

· 基础研究 ·

细针型共聚焦激光显微内镜在体成像的动物实验研究

张明明 钟宁 左秀丽 王晓 季锐 于岩波 张振 李延青

【摘要】 目的 探索细针型共聚焦激光显微内镜(nCLE)对动物腹腔组织及脏器成像的可行性。**方法** 选取 5 只实验家兔的大网膜、肝脏、胰腺、腰大肌(骨骼肌)为研究对象,nCLE 经由 19 G 穿刺针进入其内部分别进行成像,观察各腹腔组织及脏器的成像特征,并留取清晰的 nCLE 图像。最终将 nCLE 图像与病理组织学结果相对比。**结果** 5 只实验家兔腹腔组织及脏器的 nCLE 成像均成功完成,并清晰显示大网膜、肝脏、胰腺、腰大肌(骨骼肌)的细胞、腺体、微血管等显微结构,其 nCLE 图像具有特征性。各腹腔组织及脏器 nCLE 图像与病理组织学具有良好的一致性。**结论** 利用 nCLE 对腹腔组织及脏器成像具有可行性。

【关键词】 动物实验; 细针型共聚焦激光显微内镜; 在体成像

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2015H2003)

Imaging of needle-based confocal laser endomicroscopy in rabbit models Zhang Mingming, Zhong Ning, Zuo Xiuli, Wang Xiao, Ji Rui, Yu Yanbo, Zhang Zhen, Li Yanqing. Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China

Corresponding author: Li Yanqing, Email: liyanqing@sdu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility of needle-based confocal laser endomicroscopy (nCLE) for imaging of intra-abdominal tissues and organs in rabbit models in vivo. **Methods** The nCLE miniprobe was inserted through the 19-gauge needle into various intra-abdominal tissues and organs[omentum majus, liver, pancreas and psoas major (skeletal muscle)]. The nCLE images were acquired and real-time sequences of respective locations were recorded. Finally, nCLE image characteristics were compared with histopathologic findings. **Results** nCLE was successfully performed in intra-abdominal tissues and organs of five rabbit models. The microscopic structures of cells, glands and microvessels in the omentum majus, liver, pancreas and psoas major (skeletal muscle) were visualized clearly, respectively. Characteristics of various intra-abdominal tissues and organs were displayed on nCLE images, which were correlated well with histological findings. **Conclusion** Imaging of intra-abdominal tissues and organs with nCLE in vivo is feasible in future clinical practice.

【Key words】 Animal experimentation; Needle-based confocal laser endomicroscopy; In vivo imaging

Fund program:Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2015H2003)

细针型共聚焦激光显微内镜(needle-based confocal laser endomicroscopy, nCLE)是一种新型共聚焦激光显微内镜(confocal laser endomicroscopy, CLE),与探头式 CLE 在空腔脏器中应用不同,其能在常规超声内镜检查的过程中经由 19 G 穿刺针到达靶组织或

实质脏器,实现在体实时显示靶组织或实质脏器的细胞、腺体、血管等显微结构^[1]。本研究利用 nCLE 在动物模型进行腹腔组织及脏器成像,旨在探索 nCLE 在各腹腔组织及脏器的成像特征,评估 nCLE 应用的可行性,为后续开展临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物

健康家兔 5 只,体重 4.5~5.0 kg,雌雄不限,由

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2018.04.009

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院消化科

通信作者:李延青,Email:liyanqing@sdu.edu.cn

山东大学齐鲁医院动物实验中心提供。

二、材料及器械

1. 主要仪器设备和技术参数: 内镜主机为法国 Mauna Kea Technologies 公司的 Cellvizio 100 Series 系统。nCLE 探头为 AQ-Flex™ 19 共聚焦微探头, 其由 10 000 根光纤组成, 长度 4 m, 直径 0.85 mm, 光学层面扫描深度 40~70 μm, 横向分辨率 3.5 μm, 最大观察视野 325 μm×325 μm。

