

· 论 著 ·

钙视网膜蛋白在先天性无神经节细胞症中的表达特点及临床意义*

张 艳¹, 朱 进², 王士奇¹, 段文娟¹, 丁雄辉¹, 孙艳辉¹, 赵占波¹, 金 鑫¹, 王秀良¹, 金先庆^{1△}
 (1. 重庆医科大学附属儿童医院肿瘤实验室/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 400014)

摘要:目的 探讨将钙视网膜蛋白(CR)用于诊断先天性无神经节细胞症(HD)的可行性。方法 采用免疫组织化学法检测 CR 在 50 例 HD(HD 扩张段组、HD 痉挛段组)和 10 例对照组结肠壁的表达,并与常规 HE 染色进行对比分析。用 Image-Pro-Plus 图文分析系统定量分析染色结果。**结果** HD 痉挛段组与对照组及 HD 扩张段组黏膜下层、肌层间 CR 表达的平均光密度值(MOD)差异均有统计学意义($P < 0.01$);HE 染色扩张段肠壁神经丛中可见神经节细胞,痉挛段神经节细胞缺失,CR 免疫组织化学染色与 HE 染色诊断结果一致;新生儿与年长儿 HD 痉挛段黏膜下层 CR 表达差异无统计学意义($P = 0.816$)。**结论** CR 免疫组织化学染色用于新生儿 HD 的诊断与传统方法比较具有明显优越性。

关键词:先天性无神经节细胞症;钙视网膜蛋白;免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3468-03

Expression characteristics of calretinin in hirschsprung's disease and its clinical significance*

Zhang Yan¹, Zhu Jin², Wang Shiqi¹, Duan Wenjuan¹, Ding Xionghui¹, Sun Yanhui¹,
 Zhao Zhanbo¹, Jin Xin¹, Wang Xiuliang¹, Jin Xianqing^{1△}

(1. Division of Tumor, Children's Hospital of Chongqing Medical University/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/Key Laboratory of Pediatrics, Committee of Science and Technology in Chongqing/Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China; 2. Division of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To explore the feasibility of calretinin(CR) in the diagnosis of hirschsprung's disease(HD). **Methods** Colons from 50 children with HD(HD spastic segments group and ecstastic segments group) and 10 controls were stained for CR by immunohistochemistry, and were compared with conventional HE staining, with Image-Pro-Plus analysis system for quantitative analysis of staining. **Results** There was a significant difference in the expression of calretinin mean optical density between HD spastic segments group and ecstastic segments group, normal control group($P < 0.01$). Ganglion cells could be seen in ecstastic segments in HE stained section of intestinal nerve plexus, but lost in spastic segment, CR results of immunohistochemistry were consistent with HE staining results. Newborns and older children HD spastic segment submucosa had no significant difference in the expression of CR($P = 0.816$). **Conclusion** CR immunohistochemical staining for the diagnosis of neonatal HD has obvious advantages compared with traditional methods.

Key words: hirschsprung's disease; calretinin; immunohistochemistry

先天性无神经节细胞症(hirschsprung disease, HD) 又称先天性巨结肠症,其基本病变是病变肠段肠壁黏膜下和肌间神经丛中缺乏神经节细胞。病理学检查是确诊 HD 的依据。传统的病理学检查有苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)染色法。但是这两种方法的准确性均欠佳,尤其新生儿期易出现假阴性结果。因此,需要更准确的诊断方法为临床医生提供诊断依据。近年来,免疫组织化学法研究广泛,本研究拟采用免疫组织化学染色方法,检测钙视网膜蛋白(calretinin, CR)用于 HD 患儿(尤其是新生儿 HD)的诊断。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集重庆医科大学附属儿童医院 2010~2011 年诊断为散发性 HD 的根治切除术患儿 50 例,其中男 40 例,女 10 例;年龄 2 d 至 7 岁。其中小于 1 个月 6 例,1~3 个

