

· 综述 ·

角膜共聚焦显微镜对糖尿病周围神经病变的诊断价值

刘颖丰 刘芳

【摘要】 目前常用的糖尿病周围神经病变筛查与诊断手段无法做到客观准确以及鉴别高危人群。近年来一种新型检查手段——角膜共聚焦显微镜,可通过无创在体观察和准确定量检测角膜 A δ 和 C 神经纤维的分支密度、长度、迂曲度等,精确诊断糖尿病周围神经病变,且临床研究证明其对糖尿病周围神经病变的早期筛查、预测具有肯定作用,值得在临床推广应用。

【关键词】 角膜共聚焦显微镜;糖尿病周围神经病变;诊断

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270397);上海市科委医学与农业领域支撑计划(15411953100)

Diagnostic value of corneal confocal microscopy on diabetic peripheral neuropathy Liu Yingfeng, Liu Fang. Department of Endocrinology & Metabolism, Shanghai Jiaotong University Affiliated 6th People's Hospital, Shanghai Clinical Medical Center of Diabetes, Shanghai Key Clinical Center of Metabolic Diseases, Shanghai Institute for Diabetes, Shanghai Key Laboratory of Diabetes, Shanghai 200233, China
Corresponding author: Liu Fang, Email: f-liu@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Many instruments of diabetic peripheral neuropathy (DPN) are applied to screen and diagnose DPN, they all either fall into poor objectivity and accuracy, or can not be used to discriminate the high-risk population of DPN. As a newly invented technique, corneal confocal microscopy (CCM) diagnoses DPN precisely by measuring the branch density, fiber length and fiber tortuosity of A δ fibers and C fibers. Moreover, it is recently reported that CCM can predict and detect DPN early, which makes it feasible and profitable to apply in clinical practice.

【Key words】 Corneal confocal microscopy; Diabetic peripheral neuropathy; Diagnose

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81270397); Shanghai Science & Technology Pillar Program in the Field of Medicine and Agriculture (15411953100)

目前,糖尿病周围神经病变(DPN)的诊断和疗效评估主要依靠患者的神经病变相关症状和应用诸多小工具如10 g尼龙丝和128 Hz音叉等,但这些传统检查方式存在主观性和变异性强、重复性差以及敏感性低等问题^[1]。与此同时,这些检查手段主要针对的是单一神经纤维损伤的大神经病变,而DPN的早期病变存在于以无鞘C神经纤维和薄髓A δ 神经纤维为代表的小神经^[2]。这就意味着目前常用的检查方法可能无法发现早期DPN患者以及高危人群。而目前常用于检测小神经病变的两种方式——定量感觉检查和有创皮肤活检检测表皮内神经纤维密度(IENFD)都存在各自的缺陷^[1,3]。因

此,目前急需一种无创、稳定性较好且能敏感特异诊断小神经病变的检查方法。

而近年来,一种可能集以上优点于一身的新型DPN检查方法——在体角膜共聚焦显微镜(CCM)应运而生且已初步在临床证实了其对DPN的诊断价值。

1 角膜神经与CCM

角膜是人体神经支配最为密集的组织。支配角膜的神经主要来自三叉神经的眼支,进入角膜后其绝大多数神经纤维均脱髓鞘,并分为3个主要的分支:基底细胞下神经丛、上皮神经丛和基质神经。其中,位于角膜上皮细胞的基底细胞和Bowman层之间的基底细胞下神经丛是CCM在诊断DPN时的主要观察对象^[4]。除此之外,在利用CCM进行DPN研究的过程中,朗格汉斯细胞在DPN发病中的免疫相关作用也受到了关注^[5]。

CCM的主要成像原理是使用针孔大小的微小

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.03.009

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科,上海市糖尿病临床医学中心,上海市重中之重代谢病临床医学中心,上海市糖尿病研究所,上海市糖尿病重点实验室

