

· 论著 ·

· 角膜接触镜 ·

长期配戴软性角膜接触镜者角膜上皮的病理改变

郑玉胜 庄宪丽 杨延振 张秋秋 李路路

【摘要】 目的 研究软性角膜接触镜对角膜上皮组织的基底细胞数目、上皮厚度、基底细胞形态、增殖细胞核抗原(PCNA)等的影响。方法 前瞻性病例对照研究。选择配戴软性角膜接触镜超过3年的患者33例(66眼,角膜接触镜组)和从未配戴软性角膜接触镜患者33例(66眼,对照组),对所选患者,在去瓣准分子激光上皮下角膜磨镶术(Flap-free Epi-LASIK)手术中,用Epi-K角膜上皮刀取下角膜上皮瓣。2组中各取30例(60眼)采用超声进行离体角膜上皮瓣厚度的测量和采用显微镜进行基底细胞计数,各取3例(6眼)进行石蜡切片及免疫组化染色,观察角膜上皮瓣基底细胞形态的变化和进行PCNA的测定。数据采用独立样本 t 检验进行分析。结果 角膜接触镜组角膜上皮层厚度为 $(55.33\pm 4.56)\mu\text{m}$;对照组角膜上皮层厚度为 $(57.19\pm 3.82)\mu\text{m}$,二者之间差异有统计学意义($t=-2.422$, $P<0.05$)。角膜接触镜组基底上皮细胞数目减少,为 $(3872.6\pm 153.2)\text{cells}/\text{mm}^2$;对照组基底上皮细胞数目为 $(3989.2\pm 289.6)\text{cells}/\text{mm}^2$,二者之间差异有统计学意义($t=-2.757$, $P<0.01$)。角膜接触镜组较对照组角膜基底细胞排列疏松,细胞形态欠规整,基底膜较厚,相对粗糙。角膜接触镜组角膜上皮基底细胞可发现PCNA阳性细胞,而对照组无阳性细胞。结论 长期配戴软性角膜接触镜可导致角膜上皮损伤;使角膜上皮层变薄;单位面积内的角膜上皮基底细胞数量减少;角膜上皮的组织结构发生病理学改变,细胞形态发生改变,细胞之间的连接和基底膜遭到破坏,PCNA阳性细胞存在。

【关键词】 角膜; 接触镜,亲水性; 病理; 免疫组织化学

Pathological changes to the corneal epithelium from long-term contact lens wear

ZHENG Yu-sheng, ZHUANG Xian-li, YANG Yan-zhen, ZHANG Qiu-qiu, LI Lu-lu. The Ophthalmology Department of Central People's Hospital of Tengzhou, Zaozhuang 277500, China
Corresponding author: ZHENG Yu-sheng, Email: cmtzys@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of long-term soft contact lens wear on a unit area of corneal epithelium cell tissue, epithelial thickness, cell morphology and proliferating cell nuclear antigen (PCNA); to inform about the effects of contact lenses on the cornea in clinical applications. **Methods** This was an prospective case control study. Group A consisted of long-term (≥ 3 years) soft contact lens wearers (66 eyes of 33 patients) and control group B consisted of non-soft contact lens wearers (66 eyes of 33 patients). The selected patients had undergone an excimer flap-free Epi-LASIK operation, and the corneal flap was removed with an Epi-K corneal epithelial knife. Ultrasound and microscopy were used for measurement of the corneal flap thickness and the basal cell count. Paraffin section and immunohistochemistry were used to study the morphological changes of the corneal flap, basal cells and the proliferating cell nuclear antigen. Data were analyzed using an independent t test. **Results** After more than 3 years of soft contact lens wear, the thickness of the corneal epithelium was $55.33\pm 4.56\ \mu\text{m}$ and the number of basal epithelial cells were $3872.6\pm 153.2\ \text{cells}/\text{mm}^2$. The thickness of the corneal epithelium in the control group was $57.19\pm 3.82\ \mu\text{m}$ and the number of basal epithelial cells were $3989.2\pm 289.6\ \text{cells}/\text{mm}^2$. There was a statistically significant difference between the experimental and control groups ($t=-2.422$, -2.757 , $P<0.05$). In the experimental group, corneal basal cells were arranged more loosely, the cells had less structured forms, and the basal membrane was thicker and rougher compared to the control group. PCNA positive cells could be found in corneal

epithelial basal cells in the experimental group but not in the control group. **Conclusion** Long-term wear of soft contact lenses can lead to corneal epithelium injury: the corneal epithelium thickness decrease, corneal epithelial basal cells decrease in number, the structure of the corneal epithelium develops a less organized pathology. There are also changes in cell morphology, cell-cell junctions, destruction of the basal membrane, and the presence of PCNA positive cells.

