

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.023

共聚焦显微镜对蒸发过强型干眼眼表结构的观察*

杨帆 吴琼 康杨 李雪 胡琦[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院视光学中心 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:干眼已成为影响人们生活质量的主要眼表疾病之一。有关干眼的研究已成为当今眼科的研究热点,本文通过激光共聚焦显微镜对蒸发过强型干眼患者眼表结构特征进行观察,从细胞层面对干眼进行研究。**方法:**海德堡激光共聚焦显微镜(HRT3)对35例(60只眼)干眼患者及35名(60只眼)正常人的角膜上皮层朗格汉斯细胞,睑板腺腺泡密度,睑板腺开口直径及形态进行观察,并对观察结果进行描述记录。**结果:**正常眼角膜中央上皮层朗格汉斯细胞(LC)个数的平均密度为 58 ± 19 个/ mm^2 ,干眼组为 (137 ± 29) 个/ mm^2 ,两者比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。正常眼组角膜上皮层朗格汉斯细胞突起较短,分支较少,干眼患者角膜上皮层朗格汉斯细胞突起呈树枝状,其突起较正常眼组数量多且长度较长,正常组睑板腺(MG)腺泡的平均密度为 115 ± 28 个/ mm^2 ,干眼患者的睑板腺腺泡的平均密度 59 ± 16 个/ mm^2 ,两者比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。干眼组睑板腺腺泡内呈中等程度反光,对照组腺泡内呈低反光。正常组睑板腺开口呈圆形,内壁光滑,直径为 $62 \pm 14 \mu\text{m}$,干眼组睑板腺开口欠光滑,直径 $35 \pm 11 \mu\text{m}$,两者比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**共聚焦显微镜观察到在蒸发过强型干眼患者中,睑板腺腺泡直径增大,密度降低,睑板腺的开口直径变小,同时,角膜朗格汉斯细胞活化,数量增多,共聚焦显微镜可从细胞层面观察蒸发过强型干眼的眼表结构改变,使干眼病理变化的研究更为直观,为今后的进一步研究提供了更为准确的材料。

关键词:激光共聚焦显微镜;蒸发过强型干眼;眼表

中图分类号:R777.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2893-04

In Vivo Study of Evaporative Dry Eye Using Laser Confocal Microscope*

YANG Fan, WU Qiong, KANG Yang, LI Xue, HU Qi[△]

(Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: Dry eye symptoms is a disease, therefore timely detection may lead to recognition of a life-threatening condition. This article will evaluate the changes of ocular surface with evaporative dry eye using laser confocal microscope. **Methods:** 60 eyes of 35 patients who were diagnosed as evaporative dry eye, were chosen as the study group of dry eye. Other 60 eyes of 35 patients control subjects were included in the study. The images of langerhans cell (LC), meibomian gland (MG) acinar unit density and the diameter of MG orifices were acquired by laser confocal microscope. **Results:** The langerhans cell density was 137 ± 29 cells/ mm^2 in dry eye group, compared with control group 58 ± 19 cells/ mm^2 . There was statistical difference accordingly between the two group ($P < 0.05$). The processes of langerhans cell in dry eye were longer and showing more activity than that were in control group. The acinar unit density was 59 ± 16 cells/ mm^2 in dry eye group, compared with control group 115 ± 28 cells/ mm^2 . There was statistical difference accordingly between the two group ($P < 0.05$). The diameter of MG orifices was $35 \pm 11 \mu\text{m}$, compared with control group $62 \pm 14 \mu\text{m}$. There was statistical difference accordingly between the two group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The density of langerhans cell increased in dry eye group, The processes of langerhans cell in dry eye group were longer and showing more activity than that were in control group. The density of acinar unit declined in dry eye group. Laser confocal microscopy is valuable for basic research and clinical diagnosis of evaporative dry eye.

