

• 临床研究 •

不同分期圆锥角膜内皮细胞密度和形态变化

罗燕¹ 赵灿² 仲晓维² 石佳宁² 史伟云² 王婷²

¹滨州医学院,烟台 264003; ²山东第一医科大学附属眼科研究所 山东第一医科大学附属眼科医院(山东省眼科医院) 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 山东第一医科大学眼科学院,济南 250021

通信作者:王婷,Email:wt-ting@163.com

【摘要】目的评估不同分期圆锥角膜患者角膜内皮细胞密度(CD)及形态变化。**方法**采用横断面研究方法,纳入2018年3月至2021年10月就诊于山东第一医科大学附属眼科医院的圆锥角膜患者119例199眼,按照圆锥角膜Amsler-Krumeich分期标准将患者分为I期圆锥角膜组58例111眼、II期圆锥角膜组30例41眼和III期圆锥角膜组31例47眼。同期纳入年龄和性别匹配的健康受试者25人50眼作为正常对照组。采用Pentacam三维眼前节分析仪获取角膜地形图及角膜曲率(K)、中央角膜厚度(CCT)、最薄处角膜厚度(TCT)、前房深度(ACD)、角膜直径、角膜体积等眼前节参数。通过“中心法”使用非接触式角膜内皮显微镜检查并获取中央区角膜内皮CD、六角形细胞的百分数(6A)、平均细胞面积(AVE)、最大细胞面积(MAX)、最小细胞面积(MIN)、细胞面积标准差(SD)和细胞面积变异系数(CV)。采用Spearman秩相关分析角膜内皮CD和形态参数与角膜地形图相关参数的相关性。**结果**正常对照组以及I期、II期和III期圆锥角膜组CD分别为2 941(2 809,3 072)、2 825(2 667,3 030)、2 747(2 475,2 903)和2 370(2 142,2 525)个/mm²,随着圆锥角膜患者病情进展,CD逐渐降低,各组CD总体比较差异有统计学意义($H=94.862, P<0.001$)。各组CV和6A总体比较差异均有统计学意义($H=45.018,20.421$,均 $P<0.001$);III期圆锥角膜组CV明显高于正常对照组和I、II期圆锥角膜组,6A明显低于正常对照组和I期圆锥角膜组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。随着圆锥角膜病情进展,MAX、MIN、AVE和SD逐渐增大,各组MAX、MIN、AVE和SD总体比较差异均有统计学意义($H=37.905,32.437,110.182,72.941$,均 $P<0.001$);III期圆锥角膜组MAX和MIN显著高于I期圆锥角膜组和正常对照组,AVE和SD明显高于正常对照组和I、II期圆锥角膜组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。所有圆锥角膜患者CD与CCT、TCT呈中等程度正相关($r_s=0.47, P<0.001$; $r_s=0.53, P<0.001$),与平均角膜曲率(Km)呈中等程度负相关($r_s=-0.59, P<0.001$);6A与CCT、TCT呈弱正相关($r_s=0.18, P=0.01$; $r_s=0.22, P=0.002$),与Km呈弱负相关($r_s=-0.32, P<0.001$);CV与CCT、TCT呈弱负相关($r_s=-0.35, P<0.001$; $r_s=-0.37, P<0.001$),与Km呈中等程度正相关($r_s=0.48, P<0.001$);CD、CV、6A与ACD、角膜体积无明显相关性。**结论**随着圆锥角膜病情进展,角膜前突变薄,角膜内皮CD和6A降低,细胞变异性增加;角膜地形图相关参数与角膜内皮细胞的密度及形态变化存在相关性。

【关键词】圆锥角膜;角膜内皮;非接触式角膜内皮显微镜;角膜地形图

基金项目:国家自然科学基金项目(82271052);国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(U20A20386);泰山青年学者项目(tsqn201909188)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221028-00501

Change in corneal endothelial cell density and morphology in different stages of keratoconus

Luo Yan¹, Zhao Can², Zhong Xiaowei², Shi Jianing², Shi Weiyun², Wang Ting²

¹Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; ²Eye Institute of Shandong First Medical University, Eye Hospital of Shandong First Medical University (Shandong Eye Hospital), State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, School of Ophthalmology, Shandong First Medical University, Jinan 250021, China

Corresponding author: Wang Ting, Email: wt-ting@163.com

[Abstract] **Objective** To assess the changes in corneal endothelial cell density (CD) and morphology in patients with different stages of keratoconus. **Methods** A cross-sectional study was conducted. One hundred and nineteen patients (199 eyes) with keratoconus who were treated in the Eye Hospital of Shandong First Medical

University were included from March 2018 to October 2021. The 199 eyes were classified into stage I (111 eyes of 58 cases), stage II (41 eyes of 30 cases), stage III (47 eyes of 31 cases) keratoconus groups according to the Amsler-Krumeich classification. In the same period, 25 age- and sex-matched healthy subjects (50 eyes) were enrolled as a normal control group. Corneal topography and anterior segment parameters such as keratometry (K), central corneal thickness (CCT), thinnest corneal thickness (TCT), anterior chamber depth (ACD), corneal diameter and corneal volume were obtained by Pentacam 3-dimensional anterior segment imaging and analysis system. The corneal endothelial CD, percentage of hexagonal cells (6A), average cell area (AVE), maximum cell area (MAX), minimum cell area (MIN), cell area standard deviation (SD) and cell area coefficient of variation (CV) in the central area were evaluated by non-contact specular microscopy. The correlation between corneal endothelial CD, morphological parameters and corneal topographic parameters was analyzed by Spearman rank correlation. This study adhered to the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Shandong Eye Hospital (No. SDSYKYY201803). All patients were informed of the purpose and methods of the study and written informed consent was obtained before any medical examination.

