·文献综述·

角膜共焦显微镜应用的新进展

程梦雅,曹雪倩,王林农

作者单位:(210006)中国江苏省南京市,南京医科大学附属南京医院眼科
作者简介:程梦雅,女,在读硕士研究生,研究方向:角膜病学。
通讯作者:王林农,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:白内障、青光眼、角膜病、屈光不正、疑难杂症. linnongwang@aliyun.com
收稿日期:2017-06-25 修回日期:2017-10-24

Advances in the application of corneal confocal microscopy

Meng-Ya Cheng, Xue-Qian Cao, Lin-Nong Wang

Department of Ophthalmology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Lin-Nong Wang. Department of Ophthalmology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. linnongwang@aliyun.com
Received:2017-06-25 Accepted:2017-10-24

Abstract

• Corneal confocal microscopy can be used in the real-time, noninvasive, high-resolution corneal structure at the cellular level, which has been widely used in corneal disease research. This review summarizes recent advances in corneal confocal microscopy in the study of infectious keratitis, dry eye, keratoconus, diabetic peripheral neuropathy, and clinical studies to guide corneal transplantation.

• KEYWORDS: corneal confocal microscopy; infectious keratitis; dry eyes; corneal transplantation; diabetic peripheral neuropathy; keratoconus

Citation: Cheng MY, Cao XQ, Wang LN. Advances in the application of corneal confocal microscopy *Guoji Yanke Zazhi* (*Int Eye Sci*) 2017;17(12):2278-2281

摘要

角膜共焦显微镜(corneal confocal microscopy, CCM)能在细胞水平实时、非侵入性、高清晰地检测角膜结构,它已广泛应用于角膜病的研究。本文对角膜共聚焦显微镜在感染性角膜炎、干眼病、圆锥角膜、糖尿病周围神经病变以及指导角膜移植的临床研究等新进展进行综述。

关键词:角膜共聚焦显微镜;角膜炎;干眼病;角膜移植;糖尿病周围神经病变;圆锥角膜
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.12.21

引用:程梦雅,曹雪倩,王林农. 角膜共焦显微镜应用的新进展. 国际眼科杂志 2017;17(12):2278-2281

0 引言

角膜共焦显微镜(corneal confocal microscopy,CCM)以激光为光源,具有高分辨率(1μm)、高清晰度的优点,通过连续共焦扫描,可以清晰获取活体角膜各层组织和细胞的图像,是临床从细胞水平深入探讨疾病病理机制的重要研究手段之一。20 世纪 90 年代,Cavanagh 等[1]首次报道了利用角膜共焦显微镜对猫、兔以及人体进行活体眼球断层扫描的技术,开启了眼表活体内共焦显微镜在眼科诊断中的应用时代。在过去的 20a 间,CCM 检查在眼表及眼睑中应用越来越广泛,并显示出不可比拟的优越性。与以往的检查方法相比,CCM 有以下优点:(1)利用激光为光源,分辨率高,图像清晰,图像放大倍率达 800 倍[2];(2)可用于观察上皮完整的早期病变,病原体精确的深度定位,还可观察病原体周围组织情况;(3)是一种无创伤性诊断工具,在数分钟内即可对角膜全面检查,且诊断阳性率高,这种检查很容易在疾病的不同时期重复检查,以明确治疗效果[3]。

