

共聚焦显微内镜的研究现状

黄锦, 孙刚, 杨云生

黄锦, 孙刚, 杨云生, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853

作者贡献分布: 文献检索、资料分析和论文撰写由黄锦和孙刚完成, 选题和审校由杨云生完成。

通讯作者: 杨云生, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化疾病中心. sunny888@medmail.com.cn
电话: 010-66939747

收稿日期: 2008-03-31 修回日期: 2008-07-07

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-09-08

Current research status of confocal endomicroscopy

Jin Huang, Gang Sun, Yun-Sheng Yang

Jin Huang, Gang Sun, Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. sunny888@medmail.com.cn

Received: 2008-03-31 Revised: 2008-07-07

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-09-08

Abstract

Confocal endomicroscope integrates a miniaturized confocal microscope in the distal tip of a conventional endoscope, and enables subsurface analysis of gastrointestinal mucosa and *in vivo* histology during ongoing endoscopy. The diagnostic spectrum of confocal endomicroscopy is currently expanding from screening and surveillance for colorectal cancer towards ulcerative colitis, Barrett's esophagus, *Helicobacter pylori*, early gastric cancer, oral carcinoma and so on. It's tempting to speculate that confocal endomicroscopy will play an important diagnostic role in gastrointestinal diseases in the future.

Key Words: Confocal endomicroscopy; Diagnosis; Gastrointestinal disease

Huang J, Sun G, Yang YS. Current research status of confocal endomicroscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2867-2870

摘要

共聚焦显微内镜(confocal endomicroscopy)整

合了激光共聚焦显微镜和传统内镜, 实现了进行内镜检查的同时进行黏膜的共聚焦显微观察, 在对消化系统疾病的诊断方面有着独特的优势, 已经应用于结直肠癌, 溃疡性结肠炎、Barrett食管、幽门螺杆菌及早期胃癌等疾病的诊断, 本文对近年来共聚焦显微内镜的研究现状作一综述。

关键词: 共聚焦显微内镜; 诊断; 消化系统疾病

黄锦, 孙刚, 杨云生. 共聚焦显微内镜的研究现状. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2867-2870

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2867.asp>

0 引言

电子内镜问世以来, 已经在消化系统疾病的诊断和治疗等方面得到了广泛的应用。随着光学、视频、计算机等技术的迅速发展, 又诞生了将激光共聚焦显微镜结合于标准电子内镜的共聚焦内镜, 不仅具备传统电子内镜的特点, 更能同时生成共聚焦图像, 在内镜检查的过程中对体内组织实时显微成像, 提供放大1000倍的图像, 其在临床上的应用具有深远的意义。

1 共聚焦内镜的结构及成像原理

共聚焦内镜是在标准电子内镜的头端整合了激光共聚焦显微镜^[1-2]。其头端和插入镜管直径为12.8 mm, 包含一个水和气体喷嘴、两个光导束、一个辅助喷水孔道和一个2.8 mm的工作孔道。激光显微内镜检查时, 发射至组织表面的氩离子激光激发波长为488 nm, 最大激光输出功率≤1 mW。共聚焦图像的扫描速度为0.8帧/s(1024像素×1024像素)或1.6帧/s(1024像素×512像素)。每次扫描光学层面厚度为7 μm, 侧面分辨率为0.7 μm。表层下Z轴范围(自黏膜表面至黏膜下的深度)为0-250 μm。共聚焦内镜的单根光纤同时充当照明点光源和检测针孔。在单点扫描的共聚焦显微镜中, 以光栅模式扫描某点, 测量从连续的点返回至检测器的光波并将其数字化, 从而构成扫描区域的图像, 每一个图像代表组织中的一个光学切面。操作时共聚焦图像可以

■背景资料

共聚焦显微内镜在内镜检查的同时对体内组织实时显微成像, 达到光学活检的目的, 不需要活检和组织病理学检查即可获得消化系黏膜层高度放大的横断面图像。进行即时高分辨率的组织学诊断, 在对消化道疾病的诊断方面有着独特的优势, 避免了重复内镜检查及多次活检, 是快速准确的诊断工具。

