

· 临床研究 ·

干眼抗炎治疗前后角膜上皮神经分布的定量分析

程 燕, 吴 洁*, 朱海峰, 程 钰, 朱秀萍

(陕西省眼科研究所, 陕西省眼科学重点实验室, 西安市第一医院, 陕西 西安 710002)

摘要:目的 应用共焦显微镜观察轻度干眼抗炎治疗前后角膜上皮神经的改变,以期评价干眼抗炎治疗的疗效。方法 收集临床诊断为干眼患者60例(120只眼),均为1级干眼患者,随机将其分为两组,每组30例(60只眼)。所有患者均给予人工泪液,非甾体类抗炎药物治疗2周,症状无明显改善。其中一组非甾体类抗炎药换用依碳氯替泼诺0.5%眼用混悬液每日3次抗炎治疗,2周后减量为每日2次,1月时停药。治疗前及治疗后3个月,记录角膜上皮神经纤维密度、分支数量、弯曲度评分,对两组患者的上述指标进行统计学分析。结果 人工泪液联合依碳氯替泼诺0.5%眼用混悬液组治疗后3个月角膜上皮神经密度与治疗前无显著差异($P > 0.05$),但其分支数量明显减少($P < 0.05$),弯曲度变小,形态趋于正常;人工泪液联合非甾体抗炎药物组上述指标治疗前后均无显著差异($P > 0.05$)。结论 糖皮质激素类药物对于常规治疗无效的轻度干眼患者临床有效,通过共焦显微镜观察角膜上皮神经可以作为干眼患者激素抗炎治疗疗效评估的有效方法。

关键词:干眼;角膜上皮神经;共焦显微镜

中图分类号:R77 文献标识码:A 文章编号:1672-2639(2018)01-0035-06

A quantitative analysis of corneal subbasal nerves before and after the anti-inflammatory therapy in patients with dry eye

CHENG Yan, WU Jie*, ZHU Hai-feng, CHENG Yu, ZHU Xiu-ping

(Shaanxi Provincial Institute of Ophthalmology; Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology; First Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, China)

Abstract: Objective Confocal microscope was used to observe the change of corneal subbasal nerve before and after mild dry eye anti-inflammatory treatment in order to evaluate the effect of anti-inflammatory dry eye treatment.

Methods Sixty patients (120 eyes) with dry eye were randomly divided into two groups (60 eyes). All patients were given artificial tears, non-steroidal anti-inflammatory drugs for 2 weeks, no significant improvement in symptoms. One group of non-steroidal anti-inflammatory drugs for use of loteprednol etabonate 0.5% ophthalmic suspension 3 times a day anti-inflammatory treatment, 2 weeks after the reduction to 2 times a day, January withdrawal. Before treatment and 3 months after treatment, the density of corneal subbasal nerve fibers, the number of branches and the curvature score were recorded, and the above indexes of two groups of patients were statistically analyzed. **Results** There was no significant difference in the density of corneal subbasal nerve between the artificial tears combined with loteprednol etabonate 0.5% ophthalmic suspension 3 months after treatment ($P > 0.05$), but the number of branches was significantly decreased ($P < 0.05$), Less curvature, the shape tends to be normal; Artificial tears combined with non-steroidal anti-inflammatory drug group indicators before and after treatment were no

基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF206);西安市卫生局课题项目(J2011004)

作者简介:程 燕(1978—),女,陕西宜川人,副主任医师,在读博士。研究方向:角膜及眼表疾病。

* **通讯作者:**吴 洁(1963—),女,北京人,主任医师,研究生。研究方向:角膜及眼表疾病。E-mail:wutu63@163.com

significant difference($P > 0.05$). **Conclusion** Glucocorticoids are clinically effective in patients with mild dry eye that are ineffective with conventional therapy. Observation of the corneal subbasal nerve by confocal microscopy can be used as an effective method for evaluating the curative effect of steroid - anti - inflammatory treatment in patients with dry eye.