Key words: Laser confocal microscope; Evaporative dry; Ocular surface

Chinese Library Classification: R777.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)15-2893-04

前言

干眼症是一种多因素疾病,可引起眼部不适、泪液动力学异常,严重者甚至可引起视觉质量的下降和眼表结构的损害。从上世纪九十年代起,干眼就已经引起人们的重视。随着人们

生活工作方式的变化,干眼在我国的发病率逐年升高^[1]。干眼症已成为影响人们生活质量的主要眼表疾病之一。有关干眼的分类,病因,发病机制及检查已成为目前研究的热点。2007年国际干眼小组将干眼症分为水样液不足型和蒸发过强型两类,其中,蒸发过强型干眼是干眼的主要亚型之一^[2]。睑板腺功能障碍

* 基金项目:哈尔滨市科研创新人才研究专项资金项目(2011RFXYS051)

作者简介:杨帆(1983-),女,硕士,医师,主要研究方向:干眼及视觉生理

[△] 通讯作者:胡琦,电话:0451-85553890, E-mail: shuyubobo@gmail.com

(收稿日期:2013-12-18 接受日期:2014-01-16)

是蒸发过强型干眼的主要病理变化,但以往针对此型干眼的检查主要停留在宏观的观察阶段^[3],而缺少在细胞水平的观察和研究。激光共聚焦显微镜是近年来新兴的检查仪器,它的共聚焦系统和连续裂隙扫描方式使眼表结构的观察深入到细胞层面,应用共聚焦显微镜可直观的观察干眼患者细胞结构的变化,为我们今后对干眼的研究开辟了新的途径。

1 对象和方法

1.1 研究对象

35例(60只眼)干眼患者查。其中男性19例、女性16例,年龄21~41岁。35名(60只眼)正常人中男性14名,女性21名,年龄28~39岁。两组间性别和年龄比较,差异无统计学意义。蒸发过强型干眼的诊断标准:(1)BUT缩短;(2)泪液分泌试验正常;(3)眼睑及睑缘检查,发现腺体开口、分泌物等异常^[4]。正常对照眼均无外伤、感染及配戴接触镜史,经裂隙灯显微镜检查角膜透明,BUT>10,眼表面活体染色阴性,无眼科用药史。

1.2 激光共聚焦显微镜检查

(1)激光共聚焦显微镜(德国海德堡公司生产):由海德堡视网膜激光断层扫描系统3代(HRT 3)和Rostock角膜模块组件组成。激光源波长为670 nm,包含的角膜面积为0.3 mm×0.3 mm。

(2)操作步骤:被检者坐于共聚焦显微镜前,结膜囊内滴入贝诺喜表麻,向一次性无菌接触帽内滴入唯地息凝胶,将接触帽安置于检查透镜前,移动固视灯使被检者双眼平视正前方,移动物镜使被检者角膜中央与物镜轻轻接触,调节焦平面,当看到泪膜和角膜上皮细胞交界时,将置焦平面设置为0。翻转被检者上睑,使被检者上睑缘与物镜光学区接触,调整焦平面,获取睑缘结构图像并采集。

(3)图像分析与统计参数:利用HRT3自带细胞计数系统,计算朗格汉斯细胞及睑缘腺泡密度。干眼组与对照组的腺泡直径均以腺泡的最长径为准。

1.3 统计学分析方法

用HRT3自带操作软件进行细胞计数,数据用均数±标准差表示,两组细胞平均密度数值之间统计学差异应用配对t检验,以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 上皮朗格汉斯细胞

正常对照组及干眼组角膜朗格汉斯细胞均位于角膜上皮基底细胞层,胞体高反光,形态不规则,正常对照组可见短枝状突起,数量较少(图1),干眼组角膜中央朗格汉斯细胞数量突起明显增多,细胞突起变长,数量增多(图2),正常眼角膜中央上皮朗格汉斯细胞个数的平均密度为 58 ± 19 个/ mm^2 ,干眼组为 137 ± 29 个/ mm^2 ,两组间细胞平均密度差异有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

