

## •综述•

# 免疫组化方法在诊断肠神经异常性疾病中的应用进展

张燕敏 综述 王忠荣 审核

2005 年举行的第 4 届国际先天性巨结肠及其相关神经嵴病专题研讨会将先天性巨结肠、肠神经元性发育异常(intestinal neuronal dysplasia, IND)、肛门内括约肌神经性失弛缓症(Internal Anal Sphincter Neurogenic Achalasia, IASNA)、神经节细胞减少症<sup>[1]</sup>统称为肠神经元异常(Intestinal Dysganglionoses, IDs)。这类疾病是小儿便秘的常见原因,症状相似,病理学特征不同。通过病理学方法检出标本中的神经节细胞,了解其发育情况并将其大小量化对于诊断肠神经元异常性疾病具有重要意义。目前病理学方法有很多,临床上最常用的是 HE 染色和 AchE 染色,但由于 HE 染色对于未成熟的神经节细胞检出率不高,且受到病理技师个人水平的影响;而 AchE 同时存在于胆碱能神经元和非胆碱能神经元,假阳性率高,所以人们寻求其他方法。研究较多的是免疫组织化学法。本文试将近几年利用免疫组化方法在诊断肠神经元异常性疾病方面所取得的进展进行综述。

## 一、肠神经异常性疾病的病理学特征

HD 病变肠管处神经节细胞缺如,神经纤维增生,乙酰胆碱脂酶(acetyl cholinesterase, AchE)活性升高;IND 表现为神经节细胞发育不良、未成熟时的胞体小,胞浆少,细胞核小或同时合并细胞数目减少<sup>[2]</sup>;或为我们以往所说的神经元发育异常的表现,分 A、B 两型,以 B 型多见。近年来 Meier-Ruge 提出了对 IND-B 采用定量标准明确诊断,即对同一活组织连续切片 30 张,如发现 15%~20%神经丛是巨大神经丛( $\geq 8$  个神经节细胞/1 个神经丛)即可确诊<sup>[3-4]</sup>;肛门内括约肌神经性失弛缓症直肠活检有正常节细胞,仅括约肌不能松弛,直肠肛管测压证实患儿的肛管静息压力明显升高;神经节细胞减少症的病理特点为肠壁单位长度内神经丛和节细胞数的数目分别小于正常的 1/2 和 1/4;丛间距是正常

的 1.2 倍<sup>[5-6]</sup>,直肠黏膜 AchE 缺乏或较 HD 减低,环肌和粘膜下肌层增生。

## 二 针对神经节细胞的免疫组化染色方法

通常能标记神经细胞和纤维的标记物都被用于肠神经异常的实验室诊断和科学研究。包括蛋白酶类、蛋白类和一些神经因子。

1、蛋白酶类标记物 代表物有蛋白基因产物 9.5 (Protein gene product 9.5, PGP 9.5)、神经元特异性烯醇酶(neuron-specific enolase, NSE)、组织蛋白酶 D (Cathepsin D, CAD)等。

(1)PGP 9.5 是一种对粘膜肌层和固有层中异常胆碱能神经染色的神经元标志物,存在于中枢和外周神经系统的各个水平及神经内分泌细胞中,表现为黄褐色团块状的神经丛中散在分布深褐色神经节细胞,在神经胶质中细胞不表达,特异性好,但问题在于,由于 PGP9.5 在神经节细胞胞浆、神经节细胞核和神经纤维均表达,假阳性和假阴性都比较高<sup>[7]</sup>。

(2)NSE 是一种糖酵解酶,在神经母细胞分化为成熟的神经细胞后,NSE 也由非神经元特异性烯醇化酶转变为 NSE。因此 NSE 是神经元发育成熟的标志物,用标记的抗 NSE 抗体与直肠吸引活检标本中 NSE 结合,可显示肠粘膜下神经组织。如 HD 病例,可见到不同程度的 NSE 阳性神经纤维增生,而见不到神经节细胞<sup>[8]</sup>。许多学者的研究表明:作为神经节细胞的标志物,NSE 免疫组织化学技术能使神经组织清晰可见,即使新生儿粘膜下层发育不够成熟的神经节细胞也容易辨认。神经组织的特异性着色,能够避免出现 HE 染色时与炎性细胞、巨噬细胞、淋巴滤泡相混淆的问题,提高诊断 HD 的准确率<sup>[9]</sup>。问题在于与 PGP 9.5 类似,在胞体、纤维上同时染色。

