

# 人体角膜内皮细胞的共焦显微镜研究

黎明 林跃生 姚晓明 陈家祺 陈龙山 宋书华 肖启国 黄挺 周世有

**【摘要】 目的** 应用共焦显微镜观察活体角膜内皮细胞的形态学特征。**方法** 应用共焦显微镜观察正常人(20例)、角膜炎(12例)、角膜移植术后(19例)、葡萄膜炎(5例)、大疱性角膜病变(3例)、角膜白斑(6例)、角膜营养不良(7例)、青光眼(10例)、圆锥角膜(17例)等患者的角膜内皮,分析所得活体角膜内皮图象,总结其形态学特征。**结果** 活体共焦显微镜下角膜内皮的图象主要有8种:①完全正常角膜内皮。②水肿角膜内皮。③失代偿角膜内皮。④“激活”角膜内皮。⑤排斥角膜内皮。⑥有KP角膜内皮。⑦有“疣状物”的角膜内皮。⑧“双核”角膜内皮细胞。**结论** 共焦显微镜能对活体角膜内皮进行实时、无创、准确以及可重复、可比较的观察。

**【关键词】** 共焦显微镜 角膜 内皮细胞 人类

**The study of the human corneal endothelium by in vivo confocal microscopy** Li Ming, LIN Yueshen, YAO Xiao ming, et al. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510060, China

**【Abstract】 Objective** To observe and analyze the morphologic characteristics of the human corneal endothelium by in vivo confocal microscope(Confoscan2.0). **Methods** To observe and analyze the human corneal endothelium by in vivo confocal microscope, and summarize the morphologic characteristics. The patients were as followed: normal volunteers (20 eyes), keratitis (12 eyes), keratoplasty (19 eyes), uveitis (5 eyes), bubble keratopathy (3 eyes), corneal leukoma (6 eyes), corneal dystrophy (7 eyes), glaucoma (10 eyes), keratoconus (17 eyes). **Results** There were eight kinds of the human corneal endothelial images mainly by in vivo confocal microscope, including: ① the normal corneal endothelium of in vivo confocal microscope. ② the edema endothelium. ③ the uncompensable endothelium. ④ the activated endothelium. ⑤ the rejection endothelium. ⑥ the endothelium with KP. ⑦ the verrucous endothelium. ⑧ the doeble-nuclei endothelium. **Conclusion** The endothelial value of in vivo confocal microscope was accurate, sensitive, real time, no wounding, in vivo and repeatable, comparable.

**【Key words】** Confocal microscope; Cornea; Endothelium; Human

角膜内皮细胞是维持角膜正常生理功能的关键细胞。共焦显微镜是一种新型的高放大倍数(1000X)显微镜,能够方便地观察人类活体角膜内皮细胞,直接得到活体角膜内皮的病理图像,而不需要切片、固定、染色等过程。它能检查到裂隙灯显微镜(20×)及角膜内皮镜(200×)所不能发现的角膜内皮细小改变。在角膜轻度水肿时,共焦显微镜仍能进行检查,而角膜内皮镜却不行<sup>[1]</sup>。我们应用共焦显微镜对正常眼及一组患者的角膜内皮进行了系统的检查,总结了角膜内皮的共焦显微镜特征,现将初步的观察结果报告如下。

## 材料和方法

### 一、研究对象

本研究共收集99例(99只眼),男性45例,女性54例,年龄17~63岁,平均41.7岁。其中正常志愿者20例(20只眼)、角膜炎12例(12只眼)、角膜移植术后19例(19只眼)、葡萄膜炎5例(5只眼)、大疱性角膜病变3例(3只眼)、角膜白斑6例(6只眼)、角膜营养不良7例(7只眼)、青光眼10例(10只眼)、圆锥角膜17例(17只眼)。

### 二、研究方法

1. 用共焦显微镜进行三维实时检查,角膜内皮的实时扫描图像经过筛选后存盘,打印、记录内皮细胞的形态学改变进行分析。本研究使用的共焦显微镜为Confoscan2.0 (Model P3, Fortune

