

# 活体共聚焦显微镜在睑板腺观察中的应用现状

何圣玉<sup>1</sup>, 李绍伟<sup>1,2</sup>

基金项目:湖南省自然科学基金(No. 2017JJ2001);爱尔眼科医院集团科研基金(No. AM164D05)

作者单位:<sup>1</sup>(410000)中国湖南省长沙市,中南大学爱尔眼科学院;<sup>2</sup>(100021)中国北京市,北京爱尔英智眼科医院

作者简介:何圣玉,女,在读硕士研究生,研究方向:眼表及角膜病。

通讯作者:李绍伟,男,中南大学爱尔眼科学院博士研究生导师,研究方向:眼表及角膜病. shaoweili2005@vip.163.com

收稿日期:2017-10-24 修回日期:2018-01-22

## Application status of *in vivo* confocal microscopy in observation of meibomian glands

Sheng-Yu He<sup>1</sup>, Shao-Wei Li<sup>1,2</sup>

Foundation items: Natural Science Foundation of Hunan (No. 2017JJ2001); Aier Eye Hospital Group Foundation Project (No. AM164D05)

<sup>1</sup>Aier School of Ophthalmology, Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China; <sup>2</sup>Beijing Aier-Intech Eye Hospital, Beijing 100021, China

Correspondence to: Shao-Wei Li. Aier School of Ophthalmology, Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China; Beijing Aier-Intech Eye Hospital, Beijing 100021, China. shaoweili2005@vip.163.com

Received: 2017-10-24 Accepted: 2018-01-22

### Abstract

• As a non-invasive ocular imaging tool, *in vivo* confocal microscopy (IVCM) provides micro-structural information of cornea, conjunctiva and meibomian glands at the cellular level to display their microscopic structure features. IVCM supplies a unique advantage to clinical applications and research in ocular surface. Recently, application of IVCM has progressively extended to the research area on meibomian gland dysfunction (MGD) and on other diseases about meibomian gland. Thus, this paper aims to summarize the current knowledge about the role of IVCM in the assessment of meibomian glands.

• KEYWORDS: *in vivo* confocal microscopy; ocular surface; meibomian gland; meibomian gland dysfunction

Citation: He SY, Li SW. Application status of *in vivo* confocal microscopy in observation of meibomian glands. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(3):470-474

### 摘要

活体共聚焦显微镜(*in vivo* confocal microscopy, IVCM)作为一种非侵入性眼部成像技术,可在细胞水平上为角膜、结膜、睑板腺等眼表组织提供高分辨率图像,以显示它们的微观结构特征,在眼表疾病的科研和临床应用中体现出独特的优势。近年来国内外许多学者已逐渐将IVCM引入到睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)及其他睑板腺相关疾病的探究中。因此,本文对IVCM在睑板腺观察中的应用研究及其进展进行总结,以期临床工作提供参考。

关键词:活体共聚焦显微镜;眼表;睑板腺;睑板腺功能障碍

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.3.15

引用:何圣玉,李绍伟.活体共聚焦显微镜在睑板腺观察中的应用现状.国际眼科杂志2018;18(3):470-474

### 0 引言

睑板腺是人体中最大的皮脂腺。Meibom<sup>[1]</sup>首次详细描述了睑板腺:睑板腺分布在上下睑板层,上睑分布30~40个,下睑分布20~30个,并且与睑缘相垂直。睑板腺能够合成、储存并分泌脂质,且它分泌的脂质可以参与构成泪膜的脂质层。当睑板腺功能发生障碍时,泪膜的脂质层受损,进而造成蒸发过强型干眼<sup>[2-3]</sup>。睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)是一种慢性、弥漫性睑板腺异常,通常以睑板腺终末导管的阻塞和(或)睑板腺分泌物质或量的改变为主要特征,可以导致泪膜的变化、眼睛刺激性症状、炎症反应和眼表疾病<sup>[4]</sup>。MGD在人群中的发病率逐年升高,受到学者们的广泛关注,是目前国际上关于眼表疾病的研究热点之一。

