



钙视网膜蛋白在肠无神经节细胞症诊断中的应用

侯金凤 向丽 金先庆 李晓庆

【摘要】 目的 分析钙视网膜蛋白在小儿肠无神经节细胞症诊断中的应用意义。 **方法** 回顾性分析本院自 2011 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日收治的确诊小儿肠无神经节细胞症、肠神经节细胞发育异常患儿术前直肠黏膜活检标本中钙视网膜蛋白的表达情况和 HE 染色结果、根治术或造瘘术后病变段钙视网膜蛋白表达情况和病理检查 HE 染色结果。 **结果** ①肠无神经节细胞症中术前直肠黏膜活检检查钙视网膜蛋白的表达在所有病例中阴性表达 111/114 例, HE 染色未见神经节细胞 112/114 例;根治手术后痉挛段肠壁中钙视网膜蛋白均呈阴性表达 133/133 例, HE 染色未见神经节细胞 133/133 例,而在扩张段的肠壁中钙视网膜蛋白的表达均呈阳性表达 133/133 例, HE 染色可见发育正常的神经节细胞 133/133 例;②肠神经节细胞发育异常症中术前直肠粘膜活检钙视网膜蛋白表达阴性 4/4 例, HE 染色见到发育不良神经节细胞 1/4 例,其余 3 例均未见到神经节细胞;根治术或造瘘术后病变段钙视网膜蛋白表达阳性 42/42 例, HE 染色见到神经节细胞发育异常或减少 42/42 例。 **结论** 钙视网膜蛋白染色可以作为肠无神经节细胞症的诊断依据之一,但仍然有假阳性及假阴性结果可能,特别是在术前直肠粘膜活检的应用中。

【关键词】 钙视网膜蛋白; Hirschsprung 病; 免疫组织化学

Application of calretinin in the diagnosis of Hirschsprung's disease. HOU Jin-feng, XIANG Li, JIN Xian-qing, et al. Children's Hospital, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Child Development & Disorders Co-founded by Provincial Government & Ministry of Education, Chongqing International Science & Technology Cooperation Center for Child Development & Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing 40014, China

【Abstract】 Objective To analyze retrospectively the clinical significance of calretinin (CR) in the diagnosis of Hirschsprung's disease (HD). **Methods** The expression of calretinin was detected and hematoxylin & eosin (HE) staining performed for spastic and expanding segments of HD and Hirschsprungs disease allied disorder from January 1, 2011 to December 31, 2014. **Results** Among them, 111/114 cases had no preoperative expression of calretinin in spastic segment of HD. And 112/114 cases had no ganglion cells. None of 133 cases had an expression of calretinin in spastic segment and there were no ganglion cells. All 133 expanding segments had a positive postoperative expression of calretinin. HE staining showed that all 133 cases had normal ganglion cells. Four cases had no preoperative expression of calretinin in spastic segment of Hirschsprungs disease allied disorder, HE staining showed 3 cases without ganglion cells and 1 case with dysplastic ganglion cells. All 42 cases had an expression of calretinin in involved segments. All 42 cases had dysplastic ganglion cells or fewer ganglion cells. **Conclusions** Calretinin may be used for aiding the diagnosis of HD. When calretinin staining is used for diagnosing HD preoperatively, we should watch out for false positive and false negative results, especially during rectal mucosal biopsy.

【Key words】 Calretinin; Hirschsprung Disease; Immunohistochemistry

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2016.04.016

基金项目:1,国家临床重点专科建设项目,项目号:国卫办医函【2013】544;2,重庆市卫生局科研项目(钙视网膜蛋白在婴幼儿先天性无神经节细胞症的早期诊断的临床意义)。

作者单位:重庆医科大学附属儿童医院,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室,国家住院医师规范化培训示范基地(重庆市,400014),通讯作者:向丽, E-mail:13452853931@126.com

随着我国社会经济的快速发展和医疗卫生水平的提高,儿童感染性疾病的发病率日益降低,儿童先天畸形和发育异常疾病的严重性和危害性日益凸显。肠无神经节细胞症(Hirschsprung's disease, HD)是儿童先天畸形中最具有代表性的疾病,平均每 1 500 ~ 2 000 名活产婴儿中就有 1 名肠无神经节