Key words: Dry eye; Corneal subbasal nerve; Confocal microscope

根据 2017 年 TFOS 干眼病专家共识 (TFOS DEWS II) 对于干眼新的定义, 提出干眼是泪膜稳态的失衡, 这是一个核心特征。干眼的发病机制具有相当多的因素, 包括泪液渗透压升高、神经感觉的异常、眼表炎症与损害等, 这些因素共同参与了干眼的发病过程, 因此干眼是多因素参与的一类疾病^[1]。新的概念与传统的干眼定义同样强调了炎症在干眼发病中的重要作用, 既往大量的研究也表明干眼的发病可能与炎症反应有关^[2-4], 同时, McCabe E 和 Narayanan S 认为炎症似乎在整个干眼病程中发挥关键作用, 并且与其他治疗方式相比, 药理学上具有抗炎性质的药物在治疗中重度干眼患者上表现出巨大的成功^[5,6], 如糖皮质激素、环孢素等药物治疗。

国际干眼病专题研究会根据干眼患者的症状、体征及泪液试验将其分为 4 级。并根据干眼的严重程度分级进行推荐的治疗方案, 针对 1 级干眼患者 (干眼不适症状仅在环境应力作用下轻度或偶尔发生; 无视力症状或轻度视力症状, 角膜、结膜无染色或轻度染色, BUT 及 Shirmer 试验可变) 共识推荐的治疗: 教育、环境、饮食修改; 减少不良反应的全身用药; 人工泪液代用品; 眼睑的治疗。但是, 我们在临床上观察到的轻度干眼患者, 无任何角膜、结膜染色, 患者却出现严重的眼部酸痛、畏光等症状, 即症状 - 体征分离现象, 针对这种情况我们使用了推荐的治疗方法无效, 在此基础上我们换用氯替泼诺 0.5% 眼用混悬液抗炎治疗, 患者症状明显缓解, 取得了满意的临床效果。为解释这一现象的存在, 我们对该类患者及对照组进行了角膜共焦显微镜检查, 发现了角膜上皮神经的改变, 现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集我院 2012 - 01 ~ 2015 - 12 门诊诊断为 1 级干眼 (泪液试验 Shirmer I、Shirmer II 大致正常或轻度下降, BUT 时间轻度缩短或正常, 角膜、结膜未

见荧光素染色) 患者 60 例, 患者中 23 例男性, 37 例女性, 最小年龄 25 岁, 最大年龄 58 岁, 平均年龄 41.5 岁。所有患者均为双眼发病, 都具有症状 - 体征分离现象, 即所有患者 OSDI (眼表疾病指数量表) 均 ≥ 20 , 但角膜结膜未见荧光素染色。所有患者均为初发病例。排除病毒性角膜炎、Steven - Johnson 综合征、眼部烧伤等眼表病史。排除之前眼部应用激素、环孢素、他克莫司、抗生素等眼部用药病史, 并除外青光眼病史及具有青光眼家族史的患者。随机将所有干眼患者分为两组, 每组 30 例 (60 只眼)。所有研究对象均签署药物应用知情同意书。

1.2 药物干预

给予所有干眼患者人工泪液 (0.1% 玻璃酸钠滴眼液, 海露 HYCOSAN, sodium hyaluronate eye drops, 由德国乌斯法玛公司提供) 和非甾体类抗炎药物 (0.1% 普拉洛芬滴眼液) 均为每日 3 次滴双眼, 治疗 2 周后患者症状无改善。其中一组换用氯替泼诺 0.5% 眼用混悬液 (Lotemax, Bausch & Lomb Inc, Rochester, NY) 滴双眼, 每日 3 次, 应用两周后减量为每日 2 次, 共计使用 1 月后停药, 每周监测眼压变化。另一组继续原治疗方案即人工泪液联合非甾体类抗炎药的治疗。

