

· 论 著 ·

肥大细胞、神经纤维在先天性肠无神经节细胞症中的相关性研究*

王士奇¹, 金先庆^{1△}, 朱 进², 张 艳¹, 丁雄辉¹, 孙艳辉¹

(1. 重庆医科大学附属儿童医院胃肠新生儿外科/儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室/儿科学重庆市重点实验室/重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地 400014;

2. 重庆医科大学临床病理诊断中心(生命科学院) 400016)

摘要:目的 探讨肥大细胞、神经纤维在先天性肠无神经节细胞症(HD)患者不同肠段中有无数量及形态变化以及在 HD 中的可能作用。方法 选择 2010 年 1 月至 2011 年 12 月重庆医科大学附属儿童医院收治的 40 例 HD 患者肠组织标本为实验组。选择 10 例尸检患儿(死于非消化道疾病)直肠标本作为对照组,分别采用甲苯胺蓝化学染色法、S-100 免疫组织化学染色法及复合染色法处理,显微镜观察肥大细胞及神经纤维的分布及变化情况。结果 镜下肥大细胞主要集中在肠段黏膜层及黏膜下层,与神经纤维毗邻,HD 患者痉挛段肥大细胞较对照组及扩张段明显增多($P < 0.05$),脱颗粒明显,黏膜下层 S-100 阳性神经纤维表达增强($P < 0.05$),肥大细胞密度与神经纤维的密度及面积具有相关性($r = 0.573, P < 0.01; r = 0.514, P < 0.01$)。结论 肥大细胞与神经纤维关系密切,两者的变化及相互作用在 HD 的发病机制中具有重要意义。

关键词:先天性肠无神经节细胞症;肥大细胞;神经纤维

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.15.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)15-1473-03

Relationship between mast cells and nerve fibers in colon of patients with Hirschsprung's disease*

Wang Shiqi¹, Jin Xianqing^{1△}, Zhu Jin², Zhang Yan¹, Ding Xionghui¹, Sun Yanhui¹

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders;

2. Department of Pathology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate whether there are quantitative and morphological changes of mast cells and nerve fibers in different segments of the colon, and to explore their roles in the pathogenesis of Hirschsprung's disease (HD). **Methods** The stenotic, transitional and dilated segments in 40 patients with HD were collected as the experimental group in Children's Hospital of Chongqing Medical University from January 2010 to December 2011. 10 samples died of non-gastrointestinal disease were collected as the control group. Each specimens was stained by toluidine blue, S-100 immunohistochemistry and compounding. The distribution of mast cells and nerve fibers were observed by light microscope, and the results were evaluated by color image analyzer. **Results** The mast cells were localized in mucosal and submucosal, and they were notably present around the nerve fibers. In the experimental group, the number of mast cells in stenotic intestine was significantly higher than that in the dilated intestine and the control group ($P < 0.05$). Mast cells de-granulation and S100-positive fibers were seen significantly in the stenotic intestine group ($P < 0.05$). The number and the area of S100-positive fibers were positively correlated with the number of mast cells ($r = 0.573, P < 0.01; r = 0.514, P < 0.01$). **Conclusion** The close relations exist between mast cells and nerve fibers, their changes and interaction may play an important role in the pathogenesis of HD.

Key words: Hirschsprung's disease; mast cells; nerve fibers

先天性肠无神经节细胞症(Hirschsprung's disease, HD)是一种由于肠内正常神经节缺如导致肠功能障碍而影响儿童健康的疾病,是小儿常见的消化道畸形,占消化道畸形的 1/4,临床主要表现为便秘,小肠、结肠炎等。近年来研究表明,HD 的发病与免疫因素有关,但其具体机制不详^[1]。作为胃肠道免疫系统重要成员,肥大细胞与肠神经系统(enteric nervous system, ENS)之间相互作用,肥大细胞被有害信号激活后,通过释放组胺等介质将信号放大并传递至邻近的神经纤维或神经元,ENS 被激活后亦可释放 P 物质等神经递质或神经肽反作用于肥大细胞参与免疫系统及胃肠道功能的调节^[2]。这种作用对维持胃肠道正常的功能至关重要,并与肠易激综合征、食物过敏相关慢性便秘等胃肠道疾病的发生、发展密切相关^[3-4]。现将本院 40 例 HD 患者的肥大细胞、神经纤维在不同肠段中有无数量、形态变化以及在 HD 中的可能作用报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 1 月至 2011 年 12 月重庆医科大学附属儿童医院收治的 40 例 HD 患者肠组织标本为实验组(痉挛段、移行段及扩张段)。其中,男性 31 例,女性 9 例,年龄 14 d~13 岁,其中小于 1 个月 3 例,1 至 3 个月 11 例,3 个月至 1 岁 11 例,>1 岁 15 例,临床分型为常见型 29 例,长段型 6 例,短段型 5 例。选择同期 10 例尸检患儿(死于消化道疾病直肠标本)为对照组,其中,男 6 例,女 4 例,年龄 10 d~12 岁。取病例中肠管全层组织,以痉挛段、移行段及扩张段肠组织 HE 染色镜下可见发育成熟的神经节细胞。患者术前均经钡剂灌肠、直肠黏膜乙酰胆碱酯酶组织化学、直肠肛管测压检查,术中冰冻及术后 HE 染色病理检查均明确诊断为痉挛段肌间神经丛中神经节细胞缺如,病理资料完整。