■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

■研发前沿

共聚焦激光显微内镜问世以来,已经在消化系统疾病的诊断中显示出了良好的应用前景,有望成为替代传统内镜检查的有利工具。

与内镜图像同时生成。

进行共聚焦内镜检查时,为了增加对比度,往往需要使用荧光对比剂。目前应用较广泛的主要是静脉注射剂荧光素钠和局部应用的盐酸吡啶黄。荧光素钠^[3]是一种微酸性、亲水的荧光染色剂,常用于眼科,静脉注射后20 s,可以广泛结合于血清清蛋白,未结合的染色分子可随静脉输入逐渐渗透入黏膜全层,标记表面上皮的细胞外基质和基底膜,显示结肠隐窝结构、上皮细胞、固有膜的结缔组织基质、血管和红细胞,使固有膜的结缔组织基质与微血管系统产生强烈对比,并可以持续30 min。但由于荧光素钠不能穿过细胞的类脂膜与细胞核的酸性物质结合,故不能清楚显示细胞核。盐酸吡啶黄局部喷洒数秒钟即可被吸收,能够穿过细胞膜与细胞核的酸性物质结合,更适于标记表层上皮细胞、显示细胞核。但是只局限于黏膜表层(0-100 μm)不能逐渐渗入黏膜全层产生上皮下深层对比,且其分布随时间的变化小,因此二者的联合应用可以更清晰的显示胃肠黏膜的结构,这些图像与同一部位的活检组织横切面的病理图像有很好的一致性。

2 共聚焦显微镜的应用

2.1 在消化系统疾病中的应用

2.1.1 Barrett食管及Barrett食管相关的癌变:共聚焦激光显微内镜在食管疾病研究中应用最早、最多的是Barrett食管,由于杯状细胞存在,Barrett食管在共聚焦图像中有特征性的形状^[4-6]。Kiesslich *et al*^[7]用共聚焦内镜对63例存在长期胃食管反流症和已知存在Barrett食管的患者进行检查,并同时可对可疑病灶取活检进行对照,将共聚焦内镜诊断结果与活检组织病理学结果对照显示:共聚焦内镜对Barrett食管及Barrett食管相关癌变诊断的敏感性分别是98.1%和92.9%;特异性分别是94.1%和98.4%;准确性分别为96.8%和97.4%;且不同内镜医师之间的诊断一致性较好。

2.1.2 食管鳞状细胞癌:Deinert *et al*^[8]通过共聚焦显微内镜检测到食管血管和细胞结构上的改变,诊断了一位63岁的早期食管鳞状细胞癌患者。Pech *et al*^[9]研究了共聚焦显微内镜对21例早期食管鳞状细胞癌患者诊断的价值,结果显示,通过共聚焦显微内镜发现了21位患者的43处病变,共聚焦显微内镜的诊断准确率高达95%,敏感性和特异性分别为100%和87%。该项研究提示,共聚焦显微内镜可以成为诊断早期食管鳞状细胞

癌的有利工具。

2.1.3 幽门螺杆菌(*H pylori*):应用共聚焦显微内镜可以观察到经吡啶黄染色后*H pylori*的典型形状,单个或聚集成群的白色明亮的光点,经共聚焦内镜图像放大后可清楚地观察到包括菌体和鞭毛的特征性形态。Kiesslich *et al*的研究^[10]首次报道在体内直接观察到*H pylori*,为*H pylori*检测提供了一种更为直观的方法。这种技术也可以应用于*H pylori*相关性胃炎的诊断。

2.1.4 早期胃癌:共聚焦内镜在早期胃癌的诊断价值已被多项研究证实。Kitabatake *et al*^[11]对27例早期胃癌患者进行共聚焦内镜检查,将共聚焦图像与病理组织学横断面图像进行对比,由2名病理医师分别对正常和癌组织的共聚焦图像进行诊断,结果显示共聚焦图像与组织学图像对应性好,2名病理医师的诊断准确率达到94.2%和96.2%,提示依据共聚焦图像完全可以进行实时体内组织学诊断。Kakeji *et al*^[12]对内镜下切除的早期胃癌黏膜体外涂抹0.05%吡啶黄后用图像分析软件计算其核面积,显示胃癌尤其是分化型胃癌黏膜细胞核面积明显高于正常黏膜,提示吡啶黄进行细胞核染色效果好,并且可以依据共聚焦图像和细胞核面积诊断早期胃癌。由于共聚焦内镜的显微放大作用,结合染色剂增加对比度,可在内镜检查的同时进行实时模拟组织学检查,对黏膜粗糙及可疑部位进行检查并靶向活检,更易于检出黏膜内早期癌变。

2.1.5 结直肠癌:共聚焦内镜可直接对可疑病灶进行检测,大大提高了内镜对结直肠癌的检出率,而且这种快速的优化诊断对于临床内镜下治疗如肿瘤组织的内镜黏膜切除术有重要的意义。Kiesslich *et al*^[13]对42例具有行结直肠癌普查或检测指征的患者进行共聚焦内镜和普通肠镜检查,并对可疑病灶取活检,结果显示共聚焦内镜可准确地检测出瘤样病变,敏感性为97.4%,特异性为99.4%,准确性为99.2%。