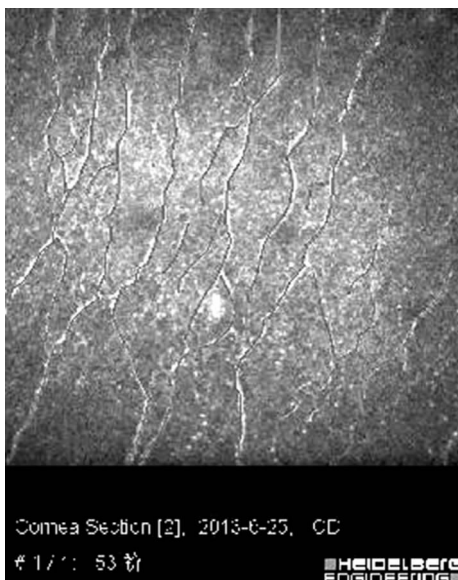
1.3 共焦显微镜检查

对所有观察对象用药前及用药后 3 个月进行双眼激光共焦显微镜检查。使用海德堡 Retina Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT III RCM) 激光共焦显微镜, HRT III RCM 纵向分辨率约 1 μm , 可以实现活体角膜各层的图像。HRT III RCM 的激光光源使用波长 670 nm 的二极管激光。检查前, 于结膜囊下穹隆部滴 1 滴 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸奥布卡因和 1 滴凝胶型人工泪液 - 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡波姆 (Bausch & Lomb, 美国)。检查在矢状轴进行, 因此检查时能够精确显示角膜各层结构。对全部研究对象进行角膜中央区图像采集, 每个患者在同一检查层面至少采集 3 张共焦显微镜图片。所有患者及正常对照组的检查均由一人完成。每眼的检查时间 $< 15 \text{ min}$, 全部患者无检查引起的并发症发生。

1.4 临床观察指标

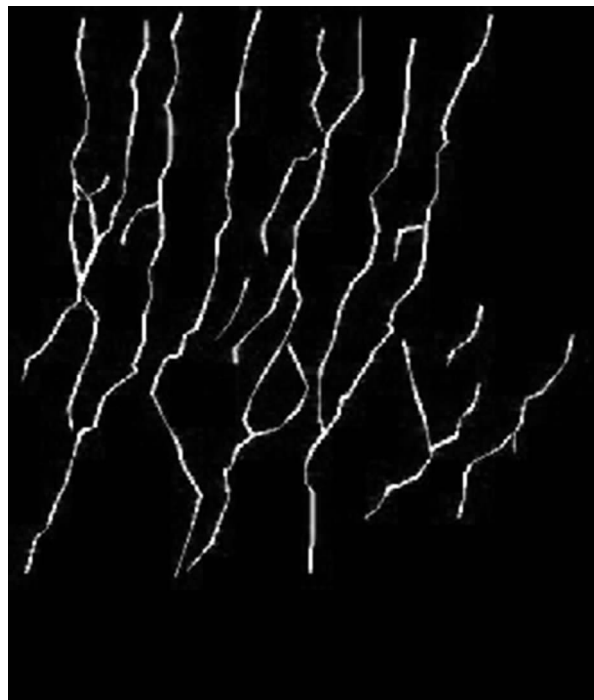
(1)神经密度(mm/mm^2):1幅图像内神经纤维的总长度为其密度,通常角膜上皮神经丛显示在 $35\sim 50\ \mu\text{m}$ 深度,计算3张图片中神经纤维长度取平均值,每幅图像相当于角膜的实际面积为 $0.16\ \text{mm}^2$ (即 $400\times 400\ \mu\text{m}$),再计算单位面积($1\ \text{mm}^2$)内的神经长度为神经密度。(2)分支数量(支/幅图)。(3)弯曲度:图像中神经纤维的弯曲程度,依据 Oliveira-Soto 分级标准,分为4级,评分越高,则神经纤维走行越弯曲。对激素组、非激素组两组患者治疗前,治疗后3个月进行双眼激光共焦显微镜检查,观察重点为角膜上皮神经,并对相关数据进行统计记录。