活体共聚焦显微镜(*in vivo* confocal microscopy, IVCM)是一种具有高分辨率的新型非侵入性的眼表成像仪器,利用其激光聚焦原理对共焦平面的被检层每一点进行扫描,在活体下即可多层次地观察眼表组织中的有形成分,并且还可以实时地拍摄细胞水平的组织形态与变化<sup>[5]</sup>。目前,IVCM广泛用于多种角膜疾病的研究,如各种感染性角膜病变、营养不良疾病、内皮病变、圆锥角膜、屈光手术和角膜移植术后的观察等,并能对角膜上皮、角膜基质细胞、角膜神经、角膜内皮细胞、免疫和炎症细胞以及睑板腺等眼表组织结构进行观察<sup>[6]</sup>。近年来随着MGD日益受到关注,IVCM在睑板腺的应用研究越来越多<sup>[7-9]</sup>,其能够观察睑板腺的腺泡、腺泡间质、腺体分泌物、腺周炎症细胞和睑板腺开口等特征。IVCM不但有助于进一步阐明MGD的病理生理机制,还能检测相关疾病的病情变化,从而评价治疗效果。本文就IVCM在睑板腺相关疾病临床研究中的应用现状进行阐述。

## 1 正常睑结膜和睑板腺的 IVCM 表现

**1.1 睑结膜** 2005 年 Kobayashi 等<sup>[10]</sup>首次使用 IVCM 观察 4 例健康人的睑结膜和下眼睑睑板腺的结构特征。他们发现结膜上皮细胞由非角化的复层柱状上皮、杯状细胞、朗格汉斯细胞和树突状细胞组成。睑结膜上皮细胞比球结膜上皮细胞体积要小,直径约为  $10\mu\text{m}$ ,其中还可以见到结膜内陷或隐窝。结膜上皮细胞的下层可以见到大量高反光细胞,可能为白细胞,在同一层面还可以观察到血细胞在血管内快速运动。睑结膜上皮细胞深层也可以见到大量的网状结构,这一结构被认为是睑板腺。随后又有多项研究<sup>[11-14]</sup>运用 IVCM 观察正常的球结膜和睑结膜的微观结构,研究发现正常的睑结膜上皮由几层薄薄的小立方上皮细胞组成。其中表层上皮细胞呈椭圆形或圆形,胞浆为深灰色,细胞核不可见,细胞边界呈浅灰色,细胞大小恒定。而基底上皮细胞大小形态不一,呈圆形或椭圆形,体积比表层上皮细胞小,细胞边界呈浅灰色。基底上皮细胞深层为成团或散在分布于上皮细胞间的杯状细胞,结膜杯状细胞核呈低反光,而细胞质呈较均匀的高反光,其体积较周围的上皮细胞大。朗格汉斯细胞群分布在不同上皮细胞层和基质层,这些细胞似短羽毛状分支,通常形成一个“Y”字形。

**1.2 睑板腺** 近些年多项研究<sup>[13-14]</sup>将 IVCM 应用于观察睑板腺,发现正常睑板腺腺泡呈类椭圆形,排列整齐。腺泡边界由较大的立方腺泡细胞围绕而成,腺泡中央为泡腔,其内可见低反光分泌物,而腺泡间质由密度均匀的结缔组织组成。Efron 等<sup>[15]</sup>运用 IVCM 从冠状面扫描睑板腺,可以观察到大量的腺泡垂直于腺体导管。他们进一步证实了腺泡边界由大小较一致的立方腺泡细胞围绕而成,这些立方腺泡细胞边界模糊,细胞质为灰色,但可见少量细胞呈高反光。腺泡腔内由有分泌功能的小细胞组成。他们还发现每个腺泡均为不同的形状,腺泡细胞的细胞质为灰色,部分细胞可见黑色的细胞核。此外,国内学者<sup>[16]</sup>运用 IVCM 观察到正常健康组的睑板腺开口呈圆形或椭圆形,由多层扁平上皮细胞环绕而成,直径约为  $30\sim 40\mu\text{m}$ ,开口中央为透明暗区。这些研究结果有助于我们对睑板腺的解剖结构有更深刻的认识。