Results The CD of the normal control group and stage I, II, III keratoconus groups was 2 941 (2 809, 3 072), 2 825 (2 667, 3 030), 2 747 (2 475, 2 903) and 2 370 (2 142, 2 525) cells/mm², respectively. With the progression of keratoconus, CD decreased gradually, and there was a significant difference in CD among the four groups ($H = 94.862, P < 0.001$). There were significant differences in CV and 6A among the four groups ($H = 45.018, 20.421$; both at $P < 0.001$). CV was significantly higher in stage III keratoconus group than that of the normal control group and stage I and II keratoconus groups and 6A was significantly lower in stage III keratoconus group than that of the normal control group and stage I keratoconus group (all at $P < 0.05$). With the progression of keratoconus, MAX, MIN, AVE and SD increased gradually, and there were significant differences in MAX, MIN, AVE and SD among the four groups ($H = 37.905, 32.437, 110.182, 72.941$; all at $P < 0.001$). MAX and MIN in stage III keratoconus group were significantly higher than those in stage I keratoconus groups and normal control group (all at $P < 0.05$). AVE and SD in stage III keratoconus group were significantly higher than those in normal control group and stage I and II keratoconus groups (all at $P < 0.05$). In patients with keratoconus, CD was moderately positively correlated with CCT ($r_s = 0.47, P < 0.001$) and TCT ($r_s = 0.53, P < 0.001$), and was moderately negatively correlated with mean keratometry (Km) ($r_s = -0.59, P < 0.001$). 6A was weakly positively correlated with CCT ($r_s = 0.18, P = 0.01$) and TCT ($r_s = 0.22, P = 0.002$), and was weakly negatively correlated with Km ($r_s = -0.32, P < 0.001$). CV was weakly negatively correlated with CCT ($r_s = -0.35, P < 0.001$) and TCT ($r_s = -0.37, P < 0.001$), and was moderately positively correlated with Km ($r_s = 0.48, P < 0.001$). There was no correlation between CD, CV, 6A and ACD, or corneal volume.

Conclusions As the keratoconus progresses, the cornea protrudes and becomes thinner with CD and 6A decreasing while CV increasing. Corneal topographic parameters are related to the density and morphology of corneal endothelial cells.

[Key words] Keratoconus; Endothelium, corneal; Microscopy, specular; Corneal topography

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82271052); National Natural Science Foundation Regional Innovation and Development Joint Fund (U20A20386); Young Taishan Scholar Program (tsqn201909188)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221028-00501

角膜内皮细胞是位于角膜最内层的单层六边形细胞,能够维持角膜正常透明度及厚度。角膜内皮细胞无再生能力且每年自然丢失率约为0.5%^[1]。各种疾病及理化因素可引起角膜内皮细胞损伤,导致细胞形态及功能发生改变,严重时甚至发生角膜内皮失代偿^[2]。圆锥角膜是一种非炎性、进行性、扩张性角膜疾病,发病率约为1/2 000,其特征是角膜局部进行性变薄和突出,导致不规则散光和视力下降^[3-5]。随着圆锥角膜病情进展,角膜扩张前突、厚度变薄,导致角膜内皮细胞发生相应改变^[6-7],而

角膜内皮细胞的密度、形态结构及功能一定程度上影响了患者治疗方式的选择^[8-9]。以往研究主要关注圆锥角膜患者术后内皮细胞密度(cell density, CD)的变化,且对圆锥角膜患者角膜内皮CD及形态变化的结论并不一致^[6,10-14];而针对不同分期圆锥角膜患者角膜内皮CD和形态变化与病情发展相关性的研究较少。本研究拟评估圆锥角膜严重程度对角膜内皮CD及形态变化的影响,并与不同角膜地形图特征参数进行相关性分析,以期指导圆锥角膜的临床诊疗。



1 资料与方法

1.1 一般资料

采用横断面研究方法,纳入 2018 年 3 月至 2021 年 10 月就诊于山东第一医科大学附属眼科医院的单眼或双眼圆锥角膜患者 119 例 199 眼,其中男 81 例 136 眼,女 38 例 63 眼,年龄 10~52 岁,中位数为 21(17,26)岁。同期纳入年龄和性别匹配的健康受试者 25 人 50 眼作为正常对照组,其中男 19 人 38 眼,女 6 人 12 眼;年龄 17~28 岁,中位数为 18(18,22)岁。圆锥角膜的诊断标准^[4]:(1)有近视、散光病史;(2)视力下降,最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA)低于 1.0;(3)裂隙灯显微镜检查中以下体征至少 1 项阳性:角膜基质变薄、锥形前突、Fleischer 环、Vogt 线、角膜上皮或上皮下瘢痕;(4)角膜地形图检查角膜前表面中央屈光力>47.00 D;(5)角膜中央下方 3 mm 处与上方 3 mm 处屈光度差值>3.00 D;(6)双眼角膜中央前表面屈光度差值>1.00 D。圆锥角膜组排除标准:(1)佩戴角膜接触镜者;(2)有眼外伤史者;(3)有眼科手术史者;(4)有急性圆锥角膜病史者;(5)有眼部变态反应、水肿史者;(6)角膜营养不良者;(7)有其他任何可能影响角膜内皮的眼部或全身疾病者;(8)IV 期圆锥角膜患者。正常对照组纳入标准为除屈光不正外无任何眼部疾病,无眼部手术及外伤史,角膜透明,且 BCVA≥1.0。

