

激光扫描共焦显微镜观察穿透角膜移植术后角膜的形态学特征

韩玉萍 李冰 赵炬伟 张明花

【摘要】 目的 研究活体穿透角膜移植术后各层角膜组织的激光扫描共焦显微镜 (Laser Scanning Confocal Microscope,LSCM) 的形态学特征。方法 应用海德堡视网膜激光断层扫描仪 II / Rostock 角膜模块 (HRT II) 对 20 例 20 眼穿透角膜移植术后 40 天 ~ 2 年的患者进行检查, 记录并分析其各层角膜图像。结果 穿透角膜移植术后早期角膜上皮细胞排列欠规则; Bowman 膜和 Descemet 膜在激光共焦显微镜下无细胞结构; 所有患者浅基质层细胞均较深基质层密集, 稳定角膜植片其内皮细胞排列紧密, 形态为均一六边形结构; 所有患者均未发现上皮下神经丛及基质神经; 术后植片排斥者有其特殊形态学表现。结论 激光扫描共焦显微镜可活体检查穿透角膜移植术后角膜各层组织结构和细胞的病理改变, 为临床诊断及用药提供有价值的客观依据, 并在跟踪随访方面具有重大意义。

【关键词】 激光扫描共焦显微镜 穿透角膜移植 角膜 形态学

Laser scanning confocal microscope in transplanted human corneas HAN Yuping, LI Bing, ZHAO Juwei, et al. Shanxi eye hospital, Taiyuan 030002, China

【Abstract】 Objective To study the morphological changes of the human corneas in vivo after penetrating keratoplasty by Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM). Methods 20 eyes of 20 patients on 40 days~2 years after penetrating keratoplasty (pkp) were examined by Heidelberg Retina Tomograph II Rostock Cornea Module (HRT II) in vivo .Images were recorded by continuously focusing the optical section through the full thickness of cornea. Results The cells of epithelium were irregular in the early stage after penetrating keratoplasty. Bowman's membrane and descemet's membrane had no visible cells in LSCM. The cell density of anterior stroma was higher than that of posterior stroma in all patients. The endothelium cells of stable grafts showed 6-edge shape and arranged closely. Nerves could not be seen in all transplanted corneas. The rejected grafts had its special characters in LSCM. Conclusions LSCM is a new tool for the study of cellular morphology and construction of human corneas after PKP in vivo. It can provide valuable objective basis for the clinical diagnosis, medical administration, and follow-up after operation.

【Key words】 Laser Scanning Confocal Microscope; Penetrating keratoplasty; Cornea; Morphology

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是近代发展起来的一种新型高精度的显微镜系统, 它在显微镜成像的基础上加装激光扫描装置, 利用计算机进行图像处理, 在成像质量和分辨率方面都比普通光学显微镜有明显的提高, 对于组织内或细胞内部微细结构的观察以及生物样品的定性、定量和定位观察均有很大的优越性, 尤其是对细胞进行无损伤断层光学扫描成像和细胞三维重组方面有明显的优越性^[1-3]。现在国外已大量使用共焦显微镜研究各种角膜疾病, 我们对穿透角膜移植术后的 20 例 20 眼角膜进行了

激光共焦显微镜检查, 现将结果报告如下:

资料和方法

1. 研究对象: 选择穿透角膜移植手术后患者 20 例 20 眼, 其中男性 13 例, 女性 7 例, 年龄 16 ~ 66 岁, 平均 (35.2 ± 13.8) 岁。所有患者均在我院行穿透角膜移植手术, 检查时距手术时间为 40 天 ~ 2 年 (平均 8.9 ± 6.7 月), 所有病例均未见原发病复发, 有两例发生免疫排斥反应, 均为混合型排斥反应。

2. 检查方法: 采用德国海德堡公司提供的海德堡视网膜激光断层扫描仪 II / Rostock 角膜模块 (HRT II) 进行检查。操作步骤: 待检眼用 0.5%

