

· 临床研究 ·

2 型糖尿病患者角膜上皮基底膜沉积物的激光共焦显微镜观察

许中中 王丽娅 荆洋 牛超 李金

Depositions of corneal epithelial basement membrane in patient with type 2 diabetes mellitus under the HRT III Rostock Cornea Module

Xu Zhongzhong, Wang Liya, Jing Yang, Niu Chao, Li Jin. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract Objective Diabetes mellitus (DM) often cause corneal epithelial disease because of the accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in cornea, especially in the basement membrane. This study was to observe the finding of depositions of corneal epithelial basement membrane under the Heidelberg Retina Tomography III Rostock Cornea Module (HRT3-RCM) to explore the probable mechanism. **Methods** Fifteen eyes of nine patients with type 2 diabetes mellitus were observed with HRT3-RCM and anterior segment optical coherence tomography (OCT) examination. Nine normal subjects with cataract without ocular surgery history and system disease were as control group. No significant difference was found in the demography between two groups. The written informed consent was obtained from any subject before initiation of any examination. **Results** The abnormal depositions of corneal epithelial basement membrane were found in 11 eyes of 8 patients in diabetic group under the HRT3-RCM with the maximum area $(2.475 \pm 0.024) \times 10^{-2} \text{mm}^2$. Some thin nerve fibers surrounded depositions, and the deforming nerve fibers of subbasal epithelium were disclosed in the eyes of patients with type 2 diabetes mellitus. The nerve fiber density was $(3.495 \pm 0.791)/\text{frame}$ in diabetes group and $(5.689 \pm 0.487)/\text{frame}$ in control group, showing a significant difference between them ($t' = 9.365, P < 0.05$). A strong refractive signal was displayed from epithelial basement membrane to anterior stroma only in four eyes in diabetic group on the anterior segment OCT, indicating the exist of depositions. No significant correlation was found between depositions of corneal epithelial basement membrane and corneal subbasal nerve fiber density ($r = -0.265, P = 0.430$). **Conclusion** The depositions of corneal epithelial basement membrane in patients with type 2 diabetes mellitus may be the accumulation of AGEs, which plays a causative role in the corneal epithelial diseases of diabetic patients.

Key words type 2 diabetes mellitus; cornea; basement membrane; confocal laser microscope

摘要 目的 观察 2 型糖尿病患者角膜上皮基底膜沉积物在激光共焦显微镜下的表现,探讨糖尿病患者出现角膜上皮病变的可能因素。**方法** 应用激光共焦显微镜对 9 例(15 眼)2 型糖尿病患者和年龄、性别匹配的健康对照眼的全角膜进行分区扫描检查,记录角膜上皮层、前弹力层及前基质层的图像,同时行眼前节光学相干断层扫描(OCT)检查,对所有检查资料进行分析。**结果** 9 例(15 眼)中,激光共焦显微镜显示 8 例(11 眼)出现角膜上皮基底膜的异常沉积物,部分沉积物周边可见纤细的神经纤维,角膜上皮层下神经纤维异常,神经纤维密度明显低于正常对照眼。眼前节 OCT 检查发现有 4 眼的基底膜、前弹力层及前基质层部位有强反射信号。角膜上皮基底膜沉积物与角膜上皮神经纤维密度间无明显相关性($r = -0.265, P = 0.430$)。**结论** 2 型糖尿病患者角膜上皮基底膜出现异常沉积物,可能是糖基化终末产物(AGEs)在角膜上皮基底膜的沉积,对糖尿病角膜上皮病变及角膜上皮神经病变有一定的影响。

