

· 综述 ·

先天性无神经节细胞症的病理学诊断研究进展

张 艳 综述 金先庆 审校

先天性无神经节细胞症(hirschsprung disease, HD)又称先天性巨结肠症,是一种由于肠壁黏膜下层神经丛和肌间神经丛中神经节细胞缺失导致的先天性肠道阻塞性疾病。临床诊断 HD 除了依据典型的临床表现、钡剂灌肠 X 线片、直肠测压外,病理检查仍是金标准。目前最常用的病理检查方法是苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)染色,研究较广泛的是免疫组织化学染色法,而相关基因表达蛋白的原位检测能从基因水平解释 HD 的发病机制,有广阔的应用前景。本文综述近年来病理技术在 HD 诊断方面的进展。

一、常规病理染色

常规病理染色主要指 HE 染色,目的在于观察显微镜下肠壁黏膜下层有无神经节细胞存在,如发现肠神经节细胞即可确诊。但要连续切片 40 张,厚度为 4 μm ,操作繁琐,工作量大,如非专人进行,结果并不一定准确^[1]。以下几种情况可导致结果不准确:①活检部位位于结肠过远端,此肠段在生理结构上缺乏神经节细胞;②活检标本太薄,未达黏膜下层 Meissner 神经丛;③神经节细胞尚未发育成熟或结构不典型,如新生儿期。以上影响诊断的准确性。

二、酶组织化学染色

AchE 染色是目前研究较多的一种方法。在 HD 病变肠段中, AchE 活性异常升高,通过显色反应看到胆碱能神经纤维大量增生,即可诊断 HD。最近有报告显示组织化学染色法仍然是诊断先天性巨结肠的金标准^[2]。也有报告显示乙酰胆碱酯酶染色具有良好的特异性(高达 100%),但敏感性不够(低至 85%),易产生大量假阴性结果^[3]。AchE 除存在于胆碱能神经元外,还存在于非胆碱能神经元,假阳性率高;在新生儿中易出现假阴性,这与新生儿阳性纤维发育不成熟有关;AchE 染色有潜在毒

性、受限于冰冻组织、容易出现模棱两可的染色结果,致诊断准确率下降。黏膜下神经丛比肌间神经丛稀疏,体积也较小,所含的神经节细胞较少,maia DM 通过研究发现,术中冰冻切片诊断 HD 的误诊率较高,因而在 I 期手术(asingle-stage procedure, SSP)术中冰冻切片作为首次诊断不是推荐的方法^[4]。因此,目前较少单一依靠 AchE 染色来诊断 HD,需要其他方法如免疫组化来协助诊断。

三、免疫组化染色

近年来研究和使用的最多的有三类免疫组织化学标记物:①对神经纤维和神经节细胞均标记的标记物;②只标记神经纤维而不标记神经节细胞的标记物;③只标记神经节细胞而不标记神经纤维的标记物。通过比较其中两类免疫组织化学标记物在病变肠壁的表达情况,可以较明确地观察有无神经节细胞,进而准确诊断 HD。

1. 钙视网膜蛋白(calretinin, CR): CR 是一种重要的钙结合蛋白,能够在 Ca^{2+} 浓度升高时防止细胞内自由 Ca^{2+} 的急剧升高引起的兴奋性中毒损伤,具有神经保护作用^[5]。2004 年,Barshack 等研究发现 CR 基因变异与 HD 发病有关,它在正常肠段中对神经节细胞和神经纤维能够正常染色,但是在痉挛段肠管不能见到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^[6]。另外, Kapur 等的研究发现与 Barshack 等一致,并且认为 CR 免疫组化染色在诊断先天性巨结肠方面优于 AchE 染色,其假阳性率低,结果容易判定,该研究提示 94% 的 HD 患者可以通过 CR 免疫组化染色得到明确诊断^[7]。2009 年,Guinard - Samuel 等回顾性研究了 131 例 HD 患者,通过 CR 免疫组化染色方法,经验丰富的病理学家诊断 HD130 例,经验不足的初级病理学家诊断 HD129 例^[3]。2011 年, Susan K 等研究认为, CR 免疫组化染色是一种有用的诊断 HD 的辅助诊断方法^[8]。

2. NSE (neuron-specific enolase, NSE): 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 NSE 转变为 NSE,对神经纤维及

神经节细胞均能显色。研究表明, NSE 免疫组织化学技术能使神经组织清晰可见, 即使新生儿黏膜下层发育不够成熟的神经节细胞也容易辨认。存在问题 NSE 不能用于定量计数神经节细胞, 只能用于定性诊断。