作者单位: 030002 太原, 山西省眼科医院

通讯作者: 韩玉萍

爱尔凯因滴眼液 (0.5%Alcaine, Alcon) 表面麻醉, 在 Rostock 角膜接触帽表面涂眼用的凝胶 (唯地息眼用凝胶)。让病人将头放进头托, 确保下腭紧靠在下腭托上并且前额要接触前额托, 保持头正位, 受检眼注视正前方。启动图像采集, 调节 CCD 摄像头的位置, 使其光轴与激光扫描摄像头的光轴垂直。将激光扫描摄像头移向病人, 直到病人角膜与 Rostock 角膜接触帽的距离在 5 毫米到 10 毫米之间, 然后将激光扫描摄像头上下左右移动, 直到角膜接触帽定位在病人角膜的中心。让病人将眼尽量睁开, 慢慢将激光扫描摄像头移向病人, 直到角膜接触帽接触病人的角膜。调到最佳状态时, 在 CCD 摄像头活动图像上会看到在角膜接触帽与角膜之间出现一薄薄的胶桥。此时在激光扫描摄像头的活动图像中就可看到角膜的图像。角膜各层的扫描图像通过液晶显示器同步显示, 观察每一扫描层面上细胞形态、密度及组织学结构。同时自动记录, 保存于计算机上。利用 HRT II /Rostock 角膜模块软件分析系统对细胞形态、密度及组织结构进行综合分析。

结 果

20 例穿透角膜移植术后患者的角膜激光共焦显微镜的影像表现:

1. 上皮细胞: (1) 穿透角膜移植术后 40 天~3 月以内患者的角膜上皮表层细胞形态大小欠均匀, 部分患者出现细胞轻度拉长, 排列呈疏松的蜂窝状, 细胞较大, 边界尚清 (图 1)。上皮基底细胞排列紧密, 细胞较表层细胞小, 也呈蜂窝状排列, 细胞边界清晰呈高反光, 未见细胞核。(2) 穿透角膜移植术后 3 月~2 年患者的角膜上皮表层细胞形态大小较均匀, 排列疏松, 细胞呈多角形, 以六边形多见 (图 2)。上皮基底细胞排列紧密, 细胞边界清晰呈高反光, 未见细胞核。(3) 2 例角膜移植术后发生排斥反应的患者角膜上皮细胞体积增大, 排列疏松, 细胞边界模糊, 细胞之间可见较多暗区 (图 3)。且在上皮基底层可见较多朗罕氏细胞 (图 4)。

2. Bowman 膜: 在激光共焦显微镜下无形态及结构。

3. 基质层: 在图像的暗背景下可见发亮的细胞核, 核间有不定形的黑色背景分割, 细胞核呈成骨细胞性、纺锤形或近椭圆形, 细胞膜、细胞浆及板层胶原等均窥不清。且浅基质层细胞明显较深基质层密集。所有患者浅基质层均未见粗大的分支状的神经干 (图 5、图 6)。2 例角膜移植术后排斥反应患者的基质

细胞排列疏松、核不规则形, 反光较弱, 且形态模糊。

4. Descemet 膜: 此膜无细胞结构。

5. 内皮细胞层: 与角膜内皮镜检查的细胞形态相同。植片稳定者内皮细胞排列紧密, 形态规则, 呈均一的六边形结构 (图 7)。2 例角膜排斥反应者内皮细胞边界不清, 形态不规则, 体积增大, 六边形细胞数目明显减少, 且可见多数颗粒状高反光点 (图 8)。