作者单位: 510060 深圳, 暨南大学附属深圳市眼科医院(黎明, 姚晓明); 中山大学中山眼科中心(林跃生, 陈家祺, 陈龙山, 宋书华, 肖启国, 黄挺, 周世有)

通讯作者: 黎明, E-mail: liming75@sina.com

Technologie Srl, Italy), 由日本 NIDEK 公司提供, 基本原理同裂隙扫描共焦显微镜。

2. 共焦显微镜检查方法: 患眼用 0.5% 爱尔卡因滴眼液 (0.5% Alcaine, Alcon) 滴眼 1 次, 开睑器开睑, 下颌及前额固定在检查托架上, 保持头正位。在水浸式圆锥状物镜表面涂眼用的凝胶 (Viscotirs Gel, CIBA Vision Ophthalmics), 调节镜头, 使凝胶与角膜病变处接触, 进行检查。角膜各层的扫描图像通过液晶显示器同步显示记录, 保存于计算机上。每帧图像, 其有效的侧像分辨率为  $1\mu\text{m}$ , 景深为  $10\mu\text{m}$ , 视野范围为  $340\mu\text{m} \times 255\mu\text{m}$ 。

## 结 果

1. 完全正常角膜内皮: 正常志愿者以及病变没有累及角膜内皮时, 角膜内皮在共焦显微镜下的正常所见, 其图象与病理切片下的角膜内皮图象很近似, 呈规则的六边形细胞结构, 细胞排列规则、大小基本一致; 胞浆呈中度反光, 细胞间隙呈暗反光, 正常情况下共焦显微镜看不到角膜内皮细胞的细胞核。详见图 1。

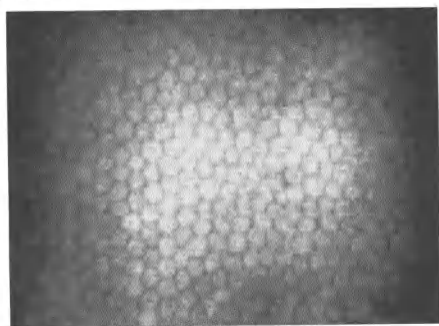


图 1 完全正常角膜内皮

2. 水肿角膜内皮: 当手术、外伤、角膜炎等病变累及角膜内皮后, 角膜内皮细胞水肿, 在共焦显微镜下表现为角膜内皮细胞的规则六边形结构边数减少, 可以呈四边、五边形, 重者可以呈三角形、甚至圆形; 细胞大小差别增大; 胞浆水肿, 呈高反光; 细胞结构模糊; 内皮细胞的边界模糊, 反光也增强。看不到角膜内皮细胞的细胞核。见图 2。

3. “失代偿”角膜内皮: 由于角膜移植以及其它一些疾病累及角膜内皮, 内皮在一段较长的时间内逐渐受损, 受损内皮细胞的功能由周围其它正常的角膜内皮细胞来代偿, 这时代偿的角膜内皮细胞在共焦显微镜下表现为增大的内皮细胞, 其六边形结构不规则, 但胞浆未水肿仍呈中度反光。细胞结构仍清晰。看不见角膜内皮细胞的细胞核。见图 3。

4. “激活”角膜内皮<sup>[1]</sup>: 一般病变即使累及



图 2 水肿角膜内皮

角膜内皮也表现为角膜内皮细胞水肿, 在共焦显微镜下看不见细胞核。但在角膜植片排斥累及角膜内皮以及长期角膜内皮失代偿时, 以前在共焦显微镜下看不见的角膜内皮细胞核可以看见, 并呈高反光, 称为“激活”。“激活”的角膜内皮细胞一般形状都不规则, 细胞大小差别较大。但细胞结构仍清晰。见图 4。

