye; corneal epithelial cell; nerve fiber; Langerhans cell