1.2 试剂与仪器 甲苯胺蓝(toluidine blue, TB, 上海化学试剂

剂公司)、S-100 兔抗人抗体(福州迈新生物技术开发公司)、即用型免疫组化 Elivision™ super 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)、二氨基联苯胺(DAB)显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)、Nikon ECLIPSE 55i 显微镜、YC. YX-2050 型病理图文分析系统(ZEISS 公司)。

1.3 TB 染色方法 取石蜡切片 60 ℃ 烤片 2 h;脱蜡、水化;0.5%TB 染色 20 min;自来水冲洗;0.5%冰醋酸分化,镜下观察至肥大细胞颗粒呈紫色;中性树脂胶封片。

1.4 S-100 免疫组织化学染色 取石蜡切片 60 ℃ 烤片 2 h;脱蜡、水化;抗原修复;3%双氧水室温静置 10 min;滴加一抗,4 ℃ 过夜;第 2 天拿出玻片,0.01 mol/L PBS 冲洗;滴加 Elivision™ super 试剂盒中 A 液(放大剂),室温孵育 10 min;滴加二抗试剂盒中 B 液(多聚酶结合物),室温孵育 10 min;DAB 显色 3 min;自来水冲洗;苏木精复染;自来水冲洗;中性树脂胶封片观察。用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.5 复合染色 按上述免疫组织化学染色步骤至 DAB 显色;0.5%TB 染色 20 min;自来水冲洗;0.5%冰醋酸分化,镜下观察至肥大细胞颗粒呈紫色;中性树脂胶封片。

1.6 结果判定 肥大细胞 TB 染色显微镜下呈蓝紫色,在黏膜或黏膜下层随机取 10 个 200 倍视野,分别计数完整肥大细胞和脱颗粒肥大细胞数量,肥大细胞密度以肥大细胞总数/10 表示,脱颗粒肥大细胞比值以脱颗粒肥大细胞数/肥大细胞总数表示。S-100 阳性神经纤维在镜下呈棕黄色,在黏膜下层中随机选取 10 个 200 倍视野,观察完整神经丛个数并记录,神经纤维密度以神经纤维总数/10 表示。平均神经纤维面积由 YC. YX-2050 型病理图文分析系统算出。

1.7 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两变量间关系运用 Pearson 相关系数, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肥大细胞染色及密度 肥大细胞 TB 染色光镜下可见胞浆呈蓝紫色,胞核浅蓝色或不染色,未脱颗粒的肥大细胞完整,呈圆形或梭形,胞质均匀,胞膜清晰,脱颗粒细胞形态不规则,胞膜破溃,颗粒涌出胞膜。肥大细胞主要分布于黏膜固有层、黏膜下层,在肌层及浆膜层分布较少。实验组痉挛段、移行段、扩张段及对照组肥大细胞密度(个)分别为 18.05 ± 3.38 、 11.54 ± 2.82 、 4.09 ± 0.94 、 2.28 ± 0.60 ,差异有统计学意义($P < 0.05$),痉挛段及移行段较对照组脱颗粒现象明显($P < 0.05$),见封 3 图 1,各肠段组具体测量结果见表 1。

2.2 神经纤维密度及形态 显微镜下可见 S-100 免疫反应阳性的神经纤维呈黄棕色颗粒,位于黏膜下神经丛及肌间神经丛中,呈散在的点状、线状或簇集分布。而神经节细胞呈阴性表达,形成神经丛中的“空白区”。在 HD 患者痉挛段黏膜下层可见 S-100 阳性反应的神经纤维增生明显,染色增强,呈波浪形,面积较对照组明显增大($P < 0.05$),见封 3 图 2,各不同肠段组测量具体结果见表 2。