角膜上皮神经纤维长度通过 AUTOCAD,三维辅助设计软件计算,对每幅共焦显微镜图片中神经纤维的长度进行计算(见图1,图2)。AUTOCAD 为美国 Auto desk 公司出品的,英文全称 CAD——Computer Aided Design(计算机辅助设计)。具体计算方法如下:将图形文件插入到 CAD 软件中,运用缩放命令将图片比例调整至与每幅图显示的角膜实际面积一致(即 $400\times 400\ \mu\text{m}$)。运用 CAD 的多义线的命令描出神经纤维形状,将单张图片中所有的神经纤维描出后将描出的多义线整体拷贝出来,通过查询多义线特性,查出所有多义线的总长度。之后用查出的总长度除以面积($0.16\ \text{mm}^2$)即可得到神经纤维密度(mm/mm^2)。



注:*运用 CAD 的多义线的命令描出神经纤维形状

图1 CAD 软件中的共焦图像神经纤维描绘



注:*将描出的多义线整体拷贝出来,查询多义线的总长度

图2 描绘神经纤维的多义线

1.5 统计方法

文中所有统计分析均采用 SPSS (PASW) 17.0 统计软件进行分析。所有研究变量均采用患者双眼平均值。同一组研究对象角膜上皮神经密度、角膜上皮神经分支数量治疗前后比较均采用配对样本 t 检验;两组间上述指标的比较采用独立样本 t 检验。角膜弯曲度评分治疗前后比较采用配对比较的秩和检验;两组之间的弯曲度评分采用独立样本比较的秩和检验。所有统计学分析以 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 激素(氯替泼诺 0.5% 眼用混悬液)组与非激素(0.1% 普拉洛芬滴眼液)组治疗前后角膜上皮神经纤维的改变

激素组、非激素组两组之间治疗前角膜上皮神经密度、角膜上皮神经纤维分支数量、弯曲度评分均无统计学差异($P < 0.05$), (见表1);激素组治疗前后观察,角膜上皮神经纤维密度无显著差异,但是治疗后神经纤维分支数量、弯曲度评分均较治疗前降低(见表2);非激素组治疗前后观察,角膜上皮神经纤维密度、神经纤维分支数量、弯曲度评分均较治疗前无显著差异(见表3)。

表1 激素组及非激素组治疗前各项指标比较($\bar{x} \pm s$)

观察指标	人工泪液联合 氯替泼诺治疗组 ($n=30$)	人工泪液联合 非甾体抗炎药物 治疗组($n=30$)	t/z	P
治疗前角膜上皮神经纤维密度(mm/mm^2)	20.2 ± 3.5	20.9 ± 3.6	-0.708(t)	0.48
治疗前角膜上皮神经纤维分支数量(支/幅图)	10.8 ± 1.7	11.1 ± 2.4	-0.403(t)	0.69
神经纤维弯曲度评分(1~4分)	3.5 ± 0.4	3.6 ± 0.4	-0.282(z)	0.78

注:治疗前两组角膜上皮神经各项指标基线水平无明显差异($P < 0.05$)。

表2 激素组治疗前后角膜上皮神经各项指标比较($\bar{x} \pm s$)

观察指标	人工泪液联合 氯替泼诺治疗组 ($n=30$)	人工泪液联合 非甾体抗炎药物 治疗组($n=30$)	t/z	P
角膜上皮神经纤维密度(mm/mm^2)	20.2 ± 3.5	19.9 ± 3.6	1.631(t)	0.114
角膜上皮神经纤维分支数量(支/幅图)	10.8 ± 1.7	4.7 ± 0.8	24.143(t)	0.000
神经纤维弯曲度评分(1~4分)	3.5 ± 0.4	1.5 ± 0.9	-4.616(z)	0.000

注:激素组治疗后上皮神经分支数量及弯曲度明显改善($P < 0.05$)。

表3 非激素组治疗前后角膜上皮神经各项指标比较($\bar{x} \pm s$)

