时域、频域和扫频OCT测量离体房水细胞的对比研究

李猛¹, 王怀洲¹, 刘玥², 张熙芳¹, 王宁利^{1*}

1. 首都医科大学附属北京同仁医院, 北京同仁眼科中心, 北京市眼科研究所, 北京市眼科与视觉科学重点实验室, 北京 100005;

2. 贵州医科大学附属医院眼科, 贵阳 550001

* 联系人, E-mail: wningli@vip.163.com

收稿日期: 2016-12-10; 接受日期: 2017-01-16; 网络发表日期: 2017-03-06

北京学者培养计划资助

摘要 既往研究显示, 时域和频域光学相干断层扫描(OCT)都可以用来测量前房细胞. 近年来, 商用的扫频OCT也运用于临床. 对于这3类OCT, 哪种测量房水细胞更准确尚无相关研究. 本研究使用这3类OCT对离体房水细胞进行了测量并进行了对比. 首先抽取人体外周血, 将其稀释为8种不同浓度, 并将其装入薄膜塑料袋内, 模拟前房细胞, 使用这3类OCT对每个样品进行扫描. 对于Visante AS-OCT和RTVue XR Avanti OCT, 可以轻易从背景噪点中分辨出房水细胞; 但对于Casia SS-1000 OCT, 难以区分背景噪点和房水细胞. 使用Visante AS-OCT的高分辨率角膜横断面扫描、RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫和3D角膜扫描模式所测得的样品血细胞密度和实际血细胞浓度高度相关(Pearson相关系数(P)分别为0.991, 0.989和0.993). RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫和3D角膜扫描模式所测得的矫正细胞密度均显著高于Visante AS-OCT ((10.46 ± 2.87) 个/ mm^2 , (11.01 ± 2.47) 个/ mm^2 vs. (1.55 ± 1.75) 个/ mm^2) ($P < 0.01$). 本研究显示, 频域RTVue XR Avanti OCT在测量离体房水细胞上, 优于另外2种OCT.

关键词 光学相干断层扫描, 葡萄膜炎, 房水细胞

房水细胞是前房炎症的一个重要临床体征^[1]. 有多种方式可以对房水细胞进行定量分析, 如裂隙灯生物显微镜^[1]、超声生物显微镜(ultrasound biomicroscopy, UBM)^[2]、激光房水闪辉仪^[3]和光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)^[4-8].

既往多个研究使用OCT对前房炎症细胞进行分级. 这些研究显示, 前节OCT (anterior segment optical coherence tomography, AS-OCT)可以在葡萄膜炎患者^[4,5,7,8]或眼术后患者^[6]中检测到房水炎症细胞.

同时AS-OCT也被用来评估啮齿类葡萄膜炎动物模型的前房炎症^[9]. 使用OCT对前房细胞进行评价的优点是: 同UBM相比^[2], 它是非接触的; 同裂隙灯生物显微镜相比^[6], 它的结果更为客观; 同激光房水闪辉仪比^[3], 它也可以用于角膜混浊患者.

既往研究使用时域^[7]和频域^[8]OCT测量前房细胞. 近年来, 扫频OCT (swept source optical coherence tomography, SS-OCT)也被运用于临床^[10]. 目前尚没有使用不同OCT评价房水细胞的对比研究. 本课题组设

引用格式: 李猛, 王怀洲, 刘玥, 等. 时域、频域和扫频OCT测量离体房水细胞的对比研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 285–291, doi: 10.1360/N052017-00014

英文版见: Li M, Wang H, Liu Y, et al. Comparison of time-domain, spectral-domain and swept-source OCT in evaluating aqueous cells *in vitro*. Sci China Life Sci, 2016, 59: 1319–1323, doi: 10.1007/s11427-016-0145-x

