

文章编号:1000-5404(2012)19-2005-04

论著

## 钙视网膜蛋白在先天性巨结肠病理诊断中的应用

朱进,安洪伟,赵涌,李昱 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:病理学教研室,神经科学中心,重庆市神经生物学重点实验室)

**[摘要]** **目的** 研究钙视网膜蛋白(calretinin, CR)免疫组织化学染色及胆碱酯酶染色(acetylcholinesterase staining, AchE)在先天性巨结肠(hirschsprung disease, HD)病理诊断中的作用对比,并探讨在直肠黏膜活检标本不足时CR的诊断作用。**方法** 采用回顾性研究的方法对比163例直肠黏膜活检CR免疫组织化学染色与AchE染色诊断HD准确性及敏感性。研究26例只含有1个黏膜下神经丛的直肠黏膜活检标本中,CR免疫组织化学染色辅助病理诊断的准确率。**结果** 在年龄<3个月的病例组中,CR免疫组织化学染色敏感度显著高于AchE染色。CR免疫组织化学染色能够准确诊断21例只含有1个黏膜下神经丛的直肠黏膜活检HD病例。**结论** CR免疫组织化学染色是一种优于AchE染色的直肠黏膜活检诊断HD的必要辅助方法。

**[关键词]** 先天性巨结肠;钙视网膜蛋白;胆碱酯酶染色

**[中图分类号]** R341; R446.8; R574.62

**[文献标志码]** A

## Application of calretinin in pathological diagnosis of Hirschsprung disease

Zhu Jin, An Hongwei, Zhao Yong, Li Yu (Department of Pathology, Neuroscience Center, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the role of calretinin (CR) immunohistochemical and acetylcholinesterase (AchE) staining in pathological diagnosis of Hirschsprung disease (HD) and the role of CR immunohistochemical staining in pathological diagnosis of HD when the rectum mucosal biopsy samples were inadequate. **Methods** The accuracy and sensitivity of CR immunohistochemical staining of rectum mucosal biopsy samples from 163 HD patients were retrospectively studied and compared. The accuracy of CR immunohistochemical staining of rectum mucosal biopsy samples containing 1 submucosal nerve plexus was studied in pathological diagnosis of HD in 26 patients. **Results** The sensitivity of CR immunohistochemical staining was significantly higher than AchE staining for the diagnosis of HD in patients aged <3 months. The CR immunohistochemical staining of rectum mucosal biopsy samples containing 1 submucosal nerve plexus could accurately diagnose HD in 21 patients. **Conclusion** CR immunohistochemical staining of rectum mucosal biopsy samples is better than AchE staining of rectum mucosal biopsy samples in diagnosis of HD.

**[Key words]** Hirschsprung disease; calretinin; acetylcholinesterase staining

Corresponding author: Zhu Jin, E-mail: zhujin79@qq.com

先天性巨结肠(congenital aganglionic megacolon, 又称 Hirschsprung disease, HD)是一种以远端直肠及其相邻结肠神经节细胞缺失为特征的先天性发育畸形<sup>[1]</sup>。直肠黏膜活检被广泛应用于诊断 HD。钳取包含黏膜下层的直肠黏膜组织,行病理检查,找到神经节细胞则排除 HD,反之则诊断 HD。但是黏膜下神经丛中含神经节细胞较少时,如神经节细胞减少症或3个月以内的健康婴儿,切片中可能没有神经节细胞,极易误诊。所以诊断过程中普遍存在的问题是:①活检标

本没有神经节细胞是否能够证明相应肠壁中没有神经节细胞?②需要多大的活检组织,才能代表肠壁的真实情况?胆碱酯酶(acetylcholinesterase stain, AchE)染色最早并最为广泛应用于辅助诊断,在无神经节细胞肠段胆碱能神经的数量增多和直径增粗,但 AchE 染色敏感性不足,易漏诊。因此,免疫组织化学被寄予厚望,常用神经特异性烯醇化酶等标记神经丛,用神经元抗核抗体等标记神经节细胞,但这些抗体仍无法解决上述问题<sup>[2]</sup>。钙视网膜蛋白(calretinin, CR)的出现给病理医师带来了希望<sup>[3-4]</sup>。在含有神经节细胞的肠段,神经节细胞及神经纤维均表达 CR;在无神经节细