观察指标	人工泪液联合 氯替泼诺治疗组 ($n=30$)	人工泪液联合 非甾体抗炎药物 治疗组($n=30$)	t/z	P
角膜上皮神经纤维密度(mm/mm^2)	20.8 ± 3.6	20.6 ± 3.4	1.288(t)	0.208
角膜上皮神经纤维分支数量(支/幅图)	11.1 ± 2.4	10.5 ± 2.4	1.111(t)	0.276
神经纤维弯曲度评分(1~4分)	3.6 ± 0.4	3.4 ± 0.4	-1.268(z)	0.205

注:非激素组治疗前后上皮神经各项指标无显著改善($P > 0.05$)。

2.2 激素(氯替泼诺0.5% 眼用混悬液)组与非激素(0.1% 普拉洛芬滴眼液)组对角膜上皮神经纤维的影响

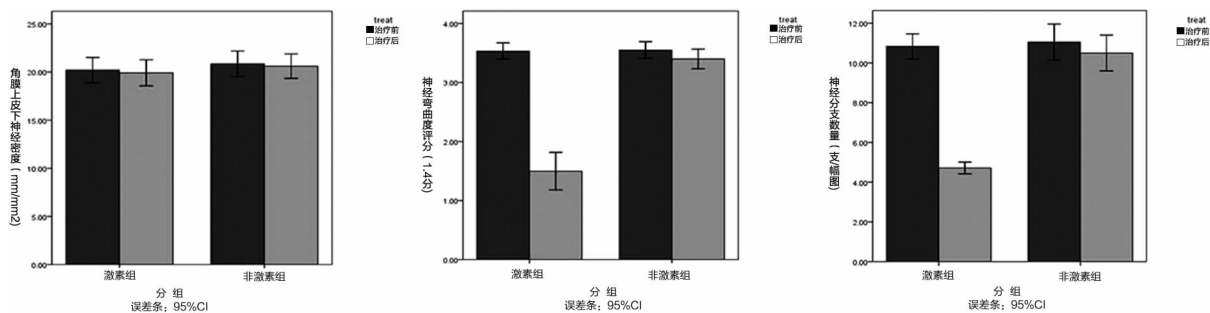
进行比较,角膜上皮神经纤维密度无显著差异,但是神经分支数量、弯曲度评分及眼表评分比较,激素组显著改善,有统计学差异(见表4及图3)。

激素组与非激素组两组患者治疗后对上述指标

表4 激素组与非激素组治疗后各项指标比较($\bar{x} \pm s$)

观察指标	人工泪液联合 氯替泼诺治疗组 ($n=30$)	人工泪液联合 非甾体抗炎药物 治疗组($n=30$)	t/z	P
治疗后角膜上皮神经纤维密度(mm/mm^2)	19.9 ± 3.6	20.6 ± 3.4	-0.754(t)	0.45
治疗后角膜上皮神经纤维分支数量(支/幅图)	4.7 ± 0.8	10.5 ± 2.4	-12.48(t)	0.000
神经纤维弯曲度评分(1~4分)	1.5 ± 0.9	3.4 ± 0.4	-6.304(z)	0.000

