

# 泪液缺乏性干眼治疗转归的定量检测

程燕<sup>1</sup>, 吴洁<sup>1</sup>, 朱海峰<sup>1</sup>, 高伟<sup>1</sup>, 刘先宁<sup>2</sup>, 朱秀萍<sup>2</sup>

作者单位: <sup>1</sup>(710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科;  
<sup>2</sup>(710002) 中国陕西省西安市, 陕西省眼科研究所  
作者简介: 程燕, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜病及眼表疾病。

通讯作者: 吴洁, 硕士, 主任医师, 研究方向: 角膜病及眼表疾病。wutu@163.com

收稿日期: 2012-04-20 修回日期: 2012-06-12

## Quantitative detection of aqueous tear deficiency dry eye treatment outcome

Yan Cheng<sup>1</sup>, Jie Wu<sup>1</sup>, Hai-Feng Zhu<sup>1</sup>, Wei Gao<sup>1</sup>, Xian-Ning Liu<sup>2</sup>, Xiu-Ping Zhu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Eye Institute of Shaanxi Province, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jie Wu. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. wutu@163.com

Received: 2012-04-20 Accepted: 2012-06-12

### Abstract

• AIM: To quantitatively detect the diseased corneal epithelial cells, conjunctival cells before and after aqueous tear deficiency dry eye treatment by using corneal confocal microscope and conjunctival impression cytology, so as to further accurately evaluate the dry eye treatment outcome and prognosis.

• METHODS: There were 21 cases (41 eyes) which were clinically diagnosed as aqueous tear deficiency dry eye based on their history, symptoms, corneal and conjunctival signs and relevant examinations. All patients with dry eye were treated by polyethylene glycol eye drops combined with Carbopol gel. Based on conjunctival impression cytology, squamous metaplasia and goblet cells number of conjunctival cells in dry eye patients were graded and the impression cells classification before and after treatment was statistically compared. Morphological change of nerve fibers under corneal epithelial before and after dry eye treatment was observed by using Heidelberg laser confocal microscopy. The changes of corneal epithelium cell density before and after treatment under peer conjunctival cells dryness were quantitatively evaluated.

• RESULTS: Impression cytology: before treatment  $\leq$  grade II in 6 eyes, grade III in 25 eyes,  $\geq$  grade IV in 10 eyes; 6 months after treatment  $\leq$  grade II in 19 eyes (46.3%), grade III in 17 eyes (41.5%),  $\geq$  grade IV in 5

eyes (12.2%). The proportion of patients with different levels of impression cells before and after treatment was significantly changed. Morphological changes under confocal microscopy: cell density decreased in cell necrosis exfoliated area of corneal epithelial before treatment; corneal subcutaneous nerve fibers appeared branch unorganized, abnormal strike line, no subcutaneous nerve fibers in 5 eyes. Regional cell density increased 6 months after treatment. All patients can seen subcutaneous nerve fibers, a small number of cases still appeared branch unorganized, abnormal strike line. Confocal microscopy showed under the conjunctival impression cytology degree at the same level, the corneal epithelial cell density before and after treatment were compared, there was statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). The cell density was significantly increased after treatment.

• CONCLUSION: The aqueous tear deficiency dry eye treatment outcomes were quantitatively observed by using corneal confocal microscopy and conjunctival impression cytology in order to determine the significant value of above two methods in dry eye treatment evaluation.

• KEYWORDS: laser confocal microscopy; conjunctival impression cytology; aqueous tear deficiency dry eye

Citation: Cheng Y, Wu J, Zhu HF, et al. Quantitative detection of aqueous tear deficiency dry eye treatment outcome. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(7):1266-1269

### 摘要

目的: 应用角膜共焦显微镜、结膜印迹细胞学在泪液缺乏性干眼治疗前后定量测定病变角膜上皮细胞、结膜细胞, 以期进一步准确评价干眼的治疗效果及预后。

方法: 选择临床确诊为泪液缺乏性干眼症患者 21 例 41 眼, 根据患者病史、症状、角结膜体征及相关检查确诊为泪液缺乏性干眼。应用聚乙二醇滴眼液及卡波姆凝胶联合治疗所有干眼患者, 治疗前后依据结膜印迹细胞检查对干眼患者结膜细胞的鳞状化生及杯状细胞数量的多少进行分级, 并对治疗前后印迹细胞分级进行统计学比较。应用海德堡激光共聚焦显微镜观察干眼治疗前后角膜上皮神经纤维的形态学改变, 定量评价同级结膜细胞干燥程度下治疗前后角膜上皮细胞密度的变化。