**[通信作者]** 朱进, E-mail: zhujin79@qq.com

胞肠段,神经纤维不表达 CR。本研究回顾性分析对比 CR 免疫组织化学染色与 AchE 染色在 HD 诊断中的敏感性 & 准确性,并选择了仅含 1 个神经丛的直肠黏膜活检标本,观察 CR 的诊断是否有效。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

CR 兔抗人抗体,Elivision 免疫组织化学试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)、碘化乙酰胆碱(德国 Merck Medicals)、蔡司 Axioskop40 显微镜及 YC(YX-2050)型病理图文分析系统。

### 1.2 病例选择

随机选择 2008-2011 年重庆市儿童医院直肠黏膜活检含 2 个及以上黏膜下神经丛的有效病例 163 例,对比 CR 免疫组织化学与 AchE 染色敏感性 & 准确性。其中男性 132 例,女性 31 例。年龄 <3 个月病例中,非 HD 5 例,根治术后病检证实 HD 的 34 例;≥3 个月的非 HD 12 例,根治术后病检证实 HD 的 112 例。这些病例送检后均行快速法 AchE 染色及 CR 免疫组织化学染色。采用 1~163 号标签代替原玻片上的病理号。

选择 2008-2011 年重庆儿童医院直肠黏膜活检仅含 1 个黏膜下神经丛病例 26 例,研究 CR 诊断有效性。当次活检均未予诊断,并行再次活检。其中 5 例被排除 HD,根治术证实为 HD 的 21 例。采用 a-z 号标签代替原玻片上的病理号。

3 名病理医师独立观察 HE 染色切片、CR 免疫组织化学染色及 AchE 染色切片,评定结果为 HD、非 HD 及可疑病例。

### 1.3 染色方法及结果判断

石蜡块 5 μm 切片。免疫组织化学染色采用 EliVision 法,具体如下:石蜡切片脱蜡水化,PBS(pH=7.4)冲洗 3 次,每次 3 min;高压修复;加 3% 过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min;PBS 冲洗;加 CR,37 °C 下孵育 60 min;PBS 冲洗;加聚合物增强剂,室温下孵育 20 min;PBS 冲洗;加酶标抗兔聚合物,室温下孵育 30 min;PBS 冲洗;加现配 DAB 溶液,显微镜下观察 3~10 min。自来水冲洗,苏木精复染,0.1% 盐酸分化,自来水冲洗返蓝;脱水、透明、封片。

AchE 染色步骤<sup>[5]</sup>:活检标本冰冻 7 μm 连续切片 16 个面。

现配孵育液[每 10 毫升孵育液含碘化乙酰胆碱 50 mg、蒸馏水 1 ml、0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液(pH 值 5.5~6.0) 6.5 ml、0.1 mol/L 枸橼酸钠液 0.5 ml、30 mmol/L 硫酸铜液 1 ml 及 5 mmol/L 铁氰化钾 1 ml]中 37 °C 下孵育 15 min。冲洗后,滴加双氧水孵育 5 min,然后冲洗、苏木精复染、脱水、封片。

结果判定方法如下:CR 免疫组织化学染色,黏膜下神经丛中神经纤维棕黄色着色,判定为阳性,即排除 HD;若未着色判定为阴性,即诊断 HD。AchE 染色<sup>[6-7]</sup>,黏膜固有层、黏膜肌层或/和黏膜下层出现棕黄色粗大的神经纤维,≥10 条/100 倍视野,判定为阳性,即诊断 HD。若 <3 条或未着色,判定为阴性,及排除 HD。若 3~10 条,则判定为可疑病例。