图 1 穿透角膜移植术后 40 天患者的角膜上皮表层细胞形态大小欠均匀, 部分患者出现细胞轻度拉长, 排列呈疏松的蜂窝状, 细胞较大, 边界尚清



图 2 穿透角膜移植术后 3 月~2 年患者的角膜上皮表层细胞形态大小较均匀, 排列疏松, 细胞呈多角形, 以六边形多见



图 3 穿透角膜移植术后发生排斥反应的患者的角膜上皮表层细胞体积增大, 排列疏松, 细胞边界模糊, 细胞之间可见较多暗区



图 4 在穿透角膜移植术后发生排斥反应的患者的角膜上皮基底层可见较多朗罕氏细胞



图5、图6 基质层可见发亮的细胞核，核间有不定形的黑色背景分割，细胞核呈成骨细胞形、纺锤形或近椭圆形，细胞膜、细胞浆及板层胶原等均窥不清。且浅基质层细胞（图5）明显较深基质层（图6）密集



图7 穿透角膜移植术后稳定植片者内皮细胞排列紧密，形态规则，呈均一的六边形结构



图8 角膜植片发生排斥反应者内皮细胞边界不清，形态不规则，体积增大，六边形细胞数目明显减少，且可见多数颗粒状高反光点

讨 论

激光扫描共焦显微镜是一种新型的光学显微镜，其成像质量和分辨率都比普通光学显微镜有明显的提高，尤其是对细胞进行无损伤断层扫描成像和细胞三维重组方面有明显的优越性，还能对每一扫描层面的深度进行精确定位。本研究利用激光扫描共焦显微镜观察了不同时期的穿透角膜移植术后患者的角膜植片影像学特点。结果显示。术后早期（3月以内），临床裂隙灯显微镜检查角膜上皮完整光滑，但共焦显微镜检查显示细胞排列欠均匀，部分细胞

变形，提示该期角膜上皮尚未完全恢复正常，故临幊上仍应局部使用促进角膜上皮修复的滴眼液，尽量避免角膜上皮的损伤。术后各期角膜基质细胞特点无明显差异，且均表现为浅基质层细胞密度明显高于深基质层。所有患者均未发现上皮下神经丛及基质神经，提示穿透角膜移植手术过程中神经被切断，术后角膜植片神经的恢复需要更长时间（2年以上）。这与以往报道的穿透角膜移植术后半年植片中可出现神经的研究不符^[4]。对角膜移植术后神经的恢复时间及影响因素尚需做更深入的研究。在2例穿透角膜移植术后发生混合型排斥反应的患者中，角膜各层细胞均出现了明显的病理学变化。且在上皮基底层可见较多朗罕氏细胞，提示朗罕氏细胞在角膜免疫炎症过程中发挥着重要的免疫信号传递作用。内皮层所见的高反光颗粒考虑为角膜排斥反应过程中出现的炎症细胞，如白细胞等。

综上所述，共焦激光显微镜因其独有的共焦特性，可以对狭窄区域内组织细胞平面产生放大作用和分辨率的明显提高，以及其具有的现代计算机扫描系统及及时成像系统，可以完成完整的图像分析和动态观察，从而使它对角膜细胞水平上的实验研究及临幊应用成为可能。共焦激光显微镜在检查过程中的无损伤性，可以直接对患者活体眼球进行研究，因此它是一种较为先进的、分辨率更好的细胞水平研究的新型仪器。共焦激光显微镜能在活体直觀四维显示角膜移植术后角膜组织结构和各层细胞的病理变化以及角膜排斥反应时的病理改变，有利于提高人们对角膜移植术后角膜植片各层的愈合情况、神经恢复等方面的认识，为临幊用药提供一定的客观依据，并在跟踪随访方面具有重大意义。

参 考 文 献

- 1 Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 1988;10:128
- 2 Ciancaglini M, Carpineto P, Zuppardi E, et al. *In vivo confocal microscopy of patients with amiodarone-induced keratopathy*. *Cornea*, 2001; 20:368-373
- 3 谢立信,史伟云,郭萍.正常人活体角膜组织结构的共焦显微镜观察.中华眼科学,2000;36:235-237
- 4 谢立信.泪膜和角膜的应用解剖和组织学.角膜移植学.第1版.北京:2000;金盾出版社,25

(收稿时间: 2006-07)