2.2 腺泡

正常睑缘腺泡呈类圆形或不规则型,腺泡壁高反光,内部低反光(图3),干眼患者腺泡明显变大,内部可见中等程度反光物质,腺泡密度减低(图4)。正常组睑板腺腺泡的平均密度为 115 ± 28 个/ mm^2 ,干眼患者的睑板腺腺泡的平均密度 59 ± 16

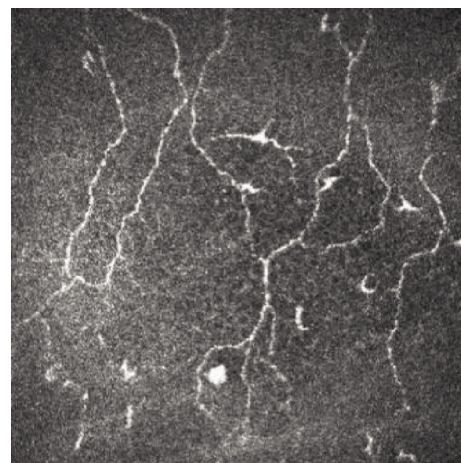


图1 正常人角膜上皮朗格汉斯细胞(800×)

Fig.1 Langerhans cell in control group (800×)

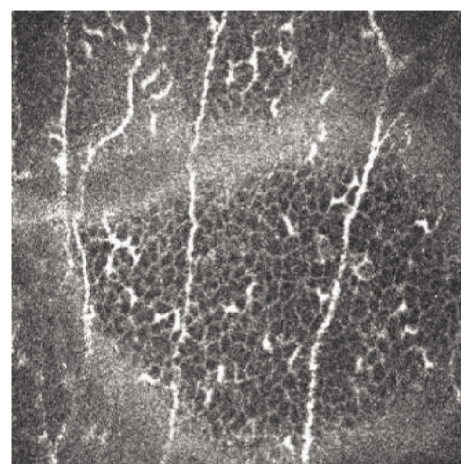


图2 干眼患者角膜上皮朗格汉斯细胞(800×)

Fig.2 Langerhans cell in dry eye group (800×)

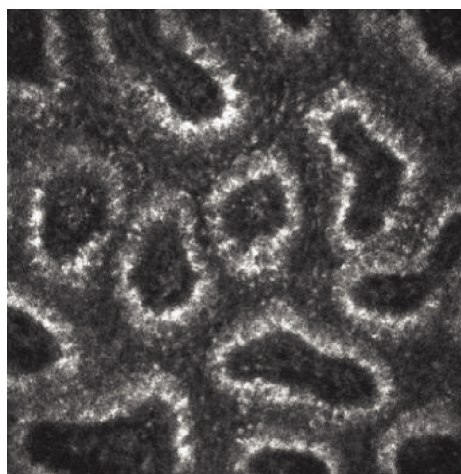


图3 正常人睑板腺腺泡(800×)

Fig.3 Acinar unit in control group(800×)

个/ mm^2 ,两组间平均密度差异有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

2.3 睑板腺开口

正常组睑板腺开口呈圆形,开口内低反光(图5),干眼组睑板腺开口变小,内壁欠光滑(图6),正常组睑板腺开口直径为 $62\pm 14\ \mu\text{m}$,干眼组睑板腺开口直径为 $35\pm 11\ \mu\text{m}$,两组间平均

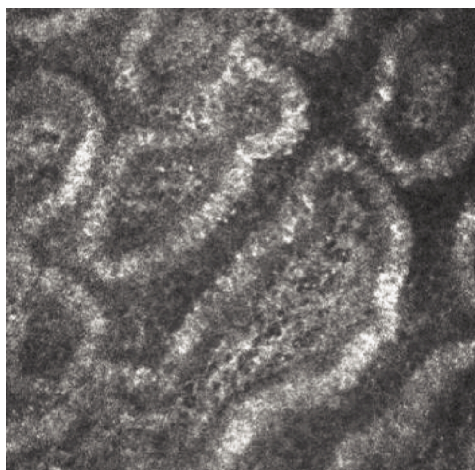


图4 干眼患者睑板腺腺泡(800×)
Fig.4 Acinar unit in control group(800×)