根据 Amsler-Krumeich 分期标准将圆锥角膜分为 I~IV 期^[15]:I 期为偏心性变陡、近视和/或散光<5.00 D,中央平均角膜曲率(mean keratometry, Km)值<48.00 D,可见 Vogt 条纹,角膜仍透明;II 期为近视和(或)散光 5.00~8.00 D,中央 Km 值 48.00~53.00 D,无角膜瘢痕,最薄处角膜厚度(thinnest corneal

thickness, TCT)≥400 μm;III 期为近视和/或散光 8.00~12.00 D,中央 Km 值>53.00 D,无角膜瘢痕,TCT 200~400 μm;IV 期为屈光度不可测量,中央 Km 值>55.00 D,中央角膜瘢痕,TCT<200 μm。其中 I 期 111 眼,占 55.8%,II 期 41 眼,占 20.6%,III 期 47 眼,占 23.6%。I 期、II 期、III 期圆锥角膜组与正常对照组间年龄和性别构成比总体比较差异均无统计学意义($H=7.255, P=0.064$; $\chi^2=1.131, P=0.770$)。裸眼视力(uncorrected visual acuity, UCVA)、BCVA 和眼压总体比较差异均有统计学意义($H=78.973, 150.701, 35.857$, 均 $P<0.001$);不同分期圆锥角膜组间眼压比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),UCVA 和 BCVA 比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 1)。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,经山东省眼科医院伦理委员会批准(批文号:SDSYKYY201803),所有患者均知晓本研究目的及方法并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 眼部一般检查 采用标准对数视力表检查患者的 UCVA 和 BCVA;采用裂隙灯显微镜(BX900,瑞士海格公司)行眼前节检查并拍摄患者眼前节图像;采用手持回弹式眼压计(SW-500,天津市索维电子技术有限公司)测量眼压;采用免扩瞳眼底照相机(AFC-210,日本 NIDEK 公司)行眼底照相检查。

1.2.2 角膜地形图检查 使用 Pentacam 三维眼前节分析仪(德国 Oculus 公司)获取角膜地形图相关参数。嘱受检者下颌置于下颌托,前额紧贴额托,稳定坐姿,瞬目后固视仪器中的光源;选择 25 张扫描采集模式,手动对焦后,仪器在 2 s 内自动完成 360°旋转扫描,获得 50 张裂隙灯图像,完成眼前节三维重建和计算分析。由计算机系统自动分析并获得 K 值、中央角膜厚度(central corneal thickness, CCT)、TCT、前房深度

表 1 各组基线特征比较
Table 1 Comparison of demographics among various groups

组别	例数/眼数	性别 [#] (男/女,n)	年龄 [*] [M(Q ₁ ,Q ₃),岁]	UCVA [*] [M(Q ₁ ,Q ₃),LogMAR]	BCVA [*] [M(Q ₁ ,Q ₃),LogMAR]	眼压 [*] [M(Q ₁ ,Q ₃),mmHg]
正常对照组	25/50	19/6	18(18,22)	0.40(0.40,0.52)	0.00(0.00,0.00)	16(14,17)
I 期圆锥角膜组	58/111	40/18	20(17,23)	0.60(0.52,0.92) ^a	0.05(0.00,0.22) ^a	15(13,17) ^a
II 期圆锥角膜组	30/41	19/11	22(20,26)	0.92(0.52,1.16) ^{ab}	0.30(0.22,0.46) ^{ab}	15(13,16) ^a
III 期圆锥角膜组	31/47	23/9	22(16,28)	1.10(0.92,1.70) ^{abc}	0.52(0.40,0.82) ^{abc}	14(13,15) ^a
H/ χ^2 值		1.131	7.255	78.973	150.701	35.857
P 值		0.770	0.064	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与 I 期圆锥角膜组比较,^b $P<0.05$;与 II 期圆锥角膜组比较,^c $P<0.05$ (#: χ^2 检验; * : Kruskal-Wallis H 检验, Wilcoxon 符号秩检验) UCVA:裸眼视力;BCVA:最佳矫正视力 1 mmHg=0.133 kPa

Note: Compared with respective normal control group, ^a $P<0.05$; compared with respective stage I keratoconus group, ^b $P<0.05$; compared with respective stage II keratoconus group, ^c $P<0.05$ (#, χ^2 test; * : Kruskal-Wallis H test, Wilcoxon signed-rank test) UCVA: uncorrected visual acuity; BCVA: best corrected visual acuity 1 mmHg=0.133 kPa



(anterior chamber depth, ACD)、角膜直径和角膜体积；检测质量应答为“OK”，重复测量3次，取平均值。所有操作均由经验丰富的技术人员完成，检查统一在暗室环境中进行。