计了本研究,使用时域、频域和扫频OCT对离体模型进行房水细胞检测并进行对比,旨在找出检测房水细胞的最佳OCT。

1 材料与方法

1.1 样品的制备与检测

本研究获得了北京同仁医院伦理委员会批准,遵守赫尔辛基宣言。健康志愿者签署了知情同意书。

抽取健康志愿者的外周血。使用自动血细胞分析仪进行全血细胞计数。外周血使用乙二胺四乙酸抗凝。外周血被0.9% NaCl溶液稀释成8种不同的细胞浓度。样品A~H的细胞浓度分别为 1.6×10^9 , 8×10^8 , 4×10^8 , 2×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 2.5×10^7 和 1.25×10^7 个/L。

每个样品均被装入一个薄的塑料袋中,并分别使用3种OCT扫描,每种扫描模式每个样品均要扫描3次。本研究使用的OCT包括Visante AS-OCT (Carl Zeiss Meditec, Inc., 爱尔兰), RTVue XR Avanti with AngioVue OCT (Optovue Inc, 美国)和Casia SS-1000 OCT(Tomey, 日本)。

Visante AS-OCT是一个频域OCT。它使用的光源波长为1310 nm。它的轴向扫描速度为2000次/s、轴向分辨率是18 μm 、侧向分辨率是60 μm 。对每个样品,均使用高分辨率角膜横断面扫描模式(10 mm $\times$ 3 mm)至少扫描3次。

RTVue XR Avanti with AngioVue OCT是一个频域OCT。它使用的光源波长为840 nm。扫描速度为每秒70000个A扫描,它的轴向分辨率是5 μm 、扫描束宽度为22 μm 。为了进行房水细胞检测,给该OCT装上了前节镜头。对于每个样品,均使用角膜线扫(8 mm $\times$ 2 mm)和3D角膜扫描(4 mm $\times$ 2 mm)两种模式进行扫描。每种模式至少进行3次扫描。

Casia SS-1000 OCT是一个扫频OCT。它的扫描速度为每秒30000次A扫描。它的轴向分辨率小于10 μm 、横向分辨率小于30 μm 。对于每个样品,都用2种扫描模式进行了检测,包括前节扫描(16 mm $\times$ 6 mm)和房角高清扫描(8 mm $\times$ 6 mm)。对于每种扫描模式,均进行了至少3次扫描。

采用单盲、人工的方式对每个OCT图像的高反射点进行了计数,所有计数均由一个研究者完成。在对OCT图像中的细胞进行计数之前,先对从背景噪点

中辨识出房水细胞的可行性进行了分析。每个OCT图像的扫描范围均使用Imge J软件(版本1.50, NIH)计算。每个OCT图像的细胞密度等于OCT图像中的高反射点除以扫描的房水面积。

1.2 统计分析

数据使用SPSS软件(版本20.0, SPSS Inc., 美国)进行分析。通过Pearson相关计算OCT测得的细胞密度和实际细胞浓度的相关性。当相关分析结果为 $R \geq 0.5$ 同时 $P < 0.05$ 时,认为OCT测量的细胞密度和实际细胞浓度相关。由于每个样品的稀释浓度不同,每种OCT扫描模式对8个样品所测得的细胞密度是不符合正态分布的。矫正细胞密度等于每个样品的实际细胞密度乘以样品的稀释倍数。例如,样品B的矫正细胞密度等于实际细胞密度 $\times 2$,样品C的矫正细胞密度等于实际细胞密度 $\times 4$ 。使用单因素方差分析来判断不同OCT扫描模式的矫正细胞密度是否有显著差异,进一步使用最小显著性差异法(least-significant difference, LSD)- t 检测来判断每两组之间的矫正细胞密度是否有差异。使用组内相关系数来判断每种OCT扫描模式的可重复性。

2 结果与分析

Visante AS-OCT和RTVue XR Avanti OCT扫描获得图像的背景噪点很均一。对于这两种OCT,可以轻易从背景噪点中分辨出房水细胞(图1)。对于Casia SS-1000 OCT,其图像的背景噪点不均一,房水细胞主要出现于扫描图像的偏前中央部分,大部分区域难以从背景噪点中区分出房水细胞(图1)。所以在后续的测量分析中,主要比较了Visante AS-OCT和RTVue XR Avanti OCT的测量结果。