关键词 2 型糖尿病;角膜;基底膜;激光共焦显微镜

分类号 R 772.2 R 770.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0517-04

糖尿病引起的视网膜病变是眼科常见的致盲性眼病之一。近年来,糖尿病角膜病变受到眼科学家的关注。Didenko 等^[1]报道至少有 70% 的糖尿病患者可出现角膜异常,称为“糖尿病性角膜病”,如干眼症、持续性上皮缺损、复发性上皮糜烂、上皮再生缓慢、无菌性溃疡、角膜知觉减退、角膜自发荧光增强等^[2-3]原发性角膜病变。共焦显微镜是一种快速无创的活体检查手段,能动态观察角膜的病理、生理变化情况。本研究对内分泌科诊断为 2 型糖尿病患者的角膜进行激光共焦显微镜检查,探讨糖尿病患者出现角膜上皮病变的可能因素,进一步了解糖尿病引起角膜病变的致病机制。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 一般资料 收集 2008 年 9—12 月河南省人民医院内分泌科住院并确诊为 2 型糖尿病的患者 9 例(15 眼),其中男 6 例(10 眼),女 3 例(5 眼);年龄 32 ~ 55 岁,平均(47.875 ± 7.624)岁;糖尿病病程 0.25 ~ 12 年,平均(5.656 ± 4.194)年。患者纳入标准:(1)首次就诊为 2 型糖尿病或平时血糖控制不稳定的 2 型糖尿病患者;(2)无角膜炎及角膜营养不良等角膜疾病;(3)无角膜接触镜配戴史;(4)无眼外伤、眼部激光治疗史及手术史;(5)裂隙灯检查示角膜组织透明,无角膜组织异常,荧光素染色无着色;(6)眼压均在正常范围内;(7)近期末服用过影响角膜代谢的药物。正常对照组纳入标准:无系统性疾病,在本中心行白内障手术前检查的患者 9 例(18 眼),其中男 5 例(10 眼),女 4 例(8 眼);年龄 39 ~ 57 岁,平均(48.375 ± 5.449)岁。患病组和正常对照组之间性别($P = 0.333$)和年龄($t' = 0.160, P > 0.05$)构成差异均无统计学意义。受检者均知情同意并经医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要仪器 激光共焦显微镜^[4-7](德国海德堡公司)由海德堡视网膜激光断层扫描系统 3 代(HRT3)和 Rostock 角膜模块(RCM)组成,放大 800 倍,分辨率为 1 μm。眼前节 OCT^[8-11]:RTVue 傅立叶 OCT 是美国 Optovue 公司生产的最新一代 OCT 产品,能够进行三维立体成像,深度分辨率为 5 μm,横向分辨率为 15 μm。

1.2 方法

1.2.1 激光共焦显微镜检查 受检眼用 0.4% 盐酸奥布卡因进行表面麻醉,将 Vidisic 眼凝胶(美国博士伦公司)滴于物镜头表面,盖上无菌角膜接触帽。嘱受检者端坐,下颌放在检查托上,前额与检查托的头带接触,以保持头位正,嘱患者注视固视灯,调整物镜位

置使激光光束位于角膜待检区,前移物镜至接触帽与角膜轻微接触,通过改变焦平面得到角膜上皮层、前弹力层及前基质层的角膜图像,采集数码照片并保存图片。嘱患者注视固视灯调整眼位,以进行不同区域的扫描(图 1)。

1.2.2 OCT 检查 嘱受检者端坐,下颌放在检查颌托上,前额与检查托的颌托接触,以保持头位正,采用 6 mm 物镜进行线扫描,手控手柄将物镜头与患者待检眼对焦,分别进行垂直和水平方向的线扫描(图 1),采集数码照片并保存图片。

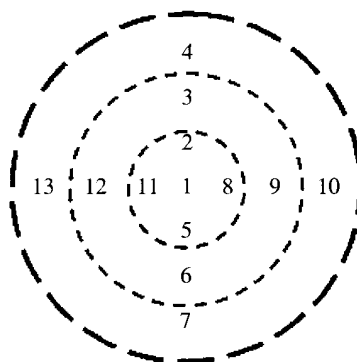


图 1 在进行激光共焦显微镜检查和 OCT 检查时均采用如图所示的数字顺序进行区域扫描。图中的数字位置代表了不同的待扫区域,图示的最内侧圆形面积代表角膜中央区域,其外的环形区域代表旁中央区域,最外的环形区域代表角膜周边区

Fig. 1 HRT3-RCM and anterior segment OCT scanning is performed according to the number sequence. The numbers represent the scanning order and different zones of cornea. The dot cycles represent the rings from center to periphery

1.2.3 观察指标 由于操作视野的局限性,进行检查时需要把角膜分为中央区、旁中央区和周边区域,在每个区域中又选定若干个扫描点,记录角膜基底膜沉积物位置,采用 Image-Pro Plus v 6.0 专业图像分析软件对采集的沉积物面积进行计算,角膜上皮层下神经密度的计算方法为采集 20 帧角膜上皮层下共焦显微镜图片,记录每幅图像中神经干的数量,计算平均值表示其密度^[12-13]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,患病组和对照组的神经纤维密度比较采用校正 t 检验,角膜上皮基底膜沉积物与角膜上皮神经纤维密度的相关分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜上皮基底膜沉积物的观察