1.2.3 角膜内皮细胞参数检查 采用非接触式角膜内皮显微镜（NSP9900II，日本Konan公司）获得角膜内皮相关参数。受检者取坐位，嘱其下颌置于下颌托，前额贴紧额托，并注视仪器内固定视标；选择中央区域角膜内皮细胞进行拍摄，点击“开始照相”按钮。使用“中心法”连续选取75个以上内皮细胞^[11,16-17]，点击“ANALYSIS”按钮进行分析，自动获得CD、细胞面积标准差（cell area standard deviation, SD）、平均细胞面积（average cell area, AVE）、细胞面积变异系数（coefficient of variation, CV）、六角形细胞的百分数（percentage of hexagonal cells, 6A）、最大细胞面积（maximum cell area, MAX）、最小细胞面积（minimum cell area, MIN），其中 $CV = SD / AVE \times 100$ 。所有操作均由经验丰富的技术人员完成。

1.3 统计学方法

采用SPSS 25.0统计学软件进行统计分析。计量资料经Shapiro-Wilk检验证实不符合正态分布，以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。各组组间计量资料差异比较采用Kruskal-Wallis H检验，两两比较采用Wilcoxon符号秩检验。计数资料以频数和百分比进行描述，组间差异比较采用 χ^2 检验。各变量之间的相关性采用Spearman秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组角膜内皮细胞相关参数比较

正常对照组和I期、II期、III期圆锥角膜组CD、

CV、6A、MAX、MIN、AVE和SD总体比较，差异均有统计学意义（ $H = 94.862, 45.018, 20.421, 37.905, 32.437, 110.182, 72.941$ ，均 $P < 0.001$ ）；其中III期圆锥角膜组CD明显低于其他3个组，6A明显低于正常对照组和I期圆锥角膜组，CV、AVE和SD明显高于其他3个组，MAX和MIN均明显高于正常对照组和I期圆锥角膜组，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）；II期圆锥角膜组CV和SD明显高于I期圆锥角膜组，MAX和MIN均明显高于正常对照组，CD明显低于正常对照组和I期圆锥角膜组，AVE明显高于正常对照组和I期圆锥角膜组，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）（表2）。

2.2 各组角膜地形图相关参数比较

各组CCT、ACD、角膜体积总体比较差异均有统计学意义（ $H = 146.454, 103.136, 22.797$ ，均 $P < 0.001$ ），各组角膜直径总体比较差异无统计学意义（ $H = 7.292, P = 0.063$ ）。I期、II期、III期圆锥角膜组CCT和角膜体积明显低于正常对照组，ACD明显高于正常对照组，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）；II期及III期圆锥角膜组CCT明显低于I期圆锥角膜组，ACD明显高于I期圆锥角膜组，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）；不同分期圆锥角膜组间角膜体积比较差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）（表3）。

2.3 圆锥角膜内皮CD及形态参数与角膜地形图参数相关性分析

相关性分析显示，所有圆锥角膜患者CD与CCT、TCT均呈中等程度正相关（ $r_s = 0.47, P < 0.001$ ； $r_s = 0.53, P < 0.001$ ），与Km呈中等程度负相关（ $r_s = -0.59, P < 0.001$ ）；6A与CCT、TCT均呈弱正相关（ $r_s = 0.18, P = 0.01$ ； $r_s = 0.22, P = 0.002$ ），与Km呈

表2 各组角膜内皮细胞参数比较 $[M(Q_1, Q_3)]$

Table 2 Comparison of corneal endothelial parameters among different groups [$M(Q_1, Q_3)$]

组别	眼数	CD(个/mm ²)	CV(%)	6A(%)	MAX(μm ²)	MIN(μm ²)	AVE(μm ²)	SD
正常对照组	50	2 941(2 809, 3 072)	39(36, 44)	53(49, 58)	833(733, 932)	98(80, 120)	340(326, 356)	137(122, 160)
I期圆锥角膜组	111	2 825(2 667, 3 030)	37(33, 41)	54(46, 61)	842(704, 971)	121(103, 134) ^a	346(327, 3 705)	132(116, 148)
II期圆锥角膜组	41	2 747(2 475, 2 903) ^{ab}	40(36, 44) ^b	50(48, 55)	901(774, 1015) ^a	108(88, 156) ^a	392(354, 409) ^{ab}	147(130, 172) ^b
III期圆锥角膜组	47	2 370(2 142, 2 525) ^{abc}	44(40, 48) ^{abc}	45(42, 55) ^{ab}	1 032(902, 1143) ^{ab}	130(110, 147) ^{ab}	422(395, 471) ^{abc}	190(164, 213) ^{abc}
H值		94.862	45.018	20.421	37.905	32.437	110.182	72.941
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与正常对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与I期圆锥角膜组比较，^b $P < 0.05$ ；与II期圆锥角膜组比较，^c $P < 0.05$ （Kruskal-Wallis H检验，Wilcoxon符号秩检验） CD：细胞密度；CV：细胞面积变异系数；6A：六角形细胞的百分数；MAX：最大细胞面积；MIN：最小细胞面积；AVE：平均细胞面积；SD：细胞面积标准差

