论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201502028

钙视网膜蛋白在先天性巨结肠中的诊断价值

童科融,朱 进,金先庆,李晓庆,向 丽,刘 伟,刘洪江,李 洪,王海涛 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院胃肠新生儿外科)

[摘要] **目的** 探讨钙视网膜蛋白(calretinin,CR)诊断先天性巨结肠(Hirschsprung's disease,HD)的概率及意义。**方法** 收集我院2008年1月至2014年10月经病理检查确诊为HD病例共495例资料,包括钡剂灌肠(contrast enema, CE)、直肠肛管测压(anorectal manometry, ARM)、经直肠黏膜吸引活检(rectal suction biopsy, RSB)等结果,通过上述各项检查阳性率来比较其在诊断HD中的价值,并分析出现CR阴性结果原因。**结果** 495例HD患儿中,435例术前CE,265例术前ARM,254例CR检查,其中术前经RSB 112例,术后142例。CE、ARM及CR诊断阳性率分别为81.1%、90.6%、99.6%,其中CR阳性率术前为98.2%,术后达100%。**结论** 诊断HD需依靠病史、典型的临床表现及辅助检查,特殊辅助检查中CR阳性率术前为98.2%,术后达100%,因此CR可广泛用于临床,作为术前HD诊断的重要指标。

[关键词] 先天性巨结肠;诊断;钙视网膜蛋白

[中图法分类号] R341;R446.8;R725.746.2 [文献标志码] A

Diagnostic value of calretinin for Hirschsprung's disease

Tong Kerong, Zhu Jin, Jin Xianqing, Li Xiaoqing, Xiang Li, Liu Wei, Liu Hongjiang, Li Hong, Wang Haitao (Department of Neonatal Gastrointestinal Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the probability and significance of calretinin (CR) in the clinical diagnosis of Hirschsprung's disease (HD). **Methods** A total of 495 children with pathologically confirmed HD *via* hematoxylin-eosin staining who admitted in our hospital from January 2008 to August 2014 were enrolled in this study. They were 387 boys and 108 girls, 178 of them were at an age o 0 to 3 months, and 317 older than 3 months, and at a mean age of 12 months and 14 d. Clinical data of contrast enema (CE), anorectal manometry (ARM) and rectal suction biopsy (RSB) were collected, and the clinical value of CR was analyzed with positive rates by above examinations. **Results** Among the 495 HD children, 435 received CE preoperatively and 353 were diagnosed as HD, with a diagnostic rate of 81.1%. There were 265 cases showing no rectoanal inhibitory reflex by ARM preoperatively, and the positive rate was 90.6%. For the 254 cases receiving CR staining after RSB (112 cases before and 142 cases after the surgery), 249 cases were negative to CR, with a diagnostic rate of 99.6%. Its positive rate was 98.2% before surgery, and 100% after surgery. **Conclusion** The clinical diagnosis of HD should be based on medical history, typical physical examination and auxiliary examination. Immunohistochemical assay for CR through RSB is of high diagnostic value, and should be widely used in clinical practice, and regarded as an important index in preoperative diagnosis of HD.

[基金项目] 国家自然科学基金(81370474);国家临床重点专科建设项目(国卫办医函[2013]544);重庆市卫生局医学科研计划(2013-2-053)

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

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150715.1033.006.html(2015-07-15)

[**Key words**] Hirschsprung's disease; diagnosis; calretinin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81370474), the National Clinical Key-discipline Construction Program (2013-544) and the Project of Medical Scientific Research Plan of Chongqing Municipal Health Bureau (2013-2-053). Corresponding author: Jin Xianqing, E-mail: etzhl@163.com