### 1.4 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理,采用配对计数资料的  $\chi^2$  检验判断 CR 免疫组化染色及 AchE 染色在不同年龄组的敏感性差异。

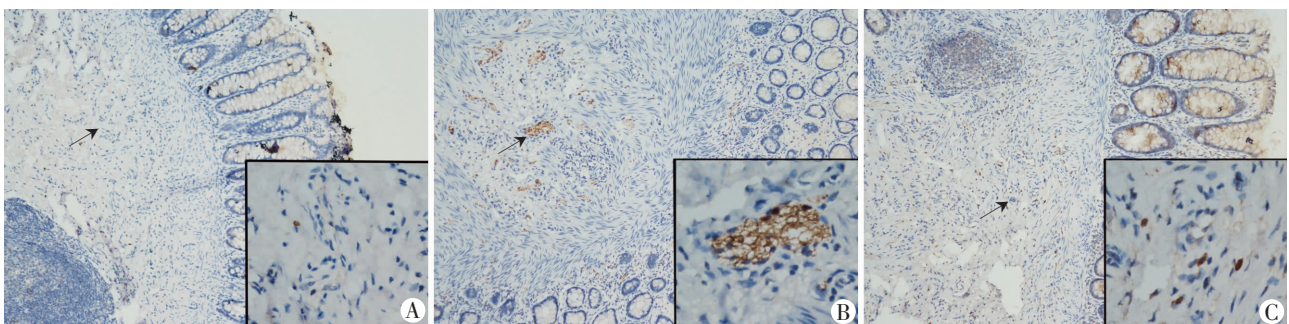
## 2 结果

### 2.1 CR 免疫组织化学染色及 AchE 染色在直肠黏膜活检诊断和排除 HD 中的应用

CR 免疫组织化学及 AchE 染色在直肠黏膜活检诊断结果如表 1。3 名病理医师观察 CR 免疫组织化学切片后,一致诊断 HD 的有 144 例(图 1A),均被证实为 HD;一致排除 HD 的有 17 例(图 1B),均被证实为非 HD。其中年龄 <3 个月病例组及 ≥3 个月组敏感度及特异度均为 100%。意见不一致 2 例,这 2 例均可见在黏膜下层找到细点状淡黄色的神经纤维(图 1C),2 名病理医师判断为可疑病例,1 名病理医师判定为 HD。再次活检及根治术后病检证实为 HD。

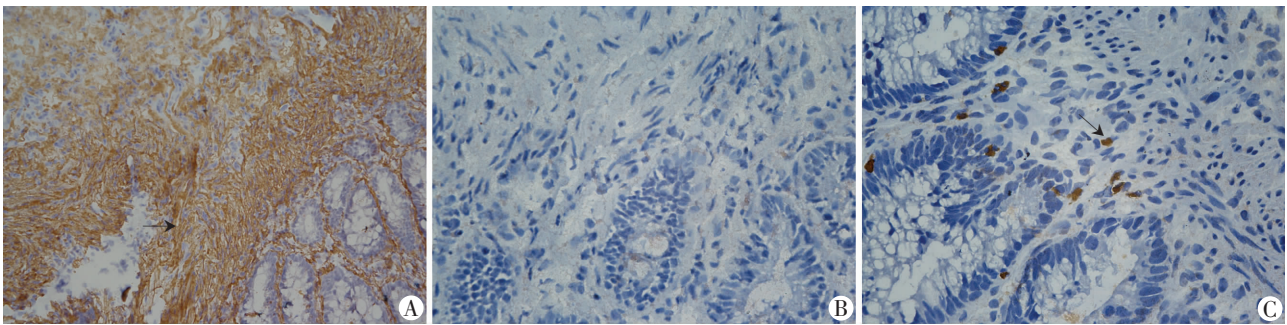
表 1 CR 免疫组化及 AchE 染色在直肠黏膜活检诊断应用中的对比

年龄	n	CR 免疫组化			AchE 染色		
		一致诊断 HD	一致排除 HD	意见不一致	一致诊断 HD	一致排除 HD	意见不一致
<3 个月	39	34	5	0	27	11	1
≥3 个月	124	110	12	2	107	14	3
合计	163	144	17	2	134	25	4