【Key words】 Cornea; Contact lenses, hydrophilic; Pathology; Immunohistochemistry

软性角膜接触镜经过了几十年的发展,技术已比较成熟。虽然软性角膜接触镜的制作材料和制作技术在不断改进,但透气功能方面的问题一直没能完全解决。软性角膜接触镜应用起来美观方便,但其副作用也是显而易见的,主要为可导致角膜长期缺氧,不仅会影响到角膜的透明度,也会影响准分子激光手术及角膜移植手术。我国有超过四亿的近视患者,其中相当一部分患者配戴软性角膜接触镜,故研究长期配戴软性角膜接触镜对角膜的损害意义重大。

1 对象与方法

1.1 对象

2010 年 7 月至 2011 年 4 月在我院准分子激光中心行去瓣准分子激光上皮下角膜磨镶术 (flap-free epipolis laser in situ keratomileusis, Flap-free Epi-LASIK) 的近视患者中,选择配戴软性角膜接触镜超过 3 年的患者和从未配戴软性角膜接触镜患者各 33 例 (66 眼),所有手术患者术前均停戴软性角膜接触镜 2 周。

角膜接触镜组男 14 例,女 19 例,年龄 18~41 岁,平均 (27.4±5.7) 岁;对照组男 17 例,女 16 例,年龄 18~40 岁,平均 (26.9±6.7) 岁。角膜接触镜组的等效球镜度 -1.5~-8.0 D,平均 (-4.76±2.46) D;对照组的等效球镜度 -1.5~-8.0 D,平均 (-4.73±2.43) D。本研究通过了本院伦理委员会审查,所有患者术前均签署知情同意书。

1.2 主要仪器及试剂

主要仪器有超声角膜测厚仪 (PacScan300P) (美国 Sonomed 公司)、MIAS 敏视图文工作站 (山东潍坊昌华公司)、Moria Epi-K 上皮刀系统 (法国 Moria 公司)、Leica Asp300 智能化组织脱水机 (德国莱卡公司)。主要试剂第一抗体鼠抗人 PCNA 单克隆抗体、第二抗体酶标抗鼠/兔聚合物、SP 试剂盒、过氧化酶阻断溶液、链霉菌抗生物素—过氧化物酶溶液等均购自福州迈新公司。

1.3 方法

1.3.1 取材 术中用 Epi-K 上皮刀切取角膜上皮瓣。取下的角膜瓣直径约 8~9 mm;用镊子翻开角膜

瓣,使之平铺于预先消毒好的载玻片上,此时角膜瓣基底面向上。用镊子轻轻调整角膜瓣位置至载玻片中央,取材完成。

1.3.2 材料处理 对所有手术所取标本进行核实、登记、分组、标记。2 组中各取 30 例 (60 眼) 采用超声进行离体角膜上皮瓣厚度的测量和采用显微镜进行基底细胞计数,各取 3 例 (6 眼) 采用石蜡切片及免疫组化染色,观察角膜上皮瓣基底细胞形态的变化和进行增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的测定。

1.3.3 角膜上皮瓣厚度测量 应用超声角膜测厚仪 (PacScan300P) 进行角膜厚度测量。把角膜瓣平铺于已消毒载玻片上,把载玻片平放在检查台上,用超声探头轻触角膜上皮瓣,在显示器上读取角膜上皮瓣厚度数值,在中央部测量 5 个点,取其平均值即为该角膜瓣厚度。所有厚度测量均由同一有经验医师操作完成。