2. 其他材料及器械: 3% 戊巴比妥钠溶液、兔台、动物手术器械、一次性使用无菌注射针 (型号规格 1.2×35TW LB) 等。

三、研究方法

1. 实验动物准备: 实验家兔术前禁食 12 h, 禁水 6 h。经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠溶液 (1 mL/kg) 麻醉后仰卧位固定于兔台上。沿家兔颈部正中切开皮肤 (5~7 cm), 分离气管后于甲状软骨下约 1 cm 处做倒 T 型切口, 行气管插管并固定。充分暴露家兔腹部后剪毛, 沿腹部正中线做一长约 7~8 cm 的皮肤切口, 其下端直达耻骨联合。分离皮下组织、肌肉, 充分暴露并辨识腹腔组织及脏器。

2. nCLE 穿刺模型的构建: nCLE 穿刺模型由 AQ-Flex™ 19 共聚焦微探头、锁定装置以及一次性使用无菌注射针组成。首先将锁定装置旋紧在无菌注射针的近端, 并将锁定装置的内口旋开。然后将共聚焦微探头通过锁定装置插入无菌注射针内, 调整探头位置使其探出远端斜角针尖 1 mm, 旋紧锁定装置使探头锁定在安全位置。将共聚焦微探头和锁定装置组合从无菌注射针内抽出 1 cm, 备用 (图 1)。待穿刺针进入靶组织后, 再将预置探头组合重新锁定于无菌注射针近端。

3. nCLE 腹腔组织及脏器成像: 经耳缘静脉注射 10% 荧光素钠溶液 2 mL, 注射 15 s 后开始准备 nCLE 成像。首先暴露实验家兔大网膜 (包含大量脂肪组织), 将 nCLE 刺入大网膜中, 标记穿刺部位并进行成像, 调整并记录 nCLE 的穿刺深度 (由浅入深) 及角度, 留取清晰的 nCLE 图像用于事后分析。大网膜 nCLE 成像完成后, 按照上述操作方法及步骤依次进行肝脏、胰腺及腰大肌 (骨骼肌) nCLE 成像。待上述所有腹腔组织及脏器 nCLE 成像完成后, 留取穿刺成像部位组织标本, 最后利用空气栓塞处死法处死实验家兔。

4. 病理检查: 不同部位的组织标本分别置于单独的容器中, 浸泡于甲醛溶液, 石蜡包埋, 切片

(4 μm) 采用 HE 染色。所有切片均由一位经验丰富的病理医师进行处理。

5. 读片: 各腹腔组织及脏器的 nCLE 图像解读以及与病理组织学结果的比对由 3 位经验丰富的内镜医师 (均完成 500 例以上 CLE 检查) 组成的专家小组进行评估。

结 果

nCLE 在 5 只实验家兔上均成功完成操作, 并依次对大网膜、肝脏、胰腺及腰大肌 (骨骼肌) 进行成像, 通过 nCLE 成像清晰显示各腹腔组织及脏器的细胞、腺体、血管等显微结构, 具体如下:

1. 大网膜 nCLE 成像: 大网膜含有丰富的脂肪组织, nCLE 下表现为大小较一致、排列规则的圆形或类圆形较透亮的细胞结构。细胞间可相互重叠, 富有立体感, 并可见白色的血管结构。相应的病理组织学图片显示单个脂肪细胞为圆形、类圆形或多边形, 大小较一致, 呈空泡样, 细胞排列规则, 细胞间可见微小血管 (图 2)。

2. 肝脏 nCLE 成像: 肝脏 nCLE 表现为呈规则放射状排列的黑色索状结构, 其间可见到白色的条索样血管, 血管内有黑色小颗粒样结构流动。相应的病理组织学图片显示肝细胞在肝小叶中以中央静脉为中心向周围呈放射状, 排列成索状结构, 肝索之间可见呈条索状分布的肝血窦, 其内可见大量红细胞 (图 3)。

3. 胰腺 nCLE 成像: 腺泡是胰腺外分泌部的重要组成部分, 因而也是 nCLE 观察的基本结构单位。nCLE 下腺泡呈圆形或多边形, 形态饱满, 大小一致, 排列规则。黑色腺泡之间的间质中可见到蜂窝状血管结构, 与正常胃底腺 CLE 表现相似。相应的病理组织学图片显示胰腺腺泡呈泡状或管状, 并由多级导管相连, 腺泡间可见丰富的毛细血管网 (图 4)。