细胞症患者,随着环境污染的加重和工业化进程的加快,发病率逐年增高。肠无神经节细胞症患者因结肠肌间和黏膜下神经节细胞缺乏,致使病变肠段失去正常组织结构及肠道蠕动功能,以顽固性便秘、排便障碍为主要临床表现^[1]。肠无神经节细胞症患者随着年龄的增长,肠管扩张明显,生长发育受到严重影响,早期诊断和及早治疗尤其重要。近年来免疫组织化学染色法作为简单可靠的肠无神经节细胞症诊断方法成为研究热点,钙视网膜蛋白备受关注。钙视网膜蛋白是钙结合蛋白家族成员,主要表达在中枢和周围的神经元中,在肠黏膜下神经丛和肌间神经丛中广泛存在。目前国内外已有多篇关于钙视网膜蛋白的基础研究,本文旨在分析钙视网膜蛋白染色在肠无神经节细胞症诊断中的应用情况。

材料与方 法

一、临床资料

收集重庆医科大学儿童医院胃肠新生儿外科于 2011 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日收治的确诊肠无神经节细胞症患者 176 例,其中男性 120 例,女性 56 例。临床表现有胎便排出延迟、腹胀等,排便时需辅助排便措施,肛查有爆破样排便 69 例,患儿均行钡剂灌肠,形态改变高度怀疑肠无神经节细胞症的患儿有 158 例(158/176,占 89.8%)。

收集本院同期收治的确诊肠神经节细胞发育异常症的患儿 42 例,均经根治术或造瘘术确诊,4 例术前行直肠黏膜活检术。

二、方 法

直肠黏膜活检采用黏膜活检吸引钳,吸引压力控制在 10 ~ 15 mL,在直肠后壁和侧壁距齿状线上 3 cm 处各取黏膜一块,钳取组织约 0.2 cm × 0.4 cm,厚度约 0.1 cm。

三、检查方法

选用 HE 染色方法检查肠壁神经节细胞的发育

情况:通过黏膜活检获取的黏膜和(或)黏膜下组织神经节细胞稀疏,需连续切片观察,正常肠黏膜可观察到神经节细胞;怀疑肠无神经节细胞症患者肠黏膜无神经节细胞。肠无神经节细胞症术后获得的肠管扩张段结肠组织可见肌间神经丛及发育良好的神经节细胞。肠无神经节细胞症痉挛段无神经节细胞。

采用免疫组织化学的方法检查钙视网膜蛋白的表达情况:棕色表达提示有神经节细胞或神经纤维,未见棕色沉淀表明缺乏神经节细胞或神经纤维,可诊断肠无神经节细胞症。

四、统计学处理

所有数据通过 SPSS17.0 统计学分析软件处理,统计学方法为 fisher 精确概率法。

结 果

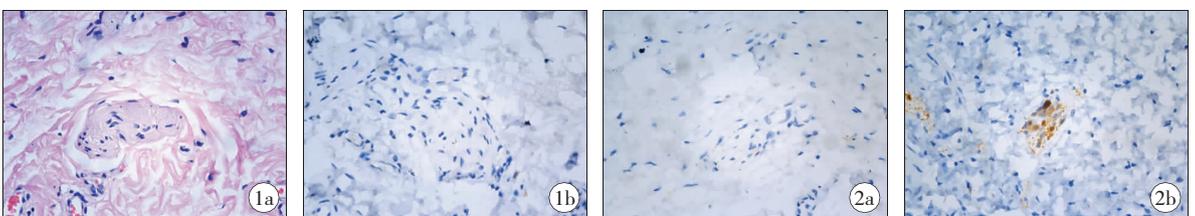
一、术前检查结果

肠无神经节细胞症患者术前直肠黏膜活检获取直肠壁组织检查连续切片 HE 染色黏膜和黏膜下层未见神经丛及神经节细胞 112/114 例,钙视网膜蛋白的表达阴性 111/114 例。2 例短段型肠无神经节细胞症 HE 染色可见神经节细胞,钙视网膜蛋白染色阳性,1 例 HE 染色未见神经节细胞,钙视网膜蛋白染色阳性。22 例直肠黏膜活检患儿为小于 1 个月的新生儿,连续切片黏膜和黏膜下层未见神经丛及神经节细胞 22/22 例,钙视网膜蛋白的表达阴性 22/22 例。

