

综述

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003430

活体共聚焦显微镜在不同类型干眼检查中的应用进展

王 希,张 琪

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘要】干眼发病机制复杂,各种病因最终都会导致角结膜损伤而引起一系列眼部不适症状,了解干眼患者眼表病理改变对疾病诊治有重要意义。近年来,活体共聚焦显微镜(*in vivo* confocal microscopy,IVCM)越来越多地用于研究干眼的微观世界。IVCM是一种非侵入性成像工具,可无创实时检查角膜细胞及神经纤维的变化、评估睑板腺等各种结构,为了解干眼的发病机制和细胞组织层面变化提供更好的帮助。本文总结了不同类型干眼在IVCM下的眼表改变,以期进一步了解各类型干眼的病理改变,辅助临床诊疗。

【关键词】干眼;活体共聚焦显微镜;眼表;组织细胞

【中图分类号】R777.34

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-09-27

Progress in the application of *in vivo* confocal microscopy in different types of dry eye examination

Wang Xi, Zhang Qi

(Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】The pathogenesis of dry eye is complex, and various etiology will eventually lead to corneal and conjunctival injury and cause a series of eye discomfort symptoms. Understanding the pathological changes of the ocular surface in patients with dry eye is of great significance for the diagnosis and treatment of the disease. In recent years, *in vivo* confocal microscopy(IVCM) has been increasingly used to study the microscopic world of dry eyes. IVCM is a non-invasive imaging tool that can examine the changes in corneal cells and nerve fibers noninvasively in real time, evaluate various structures such as meibomian glands, and provide better help in understanding the pathogenesis of dry eye and histological changes at the cellular level. This paper summarizes the changes of ocular surface of different types of dry eye under IVCM in order to further understand the pathological changes of each type of dry eye and assist clinical diagnosis and treatment.

【Key words】dry eye; *in vivo* confocal microscopy; ocular surface; histocyte

干眼为多因素引起的慢性眼表疾病,是由泪液的质、量及动力学异常导致的泪膜不稳定或眼表微环境失调,可伴有眼表炎症反应、组织损伤及神经异常,造成眼部多种不适症状和(或)视功能异常。干眼是现代社会常见的健康问题,全球患病率在5%~50%,我国患病率达21%~30%,明显影响患者的生活质量^[1]。目前常用的干眼检查如角结膜染色、泪液

作者介绍:王 希,Email:924427573@qq.com,

研究方向:角膜及眼表疾病。

通信作者:张 琪,Email:cqzqwxm@163.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:82070935);重庆

市科卫联合医学科研资助项目(编号:2023GDRC004);

重庆医科大学未来医学青年创新团队发展支持计划资助

项目(编号:W0185)。

优先出版:<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240206.1104.024>

(2024-02-09)

分泌实验等能反映角结膜损伤状态,但无法细化细胞组织学病变;眼表面干涉仪分析睑板腺(meibomian gland, MG),可检测到腺体缺失及腺管萎缩,但无法反映腺泡和局部炎症状态;CT及MRI可用于泪腺检查,对其结构以及体积测量和分析具有良好的效果,但无法反映腺泡及腺管细胞形态,且CT电离辐射强,MRI操作时间较长,会影响图像质量,且价格较贵。活体共聚焦显微镜(*in vivo* confocal microscopy,IVCM)的出现为干眼的临床诊疗提供新的思路,其作为一种非侵入辅助诊断工具,可在细胞水平上对许多眼部疾病的组织病理学进行活体评估。在干眼领域,IVCM已被广泛应用于角膜、结膜、睑板腺和泪腺的检查^[2],获得客观的图像和数据,实时监测眼表变化。本文基于IVCM在干眼中的应用研究,总结多种常见干眼亚型在IVCM下的病理改变,为临床诊治提供参考。

1 水液缺乏型干眼

水液缺乏型干眼由水液性泪液生成不足或质量异常而引起,其中干燥综合征(sjgren's syndrome, SS)相关性干眼是经典类型。SS 干眼是自身免疫介导泪腺破坏,导致眼表泪液严重缺失从而引发的眼表损伤^[3],IVCM 用于研究 SS 干眼的眼表显微形态,可以帮助临床医生评估病情及制定治疗方案^[4]。