通信作者:刘芳,Email:f-liu@sjtu.edu.cn

光源,通过物镜折射至目标表面,同时反射光也再次通过物镜平行折射至观察孔,因照明光和反射光通过的路径相同,即形成所谓的“共聚焦”,而观察孔可以反射其他光源发出的光线,从而解决传统显微镜成像分辨率较低的问题^[6]。常用的CCM主要有3种:串联式CCM、裂隙式CCM和激光式CCM。其中目前最常用的是激光式CCM,其主要优点是分辨率更高且提供更干净观察角膜内皮和基质的视野^[6]。

2 利用 CCM 诊断 DPN

2.1 CCM 诊断 DPN 相关参数 CCM 用于诊断 DPN 的主要参数包括:(1)角膜神经纤维密度(CNFD):每平方毫米内神经主干的数量。(2)角膜神经纤维长度(CNFL):每平方毫米内主要神经和分支的长度。(3)角膜神经分支密度(CNBD):每平方毫米内神经分支的数量。(4)角膜神经纤维迂曲度(CNFT):总神经纤维的弯曲度。以上4个指标均被证实有较好的可重复性,而CNFL的可重复性是其中最高的^[4]。

2.2 CCM 诊断 DPN 的有效性 与健康人群相比,许多研究已证实 DPN 患者的 CNFD、CNFL 和 CNBD 均明显下降^[7-9]。Ahmed 等^[7]对 89 例 1 型糖尿病(T1DM)患者和 64 名健康对照者做相关横断面调查发现,从正常对照组到 T1DM 患者未合并 DPN 组,再到 T1DM 患者合并 DPN 组,其 CNFD、CNFL 和 CNBD 逐渐下降,且差异有统计学意义。Zhivov 等^[9]同样发现 18 例 2 型糖尿病(T2DM)合并 DPN 患者[病程为(15.1±9.9)年],以上 3 项 CCM 指标均小于正常对照者。而 Petropoulos 等^[10]已证明人工 CNFD 和自动 CNFL 对于诊断 DPN 有较高的价值。另有研究证明,标准化的 CNFL 相比未标准化的 CNFL,能更好的区分糖尿病患者是否合并 DPN,同时与 DPN 以及现存的 DPN 传统检查方式有更高的相关性^[11]。

而关于 CNFT 在 DPN 患者中的变化仍存在争议:大部分研究表明 CNFT 是升高的^[5,12]。Mehra 等^[12]发现 20 例 T1DM 合并 DPN 患者的 CNFT 明显高于正常对照者。Tavakoli 等^[5]研究 128 例 T2DM 合并 DPN 患者亦得出相同结论。而 Messmer 等^[13]对比了 67 例糖尿病患者,其中 13 例 T1DM 患者,54 例 T2DM 患者,其 CNFT 与正常对照者相比,差异无统计学意义。Tavakoli 等^[14]对比 25 例糖尿病患者,其中 15 例为 T1DM 患者,其 CNFT 明显低于正常对照者。

已有关于以上几个指标诊断 DPN 敏感性和特异性的研究,其中以 CNFL 的诊断价值最高。Ahmed 等^[7]发现,利用 CNFL 诊断 DPN,将诊断切点定位小于 14 mm/mm²时,其敏感性为 85%,特异性

为 84%;而将切点定位小于 11.5 mm/mm²时,其诊断 DPN 的特异性为 93%,阳性似然比为 8.5;若将切点定位大于 15 mm/mm²,则 CNFL 排除 DPN 诊断的敏感性为 91%,阴性似然比为 0.16。表明在利用 CNFL 诊断 DPN 时必须综合考虑其他因素,避免漏诊和误诊。