注:激素组与非激素组比较上皮神经分支数量及弯曲度具有显著差异($P < 0.05$)。



注: * 两组治疗前后上皮神经密度无明显改善,但激素组上皮神经分支数量及弯曲度具有显著改善($P < 0.05$)。

图3 激素组与非激素组神经纤维各项指标差异性比较

3 讨论

3.1 干眼角膜上皮神经变异的可能机制

以上我们通过对临床轻度干眼患者(无角膜、结膜体征,仅有干眼症状,泪液实验及 BUT 检查轻度异常)进行了较为长期的临床观察发现,部分患者给予常规的人工泪液或联合非甾体类抗炎药物滴眼,但是临床症状并无减轻,仍会自觉眼疼、干涩、异物感等症状,对该类患者进一步行共焦显微镜检查发现其角膜上皮神经密度与正常对照组比较无显著的统计学差异,但是分支数量增加,弯曲度增大^[7-9]。以往研究证实,角膜神经承担着角膜对触觉、痛觉及温度觉的感知,不仅如此,在眨眼反射、创伤愈合^[10]及泪液的产生和分泌^[11,12]中也起着重要的作用。对此,可能的原因在于干眼发生的过程中,因为泪液渗透压升高从而诱发眼表的炎症反应,破坏眼表上皮细胞的正常屏障功能,使角膜神经受到机械性和炎症性损伤,多种炎症细胞因子作用于神经,导致其出现干眼早期角膜神经分支增多,形态扭曲变形,失去原有的平行及光滑螺旋状走形。正如 Zhang 等^[13]报道,通过对 SS 患者神经形态的观察,认为分支增多可以是一种神经再生,正是由于眼干所致的负反馈机制引起的,由细胞因子介导的神经出芽状再生,这种现象在干燥综合征的患者尤为突出,但是非 SS 的干眼患者早期亦可出现同样的改变。而此类患者泪液试验及泪膜破裂时间等干眼指标可能轻度异常或大致正常。因此,在这类轻度干眼患者,角膜上皮神经的改变可能早于泪液实验及泪膜破裂时间的改变。据此,共焦显微镜对于临床上干眼的早期诊断和用药具有指导意义。

3.2 AutoCAD 在角膜上皮神经定量分析中的应用

激光共焦显微镜的临床广泛应用为我们提供了新的研究角膜神经的方法,在活体可以随时、重复观

察角膜神经的改变^[14]。虽然目前具有众多的软件可以对共焦显微镜下的角膜图片进行分析^[15],但是我们首次应用了 AutoCAD 这一设计制图软件对于共焦图像中角膜神经长度进行测量,更加精确。AutoCAD 是通用计算机辅助绘图和设计软件,其主要功能:设置系统参数、绘制二维图形对象如点、直线、圆弧、椭圆、多义线等二维图形对象、编辑二维图形对象、编辑图形元素属性、创建和设置图层、管理图层、尺寸标注、绘制三维基本实体、通过二维图形创建三维实体、对封闭图形进行面积和长度的测量、图形的输入、输出与打印。此处我们应用图像编辑功能,对其神经走形进行描绘并根据软件提供的图形元素属性功能查询其神经纤维长度,从而得到神经密度值。同时应用设置图层功能对我们主要研究的神经走形进行设置提取,使神经纤维形态一目了然。为临床进一步定性定量研究角膜神经提供了重要方法。

3.3 糖皮质激素在干眼治疗中对上皮神经的作用机制

在本研究中,对于常规治疗无效的部分干眼患者将非甾体类抗炎药换为 0.5% 氯替泼诺滴眼液抗炎治疗 1 月后患者症状明显改善,治疗前后对比,角膜上皮神经的密度并无明显改变,但是上皮神经纤维分支数量治疗后较激素治疗前神经分支数量明显降低;同时,神经的弯曲度也较治疗前明显改善。临床观察,患者的眼部症状得到明显缓解。这些似乎呈现给我们的是眼表的症状与其神经的分支数量和弯曲度有关。Ilo S Tuisku 等^[16]的研究证实,对早期 Sjögren's 综合征患者的角膜上皮神经的研究发现,其上皮神经密度与正常对照组无显著差异,但是神经形态明显改变,较神经密度与其眼表症状之间的相关性更加紧密。其上皮神经串珠样结构明显增加,这种改变是神经出芽增生的早期

状态。炎症则是其中最主要的原因。在炎症作用下,变异的角膜基质细胞产生如 NGF(nervegrowth-factor)等神经营养素,诱导神经的轴突增生和出芽。对于这类干眼患者,给予局部的抗炎治疗如糖皮质激素治疗后,泪液中 NGF 浓度明显降低,患者症状随之改善。这与我们对非 SS 轻度干眼患者的研究相一致。