肠神经节细胞发育异常症患者中 4 例行术前直肠黏膜活检,3 例 HE 染色未见神经节细胞,钙视网膜蛋白染色阴性,1 例 HE 染色可见发育不良神经节细胞,钙视网膜蛋白染色阴性。

二、术后病理检查结果

肠无神经节细胞症:①痉挛段、扩张段标本行 HE 染色,所有病例痉挛段黏膜下及肌间神经丛均未见神经节细胞,在扩张段切缘可见发育好的神经



HE 染色 HD 患儿肠壁黏膜下未见神经节细胞 钙视网膜蛋白在 HD 患儿活检肠壁未见棕褐色颗粒 钙视网膜蛋白在痉挛段肠壁未见棕褐色颗粒表达 钙视网膜蛋白在扩张段肠壁见棕褐色颗粒表达

图 1 HD 患儿黏膜活检肠壁(400 ×); 图 2 HD 患儿根治术后肠壁(400 ×)

Fig. 1 Mucosal biopsy of HD patients (400 ×); Fig. 2 Postoperative biopsy of intestinal wall for HD patients (400 ×)

节细胞；②痉挛段、扩张段标本行钙视网膜膜蛋白染色，痉挛段钙视网膜膜蛋白的表达为阴性 133/133 例，扩张段切缘钙视网膜膜蛋白的表达为阳性 133/133 例。

肠神经节细胞发育异常症：病变段钙视网膜膜蛋白表达阳性 42/42 例，HE 染色见到神经节细胞发育异常或减少 42/42 例。

表 1 HE 染色与 CR 染色诊断肠无神经节细胞症诊断阳性率(n)

Table 1 Positive staining rates of HE and CR in HD patients(n)

方法	阴性	阳性	阳性率(%)
HE	245	2	99.2
CR	244	3	98.8

注：Fisher 精确概率法， $P = 0.686$ ， P 值 > 0.05

讨论

在肠神经系统发育、分化及神经细胞从消化道口腔向直肠迁移过程中，BMP、Wnt、Ret、GDNF 及 Calretinin 等关键基因、易感基因及相关蛋白起着重要作用^[1-3]。特别是关键基因低表达，影响相应蛋白的形成，可导致结肠蠕动功能异常，形成肠无神经节细胞症^[4]。肠无神经节细胞症的诊断主要依据典型病史、体格检查及特殊检查，特殊检查包括钡剂灌肠、肛门直肠测压及病理检查。钡剂灌肠常显示钡剂排空显著延迟，有典型的痉挛段、扩张段的形态学改变。本组 176 例中钡剂灌肠怀疑为肠无神经节细胞症的有 158 例，肠无神经节细胞症的诊断率为 89.9%，新生儿不容易观察到巨结肠的三段征象，诊断率更低。肛门直肠测压未引出正常的括约肌松弛反射对肠无神经节细胞症具有诊断意义。De^[5]等通过对 111 例便秘患儿进行前瞻性研究得出肛门直肠测压对肠无神经节细胞症诊断的灵敏度为 83.0%，特异度为 93.0%。周雪莲^[6]等对 42 例经手术病理检查或直肠黏膜活检确诊肠无神经节细胞症的患儿术前肛管直肠测压结果进行分析，发现新生儿肠无神经节细胞症诊断符合率仅 71.4%。1972 年 Meier-Ruge^[7]等提出乙酰胆碱酯酶(AchE)染色，通过显色反应看到深褐色胆碱能纤维大量增生即可诊断肠无神经节细胞症。2001 年 Nakao^[8]等对 459 例肠无神经节细胞症病理标本 AchE 分析发现特异性近 100%，但敏感度仅 91%。2011 年有学者指出 AchE 染色检查具有较高的特异性，新生儿及婴儿均为 100%，但是灵敏度不高，新生儿仅

40.0%，婴儿为 88.8%^[9]。除此之外，AchE 染色结果不同病理科医师之间分歧较大，临床逐渐淘汰。近年来免疫组织化学染色法作为简单可靠的肠无神经节细胞症诊断方法成为研究热点，包括钙视网膜膜蛋白(Calretinin, CR)，Ret, NSE, S-100, GDNF, bcl-2 等，其中钙视网膜膜蛋白备受关注^[10-18]。