1.3.4 角膜瓣中央部基底细胞计数 角膜上皮瓣经瑞氏染色法后在 100×10 倍油镜下计数。Olympus C×31 显微镜使用的是 unis 光学系统,实际视野=视野数/物镜倍率,因其视野数为 20 mm,使用 100×10 倍油镜时,物镜倍率为 100,视野直径即为 0.2 mm,则视野面积为 0.0314 mm²,计算该角膜瓣中央基底细胞密度为:视野内基底细胞数/0.0314 mm²,即得出每平方毫米基底细胞数量。

1.3.5 石蜡切片的制作与观察 2 组石蜡切片经固定、脱水、透明、固定、脱水、包埋、制作蜡块、切片、烘烤、脱蜡染色、脱水、透明、封固、在病理显微镜下观察。

1.3.6 免疫组化操作流程 切片经脱蜡和水化后进行抗原修复,然后应用 S-P 法进行免疫组化染色,经干燥、透明、中性树胶封片、镜检,在高倍镜下观察是否 PCNA 阳性。PCNA 阳性反应集中分布于细胞核,呈棕黄色颗粒状,胞质不显色。

1.4 统计学方法

前瞻性病例对照研究。采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。2 组数据比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 离体角膜上皮瓣厚度

经超声测厚仪测量离体角膜上皮瓣厚度,发现角膜接触镜组角膜上皮瓣厚度为 41.4~65.0 μm ,平均为 $(55.33\pm 4.56)\mu\text{m}$;对照组角膜上皮瓣厚度为 47.5~66.8 μm ,平均为 $(57.19\pm 3.82)\mu\text{m}$,2 组差异有统计学意义($t=-2.422, P<0.05$)。

2.2 角膜上皮基底细胞计数

在病理显微镜下进行角膜上皮基底细胞计数,角膜接触镜组角膜上皮数为 3643~4208 cells/ mm^2 ,平均 $(3872.6\pm 153.2)\text{cells}/\text{mm}^2$,明显少于对照组 $[3747\sim 4426\text{ cells}/\text{mm}^2$,平均 $(3989.2\pm 289.6)\text{cells}/\text{mm}^2$],2 组差异有统计学意义($t=-2.757, P<0.01$)。

2.3 显微镜下病理切片观察结果

在显微镜下可以见到角膜接触镜组角膜上皮基底细胞形态欠规整,部分细胞增大,细胞质染色稍浅,细胞核染色无明显差别,基底细胞排列疏松。而对照组角膜上皮基底细胞形态规整,细胞质染色稍深,细胞核染色无明显差别,基底细胞排列紧密。

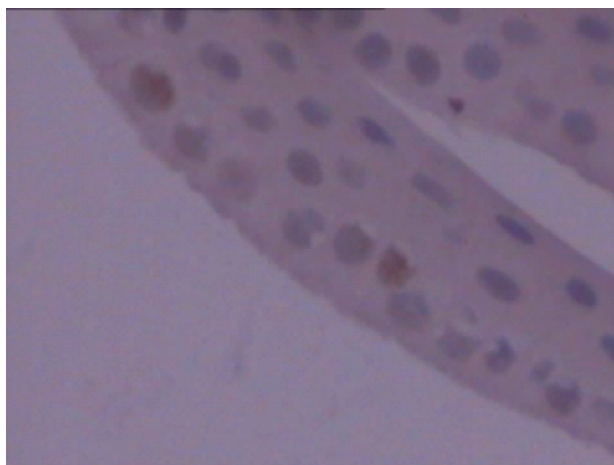
由垂直于角膜平面角膜上皮病理切片可以看出长期配戴软性角膜接触镜者的角膜上皮基底细胞面略显粗糙,增厚;基底细胞排列欠均匀,形态变化较大,细胞间隙明显;翼状细胞排列疏松,略显杂乱;扁平细胞也不够均匀。而从未配戴角膜接触镜者的角膜上皮基底细胞面光滑,平整,质地均匀,厚度也薄于实验组;基底细胞排列均匀,形态变化不大;翼状细胞排列较为规则;扁平细胞较角膜接触镜组均匀。