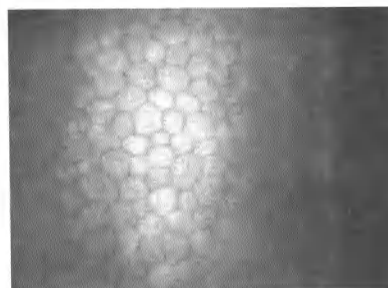


图 3 失代偿角膜内皮

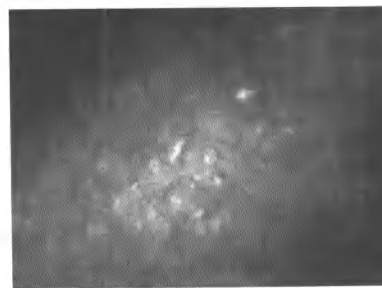


图 4 “激活”角膜内皮

5. 排斥角膜内皮: 由于角膜移植术后植片发生排斥, 累及角膜内皮以后在共焦显微镜表现出特有的改变: 在角膜内皮面可见免疫细胞浸润, 免疫细胞形状不规则。免疫细胞与内皮细胞都可有“激活”改变, 未激活的免疫细胞呈低反光, 激活的免疫细胞呈高反光 (有的细胞核呈高反光, 有的整个细胞都呈高反光)。此时角膜内皮细胞可有水肿改变: 细胞形状不规则, 边数减少, 反光增强, 结构较模糊。有色素性 KP 沉积时, 可见角膜内皮面有高反光的颗粒状 KP。内皮排斥线在共焦显微镜下为大量的细胞碎屑、色素颗粒构成。见图 5、6。

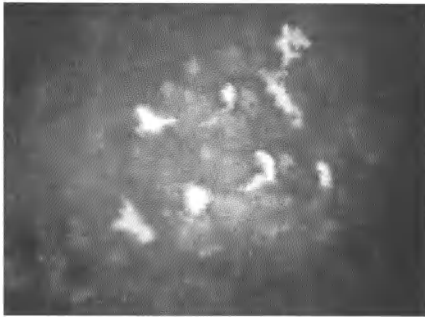


图5 排斥角膜内皮

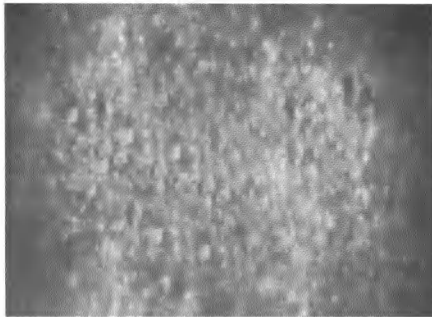


图6 内皮排斥线的共焦显微镜改变

6. 有KP角膜内皮: 在葡萄膜炎或其它一些疾病导致虹膜色素脱失时, 可在角膜内皮面看见KP。共焦显微镜下KP表现为角膜内皮面的高反光的细小颗粒状结构。见图7。

7. 有“疣状物”的角膜内皮: 我们在角膜移植术后一些患者的角膜内皮面可见一些突起的“疣状物”, 立体感较强, 角膜内皮细胞没有明显改变。见图8。

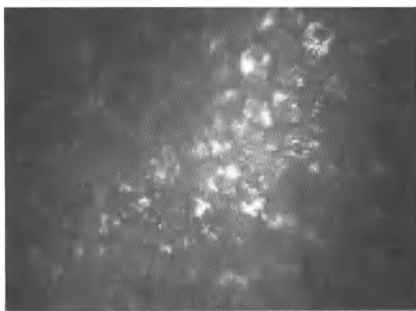


图7 有KP角膜内皮

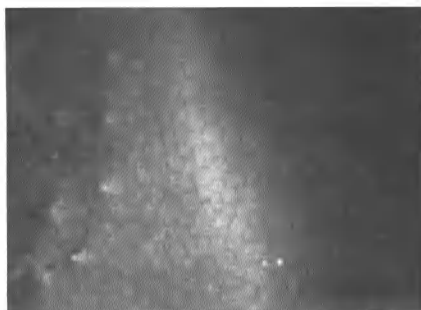


图8 有“疣状物”的角膜内皮

8. 双核的角膜内皮细胞: 我们在2例PKP术后, 植片保持透明10年以上患者的角膜内皮细胞中, 发现了一些双核的角膜内皮细胞。通过共焦显微镜可以清晰的观察到在显著增大的角膜内皮细胞中有2个细胞核存在。见图9。