结果: 印迹细胞检查: 治疗前  $\leq$  II 级 6 眼, III 级 25 眼,  $\geq$  IV 级 10 眼; 治疗 6mo 后  $\leq$  II 级 19 眼 (46.3%), III 级 17 眼 (41.5%),  $\geq$  IV 级 5 眼 (12.2%)。治疗前后不同级别印迹细胞患者比例显著改变 ( $P < 0.05$ )。共焦显微镜下细胞形态学改变: 治疗前明显的角膜上皮细胞坏死脱落区, 细胞密度下降, 角膜上皮神经纤维出现分支杂乱、

异常走行,未见上皮神经纤维5眼。治疗6mo后区域性细胞密度增加,所有患者均可见上皮神经纤维,少数病例仍可见分支杂乱、异常走行。共焦显微镜显示在同级结膜印迹细胞程度下,角膜上皮细胞密度治疗前后进行比较,统计学上具有显著性差异( $P<0.05$ )。治疗后细胞密度明显增加。

**结论:**应用角膜激光共焦显微镜和结膜印迹细胞定量观察泪液缺乏性干眼的治疗转归,从而确定以上两种方法在干眼治疗评价中具有重要价值。

**关键词:**激光共焦显微镜;结膜印迹细胞;泪液缺乏性干眼

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.07.13

**引用:**程燕,吴洁,朱海峰,等.泪液缺乏性干眼治疗转归的定量检测.国际眼科杂志2012;12(7):1266-1269

## 0 引言

干眼是由于泪液的质或量异常引起泪膜不稳定和眼表损害所导致的最常见的眼表疾病之一。干眼症指有引起干眼的局部及全身性原因,有干眼的症状而无眼表损害者。角膜结膜干燥症为干燥综合征(Sjögren syndrome, SS)的眼表改变,是干眼病的一种。干眼是干眼症及干眼病的总称<sup>[1]</sup>。根据1995年美国眼科研究所干眼工作组的研究报告将干眼分为:泪液缺乏性干眼(tear deficient dry eye, TDDE)、蒸发过强性干眼(evaporative dry eye)。本研究主要以泪液缺乏性干眼患者为研究对象,给予人工泪液替代治疗,并应用传统的结膜印迹细胞检查及活体激光共焦显微镜对治疗前后的印迹细胞分级比例、角膜上皮细胞密度及上皮神经纤维形态进行比较,以期定量评价干眼的治疗效果及上述两种方法在干眼治疗转归中的应用价值。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 选择临床确诊为泪液缺乏性干眼患者21例41眼,其中双眼20例40眼,单眼1例1眼,男9例18眼,女12例23眼,年龄17~66(平均42.4)岁。排除蒸发过强性干眼、Sjögren综合征等患者。诊断依据:(1)病史、症状及体征:患者长时间使用电脑及驾车、眼部外伤史、手术史及全身免疫相关疾病史等;具有不同程度眼部干涩感、烧灼感、异物感、针刺感、眼痒、畏光、眼红、视物模糊、视力波动等,双眼均可发生,补充人工泪液可以缓解症状;裂隙灯检查泪河线宽度小于0.3mm。角结膜的荧光素染色可见不同程度的角结膜着色,根据评分所有研究对象均为轻中度干眼患者。(2)泪液试验(Schirmer I, II)及BUT时间。所有患者的泪液试验由专人操作,统一使用泪液检测滤纸条,结果为所有患眼的Schirmer I, II均小于10mm/5min。所有患者由固定医师荧光素染色后裂隙灯下泪膜镜(北京眼科研究所研制)计算BUT时间,5s<BUT<10s。经以上依据确诊所有研究对象为泪液缺乏性干眼。

## 1.2 方法

**1.2.1 丫啶橙荧光染色结膜印迹细胞检查法<sup>[2]</sup>** 取已制备的醋酸纤维素滤纸,5g/L丁卡因表面麻醉后患眼鼻侧下睑结膜处取材,置于载玻片上。在滤膜上加1~2滴100mg/L丫啶橙生理盐水溶液,染色3~5min荧光显微

表1 治疗前后结膜印迹细胞改变 眼

细胞分级	治疗前	治疗后		
		1mo	3mo	6mo
≤Ⅱ级	6(14.6%)	6	11	19(46.3%)
Ⅲ级	25(61.0%)	25	21	17(41.5%)
≥Ⅳ级	10(24.4%)	10	9	5(12.2%)

镜下观察,并行细胞分级。根据滤纸片上细胞附着的多寡,分别观察1~3个视野,然后按Tseng分类法<sup>[3]</sup>进行分级(共0~V级),分级依据包括:杯状细胞密度、上皮细胞的形态、核/浆比例(N/C)值及标本染色后胞浆颜色的变化4项指标。对治疗前后所有患眼均进行结膜印迹细胞学检查,并进行分级记录。