有研究表明眼表严重缺水会引起角膜浅表细胞凋亡导致细胞数量下降^[5],通过IVCM 直接观察 SS 患者,发现角膜浅表上皮细胞出现形态不规则并伴有斑片状改变、细胞间隙增宽、部分患者局限性上皮剥脱、微小囊肿、糜烂,细胞数量明显减少等^[6];角膜基质减少导致中央角膜厚度降低,浅基质层细胞密度明显高于非 SS 干眼患者,而深基质细胞无明显差别,在浅基质层可见高反射细胞^[7],角膜树突状细胞(dendritic cell, DC)密度明显增加,并且较非 SS 干眼明显增高^[8-9]。Matsumoto Y 和 Ibrahim OMA^[10]利用 IVCM 观察发现 SS 干眼患者的内皮细胞密度相比于健康对照者没有明显差异,而 Kheirkhah A 等^[11]发现内皮细胞密度明显降低。相较于非 SS 干眼及健康对照者,IVCM 下 SS 干眼患者的神经纤维稀疏且分支减少,神经纤维的数量和密度下降,神经弯曲和膨大增高,而神经反射率没有显示出明显差异^[12-17],研究者认为神经膨大可能是含有代谢活性递质的神经纤维,有助于角膜营养异常情况的改善^[17],但也有研究表明,SS 患者的角膜神经膨大数量是减少的^[18],反映了神经损伤。Yang T 等^[19]使用 IVCM 观察泪腺发现,相较于健康对照者,腺泡单位密度、腺泡单位直径低,而腺体炎症细胞密度明显增高。

既往研究认为 SS 干眼患者角膜荧光素钠着染即为角膜上皮缺损处,利用 IVCM 观察发现该体征是由于角膜上皮紧密连接完整性受损、上皮通透性增加等原因导致其摄取荧光素增加所造成^[20]。因此可推测,干眼患者角膜上皮细胞密度降低,上皮形态及结构发生变化,导致角膜上皮抵御病原体和其他有害物质的屏障功能受损,眼表稳定被破坏,继而引发更严重的损害。SS 干眼患者角膜内皮细胞密度的变化存在争议,且形态学上的改变尚无报道,值得进一步研究。DC 细胞在角膜免疫学中发挥重要作用,细胞数量急剧增加被认为 是干眼致病的重要环节,研究表明角膜 DC 密度与干眼严重程度之间呈正相关关系^[21],因此利用 IVCM 观察的 DC 密度及分布有望成为临床干眼患者眼表免疫炎症状态的指标之一。除观察结膜细胞密度及形态外,IVCM 还可分析结膜细胞核浆比,有研究证实 SS 干眼患者球结膜上皮细胞核浆比健康对照者明显增大^[22],但现阶段结膜上皮细胞核浆比的研究较少,利用核浆比评价结膜干燥程度的实用性还需大样本研究支持。

2 蒸发过强型干眼

脂质异常型干眼是脂质层质或量异常引起泪液蒸发过快所致,其中睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)最为常见^[23]。MGD 是 MG 的一种慢性、弥漫性病变,腺体分泌的变化为特征。

利用 IVCM 观察 MGD 患者发现 MGD 干眼患者角膜神经密度和神经膨大与健康对照者相比差异无统计学意义,但神经弯曲度等级更高,其中轻中重度 MGD 患者神经密度和反射率存差异有统计学意义^[24];MGD 患者角膜中央 DC 数量较健康对照组明显升高^[25],但也有其他研究发现 MGD 和健康对照的角膜 DC 密度差异无统计学意义^[26];IVCM 下 MGD 患者的睑缘开口闭塞,腺泡密度明显低于健康对照,腺孔直径和睑板反射率有所增加,腺周间质不均匀性增加,腺泡壁及腺泡管增大伴有广泛的腺周炎症细胞浸润,重度 MGD 患者的 MG 萎缩伴广泛的腺周纤维化^[27-28]。

这些发现表明角膜神经弯曲能够将 MGD 干眼与健康对照组区分开,但由于相关研究较少,角膜神经弯曲是否能将 MGD 干眼与其他类型干眼区分尚无定论。角膜 DC 细胞密度存在争议,可能是 MGD 患者角膜 DC 细胞在角膜中央和周边区分布不均,取样时未做分区标记,导致计数存在差异。睑脂长期堆积导致腺泡扩张被认为是 MGD 患者眼部症状及 MG 开口形态改变出现的前期表现,早期 MGD 患者症状较轻,体征不明显,IVCM 是唯一能够检测到早期组织学改变的工具,利用 IVCM 对 MG 细胞学形态随访观察,能够早期发现腺泡扩张,进行及时干预从而避免 MGD 干眼的发生,但目前随访研究较少,未来应当扩大观察对象,延长随访时间,进行更全面的分析。