患病组 15 眼中,激光共焦显微镜检查发现 11 眼角膜上皮基底膜及前弹力层有聚集成团的致密高反光物质,一部分高反光物质周边可见纤细的神经纤维。角膜上皮神经纤维数量减少,神经纤维稀疏、纤细、

变短,分支增多,走行扭曲(图 2,3)。OCT 检查发现 4 眼的基底膜、弹力层及前基质层部位有强回声信号(图 3)。

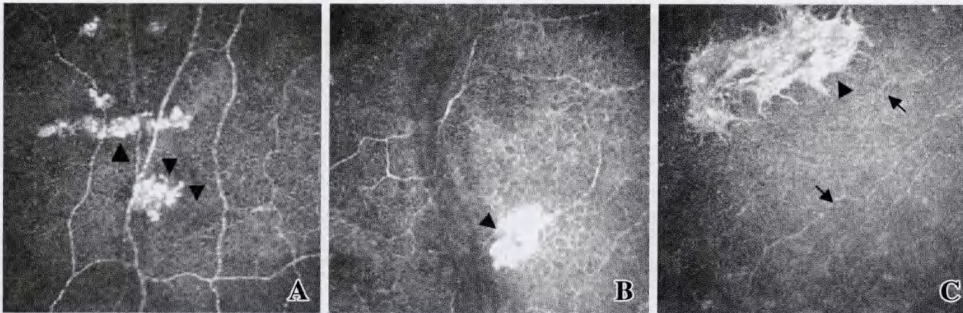


图 2 激光共焦显微镜扫描的角膜上皮基底膜图像(400 μm × 400 μm) A、B: 上皮基底膜部位的致密高反光物质(三角) C: 可见上皮基底膜部位的致密高反光物质(三角), 神经纤维变短、纤细、扭曲(箭头)

Fig. 2 In vivo confocal microscopy images of the corneal epithelial basement membrane (400 μm × 400 μm) A, B: The depositions of corneal epithelial basement membrane are displayed (triangle) C: The red triangle shows the depositions of corneal epithelial basement membrane (triangle). The shorted, slim and bend nerve fibers are seen (arrowhead)

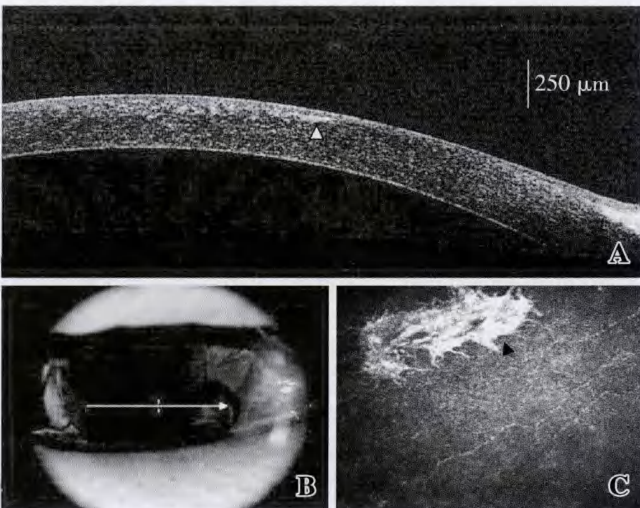


图 3 同一部位 OCT 和激光共焦显微镜扫描图像(400 μm × 400 μm) A: 可见 OCT 扫描到的高信号区域(三角) B: 扫描部位及方式 C: 同一部位激光共焦显微镜所记录的聚集成团的致密高反光物质(三角)

Fig. 3 In anterior segment OCT image of cornea and in vivo confocal microscopy images of the corneal epithelial basement membrane (400 μm × 400 μm) A: A strong refractive signal is displayed from epithelial basement membrane to anterior stroma (triangle) B: scanning zone and fashion C: The depositions of corneal epithelial basement membrane (triangle)