2.1.6 溃疡性结肠炎:大量临床研究应用共聚焦显微内镜联合色素内镜对溃疡性结肠炎及其上皮内瘤样变进行早期诊断。先给予亚甲蓝或靛胭脂,内镜下显示病变区域,再行共聚焦显微内镜检查以发现早期肿瘤。亚甲蓝的应用对共聚焦内镜激光扫描系统无影响,这种病变区域的靶向活检以及内镜检查过程中实时病理检查可发现早期瘤样变。Kiesslich *et al*^[14]选择153例有8年以上溃疡性结肠炎病史并处于缓解期的患者,按1:1的比例随机进行共聚焦内镜和常规肠镜

■相关报道

Kiesslich *et al*对于共聚焦内镜的应用进行了深入和广泛的研究,提供了非常有价值的

的检查. 在进行共聚焦内镜检查前, 用1 g/L的亚甲蓝全肠染色, 明确病变部位后, 用共聚焦内镜进行靶向活检, 且自肛门至盲肠每隔10 cm肠黏膜做随机活检. 结果表明共聚焦内镜可准确预测瘤样病变, 敏感性为94.7%, 特异性为98.3%, 准确性为97.8%. Sakashita *et al*^[15]研究也取得了类似的结果.

2.2 在其他疾病中的应用 随着共聚焦内镜的发展, 在其他领域也得到了应用. Thong *et al*^[16]将共聚焦内镜应用于口腔的恶性肿瘤诊断, 他们通过大鼠模型检测正常鼠舌及鳞状细胞癌的鼠舌, 结果显示, 通过共聚焦内镜结合5-ALA(5-氨基乙酰丙酸)及荧光素, 可以显示正常组织及病变组织的形态学差异, 共聚焦内镜有望成为无创的诊断口腔恶性肿瘤的新手段. Goetz *et al*^[17]的研究显示共聚焦探针可以用于腹腔镜及腹腔脏器的研究. 共聚焦图像可以辨认正常和病变组织细胞、亚细胞及分子结构的特征, 有望实现腹腔实时分子诊断^[18].

3 共聚焦内镜的局限性

共聚焦内镜在临床上的应用具有划时代意义, 但目前该技术主要处于研究阶段, 仍有很多问题亟待解决. 由于共聚焦内镜的硬性部件较普通内镜长、弯曲角度小, 故操控性不如常规内镜. 另外共聚焦图像质量也是影响组织学诊断的重要原因. Kitabatake *et al*^[19]对早期胃癌患者进行共聚焦内镜检查, 发现影响诊断准确性的主要因素是图像的质量. 影响共聚焦图像质量的最大的问题是存在伪影, 许多伪影是因为内镜的头端与黏膜表面没有平坦的接触, 有些是胃肠蠕动引起, 应用解痉剂及通过工作通道吸引一下使黏膜表面与内镜的头端正确接触可以减少此类伪影. Becker *et al*^[20]的研究通过video mosaicing来解决伪影, 取得了一定效果. 对比剂荧光素钠和盐酸吡啶黄的应用, 目前尚无严重不良反应报道, 但其临床风险需进一步评估. 其他对比剂如白蛋白、甲紫酚、四环素、光卟啉等显像效果不十分理想, 亟需研究新型的对比剂, 可以显示特定分子在黏膜内的分布, 以拓宽共聚焦内镜的应用.

4 结论

共聚焦内镜作为一种目前最新开发的诊断工具, 使内镜检查与在体组织学检查同步, 标志着内镜检查从表层走向深层, 从形态学到机能组织

学的质的飞跃. 相信, 随着光学显微镜技术、激光扫描技术和生物计算机图像处理技术及相关技术的进一步完善与结合, 共聚焦内镜的扫描深度可加大, 不再局限于黏膜层, 可以进行内镜下的实时肿瘤分级分期, 慢性炎症程度和活动度的分级诊断, 及对黏膜萎缩和化生进行分级分型. 同时, 对比剂的改进可以使细胞核、其他亚细胞结构或特定的分子基团清晰的显示, 将抗体及分子标志物与荧光素结合, 在共聚焦内镜下可实现识别肿瘤细胞. 可以预测, 未来的共聚焦内镜更加容易操作, 可能替代很多的病理检查, 观察各种细胞器的微细结构, 发挥更加重要的诊断治疗作用.