**1.2.2 角膜激光共焦显微镜检查** 根据治疗前丫啶橙荧光染色结膜印迹细胞检查细胞分级的结果,分别对干眼症患者治疗前及治疗后1,3,6mo的角膜上皮细胞数量的变化、上皮细胞及上皮神经纤维形态的变化进行共焦显微镜观察。HRT III纵向分辨率约1μm,可以实现活体角膜各层的图像。HRT III RCM的激光光源使用波长670nm的二极管激光。进行活体共焦显微镜检查前,于结膜囊下穹隆部滴1滴10g/L的盐酸奥布卡因和1滴凝胶型人工泪液——2g/L卡波姆。检查在矢状轴进行,因此检查时能够精确显示角膜各层结构。对全部患者进行角膜区上皮及上皮神经纤维图像采集,每个患者在同一检查层面至少采集5张共焦显微镜图片。每眼的检查时间<15min,全部患者无检查引起的并发症发生。检查由同一医师操作。

**1.2.3 临床药物治疗** 对本组干眼症患者统一使用聚乙烯二醇眼液点患眼3次/d,晚睡前加用卡波姆凝胶(含有卡波姆、中链甘油三酯及水等,模拟生理泪液)1次,共治疗6mo,上皮生长因子、抗菌素或抗病毒药物根据复查时眼部情况短期应用。

统计学分析:采用SPSS 11.0统计软件进行统计分析。采用配对t检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 治疗前后结膜印迹细胞分级** 干眼症患者21例41眼,治疗前及治疗后1,3,6mo的结膜印迹细胞学检查结果所占百分比见表1。印迹细胞检查:治疗前≤Ⅱ级6眼,Ⅲ级25眼,≥Ⅳ级10眼;治疗6mo后≤Ⅱ级19眼(46.3%),Ⅲ级17眼(41.5%),≥Ⅳ级5眼(12.2%)。

**2.2 角膜共焦显微镜下细胞形态学改变** 治疗前:(1)角膜上皮神经纤维出现分支杂乱、异常走行弯曲,神经纤维不均匀增粗、增生改变,检查中未见上皮神经纤维5眼(图1~4)。(2)干燥斑处有明显的角膜上皮细胞坏死脱落区,反光极强;细胞间隙明显增宽、局限上皮细胞缺损、排列稀疏,细胞排列层、细胞密度下降(图5,6)。治疗6mo后:(1)局限上皮细胞缺损、排列稀疏,区域性细胞密度增加。细胞形态较规则(图7,8)。(2)所有患眼均可见上皮神经纤维,但少数病例仍可见分支杂乱、异常走行,单个视野下个别神经纤维不均匀增粗、增生改变。

**2.3 角膜共焦显微镜下角膜上皮细胞密度改变** 患者21例41眼中,治疗前印迹细胞≤Ⅱ级上皮细胞密度 $676\pm 120$ 个/mm<sup>2</sup>,Ⅲ级 $577\pm 81$ 个/mm<sup>2</sup>,≥Ⅳ级 $511\pm 127$ 个/mm<sup>2</sup>;治疗6mo后印迹细胞≤Ⅱ级上皮细胞密度 $876\pm 101$ 个/mm<sup>2</sup>,