3 黏蛋白异常型干眼

黏蛋白异常型干眼是由于各种因素造成眼表上皮细胞(尤其杯状细胞)受损而引起,临床多见于眼表药物的毒性损伤。药物治疗是青光眼治疗的一线方法,长期使用抗青光眼药物会导致角结膜成分发生多种改变而引起药源性干眼^[29]。

结膜杯状细胞负责释放黏蛋白,有助于维持泪膜稳定性、眼表润滑和稳态^[30]。目前 IVCM 被证实是评估杯状细胞形态变化可靠的方法^[31]。利用 IVCM 发现与健康对照组相比,青光眼患者结膜杯状细胞明显下降,与单药治疗相比,接受 2 种药物治疗的患者的结膜杯状细胞丢失明显更大,无论降眼压药是否含有防腐剂,长期治疗后青光眼患者结膜杯状细胞和黏蛋白标志物都会降低^[32],靠近角膜缘的结膜中有大量炎症细胞浸润,其中使用噻吗洛尔治疗的患者炎症细胞数量更多^[33];IVCM 观察到多种药治疗的患者(≥ 2 种药)角膜缘上皮明显不规则,缘周 DC 细胞激活, vogt 栅栏纤维化, MG 腺体密度和面积降低,腺泡分泌反射率增加,导管口扩张^[34]。

在青光眼治疗过程中,保持杯状细胞结构和功能的完整性以及对泪膜的修饰是一个重要的挑战,IVCM 是一种有价值的非侵入性技术,可直接反映青光眼患者结膜杯状的细胞减少、炎症细胞的聚集,有助于找到既可有效降眼压又可避免干眼的平衡点。周缘炎症浸润导致角膜缘干细胞数量减少及功能改变,可能是药物引起角膜上皮损伤后不易修复的原因,局部抗炎对缓解疾病发展十分重要。目前使用IVCM 观察药物性干眼的研究集中于结膜杯状细胞的改变,关于角膜损伤、结膜免疫激活、结膜微囊肿形成的报道极少,也缺乏降眼压药单用及联合使用后眼表损伤的对比分析,增加对于这些方面的研究是未来需要努力的方向。

4 泪液动力学异常型干眼

泪液动力学异常型干眼因泪液的动力学异常引起,包括瞬目异常、泪液排出异常、等导致的干眼,暴露性眼睑闭合不全等属于这一类型干眼。临幊上暴露性眼睑闭合不全多见于甲状腺相关性眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO),这是一种与甲状腺功能异常或抗甲状腺抗体异常相关的自身免疫病。

使用IVCM 观察发现,较非活动期 TAO,活动期 TAO 患者结膜鳞状化生,朗格汉斯细胞明显增加,结膜上皮细胞及杯状细胞密度下降,但神经纤维密度、神经曲折率在活动期和非活动期 TAO 患者间差异无统计学意义^[35-37]; TAO 患者 MG 腺泡扩张、形态不规则,腺管缺失、排列紊乱,和健康对照组相比,MG 开口明显缩小,其内可见中高反光样分泌物堵塞,开口周围可见不同程度的纤维化,腺泡周围大量炎症细胞浸润。分组对比发现,在活动性 TAO 患者中,MG 有炎症细胞浸润和轻微扩张的形态学改变。在非活动性 TAO 患者中,通常可以观察到 MG 腺体阻塞、扩张和纤维化的征象^[38]。

据上述发现推测,可以通过IVCM 检测的 MG 特征性改变来鉴别活动性和非活动性 TAO,决定是否需要全身抗炎治疗。杯状细胞的减少是因为活动期自身免疫引发的眼部炎症所致^[39],杯状细胞缺失导致黏蛋白分泌减少和泪膜不稳定,这可能是活动期 TAO 干眼患病率明显高于非活动期患者的原因。TAO 患者 MG 微观结构变化主要是阻塞和炎症浸润,出现这些变化的原因可能是 TAO 患者眼球突出和睑裂扩大导致不完全眨眼增强,MG 分泌减少,最终造成 MG 阻塞、萎缩、缺失,而炎症细胞激活,与成纤维细胞相互作用,最终导致 MG 纤维化。使用IVCM 可帮助进一步理解 TAO 发生干眼的机制,定量评估患者的角结膜微观结构变化,有助于制定随访计划并给予及时干预。