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)又称先天性肠无神经节细胞症(congenital aganglionosis),是小儿外科常见疾病之一。目前国内0~3月龄HD患儿术前诊断存在困难,少见大宗病例报道,诊断HD依靠临床表现及特殊辅助检查,包括钡剂灌肠(contrast enema, CE)、直肠肛管测压(anorectal manometry, ARM)以及直肠黏膜吸引活检(rectal suction biopsy, RSB)[1]。RSB在各项辅助检查中灵敏度及特异度最高[2]。钙视网膜蛋白(calretinin,CR)是一种重要的钙结合蛋白,存在于早期胚胎发育的肠神经系统(enteric nervous system, ENS)中,在肠黏膜下神经丛及肌间神经丛中广泛存在,是一种同时标记神经节细胞及神经纤维的神经标志物[3]。本研究利用临床大样本检测CR在HD肠壁中的蛋白表达,比较术前各项辅助检查方法诊断HD的阳性率,探讨CR可否作为术前诊断HD的重要指标,为小儿外科尤其是新生儿外科在HD的诊断及治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集重庆医科大学附属儿童医院胃肠新生儿外科2008年1月至2014年10月经HE染色确诊为HD的495例住院患儿资料:男性387例,女性108例;0~3月龄178例,>3月龄317例,平均年龄12个月14 d。病例资料包括钡剂灌肠、直肠肛管测压、经直肠黏膜吸引活检行CR染色检查等结果。

1.2 仪器与检查方法

钡剂灌肠:采用德国GMM OPERA 1000mA胃肠机。直肠肛管测压:采用美国Medtronic公司生产的Polygraf ID多道胃肠功能测定仪及美国Sierra Scientific Instruments公司生产的ManoScan™360胃肠动力学检查系统。直肠黏膜吸引活检:采用澳大利亚Aus Systems Pty Ltd公司的HP1000,CP1200型号黏膜活检吸引系统(rbi2),2.5 mm口径活检舱,吸引压力在15~20 mL,在齿状线上3 cm处在直肠后壁及侧壁个切取组织一块,组织大小约0.4 cm×0.2 cm,厚度约0.1 cm。活检前予回流灌肠1次。床旁行直肠黏膜吸引活检操作时,无需麻醉,患儿取膀胱截石位,常规消毒铺巾,活检舱安装于活检钳头部,石蜡油涂抹活检舱,将活检钳头部插入肛门,置于齿状线上3 cm处,将吸引孔紧贴直肠后壁,助手用注射器做负压吸引,使黏膜及黏膜下层组织进入吸引孔内,活动切割器切取组织,取出活检钳用生理盐水冲洗,使组织由活检舱处冲出,同法切取直肠侧壁组织1块,将2块组织标本置于10%甲醛中固定送检,通过HE染色检查黏膜下有无神经节细胞,免疫组织化学染色方法检查CR表达情况。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件,χ^2检验评价3种辅助检查方法。

2 结果

2.1 CE、ARM、CR检查结果

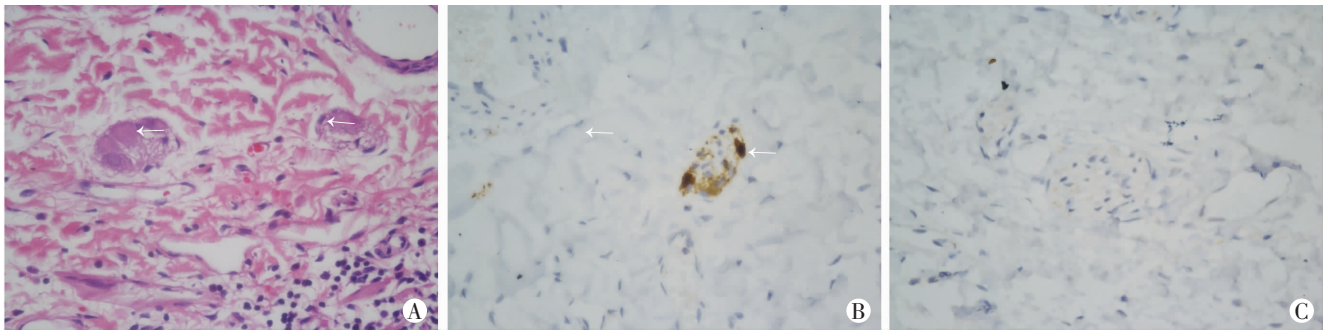
495例HD患儿中,435例CE中提示HD诊断的有353例,表现为24 h钡剂排空延迟或可见典型痉挛段、移行段及扩张段影像,未见典型HD征象的有82例,确诊率81.1%;265例ARM中未能引出典型直肠肛门抑制反射(rectoanal inhibitory reflex, RAIR)的有240例,能引出RAIR的有25例,确诊率90.6%;254例CR检查中CR阴性249例,CR阳性5例,确诊率98.0%(表1)。0~3月龄HD患儿CE确诊率78.3%;ARM确诊率89.6%;CR确诊率97.5%(表2)。≥3月龄HD患儿CE确诊率82.4%;ARM确诊率91.0%;CR确诊率98.5%(表3)。