Note: Compared with respective normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with respective stage I keratoconus group, ^b $P < 0.05$; compared with respective stage II keratoconus group, ^c $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis H test, Wilcoxon signed-rank test) CD: cell density; CV: coefficient of variation; 6A: percentage of hexagonal cells; MAX: maximum cell area; MIN: minimum cell area; AVE: average cell area; SD: cell area standard deviation



表 3 各组角膜地形图相关参数比较 [$M(Q_1, Q_3)$]
Table 3 Comparison of corneal topography parameters among different groups [$M(Q_1, Q_3)$]

组别	眼数	CCT(μm)	ACD(mm)	角膜直径(mm)	角膜体积(mm^3)
正常对照组	50	550(537,574)	3.22(3.13,3.30)	11.70(11.50,11.90)	61.70(59.70,64.20)
I 期圆锥角膜组	111	496(474,518) ^a	3.77(3.46,3.91) ^a	11.90(11.60,12.20)	59.00(57.30,61.50) ^a
II 期圆锥角膜组	41	469(440,484) ^{ab}	3.88(3.68,4.09) ^{ab}	11.90(11.55,12.15)	58.70(56.25,60.55) ^a
III 期圆锥角膜组	47	417(395,458) ^{abc}	3.94(3.61,4.17) ^{ab}	11.80(11.50,12.10)	58.60(55.10,61.50) ^a
H 值		146.454	103.136	7.292	22.797
P 值		<0.001	<0.001	0.063	<0.001

注:与正常对照组相比,^a $P<0.05$;与 I 期圆锥角膜组比较,^b $P<0.05$;与 II 期圆锥角膜组比较,^c $P<0.05$ (Kruskal-Wallis H 检验,Wilcoxon 符号秩检验)
CCT:中央角膜厚度;ACD:前房深度

Note: Compared with respective normal control group, ^a $P<0.05$; compared with respective stage I keratoconus group, ^b $P<0.05$; compared with respective stage II keratoconus group, ^c $P<0.05$ (Kruskal-Wallis H test, Wilcoxon signed-rank test) CCT: central corneal thickness; ACD: anterior chamber depth

弱负相关($r_s = -0.32, P < 0.001$);CV 与 CCT、TCT 均呈弱负相关($r_s = -0.35, P < 0.001; r_s = -0.37, P < 0.001$),与 Km 呈中等程度正相关($r_s = 0.48, P < 0.001$)(图 1)。所有圆锥角膜患者 CD、CV、6A 与 ACD、角膜体积均无明显相关性。

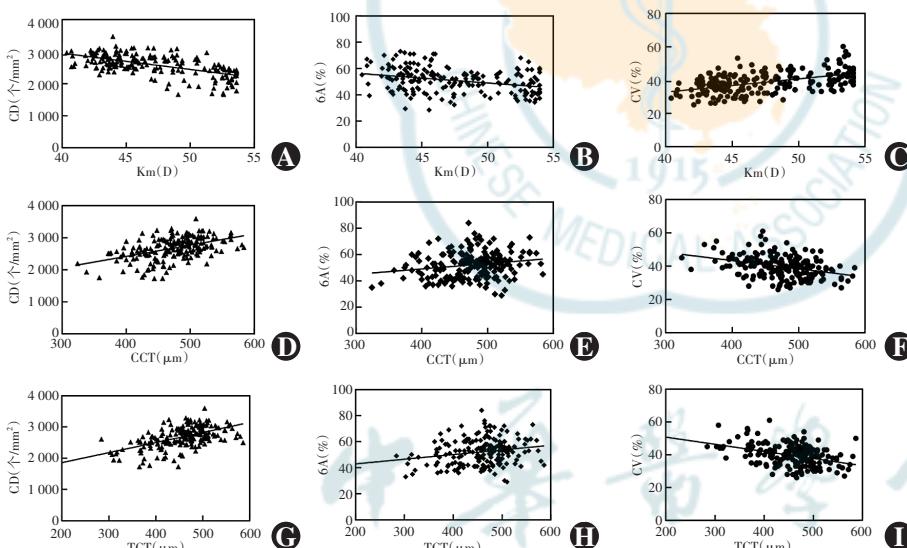


图 1 圆锥角膜内皮 CD 及形态参数与角膜地形图参数的相关性分析(Spearman 秩相关分析, $n=199$) A: Km 与 CD 呈负相关 $r_s = -0.59, P < 0.001$ B: Km 与 6A 呈负相关 $r_s = -0.32, P < 0.001$ C: Km 与 CV 呈正相关 $r_s = 0.48, P < 0.001$ D: CCT 与 CD 呈正相关 $r_s = 0.47, P < 0.001$ E: CCT 与 6A 呈正相关 $r_s = 0.18, P = 0.01$ F: CCT 与 CV 呈负相关 $r_s = -0.35, P < 0.001$ G: TCT 与 CD 呈正相关 $r_s = 0.53, P < 0.001$ H: TCT 与 6A 呈正相关 $r_s = 0.22, P = 0.002$ I: TCT 与 CV 呈负相关 $r_s = -0.37, P < 0.001$ CD: 细胞密度; Km: 平均角膜曲率; CV: 细胞面积变异系数; 6A: 六角形细胞的百分数; CCT: 中央角膜厚度; TCT: 最薄处角膜厚度