**1.3 睑板腺随着年龄的变化** 早期 Obata 等<sup>[17-18]</sup>提出关于人类睑板腺随着年龄变化的研究,他们观察到随着年龄的增长,睑板腺腺泡出现萎缩现象而未见明显扩张,且睑板腺的分泌能力也随之降低。随后有研究<sup>[19-20]</sup>关于老年人的睑板腺解剖结构和生理变化,他们发现随着年龄的增长,睑板腺腺泡细胞萎缩、导管上皮细胞过度角化、腺体分泌物减少以及分泌物的黏性增加。Wei 等<sup>[13]</sup>首次应用 IVCM 观察 40 例不同年龄的健康人,发现睑结膜杯状细胞密度和睑板腺腺泡密度随着年龄的增长而降低,但结膜的基底上皮细胞密度和朗格汉斯细胞密度在不同年龄中未见明显变化。此外,Villani 等<sup>[21]</sup>将 IVCM 应用于观察不同年龄段中无眼部症状的健康人群,进一步证实随着年龄的增长,睑板腺腺泡密度减少、腺泡直径变短、腺泡分泌物反光增强、腺泡壁不均匀性增加,且这些变化在 60 岁以上人群与 60 岁以下人群尤为明显。因此他们分析认为,与年龄有关的 MGD 有两种表现形式:(1)由于腺泡的萎缩和腺泡密度的减少导致了睑板腺的萎缩;(2)由于睑板腺分泌物阻塞了腺体。还有学者<sup>[22]</sup>

利用 IVCM 进行研究,发现在不同人种中,睑板腺腺泡密度与年龄均呈明显的负相关性。

## 2 异常睑板腺的 IVCM 表现

**2.1 睑板腺功能障碍的睑板腺结构和形态改变** MGD 主要表现为睑缘结构的炎性改变和睑板腺管口的解剖结构改变,这些变化将导致脂质分泌减少、泪液蒸发过强,是蒸发过强型干眼的最主要原因。IVCM 可以客观地记录睑结膜、睑缘、睑缘周围的毛囊和睑板腺等组织的形态结构。Messmer 等<sup>[23]</sup>首次应用 IVCM 研究睑板腺相关疾病,观察 12 例患有睑缘炎/睑板腺炎或 MGD 的患者,发现他们的腺泡呈病理性扩张,腺体的开口处阻塞;另外在 19 例患有睑缘炎/睑板腺炎而无 MGD 的患者中,有 15 例患者的睑结膜上皮细胞层和基质层出现大量的高反光炎症细胞。随后 Matsumoto 等<sup>[24]</sup>运用 IVCM 研究发现,腺泡密度与睑板腺丢失程度和睑板腺分泌能力呈负相关性,而腺泡直径与睑板腺丢失程度和睑板腺分泌能力呈正相关性。还有学者<sup>[7,16,25]</sup>运用 IVCM 研究发现,MGD 的睑板腺表现为腺泡间质的不均匀性明显增加、腺体导管上皮角化、腺泡扩张、腺泡萎缩、腺泡纤维化和腺泡间质炎症细胞浸润;萎缩的腺泡表现为腺泡直径较正常腺泡变小和/或腺泡密度降低,组成腺泡的周边立方腺泡细胞结构消失,由周围条索状纤维化组织代替。

上述 MGD 在 IVCM 中睑板腺结构和形态的改变,表明腺泡扩张、腺泡萎缩、腺泡纤维化和腺泡炎症细胞浸润是 MGD 的重要标志。其中腺泡密度和腺泡直径是可以量化的客观指标,有望成为诊断和评价 MGD 的重要参数。