月 23 例,>3 个月至 1 岁 11 例,>1 岁 10 例。临床分型为常见型 36 例,长段型 9 例,短段型 5 例。每份标本分别取扩张段近端切缘肠壁作为 HD 扩张段组(HE 染色可见神经节细胞)、取痉挛段肠壁作为 HD 痉挛段组。诊断标准为 HE 染色显示痉挛段肌间神经丛中神经节细胞缺失。本研究将年龄小于 3 个月患儿视为新生儿。尸检结肠标本 10 份,经光镜检查可见发育成熟的神经节细胞,作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 兔抗人 CR 免疫组织化学单克隆抗体、即用型免疫组织化学 ElivisionTM super 试剂盒(福州迈新生物技术公司)、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、Image-Pro-Plus 图像分析系统。

1.2.2 免疫组织化学染色 取石蜡切片 60℃烤片 2 h;脱蜡、

水化;3%过氧化氢溶液室温静置 10 min;滴加一抗,4 ℃过夜;第 2 天拿出玻片,0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(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;中性树脂封片观察。用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.2.3 HE 染色 观察对照组、痉挛段组及扩张段组结肠肠壁组织形态学变化,制备组织石蜡切片后行 HE 染色,了解肠壁一般情况及神经丛、神经节细胞情况。

1.2.4 图像分析 采用 Image-Pro-Plus 图像分析系统测定所有标本所采集图像的平均光密度值(mean optical density, MOD),测定区域为神经丛细胞区域。测量前设置统一图像校正指数,以避免染色过程中非特异性染色所造成的误差。

1.3 统计学处理 数据均录入 SPSS17.0 软件进行处理,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CR 在对照组及 HD 不同肠段不同层次中的表达 50 例患儿 HD 扩张段组及对照组结肠壁黏膜下及肌层间神经丛均呈 CR 阳性表达,呈棕黄色,分布于神经节细胞胞质及神经纤维(封 2 图 1、2),而 HD 痉挛段组 50 例患儿中 49 例肠壁各层未发现或仅有极少量 CR 蛋白表达,近乎缺失(封 2 图 3),图像分析系统定量检测其黏膜下、肌层间区 MOD 值很小,与扩张段组黏膜下、肌层间区 MOD 值比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),与对照组黏膜下、肌层间区 MOD 值比较,差异亦具有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。诊断结果与 HE 染色结果一致。但其中 1 例 HD 患儿痉挛段肠壁 CR 呈强阳性表达,其黏膜下层 MOD 值为 0.255 783,肌层 MOD 值为 0.238 923。

表 1 CR 在 3 组不同肠壁表达的 MOD 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	黏膜下层	肌层间
对照组	10	0.277 99±0.086 48	0.318 95±0.029 35
HD 扩张段组	50	0.392 18±0.055 55	0.298 79±0.062 49
HD 痉挛段组	50	0.034 46±0.027 32 [#]	0.039 14±0.024 53 [#]

[#]: $P < 0.01$,与对照组及 HD 扩张段组比较。

2.2 CR 在新生儿及年长儿 HD 痉挛段的表达 新生儿($n=29$)及年长儿($n=21$)HD 痉挛段黏膜下层 CR 蛋白 MOD 值分别为 0.030 79±0.015 63 和 0.029 33±0.024 53,二者比较差异无统计学意义($t=0.234, P=0.816$)。

2.3 对照组、HD 扩张段组和 HD 痉挛段组不同肠段中 HE 染色结果 常规 HE 染色显示在所有 HD 结肠标本黏膜下层及肌间层均可见神经丛。在 HD 扩张段组黏膜下层和肌层间神经丛内可见神经节细胞(封 2 图 4),HD 痉挛段组肠壁各层均未见神经节细胞(封 2 图 5),对照组肠壁可见神经节细胞。

3 讨论

HD 是以肠道黏膜下和肌层间神经丛内神经节细胞缺乏为主要特征,临床表现为完全性或不完全性肠梗阻,严重影响患儿的生活质量^[1],是小儿常见的消化道畸形。HD 的术前诊断除了依据病史、体征、钡灌肠 X 线片、肛管直肠测压检查外,主要还是依据病理检查。HD 的病理诊断主要表现为病变结肠段神经节细胞的缺失,神经节细胞的缺失常常伴有神经纤维的增生。在临床工作中,组织化学染色法是诊断 HD 的金标准^[2]。目前临床常用的组织化学染色主要包括 HE 染色和