钙视网膜膜蛋白是钙结合蛋白家族成员，最早由 Rogers 从鸡的视网膜基因谱中克隆获得^[19]。主要表达在中枢和周围的神经元中，在肠黏膜下神经丛和肌间神经丛中广泛存在^[20,21]；是神经细胞内重要的活性物质，具有神经保护作用，并通过调节细胞内 Ca^{2+} 浓度参与肠无神经节细胞症的发病^[22,25]。2004 年，Barshack^[26]等通过对 10 例肠无神经节细胞症患者肠管进行研究，发现在正常肠段中钙视网膜膜蛋白对神经节细胞和神经纤维能够正常染色，但在痉挛段肠管不能见到钙视网膜膜蛋白阳性显色的神经节细胞，神经纤维的显色也明显异于发育正常的神经丛中的神经纤维。2012 年 Mehran Hiradfar^[27]等对肠道不同层次包括固有层，黏膜肌层，黏膜下层及肌层钙视网膜膜蛋白染色发现肠无神经节细胞症痉挛段各层均显示钙视网膜膜蛋白阴性染色，表明钙视网膜膜蛋白可以作为肠无神经节细胞症的诊断依据之一，且有很高的敏感性及特异性。本组病例中术前及术后共有 247 例肠无神经节细胞症患者痉挛段标本行了钙视网膜膜蛋白染色，244 例支持肠无神经节细胞症诊断，诊断阳性率为 98.8%，术后 133 例肠无神经节细胞症患者扩张段及 42 例肠神经节细胞发育异常症患者病变段钙视网膜膜蛋白染色均排除肠无神经节细胞症的诊断，具有较高的特异性。

本院从 2011 年开始行直肠黏膜活检钙视网膜膜蛋白染色检查，114 例肠无神经节细胞症患者中，111 例术前直肠黏膜活检钙视网膜膜蛋白染色阳性，诊断率达 97.4%。当出现直肠黏膜活检 HE 染色与钙视网膜膜蛋白染色结果不一致时诊断肠无神经节细胞症需依靠其他证据，如钡剂灌肠检查、肛管直肠测压检查，并且结合患儿临床症状及体征。肠无神经节细胞症术前活组织病理检查大部分采用直肠黏膜吸引活检术，2009 年国际胃肠工作小组提出，诊断性的直肠黏膜活检标本应取到直肠鳞状上皮与柱状上皮交界的近端 1~2.5 cm，厚度大于等于 3 mm，至少应包含黏膜下层的 1/3^[28]。Gonzalo^[29]通过回顾性分析证实钙视网膜膜蛋白染色在直肠黏膜活检标本取材不充足时仍具诊断价值。

值得关注的是，新生儿肠无神经节细胞症肠管

形态学改变不典型,术前明确诊断直接影响到治疗方案的选择及手术方法的确定,但目前临床上常规开展的钡剂灌肠造影、直肠肛管测压等辅助检查方法对于新生儿肠无神经节细胞症的诊断准确率不高。2009 年复旦大学附属儿科医院对 75 例疑诊为肠无神经节细胞症的新生儿进行对比分析,发现直肠肛管测压及钡剂灌肠造影术前诊断肠无神经节细胞症的准确率分别为 93.3%、86.7%^[30]。新生儿期肛管直肠的机能在生后仍有继续成熟的过程,关于 RAIR 出现的时间文献报道不一,从出生后 24 h 内至出生后 2 周不等。周雪莲等对 42 例经手术病理或直肠黏膜活检确认为肠无神经节细胞症的术前直肠肛管测压结果进行分析,发现新生儿期直肠肛管测压诊断肠无神经节细胞症的符合率仅为 71.43%^[6]。本组术前行直肠黏膜活检的新生儿有 22 例,均支持肠无神经节细胞症的诊断,与钡剂灌肠造影及直肠肛管测压相比,钙视网膜蛋白具有较高的灵敏度及特异度,且受年龄影响小,有利于肠无神经节细胞症患儿的早期诊断及治疗。