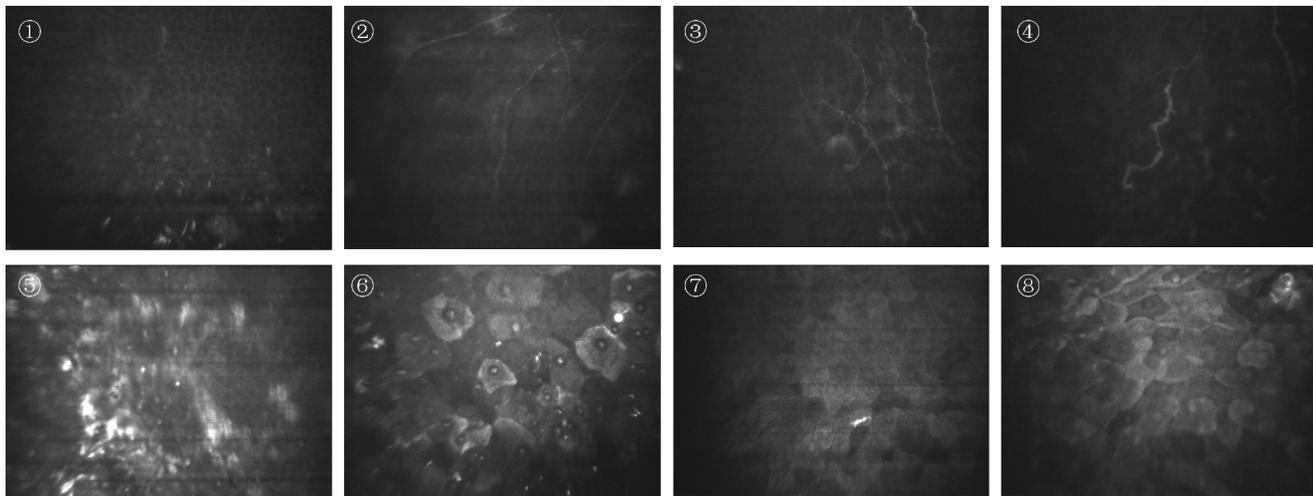


图1 角膜上皮神经纤维消失。  
 图2 角膜上皮神经纤维异常走形。  
 图3 角膜上皮神经纤维分支杂乱。  
 图4 角膜上皮神经纤维不均匀增粗、增生改变。  
 图5 干燥斑处有明显的角膜上皮细胞坏死,细胞崩解为不定形物质,反光强。  
 图6 细胞间隙明显增宽、局限上皮细胞缺损。  
 图7 治疗6mo后角膜上皮细胞密度增加,但仍可见局限性缺损。  
 图8 治疗6mo后,细胞形态较规则,密度增加。

表2 治疗前后角膜上皮细胞密度改变 (x±s, 个/mm<sup>2</sup>)

细胞分级	治疗前	治疗后			P (治疗后6mo与治疗前相比)
		1mo	3mo	6mo	
≤Ⅱ级	676±120	654±80	790±110	876±101	0.003
Ⅲ级	577±81	579±75	689±102	698±115	0.025
≥Ⅳ级	511±127	519±102	576±101	664±79	0.031

Ⅲ级 698±115 个/mm<sup>2</sup>, ≥Ⅳ级 664±79 个/mm<sup>2</sup>。同级干燥程度下角膜上皮细胞密度治疗前后分别比较,统计学上具有显著性差异(P<0.05,表2)。

### 3 讨论

干眼是由于泪液的质或量异常引起泪膜不稳定和眼表损害所导致的最常见的眼表疾病之一。随着科学技术的发展和人们生活水平的提高,由于长时间使用电脑及驾车等因素的影响,干眼的发病率也逐渐升高,并越来越受到患者及临床眼科医师的重视。干眼大致分为泪液缺乏性干眼及蒸发过强性干眼两大类,对干眼的治疗包括非药物治疗、药物治疗及手术治疗等多种方式,根据干眼的分类及不同阶段选择不同的治疗方案。因蒸发过强性干眼的影响因素较多,结膜及角膜受到睑板腺及眼表的影响较大,治疗方式也因人而异,故我们选择泪液缺乏性干眼患者作为研究对象,前期我们对该类患者进行了共焦显微镜的角膜形态学分析<sup>[4]</sup>,本研究旨在对该种类型干眼治疗前后的转归进行定量分析,通过结膜印迹细胞学及活体激光共焦显微镜两种方式结合评价干眼的治疗效果,目前国内未见相关报道。共焦显微镜能够从细胞水平活体观察眼部组织,最初多被应用于角膜病的诊断和治疗。由于其具有无创、快速、高放大倍率等优点,共焦显微镜被应用于泪膜和干眼症眼表病理学的研究。经典的角膜共焦显微镜以卤素灯作为光源,近来激光共焦显微镜对角膜及结膜等眼表组织具有更高的对比度和分辨率而广泛应用于临床<sup>[5]</sup>,为观察活体角膜组织提供了一个有力的研究工具。本研究应用激光共焦显微镜及其 Image-pro 图像分析软件

分析角膜上皮及上皮神经纤维的形态变化,并应用仪器自带细胞计数软件单盲方式计算上皮细胞密度,从而对干眼的诊断和治疗转归达到了定量测定。但对于角膜基质层及内皮层的观察以及其他类型干眼患者的角膜、结膜杯状细胞的观察尚需进一步研究。