(3)CAD 是一种天冬氨酸酶,属于溶酶体酸性蛋白酶家族,其在细胞内蛋白质的分解代谢中起关键作用,可催化许多神经肽的降解,如 P 物质、生长抑素、B 脂蛋白和血管紧张素原,在人类脑组织神经元、体内神经节细胞中含量丰富,广泛分布于几乎所有神经原和胶质细胞,但不存在于神经纤维,故

作者单位:安徽省立医院小儿外科(合肥,230001)。  
通讯作者:王忠荣, E-mail:wangzy1950@126.com

可作为肠壁神经节细胞的标记<sup>[9]</sup>。染色特异性高,仅限于肠神经节细胞,不显示任何神经纤维,不在内皮细胞、淋巴细胞及支持细胞等与未成熟的神经细胞相似的细胞中反应,CAD 染色深浅与神经节细胞的成熟度有关,对不同成熟程度的神经节细胞表达强度不同,肌间神经丛内神经节细胞染色一般强于黏膜下神经丛,目前认为是一种较好的标志物,不仅可应用于 HD 的诊断,而且可以判断神经节细胞的成熟程度,用于评估预后<sup>[10]</sup>。但在神经节细胞表达阳性率不是 100%,缺乏术中冰冻组织切片的染色特征,使术中快速诊断受限。应注意到的是,组织细胞对 CAD 也呈现阳性表达,需要进行鉴别:①组织细胞常有长而扭曲的胞核,缺乏明显的核仁;②组织细胞常是单个存在,远离神经纤维<sup>[11]</sup>。

2、蛋白类标志物 近几年使用较多的有 S-100 蛋白,外周蛋白(peripherin,PR)和钙视网膜蛋白(calretinin)。

(1)S-100 是一组可溶性相对低,分子质量高的酸性蛋白,属于神经胶质细胞特异性蛋白,亦可存在于神经纤维中,可作为肠道神经丛中胶质细胞和神经纤维的标记。S-100 对神经丛中神经纤维、施万细胞和周围细胞均为阳性染色,在阳性染色的神经丛中可观察到一种特征性形态,表现为特征的细胞状阴影“空白区”,S-100 抗体的染色模式很有用,因为它突出了阴性染色的神经节细胞。已有多位学者研究建议,联合应用 PGP 9.5、S-100 抗体可以互补,提高先天性巨结肠术前诊断的敏感度和特异性。Petchasuwan C 等<sup>[12]</sup>在实验中同时用 S-100 蛋白来测定了神经纤维的直径。

(2)PR 是 57 kDa 的Ⅲ型中间丝,其基因序列与波形蛋白、结蛋白和胶原纤维酸性蛋白高度同源;PR 为周围神经元(包括肠神经节细胞)的特异性标志物,其对肠神经元的标记特异性优于其他神经元标志物(如神经元特异性烯醇化酶、S100 蛋白和神经丝)。应用 PR 免疫组织化学染色不仅容易识别成熟和未成熟的神经元,而且可测量神经节细胞密度,这将有助于先天性肠神经系统畸形的诊断和分类<sup>[14]</sup>。

(3)calretinin 是一种钙结合蛋白,在中枢神经系统的结构功能方面起着重要作用。近来有人发现,在 HD 患者结肠的无神经节区及其伴随的神经纤维,没有钙视网膜蛋白的表达,而在 HD 患者结肠的有神经节区域及正常人的结肠粘膜下层和肌层,可见钙视网膜蛋白的表达<sup>[15]</sup>。

