论著

文章编号:1000-5404(2010)01-0060-03

Bcl-2、钙视网膜蛋白在发育异常肠壁神经节细胞中的表达

朱 进[1],金先庆[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:病理科[1],小儿外科[2])

[摘要] 目的 探讨Bcl-2和钙视网膜蛋白(calretinin,CR)在不同发育程度肠壁神经节细胞中的表达及意义。**方法** 采用免疫组织化学染色观察Bcl-2、CR在40例先天性巨结肠病(hirschsprung disease, HD)、10例先天性巨结肠类缘病(hirschsprung's allied disease, HAD)和对照组肠壁神经节细胞的表达情况。**结果** Bcl-2表达于发育较差的神经节细胞,在发育成熟的神经节细胞不表达。CR表达于发育成熟的神经节细胞,在发育较差的神经节细胞不表达或弱表达。**结论** Bcl-2和CR在肠神经节细胞的特异性表达,有助于判断神经节细胞的成熟程度。Bcl-2在发育异常肠壁神经节细胞的功能维持和恢复上可能起到了重要作用。

[关键词] 先天性巨结肠;Bcl-2;钙视网膜蛋白;免疫组织化学

[中图法分类号] R725.74; R394.3; R341 **[文献标志码]** A

Expression of Bcl-2 and calretinin in dysplasia enteric ganglion cells of hirschsprung patients

Zhu Jin[1], Jin Xianqing[2] ([1]Department of Pathology, [2]Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] Objective To explore the expression of Bcl-2 and calretinin (CR) in enteric ganglion cells in different developmental conditions and its significance. Methods The immunohistochemical staining was carried out to detect the expression of Bcl-2 and CR in enteric ganglion cells at different intestinal segments from tissue samples of 40 hirschsprung disease (HD) cases (age, 26 d to 12 years old), 10 Hirschsprung's allied disease (HAD) cases and 10 normal controls. Results In immature ganglion cells, there was a strong expression of Bcl-2, and no positive to or poor expression of CR. In mature ganglion cells, there was a strong expression of CR but no positive Bcl-2 staining. Conclusion The specific expression of Bcl-2 and CR may play an essential role in judging if the ganglion cells are mature. Bcl-2 might be of importance in the maintenance and restore of the fuction of enteric immature ganglion cells.

[Key words] hirschsprung disease; Bcl-2; calretinin; immunohistochemistry

Corresponding author: Jin Xiangqing, Tel: 86-23-63638834, E-mail: etzhl@163.com

先天性巨结肠病(hirschsprung disease,HD)及先天性巨结肠类缘病(hirschsprung's allied disease,HAD)是一类肠壁神经节细胞发育异常、以排便障碍为临床表现的疾病。HD患儿痉挛段肠壁神经节细胞缺失,部分移行段、扩张段神经节细胞发育异常。HAD患儿临床症状与HD相似,但痉挛段存在发育异常神经节细胞。神经节细胞的缺失和发育异常是肠蠕动功能低下的形态学基础。神经节细胞发育异常的性质、程度和病变范围决定了患儿的手术方案和判断预后[1]。本研究探讨免疫组织化学指标B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/lewkmia-2, Bcl-2)和钙视网膜蛋白(calretinin,CR)在不同发育程度神经节细胞表达的意义,为临床诊断和发病机制研究提供理论依据。

[通信作者] 金先庆,电话:(023)63638834,E-mail:etzhl@163.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Bcl-2鼠抗人抗体、CR兔抗人抗体、S-P免疫组织化学试剂盒及DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司),Axioskop40显微镜及YC·YX-2050型病理图文分析系统(ZEISS公司)。

1.2 临床资料

收集我院病理科2005-2007年诊断为HD的根治术切除标本40例。诊断标准为痉挛段肌间神经丛中神经节细胞缺失。男性32例,女性8例,年龄26 d至12岁,其中<1个月3例,1~3个月10例,4个月至1岁13例,>1岁14例,其中36例为常见型,2例为长段型,1例为全结肠型,1例为全肠型。另外选择我院病理科2005-2007年诊断为HAD的手术切除标本10例。男性6例,女性4例,年龄2~11岁,中位年龄为5