2.4 PCNA 测定结果

在高倍显微镜下,观察免疫组织化学处理后的角膜上皮瓣切片,长期配戴软性角膜接触镜者的角膜上皮中央基底细胞可以发现 PCNA 反应阳性细胞(见图 1),细胞核呈棕黄色颗粒状,且只存在于基底细胞,扁平细胞和翼状细胞未发现,但数量极少,每张切片,随机选择 5 个不重复高倍视野($\times 400$),经常观察不到 PCNA 反应阳性细胞,又因样本数量少,未做具体统计。从未配戴软性角膜接触镜者的角膜上皮中央基底细胞没有发现 PCNA 反应阳性细胞。

3 讨论

目前软性角膜接触镜进行屈光不正矫正,逐渐被更多患者接受,但许多研究表明长期配戴软性角膜接触镜会引起角膜损伤,其引起角膜损伤的机制尚未完全明确,可能与角膜氧供不足、角膜代谢、机械刺激等有关。本研究发现配戴软性角膜接触镜者角膜变薄,



基底细胞核见棕黄色颗粒,为 PCNA 反应阳性

图 1 长期配戴软性角膜接触镜者的角膜上皮免疫组化染色切片($\times 400$)

且基底细胞排列、形态、基底膜厚度等发生变化,这与先前研究角膜厚度变薄^[1-4]相符合,也与共焦显微镜下观察到的角膜上皮变薄^[3-4]的结果一致。

既往研究在共焦显微镜下发现长期配戴软性角膜接触镜者角膜基底细胞数目减少^[3],实验中在病理显微镜下可观察到长期配戴软性角膜接触镜者角膜上皮基底细胞大小不匀称,个别细胞明显变大,细胞间空隙明显,单位面积内细胞数目明显减少,本研究中角膜接触镜组与对照组的每平方毫米基底细胞数目平均差超过 100 个,经统计学分析,上皮基底细胞数目差异是有显著统计学意义的,其原因可能与长期配戴软性角膜接触镜引起上皮组织的缺氧反应和慢性炎症反应等^[5-9]导致组织内代谢改变有关。

由病理切片可以看出,角膜中央上皮由 5~6 层排列整齐的细胞组成,表面光滑,基底层为一层矮柱状细胞,上皮基部相对平整,无乳头样突起。基底细胞呈矮柱状或立方形,胞体较小,细胞核圆而大,位于细胞中央,着色较深,胞质强嗜碱性,基底部相对平整。长期配戴软性角膜接触镜者,上皮细胞表层细胞比较松散,不平整,间隙较为明显。这一点在进行角膜染色时常呈现细小点状着色相符合,而未戴软性角膜接触镜者一般不会有此着色改变,翼状细胞层基质也较为疏松,排列不整齐,层数比未戴软性角膜接触镜者偶有减少。由垂直于角膜平面的病理切片可以看出,基底细胞下方较为规整厚实的组织,应为基底膜,说明该 Epi-K 上皮刀能够剥离基底膜,这也是切面平整的主要原因。长期配戴软性角膜接触镜者基底细胞层比较松散,密度低,基底膜粗糙,不够完整,未戴软性角膜接触镜者基底膜较为规整,说明长期配戴软性角膜接触镜已影响到基底膜的完整

性和平滑程度, 基底细胞排列欠均匀, 形态变化较大, 细胞间隙明显。另外, 长期配戴软性角膜接触镜组的基底膜厚度较未戴软性角膜接触镜组略厚, 可能与长期软性配戴角膜接触镜引起角膜的慢性炎症或缺氧而导致的基底膜的增殖或粘连有关, 也可以解释在临床中遇到长期配戴软性角膜接触镜患者准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术手术时上皮剥离比较困难和术后 haze 发生率高现象, 但缺乏准确的定量数据, 有待于进一步研究加以证实。

PCNA 是一种分子量为 36 kD 的蛋白质, 在细胞核内合成, 并存在于细胞核内, 为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, 是一种细胞周期调节蛋白, 由 Miyachi 等于 1978 年在系统性红斑狼疮患者的血清中首次发现并命名, 因其只存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内而得名, 以后的研究发现 PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切, 在细胞增殖的启动上起重要作用, 是反映细胞增殖状态的良好指标。其作为一个敏感的检测指标, 已被广泛用于细胞增殖功能的检测。