以上这些标记物或同时作用于神经节细胞及

神经纤维,存在背景染色的问题;或与其他细胞有交叉反应,而一种理想的神经元标志物应满足以下条件:标志物应为神经元所特有,可显示所有的神经元包括未成熟的神经元而不标记神经纤维,背景染色少,同时可将不同发育程度的细胞同时染色,目前常用的标记物尚不能完全满足这些要求。这就要求人们继续寻找理想的标记物。Hu 蛋白被适时提出来。Hu 蛋白是一种神经元特异蛋白,有 4 种类型:HuA、HuB、HuC 和 HuD,除 HuA 在神经组织发生的早期在神经干细胞中有表达,其他 3 种 Hu 蛋白在神经胶质细胞中不表达,有高度的神经元特异性。最近,国内杜勇<sup>[16]</sup>发现在 HD 患者巨结肠的狭窄段和移行段 HuD 表达明显减少,HuD 蛋白主要分布于胞浆,抗 HuD 蛋白抗体使神经元的胞体和胞核都染色,胞核的染色深于胞浆,神经纤维不染色。可能是一种有前景的标记物。

### 三、神经节细胞与肠神经系统周围微环境的关系研究

随着对先天性巨结肠病因研究的不断深入,人们发现,单以神经节细胞缺失并不能解释所有的临床症状,比如巨结肠类缘病。神经节细胞与肠神经系统周围微环境的关系开始得到重视,Cajal 细胞、突触素等成为近几年研究的新方向。

1、Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs)是胃肠道平滑肌运动的起搏点。分布在胃肠道神经末梢与平滑肌之间的一类特殊细胞,近来发现 ICCs 表达原癌基因 c-kit,采用 c-kit 标记 ICCs 后发现,无神经节细胞肠管的肌间神经丛周围 ICCs 数量明显减少,环肌、纵肌内的 ICCs 也减少甚至缺如,仅有少许 ICCs 分布在环肌内表面,ICCs 网络呈断续及紊乱状态<sup>[17]</sup>。但有人发现,在 HD 的有神经节肠管间 ICCs 也减少。应用 c-kit 进行染色要注意区分 ICCs 和肥大细胞<sup>[18]</sup>。

2、突触素(synaptophysin,SY)是突触泡膜表面的特有蛋白质,存在于中枢及周围神经系统的神经轴突终末,与神经递质释放和兴奋传导有关。Dzienis-Koronkiewicz E 等<sup>[19]</sup>在实验中发现,在正常结肠及巨结肠非神经节细胞缺失段的粘膜下层、粘膜肌层,神经节细胞、神经纤维突触素单克隆抗体呈棕色反应。低倍镜下示黄褐色的小团块状,高倍镜下可见黄褐色深染的神经节细胞胞浆,其间有圆形的细胞核,神经丛中雪旺细胞和周围星形细胞对突触素单克隆抗体呈阴性反应,而在巨结肠神经节细胞缺失段,无突触素的表达。是判断消化道神经

发育的优良技术。

此外还有神经节细胞黏附分子<sup>[20]</sup>等也被用于诊断 HD 及其他肠神经系统疾病。目前尚无大规模试验来评价各种免疫组化方法的优缺点,鉴于免疫组化方法对于实验室要求较高,价格较普通,HE 染色和 AchE 染色昂贵,未能常规用于临床诊断。但随着对肠神经系统疾病病因、临床病理生理变化研究的不断深入,以及分子生物技术、病理实验技术的发展,寻找理想的标记物,提高诊断的敏感性和特异性,同时实现免疫组化技术在临床上的普及,将是今后工作的重点。