**2.2 干眼病的睑板腺结构及形态改变** 干眼病(dry eye disease,DED)是一种多因素引起的眼表疾病,伴有泪膜稳态异常、眼部不适症状、泪液渗透压升高、眼表损害、眼表炎症和神经感觉异常等<sup>[26]</sup>。DED 在世界范围内发病率约 5%~35%<sup>[27-32]</sup>,且其发病率逐年升高,而 MGD 是引起蒸发过强型干眼的主要原因<sup>[33-35]</sup>。Villani 等<sup>[6]</sup>运用 IVCM 研究发现,在干燥综合征(Sjögren's syndrome,SS)和 MGD 患者中,睑板腺的腺泡扩张。其中继发性干燥综合征(secondary Sjögren's syndrome,SS II)的平均腺泡直径为  $70\pm 42\mu\text{m}$ ,MGD 的平均腺泡直径为  $106\pm 41\mu\text{m}$ ,而原发性干燥综合征(primary Sjögren's syndrome,SS I)的平均腺泡直径为  $53\pm 31\mu\text{m}$ ,与对照组( $53\pm 14\mu\text{m}$ )相比无明显差异;SS I 和 SS II 患者的睑板腺开口平均直径分别为  $27.8\pm 5.9\mu\text{m}$  和  $20.6\pm 5.1\mu\text{m}$ ,两者均明显小于对照组( $34.7\pm 4.3\mu\text{m}$ ),但 MGD 组睑板腺开口直径为  $50\pm 9.1\mu\text{m}$ ,较对照组明显增加;SS I 患者的睑板腺腺泡密度( $138\pm 69$ 个/ $\text{mm}^2$ )明显增加,但 SS II 组和 MGD 组则明显减少,分别为  $97\pm 43$ 、 $57\pm 21$ 个/ $\text{mm}^2$ 。此外他们还发现,在 DED 患者中,他们的腺泡壁和腺泡间隙不均匀性明显高于正常组,睑板腺的分泌物反光明显增强。此外,也有学者<sup>[36]</sup>证实 DED 患者的睑板腺出现纤维化和腺泡结构的消失。随后他们又运用 IVCM 测量睑板腺的平均腺泡面积,发现干眼症状严重的腺泡面积为  $691.87\pm 182.01\mu\text{m}^2$ ,轻度干眼症的腺泡面积为  $992.17\pm 170.84\mu\text{m}^2$ 。他们还测量 DED 患者的腺泡最长直径和腺泡最短直径均较正常组减小,且症状越重者腺泡直径越小。由此可见,IVCM 有助于临床医生早期判断 DED 和 MGD 的病情,为监测病情和治疗提供一定依据。

**2.3 角膜接触镜配戴者的睑板腺结构和形态改变** 角膜接触镜(contact lens, CL)的使用在全球很普遍,然而在CL的配戴者(contact lens wearers, CLWs)中干眼症是一个常见的问题。Arita等<sup>[14]</sup>发现,在大多数CLWs中,他们的睑板腺缩短,且睑板腺在与CL接触端开始缩短。随后有研究<sup>[9]</sup>将IVCM应用于观察CLWs的睑板腺和腺体周围炎症情况等,发现CLWs组的腺泡直径变小,而腺体开口直径却变大;腺体分泌物反光增强以及腺周间隙不均匀性增加。但与对照组相比,腺泡密度却没有明显变化。他们还注意到腺泡直径的变化与CL配戴的时间长短有很大的相关性,配戴时间越长腺泡直径越短。由此他们推测,睑板腺的这些变化与CL对睑板腺的机械损伤有关,这种机械损伤进一步导致腺体导管的阻塞,进而认为CL对睑板腺的慢性机械刺激可能是诱发睑板腺变化的主要机制。

**2.4 过敏性眼表疾病的睑板腺结构和形态改变** 过敏性眼表疾病是一种常见的眼科疾病,人群患病率约20%<sup>[37]</sup>,其中春季角结膜炎(vernal keratoconjunctivitis, VKC)和特异性角膜结膜炎(atopic keratoconjunctivitis, AKC)又是两种最常见的过敏性眼表疾病。睑板腺的变化在过敏性眼表疾病所致DED中起了重要作用<sup>[24]</sup>。

2011年,Le等<sup>[38]</sup>运用IVCM观察26例VKC患者的结膜病变,发现睑板腺腺周有大量的朗格汉斯细胞。随后又有研究<sup>[39]</sup>证实,运用IVCM可以观察到VKC组的腺泡周围有大量的朗格汉斯细胞,在睑结膜型VKC尤为明显。他们还发现VKC组的腺泡轮廓比正常对照组模糊,而且腺泡腔内有固体状的高反光物质。另一个有意思的发现是,VKC的炎症细胞密度与腺泡密度呈明显的负相关性。因此作者推测,免疫炎症反应可能会影响睑板腺的结构,最终导致MGD,但尚需进一步研究论证这种推测。Ibrahim等<sup>[40]</sup>运用IVCM首次观察到AKC的睑板腺结构和正常组明显不同。他们测量AKC患者的腺周炎性细胞密度为1192个/mm<sup>2</sup>,较阻塞型MGD的腺周炎性细胞密度(712.9个/mm<sup>2</sup>)和正常对照组的腺周炎性细胞密度(60.6个/mm<sup>2</sup>)明显增加;腺泡最长直径为43.8μm,小于正常组(59.9μm);腺泡面积646μm<sup>2</sup>也较正常组(716.5μm<sup>2</sup>)和MGD组(2119.5μm<sup>2</sup>)减小;腺泡密度为40.1个/mm<sup>2</sup>,较正常组(120.1个/mm<sup>2</sup>)明显降低。他们还观察到AKC的睑板腺纤维化程度比阻塞型MGD更严重,而且出现大量的腺泡萎缩。