表 1 两组患儿肥大细胞密度及脱颗粒肥大细胞比值对比($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肥大细胞密度(个)	脱颗粒肥大细胞比值(%)
实验组			
痉挛段	40	18.05 ± 3.38^{ab}	25.39 ± 4.67^{ab}
移行段	40	11.54 ± 2.82^{ab}	20.55 ± 5.32^{ab}
扩张段	40	4.09 ± 0.94^a	12.05 ± 2.89
对照组	10	2.28 ± 0.60	10.92 ± 3.51

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与实验组扩张段比较。

表 2 两组患儿黏膜下层 S-100 阳性神经纤维测量对比($\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经纤维密度(个)	平均神经纤维面积(μm^2)
实验组			
痉挛段	40	8.71 ± 2.82^{ab}	1461.56 ± 537.27^{ab}
移行段	40	6.70 ± 2.05^{ab}	996.57 ± 395.09^{ab}
扩张段	40	3.53 ± 1.30	457.46 ± 159.10
对照组	10	3.02 ± 1.12	380.13 ± 182.17

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与实验组扩张段比较。

2.3 肥大细胞与神经纤维相关性 复合染色可见肥大细胞主要分布在神经纤维及血管周围,在 S-100 阳性神经纤维周围更易观察到肥大细胞簇集分布或沿神经走向分布,见封 3 图 3。在 HD 患者肠管中,肥大细胞密度与神经纤维密度($r = 0.573$, $P < 0.01$)及面积($r = 0.514$, $P < 0.01$)呈正相关。

3 讨论

HD 又称先天性巨结肠,是以病变肠管神经节细胞缺如为主要特征的一类疾病,同时伴有功能降低^[5]。其病因和发病机制目前尚不完全清楚,主要集中在 4 个理论:遗传学改变、神经嵴细胞移行中断理论、微环境改变理论以及免疫机制理论,先前的研究主要集中在遗传学及神经嵴细胞移行中断两个方面,而免疫学及微环境方面相对较少。近年,有研究提出,肥大细胞可能在 HD 的发病机制中扮演重要角色^[1,6],但关于其作用机制的报道尚少。

肥大细胞是重要的效应和调节性免疫细胞,源于骨髓的前体细胞,广泛分布于呼吸道、消化道和泌尿道的黏膜和结缔组织中,在神经-免疫-内分泌网络调节过程中起关键作用。胞质充满圆形嗜碱性颗粒,颗粒内含有多种生物活性物质,如组织胺、蛋白多糖、5-羟色胺、白三烯、血小板活化因子、前列腺素、类胰蛋白酶、糜蛋白酶及多种白细胞介素等^[7]。当肥大细胞受到外界刺激时,会以胞吐方式释放大颗粒内物质(即脱颗粒),进而发挥生理作用^[8]。胃肠道的肥大细胞有两种亚型:即含类胰蛋白酶不含胃促胰酶的肥大细胞,含类胰蛋白酶与胃促胰酶的肥大细胞,参与肠道免疫、消化道的分泌等肠道生理过程,被誉为肠道黏膜的第四道屏障。本实验通过 TB 染色在痉挛段组中发现,不但肥大细胞数量明显增多,且脱颗粒现象明显,与 Kobayashi 等^[1]的研究结果一致,提示肥大细胞可能通过脱颗粒现象在 HD 中发生作用。

S-100 是神经胶质细胞特异性蛋白,存在于神经纤维中,在神经节细胞中无表达。在研究肠神经系统的形态结构特征时,S-100 有较强的标记功能^[9]。本实验中采用复合染色观察肥大细胞与神经纤维的位置关系,效果良好。为避免两种染色间的相互影响,在计数肥大细胞及观察神经纤维形态时又分别进行染色。通过复合染色,可以观察到肥大细胞主要分布在肠段黏膜层及黏膜下层的神经及血管周围,证实肥大细胞与神经纤维之间的解剖学位置关系。进一步研究发现,肥大细胞在 HD 患者中的表达与神经纤维的数量及阳性面积呈显著正相关,提示激活的肥大细胞在一定程度上可以促进神经纤维的增生,机制可能是肥大细胞释放的介质通过旁分泌或内分泌机制作用于邻近的神经纤维或神经元^[10]。痉挛段神经纤维增生明显,肥大细胞数量增多,脱颗粒现象明显,说明增生的神经纤维可以反作用于肥大细胞,可能是通过其释放的 P 物质、降钙素基因相关肽、生长抑素等神经肽或神经递质^[11-12]。本研究结果支持在 HD 患者中肥大细胞与肠神经系统间可能存在“双向”作用。Yadav 等^[13]研究发现,肥大细胞数量与神经纤维大