1 CCM 在真菌性角膜炎中的应用

真菌性角膜炎(fungal keratitis,FK)是眼科致盲率较高眼病之一,在我国农民患者居多,近年来发病有逐渐上升趋势[4-5]。近期,夏元等[6]利用 CCM 发现不同的真菌在镜下各有其独特的特点:镰刀菌感染性角膜炎病灶中的菌丝在角膜浅基质层呈树枝样高反光,而在深基质层表现为线型,病灶区炎性细胞较少;念珠菌感染性角膜炎病灶中的假菌丝位于角膜浅、中基质层,有散在的孢子和炎性细胞浸润,基质纤维增生活跃;曲霉菌感染病变区的菌丝呈蠕虫状,形状较镰刀菌细且短;链格孢霉菌感染病灶区的菌丝长、直且粗大,并有球形厚垣孢子位于菌丝顶端。随后 Daas 等[7]对 1 例镜下观察到特征性真菌菌丝的患者进行病因治疗,取得了良好的疗效,而不用等待细菌培养及 PCR 结果。Kheirkha 等[8]通过比较角膜刮片、真菌培养及共焦显微镜三种检查方法的阳性率和特异性,发现角膜刮片与共焦显微镜诊断阳性率差异无统计学意义,较真菌培养高,角膜刮片在病程大于 3mo 时诊断阳性率降低,病程对共焦显微镜影响不大,真菌培养随着病程的延长,阳性率逐渐降低。真菌菌丝是诊断和鉴别真菌性角膜炎感染菌属的主要依据,角膜共焦显微镜可在活体提供有用的相关信息,为真菌性角膜炎的早期诊断和治疗提供可靠依据。

2 CCM 在棘阿米巴性角膜炎中的应用

棘阿米巴性角膜炎(acanthamoeba keratitis,AK)病程长,临床表现多为单眼发病,患者常感剧烈眼痛及视力减

退。大部分棘阿米巴性角膜炎患眼角膜上皮完整,角膜刮片及培养阳性率低,且培养时间较长(14d)。在体外实验中,棘阿米巴滋养体对神经细胞具有强烈的趋化作用,并能通过细胞裂解作用和诱导细胞凋亡杀灭神经细胞,但对角膜上皮细胞和基质细胞却无反应,由于这种嗜神经现象,典型的棘阿米巴包囊在镜下多呈串珠样排列,分布于浅中基质层,表现为直径 10~25μm、结构致密、包囊体高亮反光、包囊壁低反光的圆形小体,边境清晰,部分可见其双层壁。而炎性细胞镜下表现为边界模糊,直径约 10~12μm 小于棘阿米巴包囊的结构,且分布杂乱无规律,可与其进行鉴别[9]。Huang 等[10]对 18 例确诊为 AK 的患者在临床诊断过程中的不同时间点进行 CCM 扫描,定量分析其囊肿密度、分布和深度,量化囊肿的最大入侵深度和密度,并根据扫描结果来拟定治疗方案,对 4 例在 4 个象限中均发现囊肿且浸润深度较深的患者进行了治疗性角膜移植,而其余的保守治疗,均取得了良好的疗效。2014 年 Zhang 等[11]使用 CCM 对 AK 患者角膜溃疡区进行扫描确定病变累及的最大范围及深度来指导板层角膜移植,不仅可以控制感染,缩短病程,改善视力,而且显著降低角膜移植术后免疫排斥反应,是诊断和探索治疗棘阿米巴性角膜炎的一种有效手段。

3 CCM 在单纯疱疹病毒性角膜炎中的应用

单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex virus keratitis, HSK)是常见的眼表致盲性眼病之一,在我国,相关调查显示:国内东部地区人群中 1 型单纯疱疹病毒(HSV)的血清阳性率高达 92%[12]。CCM 下 HSK 角膜的特征性改变较少,一般可见 HSK 的角膜表层上皮细胞面积增大,不规则,密度降低,高反光细胞比例增高,上皮基底层可见树枝状高反光物质聚集[13]。目前的理论认为 HSV 初次感染后可潜伏于三叉神经节,一定条件下可引起角膜炎再次发病。由于 HSV 嗜神经的特点,HSK 角膜神经损伤的观察十分关键。Müller 等[14]在 CCM 下观察到的 HSK 上皮下神经丛改变包括:神经纤维密度、神经主干的分支数降低,神经纤维直径变小,呈弯曲或串珠样改变。神经纤维损伤在角膜炎发病后迅速发生,并长期存在,进一步阐明了 HSK 角膜知觉明显减退的发生机制。Hamrah 等[15]则观察到 HSK 患者随着角膜感觉的丢失,上皮细胞密度及大小均减小。HSV 致病机制复杂,为了便于临床研究及治疗,依据 HSK 累及病变部位而分为:上皮型(EPT)、基质型(STT)及内皮型(EDT)[16-17]。2015 年余晓菲等[18]通过 CCM 对 86 例 HSK 患者进行观察,结果显示 EPT 组中表层及翼状上皮细胞数量较对照组明显减少,STT 组中表层上皮细胞、前基质细胞及内皮细胞数量与对照组相比减少,EDT 组中内皮细胞数量较对照组减少,并且 CCM 下可见 EPT 组中参与炎症反应的主要有朗格汉斯细胞、直径 10~15μm和>15μm 的圆形细胞;和 EPT 组相比,STT 组中直径>15μm 的圆形炎症细胞明显减少;EDT 组中参与炎症反应的主要是直径 10~15μm 圆形细胞。可见,使用 CCM 可以清晰观察不同类型 HSK 角膜固有细胞和参与炎症反应细胞的变化差异。