5 参考文献

- 1 Wang TD, Van Dam J. Optical biopsy: a new frontier in endoscopic detection and diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 744-753
- 2 DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Optical techniques for the endoscopic detection of dysplastic colonic lesions. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 70-79
- 3 Kim J. The use of vital dyes in corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2000; 11: 241-247
- 4 Goetz M, Hoffman A, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. Confocal laser endoscopy: new approach to the early diagnosis of tumors of the esophagus and stomach. *Future Oncol* 2006; 2: 469-476
- 5 Kara MA, DaCosta RS, Streutker CJ, Marcon NE, Bergman JJ, Wilson BC. Characterization of tissue autofluorescence in Barrett's esophagus by confocal fluorescence microscopy. *Dis Esophagus* 2007; 20: 141-150
- 6 Dacosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Spectroscopy and fluorescence in esophageal diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 41-57
- 7 Kiesslich R, Gossner L, Goetz M, Dahlmann A, Vieth M, Stolte M, Hoffman A, Jung M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 979-987
- 8 Deinert K, Kiesslich R, Vieth M, Neurath MF, Neuhaus H. In-vivo microvascular imaging of early squamous-cell cancer of the esophagus by confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2007; 39: 366-368
- 9 Pech O, Rabenstein T, Manner H, Petrone MC, Pohl J, Vieth M, Stolte M, Ell C. Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of early squamous cell carcinoma in the esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 89-94
- 10 Kiesslich R, Goetz M, Burg J, Stolte M, Siegel E, Maeurer MJ, Thomas S, Strand D, Galle PR, Neurath MF. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology* 2005; 128: 2119-2123
- 11 Kitabatake S, Niwa Y, Miyahara R, Ohashi A, Matsuura T, Iguchi Y, Shimoyama Y, Nagasaka T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo. *Endoscopy* 2006; 38:

■创新盘点

本文总结了共聚焦激光显微内镜目前的应用现状, 尤其是在Barrett食管、食管腺癌、食管鳞癌、早期胃癌、*Hpylori*感染、溃疡性结肠炎和结肠直肠癌等消化系统疾病的诊断价值, 提出了目前存在的局限性.

■应用要点

本文对于共聚焦显微内镜的诊断价值及局限性进行总结, 为共聚焦内镜的进一步应用及发展提供方向.

■同行评价

本文符合目前临床所需, 实用性强, 层次清楚, 逻辑性强, 学术价值很好。

- 1110-1114
- 12 Kakeji Y, Yamaguchi S, Yoshida D, Tanoue K, Ueda M, Masunari A, Utsunomiya T, Imamura M, Honda H, Maehara Y, Hashizume M. Development and assessment of morphologic criteria for diagnosing gastric cancer using confocal endomicroscopy: an ex vivo and in vivo study. *Endoscopy* 2006; 38: 886-890
- 13 Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004; 127: 706-713
- 14 Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, Schneider C, Burg J, Stolte M, Vieth M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 874-882
- 15 Sakashita M, Inoue H, Kashida H, Tanaka J, Cho JY, Satodate H, Hidaka E, Yoshida T, Fukami N, Tamegai Y, Shiokawa A, Kudo S. Virtual histology of colorectal lesions using laser-scanning confocal microscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 1033-1038
- 16 Thong PS, Olivo M, Kho KW, Zheng W, Mancor K, Harris M, Soo KC. Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity. *J Biomed Opt* 2007; 12: 014007
- 17 Goetz M, Memadathil B, Biesterfeld S, Schneider C, Gregor S, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo subsurface morphological and functional cellular and subcellular imaging of the gastrointestinal tract with confocal mini-microscopy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2160-2165
- 18 Goetz M, Fottner C, Schirmacher E, Delaney P, Gregor S, Schneider C, Strand D, Kanzler S, Memadathil B, Weyand E, Holtmann M, Schirmacher R, Weber MM, Anlauf M, Kloppel G, Vieth M, Galle PR, Bartenstein P, Neurath MF, Kiesslich R. In-vivo confocal real-time mini-microscopy in animal models of human inflammatory and neoplastic diseases. *Endoscopy* 2007; 39: 350-356
- 19 Kitabatake S, Niwa Y, Miyahara R, Ohashi A, Matsuura T, Iguchi Y, Shimoyama Y, Nagasaka T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo. *Endoscopy* 2006; 38: 1110-1114
- 20 Becker V, Vercauteren T, von Weyhern CH, Prinz C, Schmid RM, Meining A. High-resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing (with video). *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1001-1007

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)