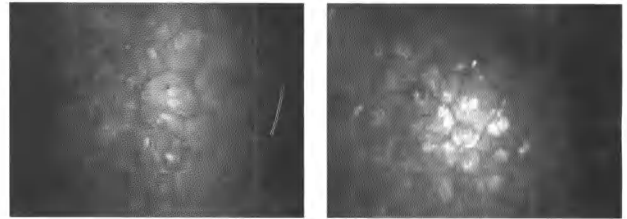


图9 “双核”角膜内皮细胞

## 讨 论

以往对角膜内皮的观察主要依靠裂隙灯显微镜和角膜内皮镜, 但裂隙灯显微镜的放大倍数较小, 角膜内皮镜的观察范围不大, 且观察不到水肿角膜的内皮细胞, 其结果与一般的病理切片有差距。共焦显微镜能够对活体角膜进行非侵入性的检查, 其放大倍数大, 可清晰地观察内皮细胞结构, 基本上能达到病理切片的效果, 而不需对角膜组织固定、切片、染色等程序, 在活体上实现了对角膜内皮观察的历史性突破。本研究首次应用共焦显微镜对活体角膜内皮进行系统的形态学研究, 总结了人体角膜内皮的共焦显微镜特征, 客观评价共焦显微镜在人类角膜内皮研究方面中的临床应用价值。

### 一、共焦显微镜下角膜内皮的特征

我们根据所观察患者所得图像, 将活体角膜内皮的共焦显微镜图像大体分为8种。每种角膜内皮都有其特有的图像, 并能在共焦显微镜下与其它几种相互区别。

1. 完全正常角膜内皮, 这是没有病变角膜内皮的共焦显微图像, 也是最为基本的角膜内皮图像, 以下六种角膜内皮图像都是在这种角膜内皮病变的基础上发生改变后产生的<sup>[3,4]</sup>。

2. 水肿角膜内皮, 各种病变累及角膜内皮都可引起角膜内皮水肿。水肿、“失代偿”与“激活”角膜内皮在共焦显微镜下都可表现为内皮细胞的六边形结构发生改变, 其边数减少, 细胞大小差别增大等改变, 但它们又都有各自的特征可相互鉴别。水肿的角膜内皮在共焦显微镜下还有因为胞浆水肿而呈现的高反光, 细胞结构模糊的改变。“失代偿”的角膜内皮, 由于是正常的角膜内皮细胞代偿而来的, 其细胞结构较水肿的内皮细胞清楚, 没有高反光及细胞结构模糊的改变。“激活”角膜内皮, 则由于能

够清楚地看见内皮细胞核所以更易鉴别,但这种激活在临床上具体代表的意义目前还不清楚,是细胞自身的凋亡被激活还是排斥反应被激活,或是代表其它的意义,目前尚无明确定论。

3. 由于角膜移植术后植片发生的排斥反应是一种多因素引起的复杂反应,在共焦显微镜下可以有水肿、“失代偿”与“激活”角膜内皮细胞的改变,但免疫细胞<sup>[2-6]</sup>在角膜内皮面的沉积是其与其它几种角膜内皮鉴别的特征。共焦显微镜对免疫细胞的观察很清楚,对临床上免疫排斥反应的诊断、鉴别很有帮助。

5. 有KP角膜内皮。凡是可以累及虹膜的眼部病变,都可在角膜后出现KP,但共焦显微镜能够观察到非常小、在裂隙灯下不明显的KP,并且对其成分也能够观察的很清楚。

6. 有“疣状物”的角膜内皮,在角膜移植术后部分患者的角膜内皮面可见一些突起的“疣状物”,立体感强,内皮细胞没有明显改变,这种“疣状物”是由于缝线牵拉引起还是其它物质在角膜内皮面沉积引起,目前还不能确定。

7. 双核的角膜内皮细胞。根据经典的角膜病理生理理论,人类的角膜内皮细胞是没有分裂能力的。但是,我们通过共焦显微镜在2例PKP术后植片保持透明10年以上患者的角膜内皮细胞中,观察到在显著增大的角膜内皮细胞中有2个的细胞核存在。这种双核角膜内皮细胞的存在,有力地挑战了经典的角膜内皮细胞不能分裂的理论。可是,这种双核角膜内皮细胞出现的具体临床意义还不清楚,该现象还有待进一步的深入研究。