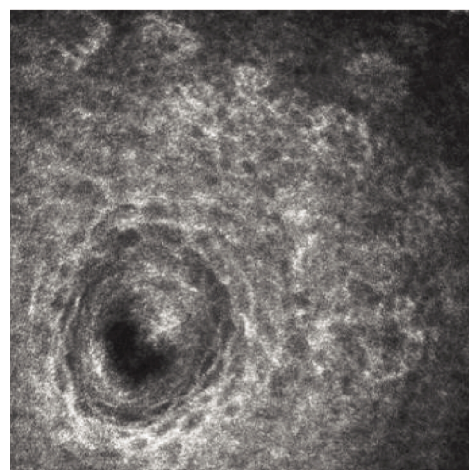


图6 干眼患者睑板腺开口(800×)
Fig.6 MG orifice in dry eye group(800×)

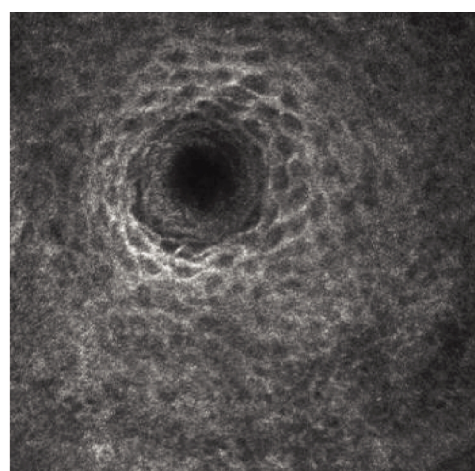


图5 正常人睑板腺开口(800×)
Fig.5 MG orifice in control group (800×)

密度差异有统计学意义($P < 0.05$) (表1)。

3 讨论

干眼已经成为当今眼表疾病研究的热点^[5],干眼相关的检查手段也日益增多^[6]。以往我们对干眼的检查主要有泪液分泌量的检测^[7],泪液质量的检测^[8],角结膜染色检查,泪膜检查^[9]及干眼仪的检测^[10],以上检查主要是从宏观角度来观察干眼症眼表的改变^[11]。激光共聚焦显微镜的共聚焦系统和连续裂隙扫描,可在活体状态下,实时,无创使观察深入到细胞层面,以往共聚焦显微镜在眼科的应用主要停留在角膜病的诊断及角膜各层结构的观察,本文应用共聚焦显微镜对睑板腺及开口进行观察,扩大了共聚焦显微镜的应用范围,从细胞的层面对干眼的眼表细微结构进行观察^[12],为干眼的研究提供了细胞形态学资料。

表1 朗格汉斯细胞,睑板腺腺泡的密度及睑板腺开口直径

Table 1 LC, MG acinar unit density and MG orifice diameter

Genotyping	Density		Diameter
	LC(cells/mm ²)	acinar unit(units/mm ²)	MG orifice
Control group	58± 19	59± 16	35± 11
dry eye group	137± 29	115± 28	62± 14
P	<0.05	<0.05	<0.05

蒸发过强型干眼是干眼的主要亚型之一,但蒸发过强型干眼往往因其泪液分泌试验结果正常,患者的症状不典型而被忽视,睑板腺功能异常是引起蒸发过强型干眼的主要诱因之一^[13],睑板腺功能与泪膜功能密切相关^[14],睑板腺数目的减少、移位、阻塞、低分泌、高分泌、新生物等睑板腺疾病,均可造成泪膜的异常,导致干眼发生^[15],但以往对睑板腺形态的研究比较少,主要集中在应用红外线睑板腺观察仪对睑板腺的形态进行观察^[16],但此种观察方法只能在睑板腺数量出现丢失后才能取得阳性结果。在腺体出现丢失之前,即睑板腺功能出现异常的早期阶段,睑板腺的病理表现为脂质排除障碍,淤积于腺泡,继而