4 CCM 在角膜移植手术中的应用

CCM 主要应用于术前病变角膜的深度判断,细胞活跃程度,术后随访观察病原菌是否复发、神经纤维再生等方面[19]。高富军等[20]通过 CCM 观察 52 例行深板层角膜移植手术治疗 FK 的患者,术前观察到其中 46 例为真菌在角膜内水平生长,6 例为真菌在角膜内斜型或垂直生长且局限于角膜的中浅层,并为其选择深板层角膜移植术式进行治疗,术后随访复发仅 2 例。近期,接英等[21]应用 CCM 观察 71 例穿透性角膜移植术后患者植片神经再生的特征:术后 1mo 角膜植片中未观察到任何神经存在;术后 3、6、12mo,角膜植片上皮下神经和基质神经的再生率均逐渐再生,且术后 12mo,再生的神经纤维与正常角膜神经纤维明显不同,表现为直径小、长度短、密度低。由于穿透性角膜移植术后神经再生受多种因素的影响而差异较大,因此 CCM 对术后的角膜神经再生进行重复连续的随访观察具有重要价值。乐琦骅等[22]对 11 例行深板层角膜移植术后的患者(7 例使用新鲜角膜,4 例使用甘油保存角膜)利用 CCM 进行全层角膜观察,发现术后角膜植片的上皮细胞、上皮细胞基底层及前弹力层的形态与正常的角膜无明显差异,新鲜植片的胞核相对较小,排列略紊乱,甘油保存植片的基质细胞则完全失去了正常形态,明显皱缩扭曲变形,为今后角膜移植材料的选择提供了参考依据。而今角膜内皮移植的技术成熟,无疑成为治疗严重角膜内皮病变的首选[23],如 Fuch 角膜内皮营养不良患者,Jie 等[24]在 CCM 下观察到其角膜各层的活体形态学特征:角膜内皮层均见到滴状赘疣,直径 20~60μm,后弹力膜增厚,后基质层可见长条形暗区结构,角膜基质反光普遍增强,Bowman 膜可见局灶性高反光区域等。特别对于角膜水肿、角膜内皮镜无法成像的患者,CCM 在细胞层面为角膜内皮移植提供了手术依据。