2.2 角膜上皮神经纤维密度

角膜上皮神经纤维数量减少,神经纤维稀疏、纤细、变短、分支增多、走行扭曲、相互交织,患病组神经密度为(3.495 ± 0.791)支/帧,对照组神经密度为

(5.689 ± 0.487)支/帧,2 组比较差异有统计学意义($t' = 9.365, P < 0.05$),2 型糖尿病患者的神经密度明显低于正常对照组。

2.3 角膜上皮基底膜沉积物与角膜上皮神经纤维密度的相关性分析

根据 2 型糖尿病患者不同分区角膜后沉积物的情况,选取具有沉积物和神经纤维的共焦显微镜图片,记录 5 幅图上角膜后沉积物的面积和神经干数量进行相关分析,结果表明,角膜后沉积物与神经干数量间无明显相关性($r = -0.265, P = 0.430$) (图 4)。

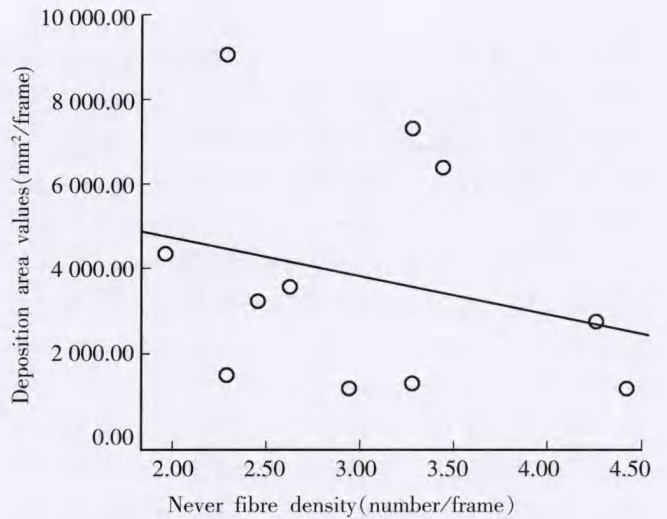


图 4 角膜上皮基底膜沉积物面积和角膜上皮神经纤维密度的相关分析($r = -0.265, P = 0.430$)

Fig. 4 Correlation between nerve fibre density of corneal subepitheliums and area values of depositions in corneal epithelial basement membrane in patients with type 2 diabetes ($r = -0.265, P = 0.430$) (Pearson correlation analysis)

3 讨论

本研究利用激光共焦显微镜和 OCT 对 2 型糖尿病患者角膜上皮基底膜的沉积物进行研究,从不同的层面上对其进行观察,但由于二者的分辨率不同,二者对沉积物的检出率有所不同。在同一病变部位利用激光共焦显微镜和 OCT 可清楚观察到沉积物的面积大小和深度。为了进一步研究沉积物和角膜上皮基底膜

周围组织的关系,我们对激光共焦显微镜图像进行分析,发现:(1)沉积物或聚集成颗粒状(图 2A)或聚集成片状高反光区域(图 2B,2C),神经纤维的形态和走行未见明显异常(图 2A),而同一被检眼的上方受检区,则见聚集成片的高反光物质,周边神经纤维纤细,数量减少,走形扭曲(图 2B),另一患者的上皮基底膜和前弹力层部位更大面积的沉积物,可见其周边神经更加纤细、变短,其周围的神经纤维变细,走形扭曲,部分中断(图 2C)。(2)片状出现的高反光沉积物多出现在神经纤维上及其周围,与角膜上皮神经纤维联系紧密。(3)患病组的神经纤维密度明显低于正常对照组。

基于以上现象我们提出了 2 种假设:(1)2 型糖尿病患者角膜上皮基底膜的沉积物与角膜上皮下的神经病变有着密切相关的联系。(2)2 型糖尿病患者的角膜上皮基底膜沉积物和神经纤维病变并没有直接的因果关系。

