

- [15] Schmit A, Carol M. Dose-effect of interleukin-10 and its immunoregulatory role in Crohn's disease[J]. European Cytokine Network, 2002, 13(3): 298-305.
- [16] Miller LJ, Fischer KA, Goralnick SJ, et al. Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. Urology, 2002, 59(5): 603-605.
- [17] He L, Wang Y, Long Z, et al. Clinical significance of IL-2, IL-10, and TNF- α in prostatic secretion of patients with chronic prostatitis[J]. Urology, 2010, 75(3): 654-657.
- [18] Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Ruaso C, et al. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51(12): 2248-2256.
- [19] Donadio AC, Depiante-Depaoli M. Inflammatory cells and MHC class II antigens expression in prostate during time-course experimental autoimmune prostatitis development [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1997, 85(2): 158-161.
- [20] Mendes LO, Amorim JP, Teixeira GR, et al. Mast cells and ethanol consumption: interactions in the prostate, epididymis and testis of UChB rats[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 66(3): 170-178.
- [21] Yang CQ, Wei YY, Zhong CJ, et al. Essential role of mast cells in the visceral hyperalgesia induced by *T. spiralis* infection and stress in rats[J]. Mediators Inflamm, 2012, 48(14): 962-969.
- [22] Rudick CN, Schaeffer AJ, Thumbikat P. Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 294(11): 1268-1270.
- [23] Busse PJ, Zhang TF, Schofield B, et al. Decrease in airway mucous gene expression caused by treatment with antitumor necrosis factor alpha in a murine model of allergic asthma[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2009, 103(4): 295-303.
- [24] 张慧云, 马文静, 何韶衡. RANTES 对肥大细胞系 P815 细胞分泌 IL-10 的诱导作用及其机制[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 108-111.
- [25] Done JD, Rudick CN. Role of mast cells in male chronic pelvic pain[J]. J Urol, 2012, 187(14): 1473-1482.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-18)

· 综 述 ·

激光共聚焦扫描显微镜在皮肤科的应用进展及评价

李彦希, 黎 智, 陶轶妮 综述, 刁庆春 审校
(重庆市第一人民医院皮肤科, 重庆 400011)

关键词: 显微镜检查, 共焦; 银屑病; 白癜风; 黑色素瘤

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.045

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)16-1904-03

传统的皮肤病理工作通过从患者的患处获取组织后经脱水、包埋、染色、切片等过程, 对其进行诊断, 这是长期以来皮肤科医生公认为作为诊断“金标准”一种诊断方法。由于其有创、耗时较长、局限于取材组织、取材部位易形成疤痕、有感染的风险、受到样本染色等的影响, 因此, 创建无创诊断系统的需求日益增加。1957年, Minsky首次阐明扫描共聚焦显微镜技术的基本原理, 1985年, Wijaneds第1次成功地用其演示了用荧光探针标记的生物材料的光学横断面, 标志着共聚焦激光显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)的关键技术已基本成熟; 直到1995年激光共聚焦扫描显微镜首次对人的皮肤组织成像。本文对 CLSM 的基本原理以及皮肤科的应用进展进行阐述。

1 CLSM 工作原理

激光共聚焦扫描显微镜是利用激光作为点光源, 在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦原理, 在体内或体外的组织内产生小光斑, 最终反射光通过针孔传输到探测仪成像, 在计算机辅助下对所观察的对象进行数字图像处理的一套观察、分析和输出系统的一种新型成像技术。主要由显微镜光学系统、扫描装置、激光光源及检测系统4部分构成。皮肤CT是应用激光共聚焦扫描显微镜原理, 在计算机辅助下的一种新型成像技术。CLSM是一个基于光学共聚焦原理, 利用计算机三维断层成像技术, 获取高分辨率图像的成熟的影像分析技术, 它能直观、实时、动态和无创地观测皮肤病发生、发展、皮损情况及其治疗疗效, 其主要的优势在于能在短时间内用无创的方式在体