5 CCM 观察干眼病角膜内细胞变化

干眼病已成为影响人们生活质量的主要眼表疾病之一。CCM 下可见干眼病患者干燥斑处有明显的角膜上皮细胞坏死脱落区,反光极强;细胞间隙增宽,局部上皮细胞缺损、排列稀疏,部分患者呈扁平形浅表层角膜上皮细胞缺失。角膜上皮下神经纤维出现分支紊乱、异常走行弯曲,神经纤维不均匀增粗、增生[25]。2014 年杨帆等[26]通过 CCM 对 35 例蒸发过强型干眼病患者的眼表结构进行观察,发现其角膜中央上皮层朗格汉斯细胞平均密度较正常组明显增加,且细胞突起呈树支状,数量较多、长度较长。另外还发现干眼患者睑板腺腺泡的平均密度较少、直径增大,腺泡内呈中等程度反光,而正常组呈低反光。这样从细胞层面观察蒸发过强性干眼病的眼表结构改变,使干眼病理变化的研究更为直观。2015 年 Kheirkhah 等[27]对 35 例不同类型的干眼病患者进行观察,结果显示干眼病组患者角膜上皮朗格汉斯细胞密度及大小明显高于正常组,其中泪液分泌不足类型的干眼病患者上皮细胞密度明显高于泪液过度蒸发型(189.8±36.9 *vs* 58.9±9.4cells/mm^2, $P=0.001$),免疫型干眼病(Sjögren 综合征)患者的朗格汉斯细胞密度明显低于炎症型干眼病患者。此外,CCM 还可清楚地观察到眼表脂质层的干涉图像,测量泪膜的厚度。在睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)性干眼病的诊断中也具有很重要的意义。2016 年,Azizi 等[28]利用 CCM 对 30 例 MGD

患者的角膜基底上皮细胞密度和神经基质厚度进行观察,同时进行泪膜破裂时间、基础泪液分泌试验、反射泪液分泌试验等相关检查,结果显示:MGD 组这三项指标均低于正常对照组,这与 CCM 观察到的基底上皮细胞及神经基质厚度下降之间的关系最为密切。另外,角膜屈光手术切断角膜神经,影响角膜知觉,是患者术后产生干眼病的主要原因之一。2015 年,杨颖等[29]利用 CCM 发现在 LASEK、LASIK、Flex、SMILE 四种不同的屈光手术术式当中,SMILE 手术对患者基底膜下神经影响最小。同样的,Mohamed-Noriega 等[30]在兔眼的动物实验中亦发现 SMILE 可最大限度保留角膜上皮完整性,对基底膜下神经影响甚小,早在术后 2wk 即可观察到规律走行的神经交通支。可指导今后角膜移植术式的选择,减少术后干眼病的形成。

6 CCM 在糖尿病周围神经病变中的应用

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病常见并发症,眼睛是人体唯一可以直接观察到神经纤维的器官,特别是角膜共焦显微镜可以量化分析角膜神经纤维参数[31-32]。且已有研究表明,糖尿病患者角膜神经纤维的改变与周围神经病变程度具有相关性,因此可以通过观察角膜神经纤维的变化,评估糖尿病周围神经病变的病理改变。Mitra 等[33]对 34 例 2 型糖尿病患者(其中合并 DPN 组 20 例,不伴 DPN 组 14 例),采用 CCM 观察并记录受检者角膜上皮下神经的形态,结果发现正常对照(NC)组的角膜上皮下神经较直,分支较少。糖尿病不伴 DPN 组角膜上皮下神经纤维长度与 NC 组相比无明显差异,但神经曲折度显著增加。王宏利等[34]研究 DPN 患者角膜神经纤维的改变与 Mitra 等[33]研究结果相符。贾晓凡等[35]将 95 例糖尿病患者根据神经传导速度是否异常分为两组,通过 CCM 记录角膜神经参数(包括神经纤维密度、神经分支密度、角膜神经纤维长度),发现 DPN 组的各项角膜神经参数低于非 DPN 组,可见 CCM 对于糖尿病 DPN 具有一定的诊断价值。

7 CCM 在圆锥角膜中的应用

圆锥角膜是不伴有炎症反应且以角膜基质层进行性变薄、向前突出,从而引起不规则近视散光和不同程度的矫正视力下降为特征的疾病。角膜地形图学是多年来诊断圆锥角膜的主要辅助方法,但是对于圆锥角膜的早期诊断具有一定的局限性。Song 等[36]利用 CCM 对不同时期的圆锥角膜患者进行观察发现:早期在角膜后基质层可见纵行或斜行的暗纹结构;中期基质层的暗纹广泛粗大,并累及前基质层;晚期全基质层均见粗大暗纹,部分病例见细胞核拉长呈梭状,Descemet 膜周围基质可呈沟壑状或放射状的断裂改变。前基质层暗纹宽度不定,层间散在高反光瘢痕,部分病例可见神经纤维与暗纹交叉处出现皱褶。因此,可以在一定程度上辅助圆锥角膜的诊断。Jordan 等[37]观察 CCM 下 38 例圆锥角膜行交联手术后角膜微结构的变化,发现术后早期亚基底神经丛完全丧失和前基质角膜细胞丢失,术后 12mo 亚基底神经丛完全再生以及角膜细胞再灌注,后基质和角膜内皮不受影响,展现了这一手术的安全性和可行性。