**2.5 慢性移植抗宿主病的睑板腺结构和形态改变** 异基因造血干细胞移植后慢性移植抗宿主病(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)发病率较高,其中60%会出现眼部并发症,而又以DED最为多见,约占50%~60%<sup>[41]</sup>,MGD为第二常见的眼部并发症,其发病率是47.8%<sup>[42]</sup>。然而关于慢性移植抗宿主病继发性干眼症(DE/cGVHD)的睑板腺形态学的研究却很少。Ban等<sup>[43]</sup>首次运用IVCM研究DE/cGVHD的睑板腺形态变化。他们发现睑板腺腺泡密度在DE/cGVHD中为57.8±38.3个/mm<sup>2</sup>,明显低于对照组(88.8±26.6个/mm<sup>2</sup>);cGVHD组的腺泡最长径和最短径分别为37.3±24.4μm和17.7±11.8μm,均低于对照组。他们还发现DE/cGVHD的腺体出现严重萎缩和纤

维化改变,并伴有炎症细胞浸润。因此他们推测,在DE/cGVHD的眼部并发症中,睑板腺纤维化导致的MGD为主要因素,且睑板腺的纤维化对MGD和干眼的影响是独立进行的。

**2.6 青光眼的睑板腺结构和形态改变** 近年来,国内外学者逐渐将IVCM应用于青光眼的治疗以观察对眼表结构和睑板腺的影响<sup>[25,44-47]</sup>。自2011年起,开始有关于长期使用抗青光眼药物后睑板腺结构和功能改变的研究<sup>[48-50]</sup>。2013年,Agnifili等<sup>[25]</sup>使用IVCM研究表明,长期使用抗青光眼药物患者的睑板腺腺泡密度和腺泡面积较正常组减少,腺泡内的脂质分泌物反光增强,睑板腺开口扩张,腺泡壁和腺泡间隙反光增强。这些病理变化与阻塞型MGD有部分相似,但在阻塞型MGD中并未发现腺泡面积变小。该研究还发现,使用含防腐剂的前列腺素类药物患者,其睑板腺腺泡壁和腺泡间隙炎症反应明显强于不含防腐剂的前列腺素类药物。还有学者研究认为<sup>[47,51]</sup>,抗青光眼治疗中睑板腺的这些病理变化,主要机制可能是由于药物毒性、炎症或免疫反应引起,而炎症反应可能是睑板腺变化的第一步。从这些研究可以看出,IVCM可能从形态学的角度揭示抗青光眼药物引起睑板腺结构、功能异常的微观机制。

### 3 IVCM在睑板腺功能障碍中的诊断应用

临床上评价睑板腺功能的方法有睑板腺按压检查、非侵入式眼表综合分析、睑板检测,最近兴起的检查手段有泪膜干涉成像、眼表泪液蒸发测定、睑板腺成像和IVCM<sup>[52]</sup>。早在2008年Matsumoto等<sup>[24]</sup>提出,腺泡密度和腺泡直径有望成为诊断和评价MGD的重要参数,他们测量了MGD患者的平均腺泡密度为47.6±26.6个/mm<sup>2</sup>,明显低于正常组(101.3±33.8个/mm<sup>2</sup>);腺泡直径为98.2±53.3μm,大于正常组(41.6±11.9μm)。由于他们的病例数较少,尚需大量数据进一步验证这些参数。接着有研究<sup>[53]</sup>报道睑板腺的腺泡密度、直径和炎症细胞密度在诊断和评价阻塞型MGD中起重要作用。随后多项研究<sup>[7,40,54]</sup>均表明,腺泡密度、腺泡直径和炎症细胞密度有望成为IVCM观察MGD的新参数,且这些参数与泪液功能、眼表荧光染色、睑板腺分泌功能、睑板腺丢失程度有很大的相关性。2010年,Ibrahim等<sup>[7]</sup>详细报道了腺泡最长径(MGALD)、腺泡最短径(MGASD)、炎症细胞密度(ICD)和腺泡密度(MGAUD)在MGD的诊断阈值分别是>65μm、<25μm、>300个/mm<sup>2</sup>和<70个/mm<sup>2</sup>。在这些诊断阈值中,MGALD的灵敏性和特异性分别是90%和81%,MGASD的灵敏性和特异性分别是86%和96%,ICD的灵敏性和特异性均为100%,腺泡密度的灵敏性和特异性分别为81%和81%。