2.3 CCM 利于 DPN 的早期诊断、评估病情及疗效评价 在早期诊断方面,首先,有研究证实:在正常人群中,糖化血红蛋白水平与 CNFL 呈负相关^[15]。这为利用 CNFL 在糖尿病发病前诊断 DPN 提供了初步依据,而在糖耐量减低(IGT)人群中,其 CNFL、CNFD、CNBD 以及 IENFD 均小于健康对照^[16]。这不但表明 IGT 人群已经存在神经纤维的病理变化,而且表明 CCM 可以有效诊断糖尿病前期患者的神经病变情况。在最新对于 IGT 人群进行的为期 3 年的随访研究中,最终进展为 T2DM 的受试者,其基线 CNFL、CNFD 和 CNBD 均低于正常对照者,且在随访过程中 CNFL 和 IENFD 会逐渐下降。但是,随访结束后仍维持在 IGT 状态和恢复正常糖耐量状态的研究对象,其基线 CCM 指标和 IENFD 均与正常对照者无差别^[8]。这与 Asghar 等^[16]的研究结果存在一定出入,但仍能再次证实 CCM 能有效评价糖尿病前期患者神经病变的情况,甚至可能为糖尿病的发生提供线索。

在评价 DPN 病情方面,已有众多研究表明 CCM 相关指标能有效指示 DPN 的严重程度:首先, CNFL、CNFD 和 CNBD 和神经功能缺损评分以及 Neuropad (欧米诺汗印法检测皮肤自主神经的泌汗功能)呈负相关,和上下肢神经传导速度呈正相关^[12]。同时, CNFL 还与冷阈值测定、激光多普勒发光检查以及心率变异度存在明显相关性。在 T1DM 患者中, CNFL 每下降 1 mm/mm²,其冷阈值也将下降 0.61℃,激光多普勒发光面积也将下降 0.07 cm²^[17]。

最后,在评价对于 DPN 疗效方面,CCM 相关指标已被证实能客观和敏感评价早期神经纤维的再生。Tavakoli 等^[14]研究表明,在糖尿病患者降低总胆固醇 2 年后,其 CNFD、CNBD 和 CNFT 均同时得到明显改善,而糖化血红蛋白的下降和 CNBD 的上升有明确的相关性;其团队进一步研究证明,CCM 相关指标能明确指示 T1DM 患者在进行肾脏胰腺移植后神经病变的改善,而传统指标(如神经功能缺损评分、定量感觉测定和 IENFD)均无明显变化^[18]。这表明在指示神经纤维再生和恢复方面,CCM 相关指标的敏感性明显好于传统指标,是更好的指示 DPN 治疗效果的评价指标。而 Azmi 等^[8]对于 IGT 人群 3 年的随访研究指出,血糖恢复正常的被观察者,其 CNFL、CNFD 和 CNBD 均明显升高,但 IENFD 却明显

降低,进一步表明 CCM 相关指标对于 DPN 疗效评价的准确性。

3 未来展望

目前,CCM 已经成为诊断 DPN 的新型手段之一,许多相关的最新研究犹如雨后春笋般涌现。而 CCM 在成为诊断 DPN 的“金标准”之前还有一段路要走。

首先,目前相关 CCM 的研究样本量还不是很大;与此同时,利用 CCM 诊断 DPN 的研究中多数研究对象都为 T1DM 患者。因此,增加样本量以及包括 T2DM 在内的其他类型糖尿病,是下一步研究需要考虑的。另一方面,关于 CCM 诊断 DPN 的相关研究多为横断面调查,缺乏动态观察性研究的相关数据。

同时,CCM 的相关指标虽然已经很大程度上由 CCM 自动获得或捕捉,但是其相关数据的获得及结果的准确度仍与 CCM 操作者和操作规程有一定的关系;再者,自动纤维测量和图片自动分析技术的提高仍然是 CCM 准确诊断 DPN 不可缺少的因素。

最后,其他疾病(如干眼症、克罗恩病、自身免疫性神经病变等)均能引起上皮下神经纤维丛的病变^[19-20]。因此,在利用 CCM 诊断 DPN 时,可能需要排除其他疾病的干扰,才能准确评估患者神经病变的情况。