### 参 考 文 献

- Martucciello G, Pini Prato A, Puri P, et al. Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: a report from the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies. *J Pediatr Surg JT - Journal of pediatric surgery*, 2005,40(10):1527-31.
- 施诚仁,陈其民,潘伟华等. 肠神经元性异常疾病的临床与病理. *外科理论与实践*, 2000,5(3):181-184.
- 周学付,李桂生. 关于先天性巨结肠类缘病名称的商榷. *中华小儿外科杂志*, 2003,24(2):176.
- Holschneider AM, Meier-Ruge W, Ure BM. Hirschsprung's disease and allied disorders—a review. *Eur J Pediatr Surg JT - European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery*. [et al] = *Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 1994,4(5):260-6.
- Meier-Ruge WA, Ammann K, Bruder E, et al. Updated results on intestinal neuronal dysplasia (IND B). *Eur J Pediatr Surg JT - European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery*. [et al] = *Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 2004,14(6):384-91.
- Meier-Ruge WA, Brunner LA. Morphometric assessment of Hirschsprung's disease: associated hypoganglionosis of the colonic myenteric plexus. *Pediatr Dev Pathol JT - Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 2001,4(1):53-61.
- Galvis DA, Yunis EJ. Comparison of neuropeptide Y, protein gene product 9.5, and acetylcholinesterase in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Pediatr Pathol Lab Med JT - Pediatric pathology & laboratory medicine : journal of the Society for Pediatric Pathology, affiliated with the International Paediatric Pathology Association*, 1997,17(3):413-25.
- 王红,曾甜. 神经元特异烯醇化酶和 5100 蛋白在巨结肠及其类缘病中的表达. *实用儿科临床杂志*, 2006,21(5):313-315.
- Dzienis-Koronkiewicz E, Debek W, Sulkowska M, et al. Suitability of selected markers for identification of elements of the Intestinal Nervous System (INS). *Eur J Pediatr Surg JT - European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery*. [et al] = *Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 2002,12(6):397-401.
- 陈卫坚,周小渔,刘宏等. 组织蛋白酶 D 和 S-100 蛋白在先天性巨结肠症中的表达. *中华小儿外科杂志*, 2006,27(1):51-53.
- Dzienis-Koronkiewicz E, Debek W, Sulkowska M, et al. Suitability of selected markers for identification of elements of the Intestinal Nervous System (INS). *Eur J Pediatr Surg JT - European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery*. [et al] = *Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 2002,12(6):397-401.
- 杨小进,林传友,胡道等. 外周蛋白和组织蛋白酶 D 在先天性巨结肠症中的表达. *中华小儿外科杂志*, 2004,25(3):261-263.
- Petchasuwan C, Pintong J. Immunohistochemistry for intestinal ganglion cells and nerve fibers: aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Med Assoc Thai JT - Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, 2000,83(11):1402-9.
- Szabolcs MJ, Visser J, Shelanski ML, et al. Peripherin: a novel marker for the immunohistochemical study of malformations of the enteric nervous system. *Pediatr Pathol Lab Med JT - Pediatric pathology & laboratory medicine : journal of the Society for Pediatric Pathology, affiliated with the International Paediatric Pathology Association*, 1996,16(1):51-70.
- Barshack I, Fridman E, Goldberg I, et al. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease. *J Clin Pathol JT - Journal of clinical pathology*, 2004,57(7):712-6.
- 杜勇,施诚仁,潘骏等. 先天性巨结肠 HuD 蛋白表达的实验研究. *临床小儿外科杂志*, 2006,4(5):345-348.
- Rolle U, Piotrowska AP, Nemeth L, et al. Altered distribution of interstitial cells of Cajal in Hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med JT - Archives of pathology & laboratory medicine*, 2002,126(8):928-33.
- Shafik A, El-Sibai O, Ahmed I, et al. Identification of interstitial cells of Cajal in the human rectum. *Front Biosci JT - Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2004,9:2848-51.
- Dzienis-Koronkiewicz E, Debek W, Chyczewski L. Use of synaptophysin immunohistochemistry in intestinal motility disorders. *Eur J Pediatr Surg JT - European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery*. [et al] = *Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 2005,15(6):392-8.
- Nogueira A, Campos M, Soares-Oliveira M, et al. Histochemical and immunohistochemical study of the intrinsic innervation in colonic dysganglionosis. *Pediatr Surg Int JT - Pediatric surgery international*, 2001,17(2-3):144-51.