## 二、共焦显微镜观察活体角膜的临床意义

共焦显微镜能对活体角膜内皮进行实时、无创、准确以及可重复、可比较的观察。以往,临床上用于检查角膜内皮细胞的非侵入性工具主要是角膜内皮镜(200×)。它可以在临床上进行循环检查而不至于引起病人的不适感觉,除了对正常人角膜的检查外,还用于评估创伤、炎症和内眼手术对角膜内皮细胞的损害<sup>[4]</sup>,是至今仍用于研究角膜植片内皮排斥反应的重要仪器。相对于角膜内皮镜检查,共焦显微镜的放大倍数更大(1000×),观察的结果更客观、直接、准确,能检查到裂隙灯显微镜(20×)及角膜内皮镜(200×)所不能发现的细小病理改变,对于疾病的早期诊断很有帮助。另外,在角膜轻度水肿时,共焦显微镜仍能进行检查,而角膜内皮镜却不能检查。并且共焦显微镜观察角膜内皮的

范围相对较宽,与其它病变相鉴别较容易,还能连续观察角膜基质、上皮细胞的情况。

共焦显微镜发明于1955年<sup>[5]</sup>,近10年开始广泛地应用于各种角膜疾病的临床研究,如各种感染性角膜炎的诊断和鉴别诊断<sup>[6,7]</sup>、角膜移植免疫排斥反应的研究<sup>[8,9]</sup>、圆锥角膜的组织形态学研究<sup>[10]</sup>、准分子激光切削术后角膜组织的细胞病理学改变<sup>[11]</sup>等等,开始了从活体细胞水平研究角膜疾病的时代。

由于共焦显微镜首次使我们能在如此大倍数的情况下直接观察活体角膜的内皮细胞,让我们看见了许多以前看不到的临床活体病理征象。但像病理检查刚问世时一样,对于这些以往观察不到的活体病理征象,人们是有争议的。首先共焦显微镜对角膜层面的扫描是与角膜板层水平的,其次它不能对组织进行染色,这些都使得共焦显微镜的图象与经典的病理图象有所不同,人们还需要时间去适应它、了解它、熟悉它。共焦显微镜作为一种新的检查手段,人们目前对它积累的经验还不多,如何理解我们观察到的一些临床活体超微结构、它们的临床意义等都需要更长期的临床观察和经验积累。

## 参 考 文 献

- Hirst LW, Stark WJ. Clinical specular microscopy of corneal endothelial rejection. *Arch Ophthalmol* 1983,101(9):1387-91
- Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, et al. Confocal microscopy of the living eye. *CLAOJ* 1990,16:65-73
- Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998;17:485-492
- Masters BR, Kino GS. Confocal microscopy of the eye. In *noninvasive diagnostic technological in the Ophthalmology*. Springer Verlag 1990,151-171
- Minsky M. Memoir on inventing the cofocal scanning microscope. *Scanning* 1988;10:128
- Chew SJ, Beuerman RW, Assoline M, et al. Early diagnosis of infections keratitis with in vivo real time confocal microscopy. *CLAO J* 1992,18:197-201
- Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE. Diagnosis of asperfillus keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea*, 1997,16:27-31
- 林跃生、孙明霞、陈家祺等. 角膜移植排斥反应的共焦显微镜研究. *中国实用眼科杂志*. 2001, 19 (8): 588-595.
- 林跃生、黎明、陈家祺等. 人体角膜移植内皮排斥反应的共焦显微镜研究. *中国实用眼科杂志*. 2003, 21 (11): 816-821
- Somodi S, Hahnel C, Slowik C, et al. Confocal in vivo microscopy and confocal laserscanning fluorescence microscopy in keratoconus. *Ger J Ophthalmol* 1996,5:518-525
- Moller PT, Vgel M, Li HF, et al. Quantification of stromal thinning, epithelial thickness, and corneal haze after photorefractive keratectomy using in vivo confocal microscopy. *Ophthalmology* 1997,104: 360-368

(收稿时间: 2006-11)