综上所述,CCM 是一种非侵入性的客观检查方法,用于分析和量化角膜神经纤维,清晰显示了角膜各层组织结构,在感染性角膜炎、末梢神经病变、干眼病及角膜移植手术等方面得到越来越多的应用。虽然 CCM 技术不断进步,但在图像采样等客观性方面依然存在方法上的局限性,是一项值得我们去重视、研究、发展的前沿技术。

参考文献

1 Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, *et al*. Confocal microscopy of the living eye. *Clao J* 1990; 16(1):65-73

2 Bourcier T, Dupas B, Borderie V, *et al*. Heidelberg retina tomograph ii findings of acanthamoeba keratitis. *Ocular Immun Inflam* 2009; 13(6):487-492

3 Nielsen E, Heegaard S, Prause JU, *et al*. Fungal keratitis-improving diagnostics by confocal microscopy. *Case Rep Ophthalmol* 2013; 4(3):303-310

4 黎黎, 梁艳闯, 张琛,等. 化脓性角膜炎病原学分析. 眼科新进展 2008; 28(10):749-753

5 Wu TG, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Experimental keratomycosis in a mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(1):210-216

6 夏元, 薛春燕, 吴艳,等. 常见致病真菌所致角膜炎的激光扫描共焦显微镜图像特点分析. 中华实验眼科杂志 2016; 34(2):155-159

7 Daas L, Viestenz A, Bischoff M, *et al*. Confocal microscopy for the diagnostics of fungal keratitis. *Ophthalmologe* 2016;113(9): 767-771

8 Kheirkhah A, Syed ZA, Satitpitakul V, *et al*. Sensitivity and specificity of laser-scanning *in vivo* confocal microscopy for filamentous fungal keratitis: role of observer experience. *Am J Ophthalmol* 2017; 179:81-89

9 Kurbanyan K, Hoesl LM, Schrems WA, *et al*. Corneal nerve alterations in acute Acanthamoeba and fungal keratitis: an *in vivo* confocal microscopy study. *Eye* 2012; 26(1):126-132

10 Huang P, Tepelus T, Vickers LA, *et al*. Quantitative analysis of depth, distribution, and density of cysts in acanthamoeba keratitis using confocal microscopy. *Cornea* 2017;36(8):927-932

11 Zhang X, Sun X, Jiang C, *et al*. A new *in vivo* confocal microscopy prognostic factor in Acanthamoeba, keratitis. *J Français Dophtalmologie* 2014; 37(2):130-137

12 Lin H,He N,Su M,*et al*. Herpes simplex virus infections among rural residents in eastern China. *BMC Infect Dis* 2011;18(5):69

13 赵波. 活体共焦显微镜在单纯疱疹病毒性角膜炎中的应用. 中华实验眼科杂志 2015;33(5):474-477

14 Müller RT, Pourmirzaie R, Pavanlangston D, *et al*. *In vivo* confocal microscopy demonstrates bilateral loss of endothelial cells in unilateral herpes simplex keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(8): 4899-4906

15 Hamrah P, Sahin A, Dastjerdi MH, *et al*. Cellular changes of the corneal epithelium and stroma in herpes simplex keratitis : an *in vivo* confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2012; 119(119):1791-1797