Visante AS-OCT高分辨率角膜横断面扫描模式测得的血细胞密度与实际的血细胞浓度高度相关($P=0.991$)(图2和3)。线性回归结果显示, OCT测得的房水细胞密度 $=0.0858 \times$ 实际血细胞浓度 -0.0419 ($R^2=0.982$)。

RTVue XR Avanti OCT角膜线扫模式测得的血细胞密度与实际的血细胞浓度高度相关($P=0.989$)(图4和5)。线性回归结果显示, OCT测得的房水细胞密度 $=0.5882 \times$ 实际血细胞浓度 $+0.2048$ ($R^2=0.9774$)。

RTVue XR Avanti OCT的3D角膜扫描模式测得的

图 1 同一样本使用不同的OCT扫描模式所获得OCT图像

A: Visante AS-OCT的高分辨率角膜横断面扫描模式; B: RTVue XR Avanti OCT的3D角膜扫描模式; C: RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫描模式; D: Casia SS-1000 OCT的房角高清扫描模式; E: Casia SS-1000 OCT的前节扫描模式

图 2 使用Visante AS-OCT对不同样品进行扫描的图像

A~H分别代表样品A~H

血细胞密度与实际的血细胞浓度高度相关($P=0.993$) (图6和7). 线性回归结果显示, OCT测得的房水细胞密度 $=0.7676 \times \text{实际血细胞浓度} + 0.0454$ ($R^2=0.9852$).

不同OCT扫描模式对8个样品进行细胞密度检测的结果见表1. Visante AS-OCT高分辨率角膜横断面扫描、RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫和3D角膜扫描模式所测得的平均矫正细胞密度($\bar{x} \pm \text{SD}$)分别为(1.55 ± 1.75), (10.46 ± 2.87)和(11.01 ± 2.47)个/ mm^2 . 单因

素方差分析显示, 3种不同扫描模式测得的平均矫正细胞密度有显著差异($F=38.836, P<0.01$). 进一步的组间比较显示, RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫描模式和3D角膜扫描模式两组之间所测得的平均矫正细胞密度无显著差异($P=0.65$), RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫描模式和3D角膜扫描模式两组所测得的平均矫正细胞密度均显著高于Visante AS-OCT高分辨率角膜横断面扫描模式($P<0.01, P<0.01$).

图3 Visante AS-OCT所测得的血细胞密度与实际血细胞浓度高度相关

表2列出了不同OCT扫描模式所测得的房水细胞

密度的组内可重复性检测结果. Visante AS-OCT高分辨率角膜横断扫描、RTVue XR Avanti OCT角膜线扫和3D角膜扫描3种扫描模式所测得房水细胞密度的可重复性检测结果的组内相关系数分别为0.975, 0.986和0.964.

3 讨论

使用 Visante AS-OCT, RTVue XR Avanti OCT 和 Casia SS-1000 OCT 对离体房水细胞模型进行了检测并比较了它们检测细胞的能力. 在检测房水细胞上, Visante AS-OCT和RTVue XR Avanti OCT优于Casia SS-1000 OCT. RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫模式

表1 对8个样品使用不同的OCT扫描模式所测得的细胞密度和矫正细胞密度

样品	实际细胞浓度 ($\times 10^8 \text{ L}^{-1}$)	细胞密度 (个/ mm^2)			矫正细胞密度 (个/ mm^2)		
		Visante	RTVue角膜 线扫	RTVue 3D角膜扫描	Visante	RTVue 角膜 线扫	RTVue 3D角膜扫描
A	16	1.368	9.071	11.8	1.368	9.071	11.8
B	8	0.6437	6.041	7.385	1.2874	12.082	14.77
C	4	0.1697	2.495	2.841	0.6788	9.98	11.364
D	2	0.07986	1.459	1.715	0.63888	11.672	13.72
E	1	0.05974	0.6528	0.5858	0.95584	10.4448	9.3728
F	0.5	0.01609	0.4993	0.2759	0.51488	15.9776	8.8288
G	0.25	0.01733	0.1132	0.1697	1.10912	7.2448	10.8608
H	0.125	0.04542	0.05617	0.05766	5.81376	7.18976	7.38048

图4 使用RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫模式对不同样品进行扫描的图像
A~H分别代表样品A~H

