

增殖性糖尿病视网膜病变患者活体角膜组织学变化的研究

高妍 李冰 赵矩伟

【摘要】 目的 探讨增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)患者角膜知觉、激光共焦显微镜下角膜上皮、神经纤维及内皮细胞的组织形态学变化。**方法** 采用激光共焦显微镜对 2006 年 6 月至 11 月于玻璃体视网膜科住院的 30 例增殖性糖尿病视网膜病变患者进行角膜上皮、神经纤维、内皮细胞形态观察,并行角膜知觉检查;与同期白内障中心住院的同年龄 30 例非糖尿病患者对照。**结果** PDR 患者角膜知觉较对照组明显减退($P < 0.001$)。共焦显微镜检查显示, PDR 组角膜上皮细胞、内皮细胞密度均低于对照组($P < 0.05$);角膜神经丛的密度明显低于对照组($P < 0.001$); PDR 患者角膜神经纤维纤细,走行迂曲,分支减少多呈钝角。**结论** 激光共焦显微镜已成为在活体状态下观察角膜形态的新方法,增殖性糖尿病视网膜病变患者角膜知觉减退与角膜神经纤维数目减少有关。

【关键词】 糖尿病;增殖性视网膜病变;角膜;组织学;激光共焦显微镜

In vivo confocal microscopy histological observation and evaluation of sensation in PDR patients' cornea

GAO Yan, LI Bing, ZHAO Ju wei. Shanxi Ophthalmological Hospital, Taiyuan, 030002 China

【Abstract】 Objective To test the changes of corneal sensation in proliferative diabetic retinopathy (PDR) patients and to observe the diabetic corneas using laser scanning confocal microscopy. **Methods** 30 PDR patients and 30 senile cataract patients of control subjects were enrolled in this study. The central cornea was scanned with HRT_II. The images of corneal epithelium, nerve plexus and corneal endothelium were analyzed. **Results** The cornea sensation of PDR patients was significantly depressed as compared to that of the controls ($P < 0.001$). The confocal microscopy revealed that the nerve fiber density of the PDR patients was decreased and there were some morphological changes in the nerve fiber of diabetic patients, such as sparse, slim, less branches, circuitous. **Conclusion** Corneal confocal microscope allows rapid and noninvasive in vivo evaluation of cornea. The depression of the corneal sensation in PDR patients is related to the reduction of the corneal nerve fibers.

【Key words】 Diabetes mellitus; Proliferative diabetic retinopathy(PDR); Cornea; Histology; Laser scanning confocal microscope

糖尿病是临床上常见的一种全身性代谢疾病,由其引起的角膜上皮病变、干眼及术后角膜持续水肿等角膜病变日趋显现。糖尿病性角膜病变(Diabetic Keratopathy, DK)是由 Schultz^[1]在 20 年前提出并命名的。目前临床上,已发现糖尿病可引起各种各样的原发或继发(手术)的角膜改变,患者会出现干眼症及许多角膜功能不良,如反复发作的角膜溃疡,持续性上皮缺损,角膜水肿,角膜敏

感度下降,内皮荧光渗透增加等。所以,糖尿病患者角膜又被认为“高危角膜”^[2]更难耐受眼部手术创伤。

本研究利用激光共焦显微镜观察增殖性糖尿病性视网膜病变患者角膜上皮细胞、内皮细胞和角膜内神经纤维的形态学改变,并探讨其角膜知觉(corneal sensation, CS)变化与神经纤维的形态学改变相关关系。为临床提供有用的组织学及病理学基础,对角膜病的研究和临床治疗方面将起到重要的指导作用。

1. 研究对象: 入选患者均为 WHO 标准确诊的 5 年以上病史的非胰岛素依赖型糖尿病患者, 经间接检眼镜眼底检查及荧光素眼底血管造影, 并按照 1987 年中华医学会眼科学会通过的糖尿病视网膜病变的分期标准, 选出糖尿病增殖型视网膜病变 30 例, 年龄 35~72 岁, 平均(62.8 ± 4.2)岁, 男性 13 例、女性 17 例; 糖尿病病程 5~23 年, 平均(13.3 ± 5)年。另设正常对照组 30 例, 年龄 37~74 岁, 平均(65.2 ± 5.4)岁, 男性 14 例、女性 16 例, 不伴有全身性疾病。两组之间年龄 ($t=2.35, P>0.05$)、性别构成 ($\chi^2=0.067, P>0.1$) 差异无统计学意义。

所有观察对象入选前无眼部外伤、眼部激光治疗及手术史; 无角膜接触镜配戴史; 裂隙灯检查显示角膜组织透明, 无角膜组织的异常, 荧光素染色无着色; 眼压均在正常范围; 糖尿病组血糖控制良好。