A: HD 痉挛段 ↑: CR 在 HD 活检标本黏膜下神经丛无表达,小图示阴性的神经丛(×400); B: 非 HD ↑: CR 在非 HD 肠壁黏膜肌层中的神经纤维及黏膜下神经丛中神经节细胞及神经纤维的表达,小图示阳性的神经丛(×400); C: HD 痉挛段 ↑: CR 在 HD 活检标本黏膜下神经丛中可见淡黄色颗粒状染色,小图示淡黄色颗粒状染色(×400)

图 1 CR 免疫组织化学染色在直肠黏膜活检诊断和排除 HD 中的应用 (EliVision ×100)



A: HD 痉挛段( $\times 200$ )  $\uparrow$ : HD 痉挛段黏膜固有层、黏膜肌层及黏膜下层增生的胆碱能神经; B: 非 HD 肠壁 AchE 染色阴性( $\times 400$ ); C: 非 HD 肠壁( $\times 400$ )  $\uparrow$ : 黏膜固有层中少量粗颗粒状结构

图2 AchE 染色在直肠黏膜活检诊断和排除 HD 中的应用

观察 AchE 切片后,一致诊断 HD 134 例(图 2A),均被证实为 HD。一致排除 HD 的有 25 例,其中 15 例被证实为非 HD(图 2B),10 例被证实为 HD。其中年龄  $< 3$  个月病例组敏感度为 81.8%, $\geq 3$  个月的病例组敏感度为 96.4%。2 个年龄组特异度均为 100%。假阴性 10 例中,6 例为  $< 3$  个月的小婴儿。意见不一致 4 例,均可在黏膜固有层看到少量阳性的粗颗粒状结构(图 2C),部分病理医师判断为可疑病例,其余病理医师判定为 HD。再次活检证实 2 例为非 HD,2 例为 HD。

经  $\chi^2$  检验,在年龄  $< 3$  个月病例组中,CR 免疫组织化学与 AchE 染色敏感度比较差异具有显著性( $P=0.03$ ),CR 免疫组织化学敏感度更高。在年龄  $\geq 3$  个月病例组中,CR 免疫组织化学与 AchE 染色敏感度比较差异无显著性( $P=0.25$ )。

### 2.2 CR 免疫组化在仅含少量黏膜下层(含有 1 个黏膜下神经丛)标本中的表达

26 例病例中,21 例黏膜下神经丛未见 CR 表达。再次黏膜活检及根治术切除标本证实为 HD。5 例黏膜下神经丛可见 CR 表达。再次黏膜活检黏膜下神经丛中找到神经节细胞,除外 HD。

## 3 讨论

AchE 染色是一种快速高效的染色方法<sup>[6]</sup>,根据碘化乙酰胆碱与 HD 患者病灶肠壁增生的胆碱能神经特异性结合的原理,通过了解胆碱能神经的多少和分布方式来诊断 HD。切片上强烈的色彩对比使判断结果非常容易。但染色操作复杂、试剂要求高,可导致人为的错误结果。小婴儿假阴性的染色结果也是困扰病理医师的难题。

CR 是一种钙结合蛋白,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,具有保护神经的作用<sup>[8]</sup>。国内外关于 CR 的研究发现,CR 基因变异与 HD 发病有关,可致胚胎期神经细胞内  $Ca^{2+}$  离子缓冲能力下降及细胞损伤<sup>[9]</sup>;在正常肠段中神经节细胞和神经纤维能够正常表达 CR,但是在痉挛段的肠管不能见到阳性显色的神经节细胞,神经纤维不表达或呈少量细点状淡黄色着色<sup>[3,10]</sup>。