2.2 CR染色检查结果

术前112例RSB(CR)阴性108例,RSB(CR)阳性4例,术后142例CR阴性141例,CR阳性1例。

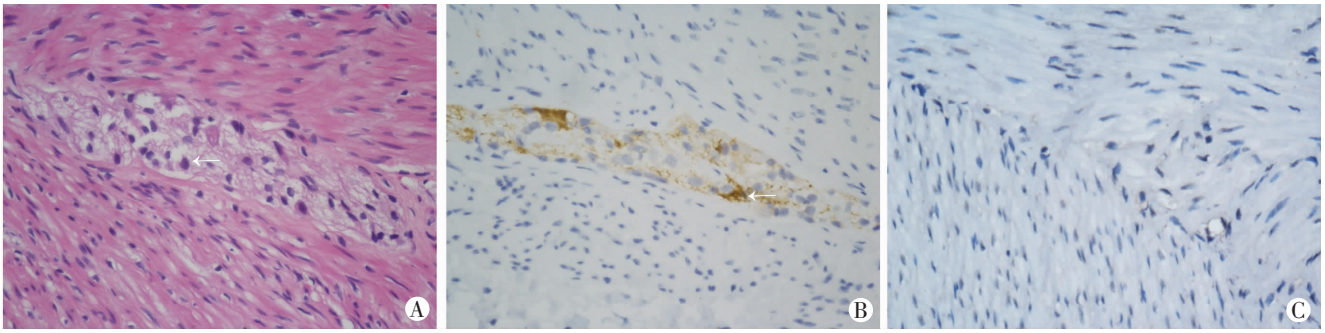
2.3 HE染色及CR表达情况

HE染色正常肠壁黏膜下神经丛(图1A)及肌间神经丛(图2A)。CR阳性反应于正常肠壁黏膜下神经丛(图1B)及肌间神经丛(图2B),可染色正常神经节细胞及神经纤维,表达在胞核及胞浆呈现为棕黄色。HD痉挛段肠壁黏膜下层(图1C)及肌层(图2C)CR均呈阴性表达。



A:正常肠壁黏膜下神经丛(HE);B:正常肠壁黏膜下神经丛(CR);C: HD痉挛段肠壁黏膜下层(CR) ↑:示神经节细胞

图1 正常及HD肠壁黏膜下神经丛病理变化 (×400)



A:正常肠壁肌间神经丛(HE);B:正常肠壁肌间神经丛(CR);C:HD痉挛段肌层(CR) ↑:示神经节细胞

图2 正常及HD肠壁肌间神经丛病理观察 (×400)

3 讨论

诊断HD需依靠病史、典型的临床表现及辅助检查,临床症状可有胎粪排出延迟、顽固性便秘及腹胀,若病史较长,婴幼儿可表现为营养障碍,学龄前儿童可表现为生长发育延迟,查体除腹部体征外肛指检查可扪及紧缩感或爆破样排气排便,由于HD临床表现出现时间不定且无特异性,因此HD单靠病史及临床表现往往不易诊断,需结合辅助检查综合分析,特殊检查包括:CE、ARM、RSB。

CE在诊断HD典型的影像学表现为痉挛段、移行段及扩张段,结合病史及症状体征,可作为HD初步诊断的依据。CE可较为直观的了解HD肠道的解剖结构并有利于估计术中切除肠段长度及手术方式的设计[4]。ARM是一种简单、安全、无创的HD术前检查手段,患儿行ARM年龄要求为胎龄加生后日龄大于40周,本研究ARM术前诊断HD阳性率为90.6%。ARM具有可重复性的优点,对于临床高度疑诊HD但单次ARM结果阴性的可以通过重复测压以降低漏诊率。回顾性研究显示出现HD征象的CE结合未引出RAIR的ARM检查诊断HD的灵敏度为98%,特异度达100%[5]。