2. 激光共焦显微镜检查方法: 所采用的激光共焦显微镜是由海德堡视网膜激光断层扫描系统 II 代(HRT-II)和 Rostock 角膜模块组件(RCM)组成。受检眼用爱尔卡因眼药水表麻, 受检者下颌放在检查托上, 前额与检查托的头带接触, 以保持头位正。盖上一次性无菌的角膜接触帽, 开启共焦显微镜的微机及录像系统后, 前移物镜至距角膜 5~10mm 处, 在 CCD 摄取的图像的的指导下, 调整物镜位置直至激光光束位于角膜中央, 前移物镜至接触帽与之轻微接触。转动焦平面调节环以获得角膜不同深度不同层次的图像。根据所获图像的真实焦平面位置(深度用 μm 表示)进行调整。每一焦平面均有三种取像模式可选择。检查结束后, 选择有价值的图像与录像存盘。

3. 角膜知觉检查方法: 采用 Cochet-Bonnet 角膜知觉仪(法国 Luneau SA 公司)进行检测, 纤维直径 0.12mm, 最长长度 60mm, 患者平卧, 眼平视前方, 用纤维末梢垂直接触角膜中央, 检查者肉眼看到纤维弯曲, 阳性反馈为感觉到角膜有异物感。从最长长度开始, 每次递减 5mm, 直到患者有阳性应答为止, 重复 3 次取平均值。所有检查均由同一名医生完成, 并与另一名医生进行了重复性检验。

4. 统计学分析方法: 用 Rostock 操作软件进行细胞计数, 数据统计用 $\bar{x} \pm s$ 表示。病例组和对照组的角膜知觉、角膜各层细胞计数的比较应用配对 t 检验; 相关性分析采用 Pearson 相关分析, 均 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

激光共焦显微镜下糖尿病组角膜的改变如下。

1. 角膜上皮细胞层: 激光共焦显微镜(HRT-II)示(17 ± 5) μm 处, 增殖性糖尿病性视网膜病变(PDR)患者组可见到角膜上皮细胞水肿, 细胞边缘不规整, 有上皮细胞脱失, 细胞密度低于对照组($t=2.15, P<0.05$); 而对照组的角膜上皮细胞的边缘发亮, 形态较规则(表 1, 图 1、2)。

表 1 PDR 组与对照组角膜上皮、内皮细胞密度比较
(个/ mm^2 , $\bar{x} \pm s$)

	例数	角膜上皮	内皮细胞
PDR 组	30	4200 ± 530	1946 ± 405
对照组	30	4730 ± 540	2369 ± 275
t		2.154	3.168
P		< 0.05	< 0.05



图 1 对照组的角膜上皮细胞的边缘发亮, 形态较规则

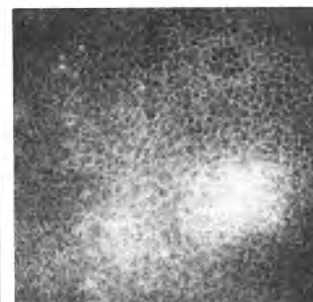


图 2 PDR 组可见到角膜上皮细胞水肿, 细胞边缘不规整, 有上皮细胞脱失

2. 角膜神经纤维层: HRT-II 示(60 ± 10) μm 处增殖性糖尿病性视网膜病变患者组神经纤维稀疏、纤细、不连续、走行迂曲, 分支少且成钝角, 神经纤维密度与单位视野分支数明显少于对照组($t=3.68, P<0.001$; $t=6.10, P<0.001$); 对照组角膜的神经纤维形态和数量清晰, 神经纤维走行较直, 纤维直径较粗, 分支多且常为锐角(表 2, 图 3、4)。

表 2 PDR 组与对照组神经纤维数量、密度及角膜敏感度比较 ($\bar{x} \pm s$)

	例数	神经纤维数量 (支/幅图)	神经纤维密度 ($\mu\text{m}/\text{幅图}$)	角膜敏感度 (mm)
PDR 组	30	4.3 ± 1.0	794 ± 256	43 ± 10
对照组	30	7.4 ± 1.8	1215 ± 378	55 ± 5
t		6.1	3.68	3.75
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001



图3 对照组神经纤维走行较直,纤维直径较粗,分支多且常为锐角



图4 PDR组神经纤维稀疏、纤细、不连续、走行迂曲,分支少且成钝角

3. 角膜内皮细胞层: HRT-II示(540 ± 25) μm 处增殖性糖尿病性视网膜病变患者组内皮细胞大小不一,很多细胞失去规则的六边形形态,有些内皮细胞边界难辨,其密度小于对照组($t=3.17, P<0.05$);对照组角膜内皮细胞多呈六边形,边缘清晰可辨,细胞体发亮(表1,图5、6)。