3.4 干眼角膜上皮神经与症状相关的可能机制

我们的研究结果提示:患者的眼表症状可能与角膜上皮神经密度无关,但是与其上皮神经的分支数量、弯曲度具有高度的相关性。推断出现上述情况的原因在于,本研究中的患者均为 1 级干眼患者,神经在各种炎症因子的作用下虽有增生及分支增多,但是其总的神经长度和单位面积下的神经密度并无显著差异,随着干眼程度的加重,神经密度就会有明显的改变,这一点在我们的前期研究中已经证实。神经分支数量的增加、弯曲度的增大无疑使得其接触眼表各种环境的面积增加,神经冲动传导增多,患者的症状加重;当经过糖皮质激素滴眼液治疗后,眼表环境明显改善,神经分支减少、弯曲度变小,形态改变趋于正常,感知眼表的神经冲动减少,患者症状减轻。这一机制将在后续的研究中进一步探索证实。

综上所述,糖皮质激素类药物对于常规治疗无效的轻度干眼患者临床证实有效,通过共焦显微镜观察角膜上皮神经可以作为干眼患者激素抗炎治疗疗效评估的有效方法。共焦显微镜下的角膜上皮神经的改变与轻度干眼患者临床症状可能有关。当然,其具体机制有待于我们进一步探索研究。

参考文献:

[1] Nelson JD, Carig JP, Akpek EK, et al. Tfos Dews II introduction[J]. Ocul Surf, 2017, 15(3): 269 - 275.

[2] Gao J, Schwalb TA, Addeo JV, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporin A therapy[J]. Cornea, 1998, 17(6): 654 - 663.

[3] Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes[J]. Arch Ophthalmol, 2000, 118(11): 1489 - 1496.

[4] Stern ME, Gao J, Schwalb TA, et al. Conjunctival T - cell

subpopulations in Sjogren's and non - Sjogren's patients with dry eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(8): 2609 - 2614.

[5] McCabe E, Narayanan S. Advancements in anti - inflammatory therapy for dry eye syndrome[J]. Optometry, 2009, 80(10): 555 - 566.

[6] Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye[J]. AM J Ophthalmol, 2004, 137(2): 337 - 342.

[7] Tuominen IS, Kontinen YT, Vesaluoma MH, et al. Corneal innervation and morphology in primary Sjogren's syndrome[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(6): 2545 - 2549.

[8] Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, et al. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(2): 418 - 422.

[9] Labbé A, Liang Q, Wang Z, et al. Corneal Nerve Structure and Function in Patients With Non - Sjögren Dry Eye: Clinical Correlations[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2013, 54(8): 5144 - 5150.

[10] Beuerman RW, Schimmelpfenning B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties[J]. Exp Neurol, 1980, 69(1): 196 - 201.

[11] Heigle TJ, Pflugfelder SC. Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis[J]. Cornea, 1996, 15(2): 135 - 138.

[12] Nishida T, Chikama T, Sawa M, et al. Differential contributions of impaired corneal sensitivity and reduced tear secretion to corneal epithelial disorders[J]. Jpn J Ophthalmol, 2012, 56(1): 20 - 25.

[13] Zhang M, Chen J, Luo L, et al. Altered corneal nerves in aqueous tear deficiency viewed by in vivo confocal microscopy[J]. Cornea, 2005, 24(7): 818 - 824.

[14] Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review[J]. Clin Exper Ophthalmol, 2007, 35(1): 71 - 88.

[15] DV Patel, CN McGhee. Quantitative analysis of in vivo confocal microscopy images: A review[J]. Survey of Ophthalmology, 2013, 58(5): 466 - 475.

[16] Ilpo S Tuisku, Yrjö T Kontinen, Liisa M Kontinen, et al. Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Experimental Eye Research, 2008, 86(6): 879 - 885.

[收稿日期 2017 - 11 - 10; 责任编辑 赵菊梅]