3. S-100 蛋白: S-100 蛋白是一组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。由于其是神经胶质细胞特异性蛋白, 神经节细胞体不表达, 故表现为空白状。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。Susan K 等应用 S-100 蛋白、外周蛋白与 HE 染色协同诊断 HD, 发现其敏感性及准确性均达到 100 %, 81 % 的 HD 患者行 S-100 染色呈阳性表达^[9]。

4. Bcl-2 (B cell lymphoma / lewkmia -2, Bcl -2): Bcl -2 是常见抗凋亡基因蛋白, 位于细胞线粒体、内质网和核膜上, 参与细胞的凋亡抑制过程, 对正常细胞起到保护作用^[10]。研究表明 Bcl-2 在神经节细胞损伤后表达增加, 并可促进神经节细胞存活^[11]。有研究发现 Bcl -2 只表达于发育异常的神经节细胞, 提示机体可能通过 Bcl -2 保持异常的神经节细胞的存活并维持其尚存的功能^[12]。研究发现, Bcl -2 在鉴别发育不成熟、形态较小的神经节细胞和神经胶质、神经卫星细胞中具有重要作用, 可用于新生儿 HD 的诊断^[13]。

5. 组织蛋白酶 D (CathepsinD, CAD): 组织蛋白酶 D 是一种天冬氨酸蛋白酶, 属于溶酶体酸性蛋白酶家族, 在细胞蛋白质的分解代谢中起关键作用, 可催化许多神经肽如 P 物质、生长抑素等的降解。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, 故可作为肠壁神经节细胞的标记物。组织蛋白酶 D 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, 不仅可应用于 HD 诊断, 而且可以判断神经节细胞的成熟程度, 用于评估预后^[14]。但不能用于术中冰冻组织切片, 使术中快速诊断受限。另外, CAD 除表达于神经节细胞外, 还阳性表达于组织细胞, 但组织细胞与神经节细胞不难鉴别: ①组织细胞常有长而扭曲的胞核, 缺乏明显的核仁; 神经节细胞核大而圆似“枭眼状”, 核仁清晰; ②组织细胞常单个存或于淋巴细胞同时现, 远离神经丛和神经纤维^[15]。

众多免疫方法中, CR 免疫组化方法用于诊断 HD 准确性、敏感性均较高, 易于使用和解释, 可以

同时用于冰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。但 CR 免疫组化方法从技术角度上需要 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。

四、基因相关表达蛋白的检测

随着分子生物学的迅猛发展, 越来越多的 HD 相关基因表达蛋白的检测应用于临床。现阶段已经确认的 HD 相关基因有原癌基因 RET、胶质细胞源性神经营养因子 (glia cells derived neurotrophic factor, GDNF)、神经营养因子、内皮素 B 受体 (endothelin receptor B, EDNRB)、内皮素 3 (endothelin3, EDN3)、内皮素转换酶 1、SOX10 以及 smad 相关蛋白 1 等 8 种基因^[16]。国外研究^[17]运用免疫组织化学方法发现, RET、SOX10 等基因相关蛋白在正常人或患儿直肠移行段以上肠壁黏膜下层及肌层表达, 而在狭窄段表达明显减弱。Uesaka 等^[18]发现: 当小鼠 RET 基因表达水平降为原来的 50% 时, 会出现类似于 HD 样无神经节细胞肠段。这些研究为 HD 术前行直肠黏膜活检明确诊断提供了新的思路。GDNF 是神经元和肠道神经节细胞有力的营养和生长因子, 体外实验证实其有促进神经节细胞存活的作用^[19]。2003 年, 在对 GDNF 杂合性突变小鼠研究时, 发现其肠神经元数量比正常减少了一半, 证实 GDNF 对肠神经的移行、增生具有重要作用^[20]。通过对中国人先天性巨结肠 EDNRB 和 EDN3 突变的筛查, 证实 EDNRB 突变与 HD 的关系, 并检测到一种中国人特有的突变类型 V185M, 提示 HD 基因突变的种族特异性^[21]。另外, 有研究^[22]通过免疫组化方法显示: EDNRB 和 EDN3 正常肠段的表达高于 HD 肠段上的表达, 在不同类型 HD 肠段上的表达程度有不同程度的差异, EDNRB、EDN3 基因与 HD 的发生及类型相关, 对 HD 的临床诊断与治疗提供新的研究方向。另外, 层黏连蛋白 (Laminin, LN) 作为重要的细胞外基质成分, 能特异地与细胞膜表面受体结合, 并改变细胞内骨架结构和肌动蛋白分子的排布情况, 使细胞定向迁移并分裂增殖, 促进肠道神经节细胞形成。有研究运用免疫荧光方法发现, LN 基因的表达在狭窄段、移行段、正常段依次减弱, 并且 LN 的以 α_2 、4、5 β_1 、2 γ I 链抗体在狭窄段神经丛呈强阳性表达, 明显异于移行段和扩张段^[23]。此研究不仅从肠道微环境角度解释了病变肠段神经节细胞形成、成熟障碍的原因, 还为 HD 研究提供了新的