眼表面泪膜中的黏蛋白是其重要成分,来源于结膜的杯状细胞和眼表面上皮细胞,对维持眼表面的正常特性具有重要的作用。印迹细胞学是一种用醋酸纤维滤膜印取眼表上皮并对细胞的形态特征进行细胞学检查的方法,主要应用于检查眼表疾病中结膜上皮杯状细胞的改变和鳞状化生程度,分析整个眼表面上皮细胞的病理学改变<sup>[6]</sup>。与其它的活检方法相比,印迹细胞学技术具有无创性、可检查整个眼表面、操作简便、经济等优越性。我院使用丫啶橙荧光染色结膜印迹细胞检查法,该方法较PAS联合苏木素染色法等其他方法具有步骤简便、快捷、荧光显色灵敏度高等多种优点,并且因其检测过程中仅使用一种试剂,对试验结果影响因素少而被广泛采用。本研究中,人工泪液替代治疗前后各级所占比例明显变化,印迹细胞≤Ⅱ级在治疗后6mo比例明显升高,印迹细胞≥Ⅳ级比例明显下降,提示治疗有效,结膜杯状细胞形态异常、鳞状化生等明显改善,正常结膜杯状细胞增加,推测其分泌黏蛋白等功能趋于正常,干眼泪液分泌增加,症状改善。印迹细胞在干眼的诊断中具有重要意义,本实验证实对干眼的治疗转归印迹细胞检查同样具有重要价值。

目前对泪液分泌减少性干眼的治疗主要采用泪液替代治疗方法,同时根据眼表炎症、是否同时合并病毒感染

等加用抗炎治疗,如联合应用 0.5g/L 环孢霉素或局部使用皮质类固醇激素等点眼,必要时联合手术治疗。其中人工泪液替代疗法是目前广为应用治疗干眼的方法,在本次研究中选用了美国 Alcon 公司的聚乙二醇滴眼液,即思然滴眼液,其主要成分为:0.4% 聚乙二醇 400 和 0.3% 丙二醇。思然滴入眼内后亲水性山梨醇会被泪液稀释,羟丙基瓜儿胶(HP-Guar)与硼酸盐之间广泛交联,形成网状结构,能令活性润滑剂聚乙二醇和丙二醇滞留,在眼表形成一个凝胶样保护层,重塑健康泪膜,给角膜提供长效润滑和持久保护。并且思然使用的是专利防腐剂 Polyquad,研究指出 Polyquad 是防腐剂中毒性最小者,患者耐受性良好,极少发现有对其过敏者<sup>[7]</sup>。同时睡前加用 2g/L 卡波姆凝胶(一种水脂质凝胶,含有卡波姆、中链甘油三酯、水等,模拟生理泪液)加强夜间的治疗效果。治疗前同一级别印迹细胞分级中,角膜上皮细胞密度治疗后明显增加,仅见个别上皮缺损区,上皮细胞形态较规则,排列相对紧密,因泪液增加,角膜上皮细胞缺血缺氧明显改善,细胞坏死脱落减少。上皮神经纤维在干眼患者表现为分支紊乱、异常走行弯曲,不均匀增粗、增生改变,其中部分病例未见上皮神经纤维。治疗后 1,3mo 均未见上皮神经纤维的明显改变和数量增加,术后 6mo 所有患眼均可见上皮神经纤维,其部分仍可见分支紊乱,增粗、不均匀等形态变化不大,但原未见神经纤维患者重新出现上皮神

经纤维,进一步提示角膜内神经纤维可再生<sup>[8]</sup>,但生长缓慢,其形态学及密度何时恢复正常还需更长时间的观察研究。此外,我们还发现随结膜印迹细胞的分级严重程度升高,角膜上皮细胞密度明显下降,二者呈负相关,两者之间是否存在影响角膜上皮生长的细胞因子或信号调节机制还有待于进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 The definition and classification of dry eye disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surf* 2007; 5(2):75-92
- 2 孙秉基,徐锦堂.角膜病的理论基础与临床.北京:科学技术文献出版社 1994:154-157
- 3 Tseng SCG. Staging of conjunctival Squamous Meta-plasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985; 92(6):728-733
- 4 吴洁,程燕,杜蕊,等.分泌减少性干眼症角膜共焦显微镜下的形态学改变. *眼科研究* 2009;27(4):329-331
- 5 王世明,陈蔚,王勤美,等. Sjögren 综合征患者的角膜激光共焦显微镜活体观察. *眼科研究* 2008; 26(2):149-152
- 6 Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulos eacetate impressions of the ocular surface: Dry eye states. *Arch Ophthalmol* 1983;101(12):1869-1872
- 7 车慧欣.泪然和潇莱威滴眼液治疗干眼症临床观察. *锦州医学院学报* 2006;27(1):70
- 8 杨浩江,吕秀芳,窦晓燕,等.激光原位角膜磨镶术后角膜的共焦显微镜研究. *眼科新进展* 2008;28(7):538-541