4. 腰大肌 (骨骼肌) nCLE 成像: 在 nCLE 的纵切面成像中, 骨骼肌纤维呈黑色长条带状结构, 宽度一致, 肌纤维间可见白色的血管结构; 而在 nCLE 的横切面成像中, 骨骼肌纤维呈类圆形或多边形, 粗细均匀, 可清晰显示黑色线性轮廓。相应的病理组织学图片显示骨骼肌纤维的纵切面呈长条带状, 肌纤维间可见微小血管; 而横切面上, 肌纤维被结缔组织膜分割成类圆形或多边形 (图 5)。

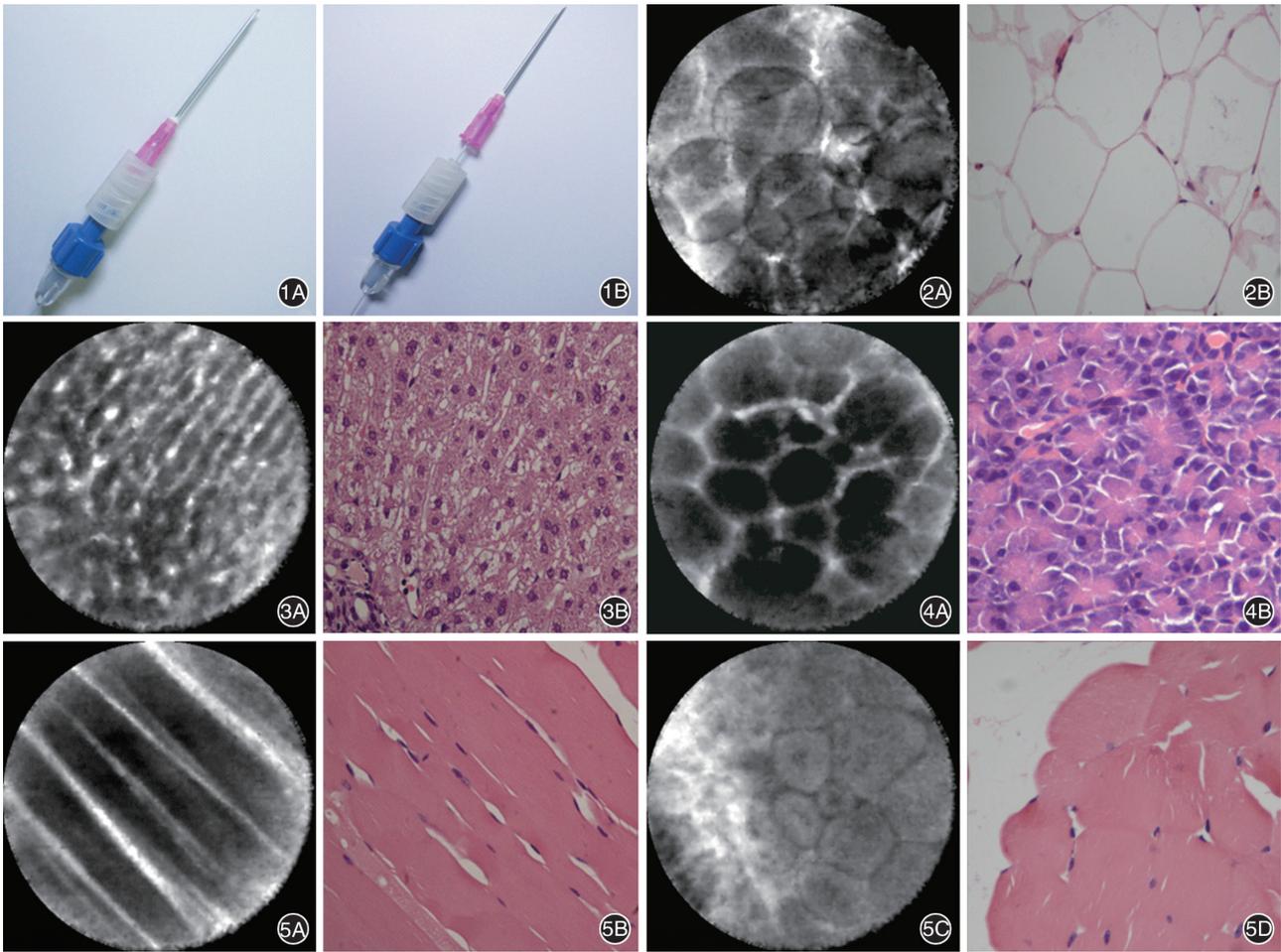


图 1 细针型共聚焦激光显微内镜穿刺模型 1A:共聚焦微探头和无菌注射针头被锁定装置锁定在安全位置;1B:共聚焦微探头和锁定装置组合与无菌注射针头分离 图 2 大网膜细针型共聚焦激光显微内镜(nCLE)成像和病理组织学图片对比 2A:nCLE 成像图片;2B:病理组织学图片 HE ×400 图 3 肝脏细针型共聚焦激光显微内镜(nCLE)成像和病理组织学图片对比 3A:nCLE 成像图片 3B:病理组织学图片 HE ×400 图 4 胰腺细针型共聚焦激光显微内镜(nCLE)成像和病理组织学图片对比 4A:nCLE 成像图片 4B:病理组织学图片 HE ×400 图 5 腰大肌(骨骼肌)细针型共聚焦激光显微内镜(nCLE)成像和病理组织学图片对比 5A:nCLE(纵切面)成像图片;5B:病理组织学(纵切面)图片 HE ×400;5C:nCLE(横切面)成像图片;5D:病理组织学(横切面)图片 HE ×400

讨 论

作为一项新兴内镜技术,近年来 CLE 已在临床中得到广泛的推广和应用。大量的国内外研究结果表明,CLE 在 Barrett 食管及其瘤变的检测^[2]、早期胃癌及其癌前病变的诊断^[3]、结直肠息肉的鉴别诊断^[4]以及炎症性肠病的诊断和监测^[5]等方面具有良好的临床应用价值。然而,由于其自身扫描深度的限制,当前 CLE 主要用于消化道等空腔脏器黏膜浅表性病变的诊断^[6],而很少应用于黏膜深层乃至腹腔脏器病变。

nCLE 利用超声内镜引导通过 19 G 穿刺针进入靶组织内部进行成像,从而一定程度上弥补了 CLE