图5 对照组角膜内皮多呈六边形,边缘清晰可辨,细胞体发亮

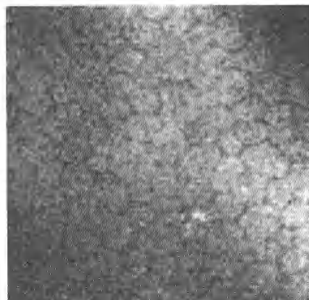


图6 PDR组内皮细胞大小不一,很多失去规则的六边形外观

4. 角膜敏感度:角膜敏感度测定发现增殖性糖尿病性视网膜病变患者组敏感度下降明显,统计结果显示,PDR组角膜敏感度明显低于对照组($t=3.75, P<0.01$),且与神经纤维密度呈正相关($r=0.51, t=2.51, P<0.05$);对照组的角膜敏感度与神经纤维密度呈正相关($r=0.66, t=3.61, P<0.05$)(表3)。

表3 神经纤维密度与角膜敏感度的相关分析

	相关系数(r)	t 值	P 值
PDR 组	0.66	3.61	< 0.05
对照组	0.51	2.51	< 0.05

讨 论

激光共焦显微镜已成为观察角膜形态的新方法,它快捷、无创、在活体状态下可对角膜各层组织进行详细观察。它可提供多种扫描模式对角膜各层次进行平面和纵向断层扫描,动态检查并记录。与传

统的光学共焦显微镜相比,有许多优势^[3]:分辨率高至 $1\mu\text{m}$,极大程度提高角膜疾病的诊断和基础研究水平;可以对病变进行确切的深度定位;无需组织切片、固定和染色,减少了标本处理过程中所造成的假象,真正体现了自然状态下的角膜病变。激光共焦显微镜因其分辨率高,即使在角膜水肿或混浊情况下仍可对角膜深层组织进行检查,这是角膜内皮镜检查所不能达到的。

糖尿病患者在接受白内障、增殖性视网膜病变手术中易发生角膜上皮剥脱、角膜水肿,术后常出现持续性的上皮缺损、反复地上皮糜烂、上皮再生迟缓、角膜上皮大泡形成等现象。本研究观察到在手术前,增殖性糖尿病性视网膜病变患者的角膜尽管裂隙灯下显示透明、完整,但激光共焦显微镜下上皮细胞有缺损、水肿现象,与国内外学者的观察结果相似^[4,7]。上皮细胞密度与同年龄组正常人相比降低,差异具有统计学意义,这与有些学者的结果不同^[4,7]。考虑与入选糖尿病患者病变程度不同有关,且本研究使用激光共焦显微镜可进行精确的深度定位,在相同层次进行测量,提高了结果的准确性,使统计学差异具有显著性。由于角膜上皮在生理结构、功能以及营养代谢、损伤后修复等方面有着特殊性,所以糖尿病在角膜上皮病变的发生发展中起的作用也是多层次、多方面的。近十年中不断有学者对糖尿病人角膜上皮病变的机制进行研究^[5]。①上皮基底膜中的糖基化终产物堆积导致糖尿病患者的角膜出现不正常的愈合和上皮粘合。②细胞内外渗透压改变:角膜上皮内多元醇的大量蓄积,细胞内水滞留,细胞膜的通透性改变,细胞肿胀,生理功能障碍。③基质金属蛋白酶因血糖升高活性增强导致上皮细胞黏附异常,易剥脱。④角膜神经递质异常等。

Panagiotis等^[10]观察到糖尿病人角膜神经纤维扭曲度增加,认为弯曲神经的出现提示神经的退行性病变和神经纤维的再生倾向;Maria等^[6]发现具有严重神经病变的I型糖尿病人角膜神经丛减少并导致角膜敏感度下降。我们的研究进一步证实了这一观察结果:增殖性糖尿病性视网膜病变患者角膜神经纤维密度下降、分支数量减少与对照组相比具有非常显著的差异,提示退行性改变增加而再生力降低。此外,增殖性糖尿病性视网膜病变患者组神经纤维稀疏、纤细、走行迂曲,角膜敏感度明显降低表明神经纤维的功能显著下降。其病变机制可能是血糖升高导致山梨醇在神经细胞内堆积,导致细胞水肿,

递质合成减少,轴浆运输减慢,继而神经末梢水肿,变性崩解^[8,9]。角膜神经纤维对角膜具有保护和营养功能,角膜上皮代谢、细胞连接、伤后修复依赖于足量角膜神经支配并提供足够的营养物质,糖尿病人角膜神经纤维减少会导致基底细胞耗尽。因此,糖尿病人眼部术后角膜的并发症发生率较高。

本文结果显示,增殖性糖尿病性视网膜病变患者及对照组角膜知觉值随着神经纤维数目的减少而降低。但对于糖尿病患者,角膜知觉值除了与神经纤维的数量有关外,还与神经纤维是否有水肿、变性有关^[4]。推测糖尿病角膜知觉的减退是由于角膜内神经纤维密度减少及功能下降引起的。Maria^[6]等发现在角膜敏感度下降前即可观察到角膜神经纤维束减少,因此利用共焦显微镜可以早期发现眼部神经病变。