AchE 染色。HE 染色如在活检标本中未发现肠神经节细胞即可确诊。HE 染色神经节细胞的形态与胶质细胞、Schwann 细胞不易鉴别,加上炎症细胞的影响,使神经节细胞不易明确观察到^[3]。本研究显示 50 例 HD 患儿中 49 例痉挛肠段 CR 呈阴性表达,与 HE 染色结果一致;但 1 例患儿痉挛肠段 CR 呈强阳性表达,不应诊断为 HD,与 HE 染色诊断结果不一致,二者染色结果相反。请 3 位病理科经验丰富的医生对 HE 染色及免疫组织化学染色检测 CR 结果进行再次判定,诊断结果不是 HD。可见,HE 染色用于 HD 的诊断可能出现结果难以判定,需经验丰富的病理医生进行诊断,而 CR 用于 HD 的诊断结果极易判定,更准确,可能优于 HE 染色。

AchE 染色技术主要染色 HD 病变肠段肠壁粗大的神经纤维,耗时短。临床上常用 AchE 染色弥补 HE 染色之不足。最近有报告显示 AchE 染色具有良好的特异性(高达 100%),但敏感性不够(低至 85%)^[4-6],且需要冷冻切片组织。HD 患儿结肠壁胆碱能神经支配的变异,可能会导致 AchE 染色结果假阴性,患儿年龄越小越容易出现,尤其是新生儿期更容易出现假阴性结果。因此,AchE 染色方法准确度亦欠佳。Kapur 等^[7]的研究认为和 AchE 染色相比较,CR 染色对于 HD 具有较高的诊断价值。CR 在正常肠段呈强阳性表达,且表达稳定,在病变肠段仅有极少量 CR 蛋白表达,近乎缺失,结果极易判定。本研究比较 HD 痉挛组、扩张段组黏膜下层及肌层间 CR 表达 MOD 值,差异均有统计学意义($P < 0.01$),提示可通过免疫组织化学染色检测 CR 行术前取直肠黏膜活检或肌层全层活检,用于 HD 的术前诊断,亦可用于术后诊断,其结果更易判定。

新生儿期 HD 由于症状不易鉴别,各种检查还存在一定的局限性以及肠神经节细胞发育不成熟的病理复杂性,要对新生儿早期作出正确诊断仍然是困扰临床的难题^[8]。本研究首次探讨了免疫组织化学检测 CR 染色在新生儿 HD 诊断中的临床意义,比较新生儿与年长儿痉挛段黏膜下层 CR 表达 MOD 值,差异无统计学意义($P=0.816$),提示免疫组织化学染色检测 CR 方法同样适用于新生儿 HD 的诊断,与 AchE 染色相比,有明显优势。

免疫组织化学染色是目前国内外研究比较活跃、较好的诊断方法。HD 的常用的相关标志物有:CR、组织蛋白酶 D、S-100 蛋白、外周蛋白、神经元特异性烯醇酶等。组织蛋白酶 D 除表达于神经节细胞外,还阳性表达于组织细胞。S-100 在肠壁肌间神经丛的神经纤维、施万细胞均呈阳性表达,而神经节细胞呈阴性表达^[9]。据报道,1988 年至今,至少 10 种免疫组织化学染色在神经节细胞中高表达,至少 5 种免疫组织化学染色高表达于神经纤维^[10],但到目前为止仍没有一种被广泛认可的标准。CR 是一种重要的钙结合蛋白,能够在钙离子浓度升高时防止细胞内自由钙离子的急剧升高引起的兴奋性中毒损伤,具有神经的保护作用^[11]。有研究发现在 HD 患儿无神经节细胞肠段 CR 蛋白缺失,并将 CR 和其他 HD 诊断标志物作比较,发现 CR 在诊断 HD 方面较 S100 蛋白、c-kit 及神经元烯醇化酶更准确。另外,其他免疫组织化学方法常常需要全层切片才能进一步确诊,但全层切片于术前不容易获得。

既往有报道统计,70%~90% 的病例可在新生儿时期明确诊断^[12]。本研究认为免疫组织化学法检测 CR 用于诊断 HD 准确性、敏感性均较高,尤其是用于新生儿 HD 的诊断与传统方法比较具有明显优越性,易于使用和解释,可以同时用