以往研究表明 PCNA 阳性表现主要在角膜上皮基底细胞层, 在角膜缘组织中表达较强^[10], 谢立信^[11]在角膜缘基底膜处发现大量 PCNA 阳性反应的细胞, 李红等^[12]通过对兔眼角膜 PCNA 的表达发现 PCNA 阳性反应细胞大多位于上下角膜缘, 角膜中央出现极少阳性细胞。本研究所取标本直径为 8~9 mm 的角膜上皮瓣, 是以角膜中央部上皮为主, 也包括部分周边部上皮, 不会存在角膜缘部位上皮组织, 据以上研究不会有明显的 PCNA 阳性反应的表达。病理切片经免疫组化处理后, 从未配戴过软性角膜接触镜的角膜上皮未发现 PCNA 阳性反应的细胞, 但长期配戴软性角膜接触镜的患者的角膜上皮可以看到 PCNA 阳性反应的细胞, PCNA 阳性反应物质为黄褐色颗粒, 主要分布于细胞核内。这说明角膜接触镜可以造成角膜上皮基底细胞的病理生理改变, 基底细胞在缺氧情况下增殖功能会增强, 在正常组织, PCNA 阳性细胞仅局限于有增殖能力的区域。但我们在长期配戴过软性角膜接触镜的患者中央部发现基底细胞的 PCNA 存在, 反映出中央部角膜上皮细

胞仍处于增生状态。PCNA 表达水平的增加, 提示角膜上皮细胞和基质细胞增生增强, 加强了与增生相关因子的表达, 致使手术后 haze 的形成, 与临床上发现长期配戴角膜接触镜者表层准分子激光手术后易出现 haze 等并发症一致。而且上皮过度增生也可以影响切削区角膜的曲率, 而成为导致手术效果不稳定和术后屈光回退的原因之一, 故对于长期配戴过软性角膜接触镜的患者应谨慎选择手术方式。

本研究表明软性角膜接触镜可导致角膜受损, 屈光不正患者应谨慎选择配戴软性角膜接触镜, 同时规范软性角膜接触镜的市场, 使患者更合理更安全地配戴软性角膜接触镜。还要加强软性角膜接触镜的市场研发, 更好地提高其透氧性, 以减少对眼睛的损害。

参考文献:

- [1] 刘祖国, 张梅. 长期配戴角膜接触镜对角膜厚度、屈率及表面规则性的影响. 中国实用眼科杂志, 2002, 20:345.
- [2] 叶翠玉, 沙翔根, 姚达强, 等. 长期配戴角膜接触镜角膜中央厚度的变化. 中国实用眼科杂志, 2006, 24:748-749.
- [3] 郑晓汾, 李冰, 王效武, 等. 配戴角膜接触镜后角膜变化的激光共焦显微镜观察. 中国实用眼科杂志, 2006, 24:1285-1288.
- [4] 严冬, 张丰菊. 共焦显微镜评价长期配戴角膜接触镜对眼角膜组织的影响. 眼视光学杂志, 2008, 10:310-313.
- [5] 谢培英, 迟蕙, 张纘, 等. 长期配戴角膜塑形镜对角膜厚度和角膜内皮细胞的影响. 中华眼科杂志, 2007, 43:680-681.
- [6] Lin MC, Graham AD, Fusaro RE, Polse KA. Impact of rigid gas-permeable contact lens extended wear on corneal epithelial barrier function. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43:1019 - 1024.
- [7] Patel SV, Melaren JN, Hodge DO, et al. Confocal microscopy in vivo in corneas of long-term contact lens wearers. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43:995-1003.
- [8] 赵少贞, 乔丽萍, 孙惠敏. 软性角膜接触镜诱发角膜改变的共焦显微镜观察. 眼视光学杂志, 2004, 6:247-249.
- [9] 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.
- [10] 祝丽娜, 陈逊, 廖荣丰. 准分子激光角膜切削术后角膜细胞的增生及激素的治疗作用. 安徽医科大学学报, 2003, 38:32-35.
- [11] 谢立信. 眼表重建手术及其未来. 眼科新进展, 2001, 21:145-147.
- [12] 李红, 苏敏, 黄悦, 等. PCNA 在新西兰大耳兔角膜及角膜缘的表达. 局解手术学杂志, 2009, 18:297-299.

(收稿日期:2013-03-22)

(本文编辑:季魏红, 毛文明)