角膜内皮细胞支架异常、细胞体积调节丧失所致细胞特有的六边形结构丧失是糖尿病性角膜内皮形态改变的一种表现^[2]。本研究中观察到增殖性糖尿病性视网膜病变患者组角膜内皮细胞形态不规则、六边形细胞减少,内皮细胞密度少于对照组。研究证实,角膜内皮细胞具有“泵”功能,可通过参与角膜水化控制,保证角膜恒定的含水量而处于相对脱水状态,以维持角膜的透明性。角膜内皮泵功能的维持,有赖于角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺ATP 酶的活性。研究表明,高血糖可以通过使酶失活或通过抑制细胞内肌醇的运输从而抑制 Na⁺-K⁺ATP 酶依赖的物质转运活动^[11]。基于这些改变,糖尿病人内眼手术后易出现持续性角膜水肿。糖尿病性视网膜病变的患者行玻璃体切除术后角膜病变通常发生在术后 1 周,需几周才能恢复。白内障术后糖尿病组患者角膜内皮渗透性明显增加,在角膜内皮扩散屏障功能恢复方面,糖尿病组需要 6 周,而非糖尿病组仅需 3 周^[12]。这些均提示我们在眼部手术中重视角膜情况,包括:轻微的前房操作;避免内皮创伤;术中应用透明质酸钠保护,减少手术时间等。

醛糖还原酶(AR)是多羟基代谢通路中的一种产物,与糖尿病引起的眼部并发症有关。醛糖还原酶抑制剂(ARIS)能改善糖尿病引起的角膜病变,如:持续的角膜上皮损害、点状角膜炎、内眼术后的角

膜病变以及改善患者的泪膜破裂时间、角膜敏感度等。动物实验中 ARIS 能提高神经传导能力和角膜敏感性。这说明醛糖还原酶在角膜敏感性降低的发病机制中起着重要作用^[12]。亦有临床实验证实 ARIS 可有效缓解糖尿病患者周围神经病变症状,提高周围神经传导速度,减慢体感诱发电位潜时^[13]。

激光共焦显微镜以其独特的光学切片能力,从四维显示角膜细胞的形态,且可以用数字准确地显示出检查部位的深度,避免了光学显微镜需根据前后细胞作为参照物而粗略确定层次的缺点。能够快速无创地在活体进行角膜各层细胞的检查,以反映糖尿病人组织退行性及再生性改变的程度^[11]。因此,应用共焦显微镜观察角膜组织学改变,可为认识糖尿病性角膜病变提供新途径。

参考文献

- Schultz RO, Von Hom, Peter MA. et al. Diabetic keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1981; 79: 180-199.
- 何平惠, 毕玉玲, 杨朝晖. 2 型糖尿病患者角膜厚度变化临床探讨. *现代医药卫生*, 2006, 22: 490-491.
- 荣蓓, 晏晓明. 激光共焦显微镜对正常人眼角膜缘和中央角膜的观察. *中华眼科杂志*, 2006, 42: 17-21.
- 刘小伟, 庞国祥, 王铮. 糖尿病患者角膜知觉测定和共焦显微镜观察. *中华眼科杂志*, 2005, 41: 920-923.
- 李鹏, 马效工, 安晓. 糖尿病性角膜上皮病变机制研究现状. *国际眼科杂志*, 2005, 5: 150-154.
- Maria E. Rosenberg, Timo M. T. et al. Corneal structure and sensitivity in type I diabetes mellitus. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2000; 41: 2915-2921.
- Maria Joao Quadrado, MD, Monika Popper, Antonio Miguet, et al. Diabetes and corneal cell densities in humans by in vivo confocal microscopy. *Cornea*, 2006, 26: 761-768.
- Kenii I, Stshi K, Chika O, et al. Ocular and systemic factors relevant to diabetic keratoepitheliopathy. *Cornea*, 2001, 20: 798-801.
- 王洵, 唐罗生. 糖尿病患者角膜内皮细胞的形态学研究. *中国现代医学杂志*, 2004, 14: 71-72.
- Panagiotis Kallinikos, Michael Berhanu. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2004; 45: 418-422.
- 张士胜, 王康孙. 角膜内皮细胞与糖尿病. *中国实用眼科杂志*, 2002, 20: 254-256.
- 李永浩, 刘祖国, 吕林. 糖尿病性角膜病变. *中国实用眼科杂志*, 2002, 20: 323-325.
- 马书平, 苏永, 袁慧娟. 醛糖还原酶抑制剂对糖尿病周围神经病变的影响. *中国实用神经疾病杂志*, 2006, 9: 16-17.

(收稿时间 2007-03)