本研究结果显示,在年龄  $< 3$  个月病例组中,CR 免疫组化敏感度明显高于 AchE 染色。准确区分了

HD 及非 HD。AchE 染色假阴性的 10 个病例中 6 例均为  $< 3$  个月的小婴儿。有研究认为,AchE 染色假阴性多见于小婴儿的原因多为超短段型巨结肠和没有取材到无神经节细胞区<sup>[11-12]</sup>。这 6 例均被 CR 免疫组化染色结果正确诊断为 HD,从而否认了以上说法。说明 AchE 染色假阴性结果的部分原因是染色原理和方法的缺陷。当神经节细胞缺失的时候,出现胆碱能神经的增生,从而被碘化乙酰胆碱结合,由铁离子染色。但是 3 个月以内的 HD 患儿增生的胆碱能神经量不足以被 AchE 染色。CR 免疫组织化学染色则不受患者年龄因素影响。

本研究 AchE 染色中,有 4 例意见不一致病例。黏膜固有层中可见少量阳性粗颗粒状结构,而不是纤维状结构。其中 2 例为 HD,2 例为非 HD,这种染色结果让病理医生很难诊断。CR 免疫组织化学染色中,有 2 例意见不一致病例,均为 HD,因其切片黏膜下神经丛中可见少量细点状淡黄色着色,明显不同于非 HD 病例中 CR 阳性着色的棕黄色粗大神经纤维,应判定为阴性,诊断 HD。这种染色差异的鉴别并不困难,总结后不会影响诊断。文献<sup>[4]</sup>报道这种淡黄色结构可能为肥大细胞的着色或血浆的非特异性染色。

本研究 CR 免疫组织化学染色准确鉴别了 26 例仅含有 1 个黏膜下神经丛的病例标本。其中 2 例非 HD 病例。经连续切片,黏膜下神经丛中未见神经节细胞。但 CR 免疫组织化学染色阳性,提示神经节细胞存在。经再次活检找到神经节细胞,证实为非 HD。可见在神经丛较少的情况下,即使切片中未找到神经节细胞,也不能轻易诊断 HD。

本研究解决了前言中直肠黏膜活检诊断 HD 的难题。切片中如果没有神经节细胞,CR 免疫组织化学染色能够通过神经纤维是否染色,间接提示神经节细胞是不存在于相应肠壁还是没有切到,具有极高的敏感性及准确性,能够准确诊断含 1 个及以上神经丛的直肠黏膜标本,并不受年龄影响。该方法操作简单,适合各级医院开展,应广泛推广于 HD 病理诊断中。

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] Kapur R P. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease [J]. *Semin Pediatr Surg*, 2009, 18(4): 212-223.  
[3] 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.  
[4] 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.  
[5] Kobayashi H, Miyahara K, Kusafuka J, *et al.* A new rapid acetylcholinesterase staining kit for diagnosing Hirschsprung's disease [J]. *Pediatr Surg Int*, 2007, 23(5): 505-508.  
[6] Nakao M, Suita S, Taguchi T, *et al.* Fourteen-year experience of acetylcholinesterase staining for rectal mucosal biopsy in neonatal Hirschsprung's disease[J]. *J Pediatr Surg*, 2001, 36(9): 1357-1363.  
[7] Pacheco M C, Bove K E. Variability of acetylcholinesterase hyperin-

ervation patterns in distal rectal suction biopsy specimens in Hirschsprung disease[J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2008, 11(4): 274-282.  
[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.  
[10] Holland S K, Ramalingam P, Podolsky R H, *et al.* Calretinin immunostaining as an adjunct in the diagnosis of Hirschsprung disease[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2011, 15(5): 323-328.  
[11] Chow C W, Campbell P E. Short segment Hirschsprung's disease as a cause of discrepancy between histologic, histochemical, and clinical features[J]. *J Pediatr Surg*, 1983, 18(2): 167-171.  
[12] Bagdzevicius R, Gelman S, Gukauskienė 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.