5 结 语

眼表改变在干眼临床评估和诊断中十分重要,IVCM 对

眼部组织结构进行细胞层面上的无创检查,可以直接发现微观结构异常,越来越广泛地应用到干眼检查与治疗中。正如本文所述,利用IVCM 可以实时评估各类干眼角结膜细胞密度形态、炎症细胞浸润、神经纤维状态以及睑板腺腺泡改变等,收集客观图像和共焦显微参数,获得不同类型干眼特征性眼表改变,可以帮助评估疾病动态变化,协助随访治疗。总之,作为干眼相关的各种眼表疾病临床诊断的补充技术,IVCM 正日益受到重视,期望未来可以通过深入研究和大样本的数据分析来制定相关评估指标和规范。

参 考 文 献

- [1] Stapleton F, Alves M, Bunya VY, et al. TFOS DEWS II epidemiology report[J]. Ocul Surf, 2017, 15(3):334-365.
- [2] Sim R, Yong K, Liu YC, et al. *In vivo* confocal microscopy in different types of dry eye and meibomian gland dysfunction[J]. J Clin Med, 2022, 11(9):2349.
- [3] Vehof J, Utheim TP, Bootsma H, et al. Advances, limitations and future perspectives in the diagnosis and management of dry eye in Sjögren's syndrome[J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 38(4):301-309.
- [4] Labbé A, Liang QF, Wang ZQ, et al. Corneal nerve structure and function in patients with non-sjögren dry eye: clinical correlations[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(8):5144-5150.
- [5] Lanza M, Iaccarino S, Varriechi G, et al. Corneal confocal microscopy alterations in Sjögren's syndrome dry eye[J]. Acta Ophthalmol, 2017, 95(5):e366-e372.
- [6] Cardigos J, Barcelos F, Carvalho H, et al. Tear Meniscus and corneal sub-basal nerve plexus assessment in primary sjögren syndrome and sicca syndrome patients[J]. Cornea, 2019, 38(2):221-228.
- [7] Alhatem A, Cavalcanti B, Hamrah P. *In vivo* confocal microscopy in dry eye disease and related conditions[J]. Semin Ophthalmol, 2012, 27(5/6):138-148.
- [8] Kheirkhah A, Rahimi Darabadi R, Cruzat A, et al. Corneal epithelial immune dendritic cell alterations in subtypes of dry eye disease: a pilot *in vivo* confocal microscopic study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(12):7179-7185.
- [9] Machetta F, Fea AM, Actis AG, et al. *In vivo* confocal microscopic evaluation of corneal Langerhans cells in dry eye patients[J]. Open Ophthalmol J, 2014, 8:51-59.
- [10] Matsumoto Y, Ibrahim OMA. Application of *in vivo* confocal microscopy in dry eye disease[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(14):41-47.
- [11] Kheirkhah A, Saboo US, Abud TB, et al. Reduced corneal endothelial cell density in patients with dry eye disease[J]. Am J Ophthalmol, 2015, 159(6):1022-1026.
- [12] Fea AM, Aragno V, Testa V, et al. The effect of autologous platelet lysate eye drops: an *in vivo* confocal microscopy study[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016:830-842.
- [13] Gabbriellini G, Baldini C, Varanini V, et al. *In vivo* confocal scan-