内或体外获得光学图像, 并且这些图像是在表皮或者真皮浅层不同深度, 与表皮相平行的方向得到的, 它并不需要物理切割样本^[1]。CLSM的缺陷在于它的检测范围局限于激光能到达组织的深浅, 只能到达真皮浅层部位。激光扫描共聚焦显微镜功能强大, 与其他的生物学技术(如免疫组化、原位杂交技术等)相结合, 使其检测范围进一步扩大。

2 CLSM 的主要观察内容

对于正常皮肤将 CLSM 与组织病理标本对照显示具有良好的对应关系, 角质层具有较高折射率, 显示为粗糙的表面和裂隙, 颗粒层的表现为明亮的颗粒状的胞质围绕着大的较暗的区域即胞核, 这些颗粒状的物质实际为细胞器和一些微观结构, 其下方的棘细胞体积小于颗粒层的细胞, 呈蜂窝状的致密结构, 基底层的细胞比棘层细胞更为明亮, 在基底细胞层的黑色素细胞表现为明亮的盘状, 在真皮乳头层可观察到毛细血管和红细胞, 在真皮乳头层及网状层还可看见交错分布的胶原纤维和胶原纤维束, 之间有暗色间隙^[2]。曝光部位或肤色较深的皮肤角质层更为明亮, 并且曝光部位皮肤的角质层的裂隙和起皱现象更为明显, 真皮乳头层的排列更为不规则。因此, 可以应用 CLSM 观察真皮表皮交界处胶原纤维的分布和数量, 以及光老化部位和光保护部位弹力纤维的主要分布情况^[3-4]。而传统的检查方法则需要通过活体组织检查和弹力纤维的染色, 不仅有创性, 耗费时间也很长。还可应用 CLSM 观察在不同人种表皮神经分布, 在病变和正常皮肤神经分布差异, 观察汗腺的分布和神经支配情况, 神经再生模式^[5]等。同时, 在离子导入、

超生波导入和电穿孔技术^[5]也可同 CLSM 在微观层面观察作用效果和作用机制。

3 CLSM 在非肿瘤性皮肤病皮损检查中的应用

3.1 红斑鳞屑性疾病 Koller 等^[1]利用 CLSM 对红斑鳞屑性疾病如银屑病、接触性皮炎、慢性盘状红斑狼疮 (CDLE)、亚急性性皮肤红斑狼疮 (SCLE)、蕈样肉芽肿 (MF) 等进行观察, 其中对诊断银屑病、接触性皮炎的敏感性和特异性较高, MF 和狼疮性疾病较低。寻常型银屑病可以实时观察到一些特征性的病理改变, 如角化不全、颗粒层变薄或消失、真皮乳头迂曲、扩张的毛细血管, 表皮均可见炎症细胞, 特别是表皮内的炎症细胞聚集形成的 Munro 微脓肿具有诊断价值^[6], 其特异性高达 96.4%, 但并不代表是惟一标准, 也要结合以上的病变特征^[7]。在银屑病中可观察到明显的棘层增厚, 厚度为 75~300 nm (正常皮肤棘层厚度为 60~90 nm), 真皮乳头增宽大于 100 nm (正常皮肤一般大于 80 nm), 其中 92% 的患者观察到颗粒层细胞的减少或消失, 而在活检标本中仅有 64% 的患者观察到这一现象, 推测与颗粒层在 CLSM 下不易于辨认有关。此外, 在 CLSM 下海绵水肿的发生率 (72%) 高于活检组织 (44%), 推测可能与在获取组织过程中的挤压和制片过程中固定等因素有关。Wolberink 等^[8]用 CLSM 对寻常型银屑病 UVB 照射进行细胞层面的疗效监测, 并指出 CLSM 还可用于炎症性皮肤病的疗效观察。在接触性皮炎的皮损内可以观察到角质层细胞排列紊乱, 炎症细胞向表皮的迁移, 表皮水肿, 真皮上部水疱的形成或破裂, 真皮内毛细血管的扩张, 毛细血管血流量增加。角化不全、界面皮炎、亲表皮的大小不一的淋巴细胞、扩张的毛细血管这是诊断 CDLE 和 SCLE 的重要线索。在 MF 中除了界面皮炎的特征外, 还可观察到表皮上方一些较圆的细胞的浸润, 成巢分布或沿着表皮的基底细胞处散在分布, 这代表异性的淋巴细胞。此外, 角质层排列紊乱, Kogoj 和 Pautrier 微脓肿, 海绵水肿没有太大的诊断价值, 在使用过程中的诊断标准主要依赖于组织学的特点。对于 MF 和狼疮类疾病诊断的敏感性较低主要由于二者有着相似的诊断学上的特征性, 如界面皮炎、亲表皮的非典型的淋巴细胞等。