本研究以沉积物的面积和神经纤维密度为指标,通过相关性分析,发现二者无明显相关性。众所周知,糖尿病性周围神经病变主要是由于神经细胞的糖醇代谢紊乱和支配神经的微血管病变引起的,角膜上皮下的神经末梢是无髓神经纤维,其病变机制可能是高血糖导致山梨醇在神经细胞内堆积,细胞内渗透压升高,导致细胞水肿,从而继发一系列改变,引起神经末梢水肿、变性崩解;山梨醇在神经细胞内堆积,可妨碍神经细胞对周围环境中的肌醇的摄取,肌醇的相对不足降低了 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性,影响了神经细胞膜内外 Na^+ 和 K^+ 正常的梯度分布,进而导致了结构的异常改变。因此二者之间可能存在更复杂的关系。我们认为角膜沉积物的出现主要是一些糖基化终末产物在胶原蛋白和层粘连蛋白的沉积。糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)的形成主要是由于还原糖如葡萄糖的醛基或酮基与蛋白质、脂质或核酸的氨基发生非酶糖化反应,经过一系列的反应,形成不可逆的高级糖化终产物^[14]。Kaji 等^[15]研究发现,AGEs 更容易在角膜上皮基底膜上沉积,尤其是在层粘连蛋白上沉积,对糖尿病角膜上皮病变起着重要作用。Ishino 等^[16]利用 AGEs 自发荧光的特性,发现糖尿病患者组的角膜自发荧光是正常对照组的 1.65 倍,提示 AGEs 与糖尿病角膜病变的关系密切。Quadrado 等^[17]通过共焦显微镜对角膜各层次结构观察分析发现,角膜基底膜及前弹力层的神经纤维密度明显降低,基底膜增厚,基底膜与上皮基底细胞之间的黏附作用降低,同时他们认为角膜自发荧光增强是由

于 AGEs 在不同部位沉积引起的。

本研究通过激光共焦显微镜对角膜上皮基底膜的沉积物进行了观察和分析,但对沉积物的性质、形成机制及其与糖尿病角膜上皮神经病变的关系尚有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Didenko TN, Smoliakova GP, Sorokin EL, et al. Clinical and pathogenetic features of neurotrophic corneal disorders in diabetes [J]. Vestn Oftalmol, 1999, 115: 7 - 11
- 2 Sanchez-Thorin JC. The cornea in diabetes mellitus [J]. Int Ophthalmol Clin, 1998, 38(2): 19 - 36
- 3 Sato E, Mori F, Igarashi S, et al. Corneal advanced glycation end products increase in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Diabetes Care, 2001, 24: 479 - 482
- 4 Bocher R, Zhivov A, Kraak R, et al. Contribution to comprehension of image formation in confocal microscopy of cornea with Rostock cornea module [J]. Br J Ophthalmol, 2005, 89: 1351 - 1355
- 5 Patel DV, McGhee CN. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 1348 - 1351
- 6 Eckard A, Stave J, Guthoff RF. In vivo investigations of the corneal epithelium with the confocal Rostock Laser Scanning Microscope (RLSM) [J]. Cornea, 2006, 25(2): 127 - 131
- 7 Labbé A, Nicola RD, Dupas B, et al. Epithelial basement membrane dystrophy: evaluation with the HRT II Rostock Cornea Module [J]. Ophthalmology, 2006, 113(8): 1301 - 1308
- 8 Calladine D, Packard R. Clear corneal incision architecture in the immediate postoperative period evaluated using optical coherence tomography [J]. J Cataract Refract Surg, 2007, 33(8): 1429 - 1435
- 9 Matonti F, Hoffart L, Prost MO, et al. Anterior segment analysis using OCT3 [J]. J Fr Ophthalmol, 2008, 31(9): 855 - 861
- 10 Szaflik JP, Oldak M, Kwiecień S, et al. Optical coherence tomography and in vivo confocal microscopy features of obstetric injury of the cornea [J]. Cornea, 2008, 27(9): 1070 - 1073
- 11 Lim LS, Aung HT, Aung T, et al. Corneal imaging with anterior segment optical coherence tomography for lamellar keratoplasty procedures [J]. Am J Ophthalmol, 2008, 145(1): 81 - 90
- 12 Darwish T, Brahma A, Efron N, et al. Subbasal nerve regeneration after penetrating keratoplasty [J]. Cornea, 2007, 26: 935 - 940
- 13 Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, et al. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients [J]. Diabetologia, 2003, 46: 683 - 688
- 14 Shamsi FA, Partal A, Sady C, et al. Immunological evidence for methylglyoxal-derived modifications in vivo [J]. J Biol Chem, 1998, 273(12): 6928 - 6936
- 15 Kaji Y, Usui T, Oshika T, et al. Advanced glycation end products in diabetic corneas [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(2): 362 - 368
- 16 Ishino Y, Yokoi N, Yasuhara T, et al. Investigation of corneal autofluorescence in diabetic patients [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2000, 104(8): 572 - 576
- 17 Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, et al. Diabetes and corneal cell densities in humans by in vivo confocal microscopy [J]. Cornea, 2006, 25: 761 - 768

(收稿:2009-01-23 修回:2009-04-12)

(本文编辑:尹卫靖)