- ning laser microscopy in patients with primary Sjögren's syndrome: a monocentric experience[J]. *Mod Rheumatol*, 2015, 25(4):585–589.
- [14] Iaccheri B, Torroni G, Cagini C, et al. Corneal confocal scanning laser microscopy in patients with dry eye disease treated with topical cyclosporine[J]. *Eye*, 2017, 31(5):788–794.
- [15] Tepelus TC, Chiu GB, Huang JY, et al. Correlation between corneal innervation and inflammation evaluated with confocal microscopy and symptomatology in patients with dry eye syndromes: a preliminary study[J]. *Albrecht Von Graefes Arch Fur Klin Und Exp Ophthalmol*, 2017, 255(9):1771–1778.
- [16] 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):420–427.
- [17] Villani E, Magnani F, Viola F, et al. *In vivo* confocal evaluation of the ocular surface morpho-functional unit in dry eye[J]. *Optom Vis Sci*, 2013, 90(6):576–586.
- [18] Cruzat A, Pavan-Langston D, Hamrah P. *In vivo* confocal microscopy of corneal nerves: analysis and clinical correlation[J]. *Semin Ophthalmol*, 2010, 25(5/6):171–177.
- [19] Yang T, Delli K, Coumou AD, et al. The lacrimal gland in Sjögren's syndrome: can we unravel its mystery using ultrasound? [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2022, 40(12):2428–2433.
- [20] Mokhtarzadeh M, Casey R, Glasgow BJ. Fluorescein punctate staining traced to superficial corneal epithelial cells by impression cytology and confocal microscopy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(5):2127–2135.
- [21] 刘瑞, 李冰, 盛敏杰. 活体共聚焦显微镜在干燥综合征眼表形态观察中的应用[J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(12):2213–2216.
- Liu R, Li B, Sheng MJ. Application of *in vivo* confocal microscopy for ocular surface observing in patients with Sjögren's syndrome[J]. *Int Eye Sci*, 2016, 16(12):2213–2216.
- [22] Kojima T, Matsumoto Y, Dogru M, et al. The application of *in vivo* laser scanning confocal microscopy as a tool of conjunctival *in vivo* cytology in the diagnosis of dry eye ocular surface disease[J]. *Mol Vis*, 2010, 16:2457–2464.
- [23] Lam SM, Tong L, Duan XR, et al. Longitudinal changes in tear fluid lipidome brought about by eyelid-warming treatment in a cohort of meibomian gland dysfunction[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(9):1959–1969.
- [24] Fu JY, Chou YL, Hao R, et al. Evaluation of ocular surface impairment in meibomian gland dysfunction of varying severity using a comprehensive grading scale[J]. *Medicine*, 2019, 98(31):e16547.
- [25] Villani E, Canton V, Magnani F, et al. The aging Meibomian gland: an *in vivo* confocal study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(7):4735–4740.
- [26] Qazi Y, Kheirkhah A, Blackie C, et al. *In vivo* detection of clinically non-apparent ocular surface inflammation in patients with meibomian gland dysfunction-associated refractory dry eye symptoms: a pilot study[J]. *Eye*, 2015, 29(8):1099–1110.
- [27] Liang QF, Gao C, Liang H, et al. *In vivo* confocal microscopy evaluation of meibomian glands in meibomian gland dysfunction patients[J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2016, 52(9):649–656.
- [28] Villani E, Ceresara G, Beretta S, et al. *In vivo* confocal microscopy of meibomian glands in contact lens wearers[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(8):5215–5219.
- [29] Mastropasqua R, Agnifili L, Fasanella V, et al. *In vivo* distribution of corneal epithelial dendritic cells in patients with glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(14):5996–6002.
- [30] Georgiev GA, Eftimov P, Yokoi N. Contribution of mucins towards the physical properties of the tear film: a modern update[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24):6132.
- [31] Staso SD, Agnifili L, Ciancaglini M, et al. *In vivo* scanning laser confocal microscopy of conjunctival goblet cells in medically-controlled glaucoma[J]. *In Vivo*, 2018, 32(2):437–443.
- [32] Agnifili L, Fasanella V, Mastropasqua R, et al. *In vivo* goblet cell density as a potential indicator of glaucoma filtration surgery outcome[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(7):2928–2935.
- [33] Kam KW, Di Zazzo A, De Gregorio C, et al. A review on drug-induced dry eye disease[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2023, 71(4):1263–1269.
- [34] Mastropasqua L, Agnifili L, Mastropasqua R, et al. *In vivo* laser scanning confocal microscopy of the ocular surface in glaucoma[J]. *Microsc Microanal*, 2014, 20(3):879–894.
- [35] Wei YH, Chen WL, Hu FR, et al. *In vivo* confocal microscopy of bulbar conjunctiva in patients with Graves' ophthalmopathy[J], 2015, 114(10):965–972.
- [36] Wu LQ, Cheng JW, Cai JP, et al. Observation of corneal Langerhans cells by *in vivo* confocal microscopy in thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *Curr Eye Res*, 2016, 41(7):927–932.
- [37] Kocabeyoglu S, Mocan MC, Cevik Y, et al. Ocular surface alterations and *in vivo* confocal microscopic features of corneas in patients with newly diagnosed Graves' disease[J]. *Cornea*, 2015, 34(7):745–749.
- [38] Cheng SN, Yu YQ, Chen J, et al. *In vivo* confocal microscopy assessment of meibomian glands microstructure in patients with Graves' orbitopathy[J]. *BMC Ophthalmol*, 2021, 21(1):261.
- [39] 程胜男, 姜发纲, 游雅琰, 等. 活体共聚焦显微镜对甲状腺相关眼病患者睑板腺微观结构的观察研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2022, 51(5):676–682.
- Cheng SN, Jiang FG, You YY, et al. Observation on the microstructure of meibomian gland in patients with thyroid-associated ophthalmopathy by *in vivo* confocal microscopy[J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2022, 51(5):676–682.

(责任编辑:周一青)