3.2 光化性疾病 日光辐射是皮肤肿瘤最主要的危险因素之一, 日常使用的防晒霜主要为了预防急性或慢性光化性疾病, 防晒指数的测定依赖于最小红斑量。UVB 照射可损伤角质细胞的 DNA, 胸腺嘧啶二聚体形成特征的指纹突变, 细胞内途径参与识别和修复紫外线诱导 DNA 损伤, 如果不能修复, 通过半胱天冬酶途径发生凋亡, 形成“晒伤”细胞^[9]。CLSM 发现在光照的皮肤厚度增加, 皮肤反射力减弱, 血管扩张, 可用于在细胞水平对防晒产品的功效分级、日晒伤的分类。Langley 等^[10]对 10 名志愿者在曝光部位和光防护部位进行的观察发现, 曝光部位的皮肤在共聚焦显微镜下显示更明亮的角质层和更多裂隙, 更多的不规则的乳头状突起, 长的胶原束增加, 角质细胞的颗粒更加密集, 棘细胞数量减少, 基底细胞数量增加以及角质层的增厚。以往对急性及慢性光化性疾病的评价主要通过活体组织检查标本的评估分析, 应用共聚焦显微镜可以在体内进行皮肤的实时监测, 并且可以多次对同一部位皮肤进行检测。

3.3 色素性疾病 CLSM 对黑色素细胞、嗜色素细胞等进行观察, 着色的角质细胞表现为多边形的细胞, 内含明亮的颗粒状的胞浆, 黑色素细胞表现为明亮、圆形或椭圆形、梭形或树枝状的细胞, 黑色素含量越高, 在 CLSM 中的成像越明亮。在对色素减退疾病如白癜风、无色素痣及炎症后色素减退斑的观察中发现, 在进展期或稳定期的白癜风, CLSM 显示出色素的完全或部分缺失, 在真皮浅层发现的颗粒或树突状物质提示白癜风

开始发生色素沉着。在无色素痣中, 真皮乳头环变得不完整, 内含的黑色素明显减少, 而且色素在此区域的分布不均匀。而炎症后色素减退斑的黑色素含量取决于炎症的部位和深度, 此外, 嗜色素细胞只出现在炎症后色素减退斑的部位^[11]。

3.4 感染性疾病 有报道在对 3 例二期梅毒的患者皮疹做 CLSM 检查, 在角质层细胞发现螺旋形的小的细长的明亮的物质, 免疫组化证实是螺旋体, 在 CLSM 下螺旋体的蛋白具有高的折光性, 因此, 非常明亮, 这些患者在暗视野显微镜下均未观察到螺旋体的存在, 其中 1 例患者暗视野和血清学检查均为阴性, 但后期发现血清学为阳性, 认为 CLSM 用来观察螺旋体这项技术的敏感性比较高, 但具体的敏感性和特异性还没有确切的数据。但 CLSM 的局限在于观测深度, 不能观察到真皮内及血管壁螺旋体及其活动, 研究还发现螺旋体在颗粒层是聚集存在, 在棘层和基底层则分散分布, 同时, 因角质层细胞比较致密, 细胞黏附力较强, 因此, 螺旋体在其中的运动十分缓慢^[12]。同时, 有学者利用 CLSM 观察到感染性皮肤上金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌形成多糖包被的微克隆, 这使得单用一种抗菌药物难以控制感染^[13]。光动力疗法作为近年治疗 HPV 感染性疾病及部分肿瘤性疾病的新手段, 其疗效高、创伤小, 具有很好的应用前景。将光敏物质外用于肿瘤或疣体表面或者给患者注射光敏剂, 再用特定波长的光照射致病区域, 使组织吸收的光敏剂受到激发, 继而产生细胞毒性作用, 进而导致细胞受损乃至死亡。其中药物前体 5-氨基酮戊酸 (5-ALA) 是人体亚铁血红素合成的前体物质, 在细胞内转化为强光敏性物质原卟啉 IX, 激光照射后产生大量单线态氧和自由基, 在细胞内近距离攻击生物膜结构, 利用 CLSM 可观察到原卟啉 IX 的聚集情况^[14]。