成像深度的不足。2010 年,Becker 等^[7]以猪(10 只)为实验对象,开展了 nCLE 在超声内镜或经自然腔道内镜手术引导下,经由 22 G 穿刺针对各腹腔组织及脏器(淋巴结、膈膜、卵巢、肝脏、脾脏和胰腺)进行实时在体成像的可行性研究。该研究展示了 nCLE 在腹腔组织及脏器的成像特点,并证实 nCLE 在体实时图像与术后病理组织学具有良好的一致性。而 2011 年,Shinoura 等^[8]通过 nCLE 在猪肝脏、胰腺、脾脏、胆囊、淋巴结的实时在体成像,显示出与 Becker 等^[7]相类似的研究结果。而本次动物实验研究成功进行了 nCLE 在家兔腹腔组织及脏器[大网膜、肝脏、胰腺、腰大肌(骨骼肌)]中的在体成像,并通过与病理组织学相比对,展现了各组织及

脏器的 nCLE 成像特征,其研究结果与国外动物实验研究^[7-8]相一致,为后续开展临床应用提供了重要实验依据。

与常规脏器组织穿刺相类似, nCLE 需借助 19 G 穿刺针刺入靶组织内部方能进行成像,因而势必造成组织损伤引起出血。在此次研究中我们发现,在 nCLE 成像过程中,出血是影响其成像质量的重要干扰因素。由于组织出血, nCLE 将无法获取完整的高质量清晰图像,从而影响对病变性质的准确判断。研究中,我们采取由浅入深渐进式的 nCLE 成像方式,避免了反复穿刺造成组织的进一步损伤,一定程度上减少了出血对 nCLE 成像的干扰。

本研究尚存在一些不足。首先,由于本研究选用家兔作为实验对象,无法进行超声内镜操作,因而未能完全模拟超声内镜引导下的 nCLE 成像过程。其次,此次研究的实验家兔数量较少,为更好的掌握 nCLE 成像仍需增加样本数量。第三,由浅入深渐进式的 nCLE 成像方式对改善 nCLE 成像质量的有效性未进行准确的评估。因而,如何能够更好的进行 nCLE 成像也将是未来 nCLE 成像亟需解决的问题。

总之,通过此次动物实验研究,显示了 nCLE 在各腹腔组织及脏器中的成像特征,其研究结果表明 nCLE 在体成像与病理组织学存在良好的一致性,对腹腔组织及脏器进行 nCLE 成像具有可行性。

参 考 文 献

[1] 张明明,李延青. 细针型共聚焦激光显微内镜在胰腺囊性病

变诊断中的应用[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(1): 49-52. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2017.01.010.