Figure 1 Correlation between endothelial CD, morphological parameters and corneal topography parameters in keratoconus (Spearman rank correlation analysis, $n=199$) A: Km was negatively correlated with CD $r_s = -0.59, P < 0.001$ B: Km was negatively correlated with 6A $r_s = -0.32, P < 0.001$ C: Km was positively correlated with CV $r_s = 0.48, P < 0.001$ D: CCT was positively correlated with CD $r_s = 0.47, P < 0.001$ E: CCT was positively correlated with 6A $r_s = 0.18, P = 0.01$ F: CCT was negatively correlated with CV $r_s = -0.35, P < 0.001$ G: TCT was positively correlated with CD $r_s = 0.53, P < 0.001$ H: TCT was positively correlated with 6A $r_s = 0.22, P = 0.002$ I: TCT was negatively correlated with CV $r_s = -0.37, P < 0.001$ CD: cell density; Km: mean keratometry; CV: coefficient of variation; 6A: percentage of hexagonal cells; CCT: central corneal thickness; TCT: thinnest corneal thickness

3 讨论

圆锥角膜患者随着角膜的前突扩张,角膜内皮细胞的密度和形态可能会发生变化;而维持角膜的透明性及正常厚度不仅需要一定密度的角膜内皮细胞,还

需要细胞保持正常的形态及功能^[18]。圆锥角膜患者的治疗及手术方式根据病变分期不同会有不同选择,其中 40.1%~61.4% 的患者接受了板层角膜移植术(lamellar keratoplasty,LKP)^[19~20],而角膜内皮细胞的密度及形态是维持 LKP 术后角膜植片透明的关键^[8~9,21]。本研究对不同分期的圆锥角膜患者角膜内皮 CD 及形态参数的变化规律进行探讨,并对角膜内皮细胞形态变化与角膜地形图参数进行相关性分析,对于指导圆锥角膜临床诊疗及预测手术效果具有重要的临床意义。

Goebels 等^[6]研究表明,随着圆锥角膜病情的进展,CD 降低; Elmassry 等^[7]研究指出,随着圆锥角膜 K 值的增加,CD 逐渐降低。Uçakhan 等^[22]研究表明,重度圆锥角膜($K > 55.0 \text{ D}$)患者 CD 显著低于轻度($K < 48.0 \text{ D}$)和中度圆锥角膜(K 为 $48.0 \sim 55.0 \text{ D}$)患者。本研究也发现,随着圆锥角膜 Km 的增加,CD 显著降低,由 I 期的 2825 个/mm^2 降至 III 期的



2 370 个/mm²。同时本研究进一步将患者 CD 变化与 CCT、TCT、Km 进行相关性分析,发现 CD 与 CCT、TCT 均呈正相关,与 Km 呈负相关,圆锥角膜患者角膜曲率越大,角膜厚度越薄,CD 越小。以往研究表明,圆锥角膜患者 CD 与角膜硬度和角膜对变形的抵抗力有关^[23]。在圆锥角膜进展过程中,角膜基质层因胶原纤维溶解,基质逐渐变薄,角膜生物力学逐渐减弱,在眼压的作用下角膜弱化区凸起、扩张,导致角膜内表面面积逐渐扩大^[24-25]。上述因素可能是导致 CD 降低的原因。然而有研究显示,轻度、中度和重度圆锥角膜患者的 CD 无明显差异^[10-14],这可能与该研究纳入的病例数较少有关;此外,病情分级标准、测量设备及图像采集方法的不同也是造成研究结论差异的原因。

本研究发现,随着圆锥角膜患者病情加重,CV 显著增大,从 I 期的 37.0% 增加到 III 期的 44.0%,增幅为 18.9%。究其原因,可能随着圆锥角膜患者病情逐渐发展,角膜扩张变薄,并受眼压的影响使角膜内皮细胞面积大小不一,CV 增加。Goebels 等^[6]研究纳入 712 例圆锥角膜患者,发现随着圆锥角膜病情的进展,CV 由圆锥角膜地形图分级 I 期的 (40.0±9.7)% 增加到 IV 期的 (49.0±17.0)%,增长了 22.5%,与本研究结果一致。Matsuda 等^[26]研究指出,圆锥角膜组 CV 大于同年龄段正常对照组。既往研究表明,不同分期的圆锥角膜之间 CV 无显著差异^[11,13]。Elmassry 等^[7]使用激光扫描共聚焦显微镜观察了 150 眼圆锥角膜患眼锥顶的角膜内皮细胞形态,发现 I 期与 II 期圆锥角膜患者的 CV 存在明显差别,但 I 期与 III 期、II 期与 III 期圆锥角膜患眼 CV 差异均无统计学意义。以上研究结果的差异可能与研究部位及测量设备不同有关。同时,本研究结果显示圆锥角膜患者 CV 与 CCT、TCT 均呈负相关,与 Km 呈正相关,圆锥角膜患者曲率越大,角膜厚度越薄,细胞变异性越大。

正常人角膜内皮细胞呈六边形,这对于维持角膜内皮功能至关重要^[27]。Elmassry 等^[7]研究指出,随着圆锥角膜患者病情的进展,6A 显著降低;Uçakhan 等^[22]使用激光扫描共聚焦显微镜观察圆锥角膜患者中央区域角膜内皮细胞,发现轻、中、重度圆锥角膜组患眼 6A 分别为 53.7%、48.1% 和 39.9%,差异无统计学意义。本研究发现,III 期圆锥角膜组 6A 显著低于 I 期圆锥角膜组,而 I 期与 II 期圆锥角膜组、II 期与 III 期圆锥角膜组之间 6A 无显著差异。同时,本研究结果发现圆锥角膜患者 6A 与 CCT、TCT 均呈正相关,与 Km 呈负相关,即圆锥角膜患者角膜曲率越大,角膜厚度越薄,六角形细胞比例越低。六边形形态可以增加