近期有学者提出钙视网膜蛋白阳性的神经纤维可以延伸至近端 1.5~2.5 cm 的无神经节细胞肠段,因此短段型肠无神经节细胞症直肠黏膜活检钙视网膜蛋白染色出现阳性神经纤维时应警惕假阳性结果的出现^[31,32]。本组病例中 1 例肠无神经节细胞症直肠黏膜活检 HE 染色未见神经节细胞,而钙视网膜蛋白染色阳性,分析原因可能与此有关。另外 2 例短段型肠无神经节细胞症直肠黏膜活检 HE 染色可见神经节细胞,同时钙视网膜蛋白染色阳性,分析原因可能与标本取材超过病变段有关。因此当临床高度怀疑肠无神经节细胞症时,如直肠黏膜活检与临床不一致,可考虑重复取材,或者全麻下取全层标本活检,以早期诊断肠无神经节细胞症,减少肠无神经节细胞症并发症的发生。

钙视网膜蛋白染色也有假阴性结果的可能,本组病例中 4 例肠神经节细胞发育异常症患者术前行了直肠黏膜活检,3 例 HE 染色未见神经节细胞,1 例 HE 染色可见发育不良神经节细胞,4 例钙视网膜蛋白染色均阴性,分析原因可能与标本取材过浅或者取材靠近肛门生理性无神经节细胞区有关。肠神经节细胞发育异常症的术前诊断困难,其临床表现与肠无神经节细胞症基本相同,钡剂灌肠及直肠肛管测压常难以鉴别两者,诊断依靠术后病理检查。对肠神经节细胞发育异常症的治疗仍有争议,通过手术切除病变段肠管,是有效的治疗措施,部分患儿

可保守治疗而痊愈,如术前能明确诊断,可减少对患儿的过度治疗。直肠黏膜活检 HE 染色可以看到黏膜及黏膜下层肠壁神经节细胞发育情况及数量,对肠神经节细胞发育异常症的诊断有一定意义,钙视网膜蛋白染色标记神经节细胞及纤维,无法观察神经节细胞的发育情况,对肠神经节细胞发育异常症的诊断意义不大^[33]。

钙视网膜蛋白染色诊断肠无神经节细胞症特别适用于新生儿,有利于早期诊断,但在术前直肠黏膜活检的应用中,因标本取材深度、位置等原因,仍有假阳性及假阴性结果的可能。

参考文献

- 1 Kapur R P. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease[J]. *Semin Pediatr Surg*, 2009, 18(4): 212-213.
- 2 Lu BC, Cebrian C, Chi X, et al. Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12): 1295-302.
- 3 Amiel J, Sproat-Emission E, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review[J]. *Med Genet*, 2008, 45: 1-14.
- 4 Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. The enteric nervous system[J]. *Dev Biol*, 2012, 366(1): 64-73.
- 5 De Lorijn F, Reitsma JB, Vo skuijl WP, et al. Diagnosis of Hirschsprung's disease: a prospective, comparative accuracy study of common tests[J]. *J Pediatr*, 2005, 146(6): 787-792.
- 6 雪莲, 陈正波, 欧弼悠. 新生儿肠无神经节细胞症直肠肛管压力监测及其临床意义[J]. *中华儿科杂志*, 2004, 42(9): 681-683.
- 7 Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, et al. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung disease [J]. *Pediatr Surg*, 1972, 7(1): 11-17.
- 8 Nakao M, Suita S, Taguchi T, et al. Fourteen-year experience of acetylcholinesterase staining for rectal mucosal biopsy in neonatal Hirschsprung's disease [J]. *Pediatr Surg*, 2001, 36(9): 1357-1363.
- 9 Robertas Bagdzevičius, Sigita Gelman, Ligita Gukauskienė, et al. Application of Acetylcholinesterase histochemistry for the Diagnosis of Hirschsprung's Disease in Neonates and Infants: a Twenty-year Experience [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2011, 47(7): 374-379.
- 10 陈菊霞, 顾志成. 钙视网膜蛋白在肠无神经节细胞症肠壁的表达及意义[J]. *中华小儿外科杂志*, 2012, 33(2):