小仅轻度相关($r=0.274$),这可能与标本来源以及测定方法不同有关。但是,肥大细胞与肠神经系统如何共同作用导致 HD 的发生,肥大细胞数量增多与肠神经节细胞缺失之间的相互联系及作用机制都有待于进一步研究。

HD 是多因素、多机制综合作用的结果,本研究从神经免疫学方面入手,证实肥大细胞可能在 HD 中扮演重要角色,其机制可能与肥大细胞和肠神经系统的双向调节作用有关,这为临床诊断和治疗 HD 提供参考。但是,肥大细胞是否是 HD 形成中的关键因素,应用肥大细胞抑制剂是否可以改善和治疗 HD,还需要通过大量实验来进一步研究。

参考文献:

- [1] Kobayashi H, Yamataka A, Fujimoto T, et al. Mast cells and gut nerve development: implications for Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia[J]. *J Pediatr Surg*, 1999, 34(4): 543-548.
- [2] 杨希林, 方秀才, 刘晓红. 胃肠道肥大细胞与肠神经系统的相互作用[J]. *胃肠病学*, 2010, 15(4): 243-245.
- [3] Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis[J]. *Gut*, 2004, 53(8): 1096-1101.
- [4] Borrelli O, Barbara G, Di Nardo G, et al. Neuroimmune interaction and anorectal motility in children with food allergy-related chronic constipation[J]. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(2): 454-463.
- [5] 朱进, 金先庆. Bcl-2, 钙视网膜蛋白在发育异常肠壁神经节细胞中的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(1): 60-62.
- [6] Hermanowicz A, Debek W, Dzienis-Koronkiewicz E, et al. Topography and morphometry of intestinal mast cells in children with Hirschsprung's disease[J]. *Folia Histochem*

Cytobiol, 2008, 46(1): 65-68.

- [7] He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(3): 309-318.
- [8] Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, et al. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases[J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(12): 2248-2256.
- [9] Krammer HJ, Karahan ST, Sigge W, et al. Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon[J]. *Eur J Pediatr Surg*, 1994, 4(5): 274-278.
- [10] Greenwood-Van Meerveld B, Venkova K, Hicks G, et al. Activation of peripheral 5-HT receptors attenuates colonic sensitivity to intraluminal distension[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2006, 18(1): 76-86.
- [11] De Jonge F, De Laet A, Van Nassauw L, et al. In vitro activation of murine DRG neurons by CGRP-mediated mucosal mast cell degranulation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(1): 178-191.
- [12] Van Op den Bosch J, van Nassauw L, Lantermann K, et al. Effect of intestinal inflammation on the cell-specific expression of somatostatin receptor subtypes in the murine ileum[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2007, 19(7): 596-606.
- [13] Yadav AK, Mishra K, Mohta A, et al. Hirschsprung's disease: is there a relationship between mast cells and nerve fibers[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(12): 493-498.

(收稿日期: 2011-11-09 修回日期: 2012-01-22)

(上接第 1472 页)

- [3] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001.
- [4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [5] Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 cells[J]. *Br J Haematol*, 2001, 115(1): 186-194.
- [6] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*, 2000, 95(3): 952-958.
- [7] Ebner P, Picard F, Richter J, et al. Accumulation of VEGFR-2⁺/CD133⁺ cells and decreased number and impaired functionality of CD34⁺/VEGFR-2⁺ cells in patients with SLE[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2010, 49(1): 63-72.
- [8] Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair[J]. *Circulation*, 2005, 111(22): 2981-2987.
- [9] Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, et al. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental

hypertensive rats and patients with essential hypertension[J]. *Hypertens*, 2005, 23(10): 1831-1837.

- [10] Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis[J]. *Lancet*, 2004, 364(9434): 561-512.
- [11] Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, et al. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(4): 1296-1304.
- [12] Allanore Y, Batteux F, Avouac J, et al. Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2007, 25(1): 60-66.
- [13] Gomer RH. Circulating progenitor cells and scleroderma[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2008, 10(3): 183-188.
- [14] Del Papa N, Cortiana M, Cominal DP, et al. Endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: their possible role in angiogenesis[J]. *Reumatismo*, 2005, 57(3): 174-179.
- [15] Zhou Y, Zhu J, Zou L, et al. Changes in number and biological function of endothelial progenitor cells in hypertension disorder complicating pregnancy[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2008, 28(6): 670-673.

(收稿日期: 2011-12-20 修回日期: 2012-03-08)