内皮细胞之间的接触面积,使细胞连接更加紧密,更利于抵抗机械应力对细胞结构和功能造成的损伤^[23]。圆锥角膜常伴有角膜生物力学特性的改变^[28],对于 III 期圆锥角膜患者,机械拉伸改变了角膜内皮细胞所承受的应力,从而导致细胞六边形形态发生变化,甚至影响细胞功能。同时,上述结果进一步验证了随着圆锥角膜病情的加重,角膜不断扩张变形,六边形角膜内皮细胞逐渐减少。

本研究中,III 期圆锥角膜组 MAX 和 MIN 显著大于 I 期圆锥角膜组,AVE 显著大于 I 期和 II 期圆锥角膜组,且 II 期圆锥角膜组 AVE 也显著大于 I 期圆锥角膜组,即随着病情进展,角膜内皮细胞面积增大。Goebels 等^[6]研究表明,随着病情的进展,圆锥角膜患者 MAX、AVE、MIN 均显著增加,与本研究结果一致。推测随着病情的进展,CD 显著降低,CV 变大,角膜内皮细胞扩大、移行以保持紧密连接。Matsuda 等^[26]研究指出,圆锥角膜组 SD 显著高于对照组,但 2 个组间 AVE 无显著差异。Shah 等^[13]分析了 162 例圆锥角膜患者的中央角膜内皮细胞,发现不同分期圆锥角膜患者间 MAX、MIN、AVE、SD 差异均无统计学意义。究其原因可能与圆锥角膜患者在年龄和疾病构成上不同,以及观察位置和研究方法不同有关。

本研究亦存在一些局限性,由于非接触式角膜内皮显微镜检查需要角膜上皮和内皮表面的清晰反射,本研究未纳入伴有角膜水肿、瘢痕的 IV 期圆锥角膜患者,导致纳入的圆锥角膜患者不够全面。后续将进一步使用激光扫描共聚焦显微镜及内皮显微镜对所有圆锥角膜患者角膜内皮细胞变化进行综合评估。由于不同圆锥角膜锥顶位置对角膜内皮细胞的影响不同,本研究仅分析了圆锥角膜患者中央区域内皮 CD 和形态,后续研究中应增加针对角膜不同位置及角膜周边区域内皮细胞的观察。此外,本研究所纳入 II 期、III 期圆锥角膜患者和正常对照组样本量较小,我们将在后续研究中进一步扩大样本量,减少误差与偏倚。

综上所述,随着圆锥角膜病情的进展,角膜前突变薄,角膜内皮 CD 降低,六边形细胞数减少,细胞变异性增加,角膜内皮 CD 及形态变化与 Km、CCT 和 TCT 存在相关性。因此,对于不同病情的圆锥角膜患者需密切关注角膜内皮细胞情况,选择恰当的治疗方式,避免造成严重的视力损失。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 罗燕:参与选题、研究实施、数据收集和分析、论文撰写;赵灿、王婷:参与选题与研究设计、论文修改、最终定稿;仲晓维、石佳宁:参与研究实施、数据收集;史伟云:研究设计、指导研究