- 88-91.
- 11 Yang WI, Oh JT. Calretinin and microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung's disease [J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48 (10):2112-2117.
 - 12 Volpe A, Alaggio R, Midrio P, et al. Calretinin, β -tubulin immunohistochemistry, and submucosal nerve trunks morphology in Hirschsprung disease: possible applications in clinical practice [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013, 57(6):780-787.
 - 13 Morris MI, Soglio DB, Ouimet A, et al. A study of calretinin in Hirschsprung pathology, particularly in total colonic aganglionosis [J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48 (5):1037-1043.
 - 14 Menchaca-Cervantes C, Rodríguez-Velasco A, Ramón-García G, et al. Hirschsprung's disease: the immunohistochemistry as ancillary method for the diagnosis [J]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2013, 51(6):610-613.
 - 15 殷敏智, 马靖, 张忠德, 等. 免疫组织化学染色在诊断肠无神经节细胞症和类缘病中的应用 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2013, 34(5):334-338.
 - 16 Bachmann L, Besend? rfer M, Carbon R, et al. Immunohistochemical panel for the diagnosis of Hirschsprung's disease using antibodies to MAP2, calretinin, GLUT1 and S100 [J]. See comment in PubMed Commons below *Histopathology*, 2015, 66(6):824-835.
 - 17 Małdyk J, Rybczyńska J, Piotrowski D, et al. Evaluation of calretinin immunohistochemistry as an additional tool in confirming the diagnosis of Hirschsprung disease [J]. *Pol J Pathol*, 2014, 65(1):34-39.
 - 18 王海涛, 李晓庆, 金先庆. 3 月龄以上儿童先天性巨结肠 81 例诊治分析 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2015, 14(3):186-189.
 - 19 Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons [J]. *Cell Biol*, 1987, 105(3):1343-1353.
 - 20 Sayegh AI, Ritter RC. Morphology and distribution of nitric oxide synthase-neurokinin-1-receptor-, Calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine [J]. *Anat Rec A Adv Mol Cell Evol Biol*, 2003, 271(1):209-216.
 - 21 Ellis LM, Mawe GM. Distribution and chemical coding of cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide (CART)-immunoreactive neurons in the guinea pig bowel [J]. *Cell Tissue Res*, 2003, 312(3):265-274.
 - 22 Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system [J]. *Trends Neurosci*, 1992, 15(8):303-308.
 - 23 Mosher JT, Yeager XI, Kruger GM, et al. Intrinsic differences among spatially distinct neural crest stem cells in terms of migratory properties, fate determination, and ability to colonize the enteric nervous system [J]. *Dev Biol*, 2007, 303(1):1-15.
 - 24 Matsuda H, Hirato J, Kuroiwa M, et al. Histopathological and immunohistochemical study of the enteric innervations among various types of aganglionoses including isolated and syndromic Hirschsprung disease [J]. *Neuropathology*, 2006, 26(1):8-23.
 - 25 高红, 白玉作, 刘红, 等. 肠无神经节细胞症 C-fos 原癌基因表达的研究 [J]. *中华消化杂志*, 2000, 20(4):234-236.
 - 26 Barshack I, Fridman E, Goldberg I, et al. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(7):712-716.
 - 27 Hiradfar M, Sharifi N, Khajedaluae M, et al. Calretinin Immunohistochemistry: an aid in the diagnosis of Hirschsprung's Disease [J]. *Ira J Basic Med Sci*, 2012, 15(5):1053-1059.
 - 28 Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(2):271-301.
 - 29 Gonzalo DH, Plesec T. Hirschsprung disease and use of calretinin in inadequate rectal suction biopsies [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(8):1099-1102.
 - 30 Huang Y, Zheng S, Xiao X, et al. Preliminary evaluation of anorectal manometry in diagnosing Hirschsprung's disease in neonates [J]. *Pediatr Surg Int*, 2009, 25(1):41-50.
 - 31 Kapur RP. Calretinin-immunoreactive mucosal innervation in very short segment Hirschsprung disease: a potentially misleading observation [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2014, 17(1):28-35.
 - 32 Sanda Alexandrescu, Harvey Rosenberg, Nina Tatevian. Role of calretinin immunohistochemical stain in evaluation of Hirschsprung disease: an institutional experience [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(12):2955-2961.
 - 33 刘洪江, 朱进, 向丽. 4 例先天性巨结肠同源病临床分析 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2015, 14(2):89-91.

(收稿日期: 2015-07-19)

(本文编辑: 尹强)