图5 RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫模式所测得的血细胞密度与实际血细胞浓度高度相关

和3D角膜扫描模式所测得的矫正细胞密度均显著高于Visante AS-OCT的高分辨率角膜横断面扫描模式,也就意味着同Visante AS-OCT相比,RTVue XR Avanti OCT在检测房水细胞上有更高的分辨率。

在本研究中使用Visante AS-OCT在样品G和H中所测得的细胞密度显著高于样品F,而与实际细胞浓度不一致,可能与Visante AS-OCT的较低分辨率有关。

当房水细胞浓度小于 5×10^7 个/L时,不建议使用Visante AS-OCT测量房水细胞。

多种商用OCT^[4-8]可以用来检测人眼前节组织。在本研究中,仅选择了3种商用OCT,分别代表了3类OCT。具体来说,Visante AS-OCT是一种时域OCT,在这3种OCT中,它的A扫描速度最慢。Visante AS-OCT是用来检测房水细胞的第一代OCT。多个研究显示,它可以在活体或离体中定量分析房水细胞^[4,5,7]。RTVue XR Avanti OCT是一种频域OCT,在这3种OCT中,它的A扫描速度最高。目前还没有使用该OCT对房水细胞进行检测的研究。最近有一个研究使用RTVue-100 OCT (Optovue Inc, 美国)在活体中对房水细胞进行检测,研究表明,该OCT所测得的细胞数量与房水细胞的临床分级显著相关^[8]。RTVue XR Avanti OCT具有更高的扫描速度,是RTVue-100 OCT的升级版。它使用的光源波长为840 nm。Cirrus HD Fourier-domain OCT (model 4000, Carl Zeiss Meditec AG),另一种频域OCT,也被用来在活体中检测房水细胞^[6]。既往研究显示,时域和频域OCT都可以在葡萄膜炎患者^[4,5,7,8]或者眼术后患

表2 不同OCT扫描模式所测得的样品房水细胞数的组内可重复性测量结果^{a)}

OCT扫描模式	ICC*	95% CI
Visante AS-OCT高分辨率角膜横断面扫描模式	0.975	0.917~0.994
RTVue XR Avanti OCT的3D角膜扫描模式	0.986	0.952~0.997
RTVue XR Avanti OCT的角膜线扫模式	0.964	0.886~0.992

a)*: 组内相关系数

图6 使用RTVue XR Avanti OCT的3D角膜扫描模式对不同样品进行扫描的图像
A~H分别代表样品A~H

图7 使用RTVue XR Avanti OCT的3D角膜扫描模式所测得的血细胞密度与实际血细胞浓度高度相关

者^[6]中评价房水细胞。Casia SS-1000 OCT是一个扫频前节OCT, 由于其高的扫描速度和大的扫描范围, 在临床上被广泛使用于前节成像^[10], 但是目前还未发现使用它来检测房水细胞的研究。

本研究使用外周血细胞作为研究对象, 它的主要成分为红细胞。本研究与Li等人^[7]的研究不同, 它使用的是乳胶微球。乳胶微球的平均直径仅3 μm^[7]。葡萄膜炎患者的前房细胞主要是中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞^[11,12]。中性粒细胞的平均直径为12~15 μm。淋巴细胞的平均直径为7 μm, 巨噬细胞的平均直径为21 μm。单核细胞的平均直径为7~10 μm。葡萄膜炎患者前房内的这4种细胞的直径显著大于乳胶微球, 仅稍大于外周红细胞。Rose-Nussbaumer等人^[13]使用OCT检测了3种炎症细胞和红细胞, 并比较了他们的光学特性。该研究表明, 所有细胞在OCT图像上都表现为高反射点, 红细胞的平均轴向宽度与中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞这3种炎症细胞类似。考虑到外周血细胞的大小与葡萄膜炎患者前房中的炎症细胞大小类似, 所