参考文献

- [1] Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, et al. Postnatal development of corneal endothelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986, 27(1) : 44-51.
- [2] Pan F, Yao YF. Research progress on proliferative property and capacity of human corneal endothelium [J]. J ZheJiang Univ (Med Sci), 2011, 40(1) : 94-100. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2011.01.017.
- [3] Gomes JA, Tan D, Rapuano CJ, et al. Global consensus on keratoconus and ectatic diseases [J]. Cornea, 2015, 34(4) : 359-369. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000408.
- [4] Rabinowitz YS. Keratoconus [J]. Surv Ophthalmol, 1998, 42(4) : 297-319. DOI: 10.1016/s0039-6257(97)00119-7.
- [5] Ferrari G, Rama P. The keratoconus enigma: a review with emphasis on pathogenesis [J]. Ocul Surf, 2020, 18(3) : 363-373. DOI: 10.1016/j.jtos.2020.03.006.
- [6] Goebels S, Eppig T, Seitz B, et al. Endothelial alterations in 712 keratoconus patients [J/OL]. Acta Ophthalmol, 2018, 96(2) : e134-e139 [2022-11-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28597601>. DOI: 10.1111/aos.13471.
- [7] Elmassy A, Osman A, Sabry M, et al. Corneal endothelial cells changes in different stages of keratoconus: a multi-centre clinical study [J/OL]. BMC Ophthalmol, 2021, 21(1) : 143 [2022-11-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33743631>. DOI: 10.1186/s12886-021-01913-7.
- [8] van Dooren BT, Mulder PG, Nieuwendaal CP, et al. Endothelial cell density after deep anterior lamellar keratoplasty (Melles technique) [J]. Am J Ophthalmol, 2004, 137(3) : 397-400. DOI: 10.1016/j.ajo.2003.09.053.
- [9] McMonnies CW. Corneal endothelial assessment with special references to keratoconus [J/OL]. Optom Vis Sci, 2014, 91(6) : e124-e134 [2022-11-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830369>. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000271.
- [10] Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, et al. Laser scanning *in vivo* confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(7) : 2964-2970. DOI: 10.1167/iov.07-0968.
- [11] El-Agha MS, El Sayed YM, Harhara RM, et al. Correlation of corneal endothelial changes with different stages of keratoconus [J]. Cornea, 2014, 33(7) : 707-711. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000134.
- [12] Timucin OB, Karadag MF, Cinal A, et al. Assessment of corneal endothelial cell density in patients with keratoconus not using contact lenses [J]. Cont Lens Anterior Eye, 2013, 36(2) : 80-85. DOI: 10.1016/j.clae.2012.10.081.
- [13] Shah Z, Shilpy N, Purohit D, et al. Assessment and correlation of corneal endothelial cell changes in different stages of keratoconus in non-contact lens wearers [J]. Optom Vis Sci, 2021, 98(11) : 1295-1298. DOI: 10.1097/OPX.0000000000001805.
- [14] Yeniad B, Yilmaz S, Bilgin LK. Evaluation of the microstructure of cornea by *in vivo* confocal microscopy in contact lens wearing and non-contact lens wearing keratoconus patients [J]. Cont Lens Anterior Eye, 2010, 33(4) : 167-170. DOI: 10.1016/j.clae.2010.04.005.
- [15] Kamiya K, Ishii R, Shimizu K, et al. Evaluation of corneal elevation, pachymetry and keratometry in keratoconic eyes with respect to the stage of Amsler-Krumeich classification [J]. Br J Ophthalmol, 2014, 98(4) : 459-463. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-304132.
- [16] Doughty MJ, Müller A, Zaman ML. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope [J]. Cornea, 2000, 19(2) : 148-158. DOI: 10.1097/00003226-200003000-00006.
- [17] Inaba M, Matsuda M, Shiozaki Y, et al. Regional specular microscopy of endothelial cell loss after intracapsular cataract extraction: a preliminary report [J]. Acta Ophthalmol (Copenh), 1985, 63(2) : 232-235. DOI: 10.1111/j.1755-3768.1985.tb01539.x.
- [18] Liu XF, Zhou DD, Xie T, et al. Nrf2, a potential therapeutic target against oxidative stress in corneal diseases [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017 : 2326178 [2022-12-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29209447>. DOI: 10.1155/2017/2326178.
- [19] Xie L, Qi F, Gao H, et al. Major shifts in corneal transplantation procedures in north China: 5316 eyes over 12 years [J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93(10) : 1291-1295. DOI: 10.1136/bjo.2008.148981.
- [20] Ting DS, Sau CY, Srinivasan S, et al. Changing trends in keratoplasty in the West of Scotland: a 10-year review [J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96(3) : 405-408. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300244.
- [21] Keenan TD, Carley F, Yeates D, et al. Trends in corneal graft surgery in the UK [J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(4) : 468-472. DOI: 10.1136/bjo.2010.182329.
- [22] Uçakhan OO, Kanpolat A, Yılmaz N, et al. *In vivo* confocal microscopy findings in keratoconus [J]. Eye Contact Lens, 2006, 32(4) : 183-191. DOI: 10.1097/01.icl.0000189038.74139.4a.
- [23] Alvani A, Hashemi H, Pakravan M, et al. Dynamic corneal biomechanics in different cell layers: in keratoconus and normal eyes [J]. Ophthalmic Physiol Opt, 2021, 41(2) : 414-423. DOI: 10.1111/opo.12768.
- [24] Kao WW, Vergnes JP, Ebert J, et al. Increased collagenase and gelatinase activities in keratoconus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 107(3) : 929-936. DOI: 10.1016/0006-291x(82)90612-x.
- [25] Roberts CJ, Dupps WJ Jr. Biomechanics of corneal ectasia and biomechanical treatments [J]. J Cataract Refract Surg, 2014, 40(6) : 991-998. DOI: 10.1016/j.jcrs.2014.04.013.
- [26] Matsuda M, Suda T, Manabe R. Quantitative analysis of endothelial mosaic pattern changes in anterior keratoconus [J]. Am J Ophthalmol, 1984, 98(1) : 43-49. DOI: 10.1016/0006-9394(84)90187-9.
- [27] McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions [J]. Cornea, 2008, 27(1) : 1-16. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31815892da.
- [28] Dou S, Wang Q, Zhang B, et al. Single-cell atlas of keratoconus corneas revealed aberrant transcriptional signatures and implicated mechanical stretch as a trigger for keratoconus pathogenesis [J/OL]. Cell Discov, 2022, 8(1) : 66 [2022-12-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35821117>. DOI: 10.1038/s41421-022-00397-z.

(收稿日期:2023-01-17 修回日期:2023-02-12)

(本文编辑:张宇 骆世平)

读者·作者·编者

本刊对稿件的学术要求

文稿须有较高的学术价值,具有创新性、科学性、导向性和实用性。文稿要求资料翔实、实事求是、立论新颖、方法学正确、论据充分、图表恰当、结果客观、结论可靠、论述严谨、符合逻辑、层次清晰、数据准确、语句通顺。

(本刊编辑部)