(收稿:2012-04-24;修回:2012-07-09)

(编辑 汪勤俭)

## 个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)19-2008-01

### 以周围神经病变为主要表现的 ANCA 相关性血管炎 1 例

钟家菊<sup>1</sup>, 魏有东<sup>1</sup>, 曹 笃<sup>1</sup>, 周婵娟<sup>2</sup>, 谢 鹏<sup>2</sup> (400016 重庆, 重庆医科大学: 附属第一医院神经内科<sup>1</sup>, 神经科学研究中心<sup>2</sup>)

[关键词] ANCA; 血管炎; 周围神经病变

[中图分类号] R543 [文献标志码] B

ANCA 相关性血管炎 (ANCA associated vasculitis, AAV) 通常以肾脏损害及肺部受累为主要表现, 也可累及全身皮肤、关节、肌肉、胃肠道、神经系统等, 但以周围神经病变为主要表现的病例十分少见, 我科收治 1 例, 报告如下。

#### 1 临床资料

患者女性, 69 岁, 因“发热 2 个多月, 四肢疼痛、麻木、无力 20 余天”于 2012 年 4 月 17 日入院。2 个多月前, 患者无明显诱因出现反复高热及咳嗽咳痰, 最高体温 39.9℃, 于当地诊所行感冒治疗, 体温反复, 病情无缓解, 转入当地三甲医院治疗, 仍反复发热, 体温波动在 37.5~38.5℃; 20 多天前, 患者感右下肢肢体疼痛、麻木、无力, 半天后逐渐向左下肢及双手蔓延, 不能行走, 无头痛、恶心、呕吐及大小便障碍。肌电图示: 双下肢备检肌神经源性损害, 脑脊液无色透明, 细胞总数 10×10<sup>6</sup>/L, 有核细胞数 2×10<sup>6</sup>/L, 蛋白 0.35 g/L, 糖和氯化物正常, 骨髓培养、血培养及肥达试验 (-), 胸部 CT 提示双肺间质性病变及双下叶肺炎, 纤维支气管镜未找到肿瘤及结核依据, 心脏彩超未见异常, 当地三甲医院全院会诊后考虑诊断“肺部感染、吉兰-巴雷综合征 (GBS)”, 予以抗感染、止痛、营养神经等治疗

后, 咳嗽咳痰明显好转, 但高热及全身疼痛、麻木仍持续存在, 为进一步诊治遂来我院。既往: 高血压病史 3 年, 否认外地久居史及旅游史。

入院查体: 神清, 精神差, 对答切题, 查体合作, 颅神经 (-), 双侧大小鱼际肌可见轻度萎缩, 双上肢肌力 IV 级, 双下肢肌力 IV, 肌张力不高, 四肢腱反射对称 (-), 双上肢及双下肢大腿下 1/3 以下肢体痛觉减退, 深感觉未见异常, 双侧病理征 (-)。体温: 38.9℃, 全身皮肤未见皮疹, 咽部未见充血, 双肺呼吸音粗, 未闻及干湿啰音, 心腹查体未见异常。

辅助检查: WBC 18.98×10<sup>9</sup>/L, Hb 96.0 g/L, PLT 443×10<sup>9</sup>/L, BUN 3.10 μmol/L, CREA 39 μmol/L, UA 101 μmol/L, 脑脊液无色透明, 细胞总数 50×10<sup>6</sup>/L, 有核细胞数 5×10<sup>6</sup>/L, 蛋白 0.37 g/L, 糖和氯化物正常。肌电图提示: 双侧正中、尺、胫、腓及右侧桡神经损害, 双 F 波及 H 反射传导速度减慢, 右侧肱三头肌及双侧肱二头肌、大小鱼际肌、腓肠肌神经源性损害。肝功、电解质、血脂血糖、肌酶谱、癌谱、大小便常规等未见异常。进一步辅查: ESR 75 mm/h, CRP 125.00 mg/L, RF 197.0 IU/ml, HsCRP > 20; p-ANCA (+, 1: 32), MPO (+), c-ANCA (-), PR3 (-)。结合患者病史体征, 我科考虑诊断: ① ANCA 相关性血管炎; ② 肺部感染; ③ 高血压病 2 级, 中危。结合风湿免疫科会诊意见, 予以甲泼尼龙 40 mg, 1 次/d, 静滴 2 周治疗后改为口服泼尼松片 50 mg, 1 次/d, 同时予以抗感染、营养神经等对症治

(下转 2015 页)