以选用了外周血细胞作为前房炎症细胞的替代物。

本研究使用已知浓度的外周血细胞作为测量样本, 使用多种OCT对其进行了定量检测, 并将检测结果与实际细胞浓度进行对比分析, 证实OCT可以用来定量分析房水细胞, 也获得了定量公式, 可以为以后的活体房水细胞定量检测提供标准。目前裂隙灯生物显微镜是前房炎症定量检测的金标准^[1]。葡萄膜炎标准命名工作组通过裂隙灯生物显微镜将前房炎症细胞分为0~4级^[1]。但是它是一种主观和半定量的评价方式。多个研究使用OCT在活体中检测房水细胞并与裂隙灯生物显微镜的结果进行比较^[6,8]。但是目前没有研究将OCT测量的房水细胞结果同其实际细胞浓度进行对比。本课题组使用已知浓度的外周血细胞作为金标准, 测试了3种OCT检测房水细胞的准确性并且对其结果进行了定量分析。

本研究有一些不足。(i) 使用的是外周血细胞, 不是真实的房水细胞, 与真实的房水细胞有一定的差异。(ii) 仅在体外进行了检测。在实际中, 房水细胞是不停运动的, 细胞的运动可能会影响OCT的扫描结果, 特别是对于进行重复扫描的OCT模式。(iii) 本研究仅使用了3种商用OCT。

尽管有上述不足, 本研究表明, OCT可以在体外定量房水细胞, 而且OCT测量的房水细胞浓度与实际的细胞浓度有良好的相关性。OCT是一种良好的检测前房炎症细胞的工具, 特别是对于前房炎症改变轻微以至于普通的裂隙灯生物显微镜不能检测到炎症改变的那部分患者。RTVue XR Avanti OCT, 一种频域OCT, 在检测房水细胞方面优于另外2种OCT。推荐使用设计参数类似于RTVue XR Avanti OCT的OCT系统进行前房细胞的检测。

参考文献

- 1 Jabs D A, Nussenblatt R B, Rosenbaum J T. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the first international workshop. *Am J Ophthalmol*, 2005, 140: 509–516
- 2 Peizeng Y, Qianli M, Xiangkun H, et al. Longitudinal study of anterior segment inflammation by ultrasound biomicroscopy in patients with acute anterior uveitis. *Acta Ophthalmol*, 2009, 87: 211–215
- 3 Ladas J G, Wheeler N C, Morhun P J, et al. Laser flare-cell photometry: methodology and clinical applications. *Surv Ophthalmol*, 2005, 50: 27–47
- 4 Agarwal A, Ashokkumar D, Jacob S, et al. High-speed optical coherence tomography for imaging anterior chamber inflammatory reaction in uveitis: clinical correlation and grading. *Am J Ophthalmol*, 2009, 147: 413–416.e3
- 5 Igbe A O, Rico M C, Garg S J. High-speed optical coherence tomography as a reliable adjuvant tool to grade ocular anterior chamber inflamma-

- tion. *Retina*, 2014, 34: 504–508
- 6 Kumar D A, Agarwal A, Sivangnanam S, et al. Aqueous reaction quantification after phacoemulsification: Fourier-domain optical coherence tomography versus slitlamp biomicroscopy. *J Cataract Refract Surg*, 2014, 40: 2082–2090
 - 7 Li Y, Lowder C, Zhang X, et al. Anterior chamber cell grading by optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54: 258
 - 8 Sharma S, Lowder C Y, Vasanji A, et al. Automated analysis of anterior chamber inflammation by spectral-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 2015, 122: 1464–1470
 - 9 Pepple K L, Choi W J, Wilson L, et al. Quantitative assessment of anterior segment inflammation in a rat model of uveitis using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57: 3567
 - 10 Baskaran M, Ho S W, Tun T A, et al. Assessment of circumferential angle-closure by the iris-trabecular contact index with swept-source optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 2013, 120: 2226–2231
 - 11 Chang J H, McCluskey P J, Wakefield D. Acute anterior uveitis and HLA-B27. *Surv Ophthalmol*, 2005, 50: 364–388
 - 12 Rao N A. Pathology of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Int Ophthalmol*, 2007, 27: 81–85
 - 13 Rose-Nussbaumer J, Li Y, Lin P, et al. Aqueous cell differentiation in anterior uveitis using Fourier-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56: 1430–1436