作者: 张燕敏, 王忠荣  
作者单位: 安徽省立医院小儿外科, 合肥, 230001  
刊名: 临床小儿外科杂志 **ISTIC**  
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY  
年, 卷(期): 2007, 6(1)  
被引用次数: 0次

## 参考文献(20条)

1. [Dzienis-Koronkiewicz E;Debek W;Sulkowska M Suitability of selected markers for identification of elements of the Intestinal Nervous System \(INS\) 2002\(06\)](#)
2. 王红;曾甜 [神经元特异烯醇化酶和5100蛋白在巨结肠及其类缘病中的表达](#)[期刊论文]-[实用儿科临床杂志](#) 2006(05)
3. [Barshack I;Fridman E;Goldberg I The loss of calretinin expression indicates aganglioneosis in Hirschsprung's disease 2004\(07\)](#)
4. [Szabolcs MJ;Nisser J;Shelanski ML Peripherin:a novel marker for the immunohistochemical study of malformations of the enteric nervous system 1996\(I\)](#)
5. [Galvis DA;Yunis EJ Comparison of neuropeptide Y,protein gene product 9.5,and acetylcholinesterase in the diagnosis of Hirschsprung's disease 1997\(03\)](#)
6. [Meier-Ruge WA;Brunner LA Morphometric assessment of Hirschsprung's disease:associated hypoganglioneosis of the colonic myenteric plexus 2001\(01\)](#)
7. [Meier-Ruge WA;Ammann K;Bruder E Updated results on intestinal neuronal dysplasia \(IND B\) 2004\(06\)](#)
8. [Holschneider AM;Meier-Ruge W;Ure BM Hirschsprung's disease and allied disorders-a review 1994\(05\)](#)
9. 周学付;李桂生 [关于先天性巨结肠类缘病名称的商榷](#)[期刊论文]-[中华小儿外科杂志](#) 2003(02)
10. 施诚仁;陈其民;潘伟华 [肠神经元性异常疾病的临床与病理](#)[期刊论文]-[外科理论与实践](#) 2000(03)
11. [Nogueira A;Campos M;Soares-Oliveira M Histochemical and immunohistochemical study of the intrinsic innervation in colonic dysganglioneosis 2001\(2-3\)](#)
12. [Dzienis-Koronkiewicz E;Debek W;Chyczewski L Use of synaptophysin immunohistochemistry in intestinal motility disorders 2005\(06\)](#)
13. [Shafik A;EI-Sibai O;Ahmed I Identification of interstitial cells of Cajal in the human rectum 2004](#)
14. [Rolle U;Piotrowska AP;Nemeth L Altered distribution of interstitial cells of Cajal in Hirschsprung disease 2002\(08\)](#)
15. 杜勇;施诚仁;潘骏 [先天性巨结肠HuD蛋白表达的实验研究](#)[期刊论文]-[临床小儿外科杂志](#) 2006(04)
16. [Petchasuwan C;Pintong J Immunohistochemistry for intestinal ganglion cells and nerve fibers:aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease 2000\(11\)](#)
17. 杨小进;林传友;胡道 [外周蛋白和组织蛋白酶D在先天性巨结肠症中的表达](#)[期刊论文]-[中华小儿外科杂志](#) 2004(03)
18. [Dzienis-Koronkiewicz E;Debek W;Sulkowska M Suitability of selected markers for identification of elements of the Intestinal Nervous System \(INS\) 2002\(06\)](#)

19. [陈卫坚;周小渔;刘宏 组织蛋白酶D和S-100蛋白在先天性巨结肠症中的表达\[期刊论文\]-中华小儿外科杂志](#)  
2006(01)

20. [Martucciello G;Pini Prate A;Puri P Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system:a report from the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies](#) 2005(10)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_lcxewkzz200701023.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200701023.aspx)

授权使用: 黔南民族师范学院(gnnzsfxy), 授权号: ac4a1ba7-7e25-4e64-808f-9ed4010b9b12

下载时间: 2011年4月29日