参 考 文 献

- [1] Freeman R, Chase KP, Risk MR. Quantitative sensory testing cannot differentiate simulated sensory loss from sensory neuropathy[J]. *Neurology*, 2003, 60(3):465-470.
- [2] Vinik A, Ullal J, Parson HK, et al. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options[J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006, 2(5):269-281. DOI: 10.1038/npendmet0142.
- [3] Lauria G, Lombardi R, Camozzi F, et al. Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy[J]. *Histopathology*, 2009, 54(3):273-285. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03096.x.
- [4] Papanas N, Ziegler D. Corneal confocal microscopy: a new technique for early detection of diabetic neuropathy[J]. *Curr Diab Rep*, 2013, 13(4):488-499. DOI: 10.1007/s11892-013-0390-z.
- [5] Tavakoli M, Boulton AJ, Efron N, et al. Increased Langerhan cell density and corneal nerve damage in diabetic patients: role of immune mechanisms in human diabetic neuropathy[J]. *Cont Lens Anterior Eye*, 2011, 34(1):7-11. DOI: 10.1016/j.clae.2010.08.007.
- [6] Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. *In vivo* confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 37(1):100-117. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2009.02016.x.
- [7] Ahmed A, Bril V, Orszag A, et al. Detection of diabetic sensorimotor polyneuropathy by corneal confocal microscopy in type 1 diabetes: a concurrent validity study[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(4):821-828. DOI: 10.2337/dc11-1396.
- [8] Azmi S, Ferdousi M, Petropoulos IN, et al. Corneal confocal microscopy identifies small-fiber neuropathy in subjects with impaired glucose tolerance who develop type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(8):1502-1508. DOI: 10.2337/dc14-2733.
- [9] Zhivov A, Winter K, Hovakimyan M, et al. Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e52157. DOI: 10.1371/journal.pone.0052157.
- [10] Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H, et al. Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with *in vivo* corneal confocal microscopy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(4):2071-2078. DOI: 10.1167/iovs.13-13787.
- [11] Edwards K, Pritchard N, Vagenas D, et al. Standardizing corneal nerve fibre length for nerve tortuosity increases its association with measures of diabetic neuropathy[J]. *Diabet Med*, 2014, 31(10):1205-1209. DOI: 10.1111/dme.12466.
- [12] Mehra S, Tavakoli M, Kallinikos PA, et al. Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration after pancreas transplantation in patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(10):2608-2612. DOI: 10.2337/dc07-0870.
- [13] Messmer EM, Schmid-Tannwald C, Zapp D, et al. *In vivo* confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010, 248(9):1307-1312. DOI: 10.1007/s00417-010-1396-8.
- [14] Tavakoli M, Kallinikos P, Iqbal A, et al. Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy[J]. *Diabet Med*, 2011, 28(10):1261-1267. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2011.03372.x.
- [15] Wu T, Ahmed A, Bril V, et al. Variables associated with corneal confocal microscopy parameters in healthy volunteers: implications for diabetic neuropathy screening[J]. *Diabet Med*, 2012, 29(9):e297-e303. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2012.03678.x.
- [16] Asghar O, Petropoulos IN, Alam U, et al. Corneal confocal microscopy detects neuropathy in subjects with impaired glucose tolerance[J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(9):2643-2646. DOI: 10.2337/dc14-0279.
- [17] Sivaskandarajah GA, Halpern EM, Lovblom LE, et al. Structure-function relationship between corneal nerves and conventional small-fiber tests in type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(9):2748-2755. DOI: 10.2337/dc12-2075.
- [18] Tavakoli M, Mitu-Pretorian M, Petropoulos IN, et al. Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation[J]. *Diabetes*, 2013, 62(1):254-260. DOI: 10.2337/db12-0574.
- [19] Lalive PH, Truffert A, Magistris MR, et al. Peripheral autoimmune neuropathy assessed using corneal *in vivo* confocal microscopy[J]. *Arch Neurol*, 2009, 66(3):403-405. DOI: 10.1001/archneurol.2008.587.
- [20] Gemignani F, Ferrari G, Vitetta F, et al. Non-length-dependent small fibre neuropathy. Confocal microscopy study of the corneal innervation[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(7):731-733. DOI: 10.1136/jnnp.2009.177303.

(收稿日期:2016-06-12)