腺泡增大,本研究应用共聚焦显微镜对干眼患者及正常对照组进行检查发现,在蒸发过强型干眼患者中,睑板腺腺泡的平均密度 59 ± 16 个/mm²,明显低于正常对照组 115 ± 28 个/mm²,干眼组睑板腺开口直径为 $35 \pm 11 \mu\text{m}$,低于正常组 $62 \pm 14 \mu\text{m}$ 。激光共聚焦显微镜可在睑板腺功能出现异常的早期阶段,对睑板腺的腺泡,睑板腺开口的形态进行观察,计算睑板腺腺泡密度及睑板腺开口的直径,可观察到更为早期的睑板腺病变,使睑板腺的研究更为精确。

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^[17]与传统的干眼病定义相比,该定义强调了

炎症在干眼病发病中的重要作用,认为干眼是一类伴有泪腺或眼表炎症的多因素疾病^[8],炎症反应是干眼发病的重要因素之一,在干眼复杂的发病机制中,炎症扮演着重要角色^[9]。炎症与干眼的发病相互影响,互为因果,本研究发现,干眼组的朗格汉斯细胞与对照组相比,突起增多,变长,细胞密度为 137 ± 29 个/ mm^2 ,明显大于对照组 58 ± 19 个/ mm^2 ,说明朗格汉斯细胞活化,证明了干眼患者中眼表处于炎症反应活跃状态,但是促使朗格汉斯细胞活化的眼内部因素,例如睑缘,结膜炎症,和外部因素,例如环境污染,两种因素在炎症反应中的地位,具体反应途径,尚需进一步深入研究。