HD最基本的病理特点是病变肠管黏膜下神经丛及肌间神经丛神经节细胞缺如,及异常增生的神经纤维,最常累及直肠及乙状结肠,也可累及全部结肠,偶可累及小肠[6]。常规HE染色工作量大,对病理医师的经验要求较高,同时标本有可能存在取材不足、部位过低等原因,均可影响HE染色结果判定的准确性。乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase,AchE)染色经研究表明用于协助诊断HD具有相当大的优势[7]。HD病变肠段镜下特征性的表现为神经节细胞缺如及胆碱能神经纤维AchE高表达。尽管AchE染色在诊断HD中因其较高的组织化学准确性被广泛用于临床,但仍存在一定的假阳性及假阴性结果[8]。近年有学者提出AchE染色特异性较高,可达100%,但其灵敏度不高,尤其是新生儿及婴儿,灵敏度仅为40.0%及88.8%[9]。原因可能与取材部位差异性、酶系统发育不成熟以及操作等因素有关[2]。此外,新生儿阳性神经纤维发育不成熟,神经节细胞较难与内皮细胞或其他黏膜下细胞相辨别,以及AchE染色需冰冻组织等原因,因此现较少单一依靠AchE染色诊断HD。

随着微创技术的发展,近年我院对疑诊HD 0~

3月龄的小婴儿,RSB已实现床旁操作,无需麻醉及术后物理止血,切取标本达黏膜下层,可经HE染色、免疫组化染色等检查用于协助HD诊断。目前通过免疫组化染色协助诊断HD应用越来越广泛,而CR免疫组化染色与术后病理诊断符合率非常高。

CR是一种重要的钙结合蛋白,其相对分子量为29×10^3,含269~271个氨基酸,由16q22-q23基因编码[10]。最早由Rogers从鸡的视网膜基因谱中克隆发现,因此得名。CR的表达与神经发育相关,目前研究主要集中于中枢神经系统,如小脑颗粒细胞,CR的缺失可导致早期有丝分裂后的颗粒细胞失去分化潜能并可远期影响其移行及存活[11],而CR的表达与PNS特别是ENS发育及HD发病的关系至今仍不清楚。CR能在细胞内自由Ca^{2+}的急剧升高时缓冲细胞内的Ca^{2+},避免引起兴奋性中毒损伤,在ENS的构成及功能中起重要作用[12]。CR在正常肠段中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[13]。经研究CR用于诊断HD具有很高的特异度及灵敏度[14-15]。Luis等[16]通过实验显示CR结合S-100染色RSB标本其特异度及阳性预测值均可达100%。同时CR在RSB取材不足时仍具有诊断价值[17]。2013年等[18]经回顾性分析表明CR染色优于AchE,尤其对于TCHD、RSB标本以及早产儿,CR有助于早期诊断HD。近年有学者指出CR阳性神经纤维可延伸至近端1.5~2.5 cm的无神经节细胞肠段,因此超短段型HD行RSB(CR)出现染色阳性神经纤维需警惕假阳性结果可能[20-21]。另外,CR免疫组化染色为显色反应,结果读取直观,对病理医师经验依赖度相对较低,CR检查还具有操作简单、成本低等特点。

本研究112例术前行了CR检查,共4例不支持诊断,分析术前4例RSB(CR)阳性原因:2例为小婴儿(1例日龄6 d,另1例日龄46 d),术后诊断均为短段型HD(痉挛段分别为2、3 cm),而RSB取材一般将活检钳放入肛门3~4 cm切取标本,因此推测该2例CR出现假阴性结果主要与RSB标本取材位置超过病变肠段有关。另外2例RSB(CR)阳性:其中1例标本为直肠后、侧壁黏膜共2例,免疫组化提示其中1例黏膜下神经丛CR弱阳性,另1例直肠黏膜标本免疫组化找到少量CR阳性神经纤维,考虑到CR的染色特点,结合患儿有典型临床表现,CBE、ARM支持HD诊断,术后病检均提示HD,需考虑先天性巨结肠类缘病(hirschsprung's allied disease, HAD)可能。