除了上述测量参数,IVCM还可以测量上下眼睑腺周炎症细胞密度(个/mm<sup>2</sup>),为我们提供了MGD的炎症反应状态。最近一项研究<sup>[55]</sup>表明,IVCM可以观察到难治性MGD患者的睑结膜炎症细胞比易治性MGD患者的睑结膜炎症细胞数量增高。结膜炎症细胞密度在有症状的MGD患者中是正常组的5倍,且炎症细胞密度与泪膜破裂时间呈显著的负相关性、与症状的严重程度(OSDI评分)呈显著的正相关性,提示睑结膜的炎症反应与眼部症状有关。

IVCM 有助于临床医生早期诊断 MGD, 且对其疗效的评估和症状的缓解有一个量的评价, 还可以辅助 MGD 的分类。然而, 这些参数的具体诊断阈值迄今为止还没有明确的定义。

#### 4 总结

IVCM 应用于人体角膜病的研究已有 20 余年的历史。近年来, IVCM 在 MGD、DED、过敏性眼表疾病、戴 CL 者、青光眼、慢性移植抗宿主病继发性干眼症的睑板腺形态学变化的临床研究方面也有了新的进展。以往对于眼表组织微观结构的观察和研究以组织病理、免疫组织化学、印迹细胞学等手段为主。IVCM 这一光学断层扫描技术使人们实现了在活体上观察睑板腺腺泡密度、腺泡直径、腺体开口、腺泡纤维化和腺泡间质炎症细胞等微观结构, 还能进行定量分析, 为睑板腺相关疾病的临床研究开辟了新的领域。然而, IVCM 在这些疾病的临床应用中也有其局限性: (1) 由于激光穿透力有限, 它对睑板腺深部的腺管结构显像不清, 故无法观察分析腺管的病变; 其次, IVCM 只能对组织结构中的有形成分和细胞进行形态学的观察, 对于某些细胞和组织的鉴别仍然存在局限性。(2) IVCM 在睑板腺的检查应用中, 需要翻转被检查者的眼睑, 接触的平面不如角膜平整, 其操作难度更大, 可能给被检查者带来更大不适。且其测量结果受被检查者的配合度、检查部位、聚焦深度、成像系统分辨率、检查者主观判读等因素的影响, 其一致性、可重复性有待确证。(3) IVCM 成像技术尚需进一步提升, 彩色成像和三维重建技术是未来发展的趋势。

综上所述, IVCM 作为一种在活体中非侵入性的成像技术, 有助于探索睑板腺相关疾病的发病机制和影响因素, 还能从细胞形态学水平评估、监测 MGD 的治疗效果, 更为准确地判断疾病的预后。当然, IVCM 在睑板腺的观察应用中是否还有新的进展, 仍需要研究者进一步的探究。

#### 参考文献

- 1 Meibom H. De Vasis Palpebraum Novis Epistola Helmeštadi: Typis sumptibus. Helmeštadt: Henning Muller 1992; 34
- 2 Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, et al. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 2004; 78(3): 347-360
- 3 乔静, 晏晓明. 睑板腺脂质研究进展. *中华眼科杂志* 2012; 48(12): 1141-1145
- 4 Tomlinson A, Bron AJ, Korb DR, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction; report of the diagnosis subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(4): 2006-2049
- 5 Erie JC, McLaren JW, Patel SV, et al. Confocal microscopy in ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 2009; 148(5): 639-646
- 6 Villani E, Baudouin C, Efron N, et al. *In Vivo* Confocal Microscopy of the Ocular Surface: From Bench to Bedside. *Curr Eye Res* 2014; 39(3): 213-231
- 7 Ibrahim OM, Matsumoto Y, Dogru M, et al. The efficacy, sensitivity, and specificity of *in vivo* laser confocal microscopy in the diagnosis of meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology* 2010; 117(4): 665-672
- 8 Villani E, Beretta S, De Capitani, et al. *In vivo* confocal microscopy of meibomian glands in Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(2): 933-939
- 9 Villani E, Ceresara G, Beretta S, et al. *In vivo* confocal microscopy of meibomian glands in contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