于冷冻切片与石蜡切片标本,且不需要分析大量组织切片,可用于术前直肠黏膜活检及术后病理检查,是一种较准确的诊断 HD 的方法,有望成为新生儿 HD 诊断的一种新的实用性、准确性均较高的方法。但免疫组织化学法检测 CR 从技术角度上时间需要 2~3 d,不能用于术中快速诊断,需与其他方法联合应用以提高 HD 术中快速诊断率。

参考文献:

- [1] Lwashita T, Kruger GM, Parda R, et al. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function[J]. *Science*, 2003, 301(5635):972-976.
- [2] Montedonico S, Cáceres P, Muñoz N, et al. Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years experience with more than 1 500 biopsies[J]. *Pediatr Surg Int*, 2011, 27(5):479-486.
- [3] 杨小进, 林传友, 胡道松, 等. 外周蛋白和组织蛋白酶 D 在先天性巨结肠症中的表达[J]. *中华小儿外科杂志*, 2004, 25(3):261-263.
- [4] Pacheco MC, Bove KE. Variability of acetylcholinesterase hyperinnervation patterns in distal rectal suction biopsy specimens in Hirschsprung disease [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2008, 11(4):274-282.
- [5] Nakao M, Suita S, Taguchi T, et al. Fourteen-year experience of acetylcholinesterase staining for rectal mucosal biopsy in neonatal Hirschsprung's disease [J]. *J Pediatr Surg*, 2001, 36(9):1357-1363.
- [6] Chentanez V, Chittmitrapap S, Cheepsoonthorn P, et al.

New classification of histochemical staining patterns of acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy in Hirschsprung's disease [J]. *Med Assoc Thai*, 2000, 83(10):1196-1201.

- [7] Kapur RP, Reed RC, Finn LS, et al. Calretinin immunohistochemistry versus acetylcholinesterase histochemistry in the evaluation of suction rectal biopsies for Hirschsprung disease[J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2009, 12(1):6-15.
- [8] 刘虎, 徐兵. 新生儿巨结肠诊断的现状与进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(16):2433-2435.
- [9] Holland SK, Hessler RB, Reid-Nicholson MD, et al. Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease[J]. *Modern Pathology*, 2010, 23(9):1173-1179.
- [10] Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(10):1379-1384.
- [11] 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.
- [12] Khan AR, Vuianic GM, Huddart S. The constipated child; how likely is Hirschsprung's disease[J]. *Pediatr Surg Int*, 2003, 19(6):439-442.

(收稿日期:2012-02-13 修回日期:2012-07-27)

(上接第 3467 页)

- [4] Jelen S, Wacker S, Aponte-Santamaria C, et al. Aquaporin-9 protein is the primary route of hepatocyte glycerol uptake for glycerol gluconeogenesis in mice [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52):44319-44325.
- [5] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1):1-26.
- [6] Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis [J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34(6):643-648.
- [7] Gupta R, Bhangoo A, Matthews NA, et al. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in obese children [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2011, 24(11/12):907-911.
- [8] Miranda M, Ceperuelo-Mallafre V, Lecube A, et al. Gene expression of paired abdominal adipose AQP7 and liver AQP9 in patients with morbid obesity: relationship with glucose abnormalities [J]. *Metabolism*, 2009, 58(12):1762-1768.
- [9] Liu H, Mei ZC, Xiao X. Effects of insulin and LY294002

inhibitors of PI3K on the regulations and expression of aquaporin 9 in normal liver cells [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2010, 18(6):455-458.

- [10] Maeda N, Hibuse T, Funahashi T. Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190):233-249.
- [11] Guo XQ. Advances in research on aquaglyceroporin and glycerol transport [J]. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2007, 31(5):487-489.
- [12] Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, et al. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(10):1548-1556.
- [13] Zhang H, Wen K, Shen J, et al. Characterization of immune responses following intranasal immunization with the Mycobacterium bovis CFP-10 protein expressed by attenuated Salmonella typhimurium [J]. *Scand J Immunol*, 2010, 72(4):277-283.

(收稿日期:2012-02-03 修回日期:2012-07-01)