[2] Canto MI, Anandasabapathy S, Brugge W, et al. In vivo endomicroscopy improves detection of Barrett's esophagus-related neoplasia; a multicenter international randomized controlled trial (with video)[J]. *Gastrointest Endosc*, 2014, 79(2): 211-221. DOI: 10.1016/j.gie.2013.09.020.

[3] Li WB, Zuo XL, Li CQ, et al. Diagnostic value of confocal laser endomicroscopy for gastric superficial cancerous lesions[J]. *Gut*, 2011, 60(3): 299-306. DOI: 10.1136/gut.2010.223586.

[4] Wanders LK, East JE, Uitentuis SE, et al. Diagnostic performance of narrowed spectrum endoscopy, autofluorescence imaging, and confocal laser endomicroscopy for optical diagnosis of colonic polyps: a meta-analysis[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(13): 1337-1347. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70509-6.

[5] Karstensen JG, Säfteiu A, Brynskov J, et al. Confocal laser endomicroscopy in ulcerative colitis: a longitudinal study of endomicroscopic changes and response to medical therapy (with videos)[J]. *Gastrointest Endosc*, 2016, 84(2): 279-286. e1. DOI: 10.1016/j.gie.2016.01.069.

[6] Konda VJ, Aslanian HR, Wallace MB, et al. First assessment of needle-based confocal laser endomicroscopy during EUS-FNA procedures of the pancreas (with videos)[J]. *Gastrointest Endosc*, 2011, 74(5): 1049-1060. DOI: 10.1016/j.gie.2011.07.018.

[7] Becker V, Wallace MB, Fockens P, et al. Needle-based confocal endomicroscopy for in vivo histology of intra-abdominal organs: first results in a porcine model (with videos)[J]. *Gastrointest Endosc*, 2010, 71(7): 1260-1266. DOI: 10.1016/j.gie.2010.01.010.

[8] Iwashita T, Lee JG, Shinoura S, et al. Endoscopic ultrasound-guided rendezvous for biliary access after failed cannulation[J]. *Endoscopy*, 2012, 44(1): 60-65. DOI: 10.1055/s-0030-1256871.

(收稿日期:2017-09-25)

(本文编辑:钱程)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中华消化内镜杂志》2018 年可直接使用英文缩写的常用词汇

ERCP(经内镜逆行胰胆管造影术)

EST(经内镜乳头括约肌切开术)

EUS(内镜超声检查术)

EUS-FNA(内镜超声引导下细针抽吸术)

EMR(内镜黏膜切除术)

ESD(内镜黏膜下剥离术)

ENBD(经内镜鼻胆管引流术)

ERBD(经内镜胆道内支架放置术)

APC(氩离子凝固术)

EVL(内镜下静脉曲张套扎术)

EIS(内镜下硬化剂注射术)

MRCP(磁共振胰胆管成像术)

NBI(窄带成像技术)

GERD(胃食管反流病)

RE(反流性食管炎)

IBD(炎症性肠病)

UC(溃疡性结肠炎)

NSAIDs(非甾体抗炎药)

PPI(质子泵抑制剂)

HBV(乙型肝炎病毒)

HBsAg(乙型肝炎病毒表面抗原)

Hb(血红蛋白)

NO(一氧化氮)

PaO₂(动脉血氧分压)

PaCO₂(动脉血二氧化碳分压)

ALT(丙氨酸转氨酶)

AST(天冬氨酸转氨酶)

AKP(碱性磷酸酶)

IL(白细胞介素)

TNF(肿瘤坏死因子)

VEGF(血管内皮生长因子)

ELISA(酶联免疫吸附测定)

RT-PCR(逆转录-聚合酶链反应)