岁。其中HAD亚型——肠神经元性发育异常症(intestinal neuronal dysplasia, IND)7例。诊断标准为痉挛段肌间神经丛中神经节细胞数量超过7个,并且有黏膜层胆碱酯酶活性增加。HAD亚型——神经节细胞减少症(hypoganglionosis,HG)3例。诊断标准为痉挛段各肌间神经丛中可见2个以下形态基本正常的神经节细胞。以上实验组标本均选择各例病例的痉挛段、移行段和扩张段蜡块进行切片。尸检结肠标本10例,经光镜检查可见发育成熟的神经节细胞,作为正常对照组。

1.3 免疫组织化学染色

免疫组化染色步骤采用S-P法,DAB显色。对石蜡块5 μm厚连续切片,进行免疫组织化学染色,一抗为Bcl-2、CR工作液,以PBS液代替一抗设阴性对照。步骤如下:切片脱蜡、水化;0.01 mol/L PBS冲洗;滴加3% H_2O_2,室温静置10 min;0.01 mol/L PBS冲洗;抗原修复;0.01 mol/L PBS冲洗;滴加正常山羊血清封闭液,室温20 min,甩去多余液体;滴加一抗,37 ℃ 1 h;0.01 mol/L PBS冲洗;滴加二抗,37 ℃ 15 min;0.01 mol/L PBS冲洗;DAB显色;自来水冲洗;苏木精复染;自来水冲洗;脱水、透明、封片。

1.4 数据测量及统计学方法

将Bcl-2表达阳性的病变神经节细胞、神经丛与Bcl-2表达阴性的正常组进行形态学比较。采用YC·YX-2050型病理图文分析系统,神经丛面积由病理图文分析系统测量神经丛长径和短径后自动算出。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件,行秩和检验。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色情况

10例HAD的痉挛段肠壁肌间神经丛神经节细胞均呈Bcl-2阳性(图1A),CR阴性、偶有弱阳性(图1B)。5例IND、1例HG的移行段肠壁肌间神经丛神经节细胞呈Bcl-2阳性,CR阴性、偶有弱阳性。其中3例IND的扩张段肠壁肌间神经丛神经节细胞呈Bcl-2阳性,CR阴性、偶有弱阳性。

40例HD中有19例移行段肠壁肌间神经丛神经节细胞呈Bcl-2阳性,CR阴性、偶有弱阳性。其中7例HD的扩张段肠壁肌间神经丛神经节细胞也呈Bcl-2阳性,CR阴性、偶有弱阳性。

10例对照组结肠肠壁肌间神经丛中神经节细胞均呈Bcl-2阴性(图1C),CR阳性(图1D)。

2.2 Bcl-2表达阳性的神经节细胞的数量、直径和神经丛面积

HD痉挛段肌间神经丛增生明显,面积可达正常组4倍以上,但无神经节细胞,所以只将HD移行段、扩张段阳性表达Bcl-2的神经节细胞纳入表1。文献[2]认为,HG病变肠段神经节细胞大小较正常,遂将其节细胞直径纳入表1后未作统计学比较。选用形态完整的神经丛和具有细胞核的神经节细胞纳入测量。测量结果见表1。Bcl-2阳性的神经节细胞直径、数量或所在神经丛的面积,与正常的神经节细胞和神经丛相比具有统计学差异($P<0.05$)。

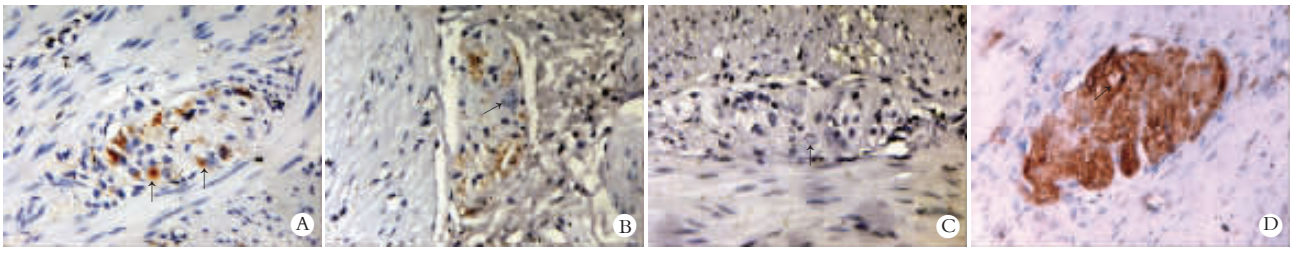
表1 各组神经丛及神经节细胞测量对比($\bar{x} \pm s$)