假设:由于 RET 基因的表达减少或者突变为 HD 的形成提供了基因条件,而 LN 基因的表达异常,从组织条件上又过早地促进了肠道神经细胞的分化、发育、成熟、定居,从而导致了病变段神经节细胞的缺如。这样可能使两种学说统一起来进行深入研究,希望能从分子水平对 HD 的病因做更深入的研究和解释。HD 相关基因的表达蛋白能从基因水平解释 HD 的发病机制,有极广的应用前景,有望为临床诊治 HD 提供新的途径。

参考文献

- Moore SW, Johnson G. Acetylcholinesterase in Hirschsprung's disease[J]. *Pediatr Surg Int*, 2005, 21(4): 255-263.
- Sandra Montedonico, Patricio Caáceres, Natalia Muñoz, et al. Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years experience with more than 1,500 biopsies[J]. *Pediatric Surgery International*, 2011, 27: 479-486.
- Guinard - Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease[J]. *Modern Pathology*, 2009, 22: 1379-1384.
- Maia DM. The reliability of frozen-section diagnosis in the pathologic evaluation of Hirschsprung's disease[J]. *Am J Surg Pathol*. 2000. 24(12): 1675-1677.
- Iwashita T, Kruger GM, Pardoll R, et al. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function[J]. *Science*, 2003, 301(5635): 972-976.
- 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: 712-716.
- 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: 6-15.
- Holland SK, Ramalingam P, Podolsky RH, et al. Calretinin immunostaining as an adjunct in the diagnosis of Hirschsprung disease[J]. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2011, 15(5): 323-328.
- Holland SK, Hessler RB, Reid-Nicholson M, et al. Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease[J]. *Modern Pathology*, 2010, 23: 1173-1179.
- 陈春烨, 张乾勇, 易龙, 等. Bcl-2 在氧化低密度脂蛋白诱导人血管内皮细胞凋亡中的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(8): 663-667.
- Huang X, Wu DY, Chen G, et al. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism[J]. *Investigative Ophthalmology Visual & Science*, 2003, 44(1): 347-354.
- 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.
- Park SH, Min H, Chi JG, et al. Immunohistochemical studies of pediatric intestinal pseudo-obstruction: bcl2, a valuable biomarker to detect immature enteric ganglion cells[J]. *American Journal of Surgical Pathology*, 2005, 29(8): 1017-1024.
- Dzienis-Koronkiewicz E, Debek W, Sulkowska M, et al. Suitability of selected markers for identification of elements of the intestinal nervous system (INS)[J]. *Eur J Pediatr Surg*, 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[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27(1): 52.
- McCallion AS, Stames E, Conlon RA, et al. Phenotype variation in two-locus mouse models of Hirschsprung disease: tissue-specific interaction between Ret and Ednrb[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(4): 1826-1831.
- Jain S, Noughton CK, Yang M, et al. Mice expression a dominant-negative Ret mutation phenocopy human Hirschsprung disease and delineate a direct role of Ret in spermatogenesis[J]. *Development*, 2004, 131(21): 5503-5513.
- Uesaka T, Nagashimada M, Yonemura S, et al. Diminished Ret expression compromises neuronal survival in the colon and causes intestinal aganglionosis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(5): 1890-1898.
- Takahadhi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases[J]. *Cytokine Growth Factor*, 2001, 12: 361-373.
- Gianino S, Gilder JR, Gresswell J, et al. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation[J]. *Development*, 2003, 130: 2187-2198.
- Zhang XN, Zhou MN, Qiu YQ, et al. Genetic analysis of RET, EDNRB, and EDN3 genes and three SNPs in MCS + 9.7 in Chinese patients with isolated Hirschsprung disease[J]. *Biochemical Genetics*, 2007, 45: 523-527.
- 戚华, 黄剑飞, 鲁菊英, 等. 先天性巨结肠中 EDNRB 和 EDN3 的表达[J]. *天津医药*, 2007, 35(4): 268-269.
- Alpy F, Rife L, Jaubert F, et al. The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation[J]. *Hum Pathol*, 2005, 36: 1055-1065.