142例术后行了CR检查,1例不支持诊断,分析原因如下:2011年我院张艳等[22]对10例对照组肠管及50例HD扩展段、痉挛段肠管进行CR染色与HE染色对比研究,发现CR染色诊断HD与HE染色诊断HD阳性率无显著性差异。50例术后诊断HD病例CR染色49例阴性,1例CR阳性(即上述病例),该病理切片经3名病理科医师会诊反复切片后找到典型神经节细胞,排除HD诊断。

综上所述,术前112例行CR检查,2例考虑与RSB标本取材位置超过病变肠段有关,2例染色不典型考虑HAD可能。术后142例行了CR检查,1例不支持诊断,后经多名病理医师会诊反复切片找到神经节细胞排除HD诊断。CR诊断符合率术前为98.2%(108/110),术后达100%(141/141)。因此CR诊断HD有明显的优势,可广泛用于临床,作为术前HD诊断的重要指标。

参考文献:

[1] 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]. J Pediatr Surg, 2005, 40(10): 1527-1531.

[2] De-Lorijn F, Reitsma J B, Voskuijl W P, *et al*. Diagnosis of Hirschsprung's disease: a prospective, comparative accuracy study of common tests[J]. J Pediatr, 2005, 146(6): 787-792.

[3] 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.

[4] Garrett K M, Levitt M A, Pena A, *et al*. Contrast enema findings in patients presenting with poor functional outcome after primary repair for Hirschsprung disease[J]. Pediatr Radiol, 2012, 42(9): 1099-1106.

[5] Vult-von-Steyern K, Wingren P, Wiklund M, *et al*. Visualisation of the rectoanal inhibitory reflex with a modified contrast enema in children with suspected Hirschsprung disease [J]. Pediatr Radiol, 2013, 43(8): 950-957

[6] Kessmann J. Hirschsprung's disease: diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2006, 74(8): 1319-1322.

[7] Lake B D, Puri P, Nixon H H, *et al*. Hirschsprung's disease: an appraisal of histochemically demonstrated acetylcholinesterase activity in suction rectal biopsy specimens as an aid to diagnosis[J]. Arch Pathol Lab Med, 1978, 102(5):

244 – 247.

[8] Moore S W, Johnson G. Acetylcholinesterase in Hirschsprung's disease[J]. Pediatr Surg Int, 2005, 21(4): 255 – 263.

[9] Bagdzevicius R, Gelman S, Gukauskiene L, *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] Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S. 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice[J]. Cerebellum, 2002, 1(4): 241 – 258.

[11] Todkar K, Scotti A L, Schwaller B. Absence of the calcium-binding protein calretinin, not of calbindin D-28k, causes a permanent impairment of murine adult hippocampal neurogenesis[J]. Front Mol Neurosci, 2012, 5: 56.

[12] Baimbridge K G, Celio M R, Rogers J H. Calcium-binding proteins in the nervous system[J]. Trends Neurosci, 1992, 15(8): 303 – 308.

[13] 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.

[14] Yadav L, Kini U, Das K, *et al*. Calretinin immunohistochemistry versus improvised rapid Acetylcholinesterase histochemistry in the evaluation of colorectal biopsies for Hirschsprung disease[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2014,57(3): 369 – 375.

[15] 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.

[16] De-la-Torre L, Santos K, Vargas-Gonzalez R, *et al*. Hirschsprung disease. Evaluation of calretinin and S-100 as ancillary methods for the diagnosis of aganglionosis in rectal biopsies[J]. Acta Pediatr Mex, 2012, 33(5): 246 – 251.

[17] Gonzalo D H, Plesec T. Hirschsprung diease and use of calretinin in inadequate rectal suction biopsies[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(8): 1099 – 1102.

[18] Morris M I, Soglio D B, 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.

[19] Alexandrescu S, Rosenberg H, Tatevian N. Role of calretinin immunohistochemical stain in evaluation of Hirschsprung disease: an institutional experience[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12): 2955 – 2961.

[20] Kapur R P. Calretinin-immunoreactive mucosal innervation in very short-segment Hirschsprung disease: a potentially misleading observation[J]. Pediatr Dev Pathol, 2014, 17(1): 28 – 35.

[21] 张艳, 朱进, 王士奇, 等. 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[J]. 重庆医学, 2012, 41(33): 3468 – 3470.

(**收稿**:2014-12-15;**修回**:2015-02-01)

(编辑 黄 超)