4 CLSM 在皮肤肿瘤检查中的应用

4.1 恶性黑色素瘤 CLSM 对黑色素敏感, 反射指数高。因此, 对于色素性肿瘤如色素性基底细胞癌、恶性黑色素瘤 (malignant melanoma, MM)、色素痣等的诊断具有很大优势。Gerger 等^[15]发现在良性的色素痣中黑色素细胞在 CLSM 表现为圆形或椭圆形明亮的单一核的细胞, 并且亮度均匀, 角化细胞边界清楚, 在 MM 中细胞排列紊乱, 细胞表现为多形性, 形状不规则, 角化细胞边界不清或缺失, 通常呈现多分支的树突样结构, 亮度不均匀。对于表皮真皮交界处的观察对诊断 MM 提供重要线索, 在诊断 MM 时, 结构紊乱和细胞的多形性是最为关键的^[16]。有学者还提出在 CLSM 中诊断 MM 的标准, 主要表现为表皮各层形成孤立的团块, 黑色素细胞数量增加, 明显增生变大, 细胞体积明显大于角质细胞, 在 CLSM 中胞质显示出强信号, 并且这些黑色素细胞显示出树突样结构, 出现异型性, 黑色素细胞在表皮真皮交界处如同 paget 细胞样增生^[17], 异常的黑素细胞的增殖, 破坏了角质细胞的蜂巢结构, 使其结构模糊或消失。但 paget 细胞样增生模式还可见于 Spitz's 痣、先天性色素痣以及激光治疗后的色素痣等, 所以, 它只能作为诊断线索之一。其局限性仍在于无法评估肿瘤的浸润深度。

4.2 基底细胞癌 在组织病理中瘤团周围细胞呈栅栏状排列, 中间细胞排列不规则, 瘤细胞团周围裂隙对诊断基底细胞癌具有特异性的诊断价值。通常认为瘤细胞团周围的裂隙是由于在制片 (固定、脱水、包埋) 过程中瘤体组织的收缩造成的, 最早认为是 BCC 的基底细胞蛋白合成减少, 使得肿瘤组织和真皮组织粘连性降低所致。然而, 在冰冻切片内仍有裂隙存在, 因此认为还有其他原因导致这种现象。在 CLSM 对活体组织进行无创实时的观察发现裂隙也是存在的, 是由于黏液等无定形物质的沉积所致^[18]。在 CLSM 中可以观察到在同一轴面单一核细胞延长和极化是诊断 BCC 的特异性的标准^[19], 其

他的特征还包括多形性的角质细胞、真皮内炎细胞的浸润、栅栏状细胞排列等。

4.3 鳞状细胞癌 有报道对口腔黏膜发生的鳞状细胞癌进行 CLSM 的观察表明,细胞大小、细胞核大小及形态发生明显变化,即异形性,并可以观察在细胞层面的变化,如核深染、胞浆比例升高、细胞和胞核的多形性等^[20],其中核深染表现为核的密度值(245.916 nm)远远高于正常组织(132.006 nm)和一些良性肿瘤的测量值,表明肿瘤细胞增生活跃。

激光共聚焦扫描显微镜的出现提供了无创、快速检测的一种方法,主要对表皮及真皮浅层的病变提供诊断,其诊断的灵敏性和特异性对不同疾病有所差别。随着研究的进一步深入,其应用范围和诊断的准确性将进一步提高。

参考文献:

- [1] Koller S, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, et al. In vivo reflectance confocal microscopy of erythematous skin diseases[J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(6): 536-540.
- [2] Huzaira M, Rius F, Rajadhyaksha M, et al. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(6): 846-852.
- [3] Watson RE, Griffiths CE, Craven NM, et al. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin distribution at the dermal-epidermal junction [J]. *Dermatol*, 1999, 112(5): 782-787.
- [4] Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, et al. Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging[J]. *Photochem Photobiol*, 2008, 84(6): 1421-1430.
- [5] Simone DA, Nolano M, Johnson T, et al. Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function[J]. *Neuro Sci*, 1998, 18(21): 8947-8959.
- [6] Ardigo M, Cota C, Berardesca E, et al. Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis[J]. *Euro Acad Dermat Venereo*, 2009, 23(6): 1468-1483.
- [7] Zhong LS, Wei ZP, Liu YQ. Sensitivity and specificity of munro microabscess detected by reflectance confocal microscopy in the diagnosis of psoriasis vulgaris[J]. *J Dermatol*, 2012, 39(3): 282-283.
- [8] Wolberink EA, van Erp PE, de Boer-van Huizen RT, et al. Reflectance confocal microscopy: an effective tool for monitoring ultraviolet B phototherapy in psoriasis[J]. *Br J Dermatol*, 2012, 167(2): 396-403.
- [9] Ulrich M, Ruter C, Astner S, et al. Comparison of UV-induced skin changes in sun-exposed vs. sun-protected skin: preliminary evaluation by reflectance confocal microscopy [J]. *Br J Dermatol*, 2009, 161(1): 46-53.
- [10] Langley RG, Burton E, Walsh N, et al. In vivo confocal scanning laser microscopy of benign lentigines: comparison to conventional histology and in vivo characteristics of lentigo maligna[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 55(1): 88-97.
- [11] Xiang W, Xu A, Xu J, et al. In vivo confocal laser scanning microscopy of hypopigmented macules: a preliminary comparison of confocal images in vitiligo, nevus depigmentosus and postinflammatory hypopigmentation [J]. *Lasers Med Sci*, 2010, 25(4): 551-558.
- [12] Venturini M, Sala R, Semenza D. Reflectance confocal microscopy for the in vivo detection of treponema pallidum in skin lesions of secondary syphilis[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2009, 60(4): 639-642.
- [13] Akiyama H, Morizane S, Yamasaki O, et al. Assessment of streptococcus pyogenes microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy[J]. *J Dermatol Sci*, 2003, 32(3): 193-199.
- [14] De Rosa FS, Marchetti JM, Thomazini JA, et al. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy[J]. *J Control Release*, 2000, 65(3): 359-366.
- [15] Gerger A, Koller S, Kern T, et al. Diagnostic applicability of in vivo confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(3): 493-498.
- [16] Marghoob AA, Charles CA, Busam KJ, et al. In vivo confocal scanning laser microscopy of a series of congenital melanocytic nevi suggestive of having developed malignant melanoma[J]. *Arch Dermatol*, 2005, 141(11): 1401-1412.
- [17] Busam KJ, Charles C, Lohmann CM, et al. Detection of intra-epidermal malignant melanoma in vivo by confocal scanning laser microscopy[J]. *Melanoma Res*, 2002, 12(4): 349-355.
- [18] Ulrich M, Roewert-Huber J, Gonzalez S, et al. Peritumoral clefting in basal cell carcinoma: correlation of in vivo reflectance confocal microscopy and routine histology[J]. *J Cutan Pathol*, 2011, 38(2): 190-195.
- [19] Agero AL, Busam KJ, Benvenuto-Andrade C, et al. Reflectance confocal microscopy of pigmented basal cell carcinoma[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 54(4): 638-643.
- [20] Anuthama K, Sherlin HJ, Anuja N, et al. Characterization of different tissue changes in normal, betel chewers, potentially malignant lesions, conditions and oral squamous cell carcinoma using reflectance confocal microscopy: correlation with routine histopathology[J]. *Oral Oncology*, 2010, 46(2): 232-248.