16 谢立信, 史伟云. 角膜病学. 北京:人民卫生出版社 2007:285-289

17 Nagasato D,Araki-Sasaki K,Kojima T,*et al*. Morphologica changes of corneal subepithelial nerve plexus in different types of herpetic keratitis. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55(5):444-450

18 余晓菲, 王丽娅, 张月琴. 不同类型单疱病毒性角膜炎角膜内细胞变化共聚焦显微镜观察. 中国实用眼科杂志 2015;33(3):245-249

19 Wessel JM, Bachmann BO, Meiller R, *et al*. Fungal interface keratitis by Candida orthopsilosis following deep anterior lamellar keratoplasty. *BMJ Case Reports* 2013

20 高富军, 赵庆亮. 共焦显微镜指导深板层角膜移植治疗真菌性角膜炎临床观察. 中国实用眼科杂志 2010; 28(2):155-157
21 接英, 王怡, 李上,等. 穿透性角膜移植术后植片神经再生的共焦显微镜观察. 首都医科大学学报 2016,;37(3):370-375
22 乐琦骅, 徐建江. 深板层角膜移植术后全层角膜组织的共焦显微镜观察. 中华眼科杂志 2007; 43(10):936-939
23 张章, 周如侠, 王林农. 角膜内皮移植术新进展. 医学研究生学报 2015;8:889-892
24 Jie Z, Patel DV. The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy-A review of molecular and cellular insights. *Exp Eye Res* 2015;130:97-105
25 Kinard KI, Smith AG, Singleton JR, *et al*. Chronic migraine is associated with reduced corneal nerve fiber density and symptoms of dry eye. *Headache J Head Face Pain* 2015;55(4):543-549
26 杨帆, 吴琼, 康杨,等. 共聚焦显微镜对蒸发过强型干眼眼表结构的观察. 现代生物医学进展 2014; 14(15):2893-2896
27 Kheirkhah A, Rahimi DR, Cruzat A, *et al*. Corneal epithelial immune dendritic cell alterations in subtypes of dry eye disease: a pilot *in vivo* confocal microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(12):7179-7185
28 Azizi S, Uçak T, Yaşar I, *et al*. Evaluation of the corneal layers in meibomian-gland-dysfunction-related dry eye by *in vivo* slit-scanning confocal microscopy. *Semin Ophthalmol* 2017;32(3):377-384
29 杨颖, 左晶, 张传伟,等. 不同角膜屈光手术对基底膜下神经的影响. 国际眼科杂志 2015;15(8):1429-1431
30 Mohamed-Noriega K, Riau AK, Lwin NC, *et al*. Early corneal nerve damage and recovery following small incision lenticule extraction (SMILE) and laser *in situ* keratomileusis (LASIK). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(3):1823-1834
31 Shtein RM, Callaghan BC. Corneal confocal microscopy as a measure of diabetic neuropathy. *Diabetes* 2013; 62(1):25-26
32 Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H, *et al*. Corneal nerve loss detected with corneal confocal microscopy is symmetrical and related to the severity of diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care* 2013; 36(11):3646-3651
33 Mitra T, Piyara B, John M, *et al*. Corneal confocal microscopy for the diagnosis of diabetic autonomic neuropathy. *Muscle Nerve* 2014; 52(3):363-370
34 王宏利, 樊东升, 王薇,等. 角膜共焦显微镜对于糖尿病自主神经病变的早期诊断价值. 中华医学杂志 2015; 95(35):863-866
35 贾晓凡, 李明顺, 戴虹,等. 角膜共焦显微镜对2型糖尿病周围神经病变的诊断价值. 中国糖尿病杂志 2016; 8(8):457-462
36 Song P, Wang S, Zhang P, *et al*. The superficial stromal scar formation mechanism in keratoconus: a study using laser scanning *in vivo* confocal microscopy. *Biomed Res Int* 2016; 2016(3):7092938
37 Jordan C, Patel DV, Abeysekera N, *et al*. *In vivo* confocal microscopy analyses of corneal microstructural changes in a prospective study of collage cross-linking in keratoconus. *Ophthalmology* 2014; 121(2):469-474