2011; 52(8): 5215-5219

- 10 Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K. *In vivo* findings of the bulbar/palpebral conjunctiva and presumed meibomian glands by laser scanning confocal microscopy. *Cornea* 2005; 24(8): 985-988
- 11 Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K. *In vivo* laser and white light confocal microscopic findings of the human conjunctiva. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2004; 35(6): 482-484
- 12 Messmer E, Mackert M, Zapp D, et al. *In vivo* confocal microscopy of normal conjunctiva and conjunctivitis. *Cornea* 2006; 25(7): 781-788
- 13 Wei A, Hong J, Sun X, et al. Evaluation of age-related changes in human palpebral conjunctiva and meibomian glands by *in vivo* confocal microscopy. *Cornea* 2011; 30(9): 1007-1012
- 14 Arita R, Itoh K, Inoue K, et al. Contact lens wear is associated with decrease of Meibomian glands. *Ophthalmology* 2009; 116(3): 379-384
- 15 Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. *In Vivo* Confocal Microscopy of the Palpebral Conjunctiva and Tarsal Plate. *Optom Vis Sci* 2009; 86(11): 1303-1308
- 16 梁庆丰, 高超, 梁虹. 活体共聚焦显微镜对睑板腺功能障碍患者睑板腺形态检测的应用研究. *中华眼科杂志* 2012; 52(9): 649-656
- 17 Obata H, Horiuchi H, Miyata K, et al. Histopathological study of the meibomian glands in 72 autopsy cases. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1994; 98(8): 765-771
- 18 Obata H. Anatomy and histopathology of human Meibomian gland. *Cornea* 2002; 21(7 suppl): S70-74
- 19 Arita R, Itoh K, Inoue K, et al. Noncontact infrared meibography to document age-related changes of the meibomian glands in a normal population. *Ophthalmology* 2008; 115(5): 911-915
- 20 Sullivan BD, Evans JE, Dana MR, et al. Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(9): 1286-1292
- 21 Villani E, Canton V, Magnani F, et al. The aging Meibomian gland; an *in vivo* confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(7): 4735-4740
- 22 Knop E, Knop N, Millar T, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction; report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(4): 1938-1978
- 23 Messmer EM, Torres Suárez E, Mackert MI, et al. *In vivo* confocal microscopy in blepharitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2005; 222(11): 894-900
- 24 Matsumoto Y, Sato E, Ibrahim O, et al. The application of *in vivo* laser confocal microscopy to the diagnosis and evaluation of meibomian gland dysfunction. *Mol Vis* 2008; 14: 1263-1271
- 25 Agnifili L, Fasanella V, Costagliola C, et al. *In vivo* confocal microscopy of meibomian bands in glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2013; 97(3): 343-349
- 26 Craig JP, Nichols KK, Nichols JJ, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf* 2017; 15(3): 276-283
- 27 Lee AJ, Lee J, Saw SM, et al. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(12): 1347-1351
- 28 Lin PY, Tsai SY, Cheng CY, et al. Prevalence of dry eye among all elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study. *Ophthalmology* 2003; 110(6): 1096-1101
- 29 Munoz B, West SK, Rubin GS, et al. Causes of blindness and visual impairment in a population of older Americans: The Salisbury Eye Evaluation Study. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(6): 819-825
- 30 Schein OD, Hochberg MC, Munoz B, et al. Dry eye and dry mouth in the elderly: a population-based assessment. *Arch Intern Med* 1999; 159(12): 1359-1363