通过以上的研究我们发现,共聚焦显微镜可对蒸发过强型干眼的眼表结构进行细胞水平上的观察,应用共聚焦显微镜我们可以了解到,蒸发过强型干眼患者的角膜中央朗格汉斯细胞突起数量明显增多,细胞突起变长,细胞数量增多,睑板腺腺泡直径增大,密度降低,同时,睑板腺的开口直径变小,睑板腺开口内壁不光滑,共聚焦显微镜可对干眼患者的眼表进行实时,无创的检查,其检查结果可精确到细胞层面,使干眼的研究更具说服力,为干眼的发病机制的研究开辟了更为广阔的前景。但是,如何应用共聚焦显微镜对不同病变程度的干眼患者进行观察,干眼患者不同病变时期在共聚焦显微镜下的标志性改变,尚需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 孙倩娜, 邓新国. 干眼的研究现状[J]. 眼科研究, 2009, 27(9): 819-822
Sun Qian-na, Deng Xin-guo. Current research on dry eye[J]. Chin Ophthal Res, 2009, 27(9): 819-822
- [2] Michael A, Lemp M D, Gary N, et al. The definition & classification of dry eye disease[C]. Guidelines from the 2007 International Dry Eye Workshop, 2008
- [3] 袁进, 陈家祺. 加强和规范干眼的临床研究[J]. 眼科, 2010, 19(3): 148-154
Yuan Jin, Chen Jia-qi. Strengthen and standardize clinical study of dry eye[J]. Ophthalmol CHN, 2010, 19(3): 148-154
- [4] 林惠玉, 李兵. 蒸发过强型干眼诱发因素研究进展[J]. 眼科研究, 2010, 28(7): 684-687
Lin Hui-yu, Li Bing. Research progression in inducing factors of evaporative dry eye[J]. Chin Ophthal Res, 2010, 28(7): 684-687
- [5] Javadi M A, Feizi S. Dry Eye Syndrome[J]. Journal of ophthalmic and vision research, 2011, 6(3): 192-198
- [6] Bhavsar A S, Bhavsar S G, Jain S M. A review on recent advances in dry eye: pathogenesis and management[J]. Oman J Ophthalmol, 2011, 4(2): 50-56
- [7] Bawazeer A M, Hodge W G. One-minute schirmer test with anesthesia[J]. Cornea, 2004, 23(3): 318-319
- [8] Fukuda M, Wang H F. Dry eye and closed eye tears[J]. Cornea, 2000, 19(Suppl 3): 44-48
- [9] 杨庆松, 王宁利, 孙旭光, 等. 应用泪膜干涉成像方法诊断干眼的初步临床研究[J]. 中国医刊, 2005, 40(4): 50-52
Yang Qing-song, Wang Ning-li, Sun Xu-guang, et al. The primary clinical study of tear film interferometry for dry eye diagnosis[J]. Chinese Journal of Medicine, 2005, 40(4): 50-52
- [10] 刘祖国, 罗丽辉, 程冰, 等. 干眼仪在干眼诊断中的价值初步评价[J]. 中国实用眼科杂志, 2003, 21(5): 358-361
Liu Zu-guo, Luo Li-hui, Cheng Bing, et al. Diagnosis of dry eye by DR-1 tear interferometry[J]. Chinese Journal of Practical Ophthalmology, 2003, 21(5): 358-361
- [11] 李凯, 王育良. 干眼的诊断进展 [J]. 临床眼科杂志, 2009, 17(6): 571-573
Li Kai, Wang Yu-liang. Recent advances in the diagnosis of dry eye [J]. Journal of Clinical Ophthalmology, 2009, 17(6): 571-573
- [12] Benítez C 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]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2004, 45(9): 3030-3035
- [13] 洪晶. 提高对睑板腺功能障碍的认识 重视睑板腺功能障碍相关性干眼的药物治疗[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(10): 865-868
Hong Jing. Improving the understanding for meibomian gland dysfunction Paying attention to the management of meibomian gland dysfunction associated- dry eye[J]. Chin J Ophthalmol, 2012, 30(10): 865-868
- [14] 李晶, 许中中, 余晓菲, 等. 睑缘炎患者睑板腺形态变化及其与干眼的关系[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(6): 557-561
Li Jing, Xu Zhong-zhong, Yu Xiao-fei, et al. Improving the understanding for meibomian gland dysfunction Paying attention to the management of meibomian gland dysfunction associated- dry eye [J]. Chin J Ophthalmol, 2012, 30(6): 557-561
- [15] 肖辛野, 刘祖国. 泪液脂质层异常与干眼的临床研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2012, 48(3): 282-285
Xiao Xin-ye, Liu Zu-guo. Abnormal of tear lipid layer and recent advances in clinical study of dry eye[J]. Chin J Ophthalmol, 2012, 48(3): 282-285
- [16] Zengin N, Tol H, Giindfiz K, et al. Meibomian gland dysfunction and tear film abnormalities in rosacea[J]. Cornea, 1995, 14(2): 144-146
- [17] 马晓昀, 殷莲华. 炎症与干眼症的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2009, 36(4): 495-498
Ma Xiao-jun, Yin Lian-hua. Advancement in the study of relations between inflammation and dry eye[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2009, 36(4): 495-498
- [18] 刘祖国, 林志荣. 重视干眼中眼表炎症的作用[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2012, 14(4): 193-196
Liu Zu-guo, Lin Zhi-rong. Emphasizing on the role of ocular surface inflammation in dry eye[J]. Chin J Optom Ophthalmol Vis Sci, 2012, 14(4): 193-196
- [19] Steven P, Cursiefen C. Anti-inflammatory treatment in dry eye disease [J]. Klin Monbl Augenheilkd, 2012, 229(5): 500-505