组别	神经丛数量	神经节细胞数量(个/神经丛)	神经节细胞直径(μm)	神经丛面积(μm²)
IND组	15	8.30±0.75[a]	17.65±0.83[a]	9 164.08±1 234.91[a]
HG组	4	1.00±0.89[a]	19.30±0.98	2 310.17±380.66[a]
HD组	26	3.07±0.80[a]	18.33±1.11[a]	6 457.89±924.22[a]
正常对照组	10	4.20±0.79	20.03±1.98	4 413.50±1 195.53

a: $P<0.01$, 与正常对照组比较

3 讨论

研究表明,先天性巨结肠及其类缘病除了肠壁神经节细胞的缺如或者形态、数量改变外,还有其功能的降低[3]。这些形态学变化在HD及不同的HAD亚型是不同的。通常HAD被分为4种亚型[2]:IND、HG、神经节细胞未成熟和神经元性发育不良。现普遍认为IND中可见到神经节细胞增多及巨大神经节形成[4]。其中神经节细胞增多即指肠壁单位长度内节细胞数目明显增多,常伴不成熟现象;巨大神经节指黏膜下丛内节细胞数目大于7个(正常为2~5个),神经丛面积大于等于正常的3倍。HG的神经丛和神经节细胞数均减少,稀少细小的肌间神经丛内仅1~2个形态基本正常的节细胞。本研究测量了表达Bcl-2的神经节细胞直径、数量及所在神经丛的面积,将其与对照组中的神经节细胞及所在神经丛进行统计学比较,发现表达Bcl-2的神经节细胞及所在神经丛的形态特点明显异于正常。IND中呈Bcl-2阳性、CR阴性的肌间神经丛神经节细胞体积较正常对照组小,数量明显增加,达7~12个,神经丛的面积也明显增加。HG中呈Bcl-2阳性、CR阴性的肌间神经丛神经节细胞数量明显减少,除部分神经丛缺如神经节细胞外,通常只有1~2个。神经丛的面积较之减小。HD移行段和扩张段呈Bcl-2阳性、CR阴性的肌间神经丛神经节细胞体积可



A: 肠神经元性发育异常症(Bcl-2) ↑:神经节细胞细胞质有表达; B: 神经节细胞减少症(CR) ↑:神经节细胞不表达;
C: 正常对照组(Bcl-2) ↑:神经节细胞不表达; D: 正常对照组(CR) ↑:神经节细胞有表达

图1 先天性巨结肠及其类缘病的免疫组化观察 (S-P ×400)

较正常对照组略小,数量也略有减少,但面积可达正常组2~3倍。测量及统计分析结果证明了Bcl-2检测结果是符合HD及HAD的病理变化的。

在普通HE染色下,发育异常的神经节细胞与神经丛中的Swann细胞、小胶质细胞及炎症细胞非常相似。这要求病理医师在光镜下非常熟悉正常的神经节细胞的形态和数量变化,所以如果Bcl-2、CR可以直接鉴别发育异常的神经节细胞,将是非常有帮助的。

国外研究表明Bcl-2只染色发育异常的神经节细胞,不染色成熟的神经节细胞[5]。本研究表明,Bcl-2在成熟神经节细胞、神经胶质、神经卫星细胞和炎症细胞均不染色。3例新生儿HD患儿扩张段和移行段均见表达Bcl-2的神经节细胞,说明这些神经节细胞均未发育成熟。可能是因为通常肠神经节细胞在新生儿出生2~4周后才发育成熟,也可能是因为HD病变所致;在部分非新生HD患儿移行段、扩张段肠壁标本中可看到Bcl-2的表达。这证实了除HD患儿痉挛段神经节细胞发育缺失外,还伴有其他肠段神经节细胞的发育异常。这是部分HD患儿在根治术后排便功能恢复困难原因之一;10例HAD患儿病变肠壁的神经节细胞发育异常,Bcl-2呈阳性表达。部分IND、HG移行段、扩张段神经节细胞未表达Bcl-2,其神经节细胞数量、形态如正常组神经节细胞。考虑为这部分患儿病情较轻,病变未累及移行段和扩张段。以上病变组均未见Swann细胞、小胶质细胞及炎症细胞表达。