- 31 Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, *et al.* Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol* 1997;124(8):723-728
- 32 Jie Y, Xu L, Wu YY, *et al.* Prevalence of dry eye among adult Chinese in the Beijing Eye Study. *Eye (Lond)* 2009;23(3):688-693
- 33 Viso E, Gude F, Rodriguez-Ares MT. The association of meibomian gland dysfunction and other common ocular diseases with dry eye: a population-based study in Spain. *Cornea* 2011;30(1):1-6
- 34 Bron AJ, Tiffany JM. The contribution of meibomian disease to dry eye. *Ocul Surf* 2004;2(2):149-165
- 35 Rege A, Kulkarni V, Puthran N, *et al.* A clinical study of subtype-based prevalence of dry eye. *J Clin Diagn Res* 2013;7(10):2207-2210
- 36 Zhao H, Chen JY, Wang YQ, *et al.* *In vivo* Confocal Microscopy Evaluation of Meibomian Gland Dysfunction in Dry Eye Patients with Different Symptoms. *Chin Med J (Engl)* 2016;129(21):2617-2622
- 37 Berdy GJ, Hedqvist B. Ocular allergic disorders and dry eye disease: associations, diagnostic dilemmas, and management. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 2000;(230):32-37
- 38 Le Q, Hong J, Zhu W, *et al.* *In vivo* laser scanning confocal microscopy of vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Ophthalmol* 2011;39(1):53-60
- 39 Wei Q, Le Q, Hong J, *et al.* *In vivo* confocal microscopy of meibomian glands and palpebral conjunctiva in vernal keratoconjunctivitis. *Indian J Ophthalmol* 2015;63(4):327-330
- 40 Ibrahim OM, Matsumoto Y, Dogru M, *et al.* *In vivo* confocal microscopy evaluation of Meibomian gland dysfunction in atopic - keratoconjunctivitis patients. *Ophthalmology* 2012; 119 ( 10 ): 1961-1968
- 41 Jabs DA, Wingard J, Green R, *et al.* The eye in bone marrow transplantation, III. Conjunctival graft - vs - host disease. *Arch Ophthalmol* 1989;107(9):1343-1348
- 42 Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, *et al.* Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83(10):1125-1130
- 43 Ban Y, Ogawa Y, Ibrahim OM, *et al.* Morphologic evaluation of Meibomian glands in chronic graft-versus-host disease using *in vivo* laser confocal microscopy. *Mol Vis* 2011;17(29):533-2543
- 44 Mastropasqua R, Fasanella V, Pedrotti E, *et al.* Transconjunctival aqueous humor outflow in glaucomatous patients treated with prostaglandin analogues: an *in vivo* confocal microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;252(9):1469-1476
- 45 Agnifili L, Carpineto P, Fasanella V, *et al.* Conjunctival findings in hyperbaric and low-tension glaucoma: an *in vivo* confocal microscopy study. *Acta Ophthalmol* 2012;90(2):e132-137
- 46 Mastropasqua L, Agnifili L, Fasanella V, *et al.* Conjunctival goblet cells density and preservative-free tafluprost therapy for glaucoma: an *in vivo* confocal microscopy and impression cytology study. *Acta Ophthalmol* 2013;91(5):e397-405
- 47 Mastropasqua L, Agnifili L, Mastropasqua R, *et al.* Conjunctival modifications induced by medical and surgical therapies in patients with glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13(1):56-64
- 48 Cunniffe MG, Medel - Jiménez R, González - Candial M. Topical antiglaucoma treatment with prostaglandin analogues may precipitate meibomian gland disease. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 2011;27(5):e128-129
- 49 Arita R, Itoh K, Maeda S, *et al.* Comparison of the long-term effects of various topical antiglaucoma medications on meibomian glands. *Cornea* 2012;31(11):1229-1234
- 50 Arita R, Itoh K, Maeda S, *et al.* Effects of long-term topical antiglaucoma medications on meibomian glands. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250(8):1181-1185
- 51 Mastropasqua L, Agnifili L, Mastropasqua R, *et al.* *In vivo* laser scanning confocal microscopy of the ocular surface in glaucoma. *Microsc Microanal* 2014;20(3):879-894
- 52 Geerling G, Baudouin C, Aragona P, *et al.* Emerging strategies for the diagnosis and treatment of meibomian gland dysfunction: Proceedings of the OCEAN group meeting. *Ocul Surf* 2017;15(2):179-192
- 53 Matsumoto Y, Shigeno Y, Sato EA, *et al.* The evaluation of the treatment response in obstructive meibomian gland disease by *in vivo* laser confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(6):821-829
- 54 Fasanella V, Agnifili L, Mastropasqua R, *et al.* *In Vivo* Laser Scanning Confocal Microscopy of Human Meibomian Glands in Aging and Ocular Surface Diseases. *Biomed Res Int* 2016;2016:7432131
- 55 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. *Eye* 2015;29(8):1099-1110