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[6]。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[7]。本研究发现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。但是神经节细胞发育成熟以后,Bcl-2不再参与神经节细胞的抗凋亡过程。这种过程不但可能存在于神经系统发育不成熟的新生儿扩张段和移行段肠壁,还可能存在于由于HD本身病变或合并结肠炎造成的扩张段和移行段肠壁发育异常的神经节细胞中。

CR是一种重要的钙结合蛋白,能够在Ca^{2+}离子浓度升高时防止细胞内自由Ca^{2+}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[8]。国外关于CR的研究发现,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,但是在痉挛段的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[9]。在本研究中,3例新生儿HD患儿各肠段均不能见到阳性表达的神经节细胞,神经纤维呈弱阳性表达或不表达;在出现Bcl-2表达的非新生儿HD患儿移行段、扩张段肠壁标本中,见到神经节细胞不表达CR或弱表达;在10例HAD患儿痉挛段肠壁中神经节细胞不表达,神经纤维呈弱阳性表达或不表达。HAD中各含有Bcl-2阳性的神经节细胞的肠段均无CR的表达或弱表达。而在正常对照组中各例标本均表达了CR。说明CR主要表达于发育成熟的神经节细胞及周围的神经纤维,而在发育异常的神经节细胞及周围的神经纤维不表达或弱表达。

本研究表明,除HD及HAD痉挛段神经节细胞缺失或发育异常外,扩张段和移行段也可能伴有神经节细胞的发育异常,两者都是患儿肠蠕动功能低下的形态学基础。我们还发现Bcl-2除了不表达于成熟的神经节细胞外,还不表达于神经胶质、神经卫星细胞和炎症细胞。联合CR在神经节细胞的表达特点,可鉴别形态不典型的发育异常的神经节细胞,以助于HD及HAD的诊断。若应用于术后诊断及随访,有助于判断患儿肠功能恢复情况。Bcl-2的表达特点也提示了机体可能存在着促进异常发育的神经节细胞发育成熟或保护其功能的分子基础。在今后的研究中,若能进一步调控Bcl-2基因的表达,那么将会有望恢复HD及HAD患儿肠功能。

参考文献:

[1] Kohno M, Ikawa H, Fukumoto H, *et al*. Usefulness of endoscopic marking for determining the location of transanal endorectal pull-through in the treatment of Hirschsprung's disease[J]. Pediatr Surg Int, 2005, 21(11): 873-877.

[2] 张忠德. 先天性巨结肠类缘病[M]//武忠弼, 杨广华. 中华外科病理学. 北京:人民卫生出版社, 2002:3136-3138.

[3] Bassotti G, Villanacci V, Maurer C A, *et al*. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation[J]. Gut, 2006, 55(1): 41-46.

[4] Meier-Ruge W A, Bruder E, Kapur R P. Intestinal neuronal dysplasia type B: one giant ganglion is not good enough[J]. Pediatr Dev Pathol, 2006, 9(6): 444-452.

[5] Park S H, Min H, Chi J G, *et al*. Immunohistochemical studies of pediatric intestinal pseudo-obstruction: bcl2, a valuable biomarker to detect immature enteric ganglion cells[J]. Am J Surg Pathol, 2005, 29(8): 1017-1024.

[6] 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.

[7] Huang X, Wu D Y, Chen G, *et al*. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1): 347-354.

[8] Iwashita T, Kruger G M, Pardal R, *et al*. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function[J]. Science, 2003, 301(5635): 972-976.

[9] 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.

(**收稿**:2008-01-13;**修回**:2009-02-26)

(编辑 吴培红)