

先天性巨结肠患儿钡剂残留与 Cajal 间质细胞相关性的研究

李宁 韦佳 邱银荣 赵文涛 王文美 刘豫隆 冯杰雄

【摘要】 目的 通过比较先天性巨结肠患儿钡灌肠检查 24 h 后钡剂残留情况与肠壁 Cajal 间质细胞(ICC_s)数量之间的关系,探讨钡剂残留对判断肠管切除范围的指导意义。**方法** 研究对象为 34 例在我院诊断为先天性巨结肠并行根治手术的患儿。从每段切除肠管的近端及远端分别取一块标本行 HE 染色检测神经节细胞。每例患儿另取 3 块标本做免疫组化染色观察 ICC_s, 分别位于钡剂残留水平以下 3~5 cm(A 组)、残留处(B 组)以及残留水平以上 3~5 cm 处(C 组)。采用 ImagePro-Plus 图像定量检测比较三组标本 ICC_s 数量的差异。**结果** HE 染色示 34 例患儿远端标本均未见神经节细胞,且近端标本神经节细胞正常。免疫组化染色后 ICC_s 呈棕黄色,主要位于肠壁肌层及黏膜下层中。A 组标本肌层中 ICC_s 较稀疏,黏膜下层 ICC 几乎消失。B 组标本 ICC_s 变异度较大,部分标本 ICC_s 丰富,另有部分标本 ICC_s 显著减少。C 组标本肌层、黏膜下层中均可见丰富的 ICC_s。采用 ImagePro-Plus 测量三组标本照片的平均光密度,结果 A 组显著低于 C 组,两者相比差异有统计学意义。采用配对四格表比较两者相关性结果显示,根据钡剂残留判断 ICC_s 减少的特异度为 95.5%,敏感度 71.7%。**结论** 先天性巨结肠患儿钡剂残留段肠管 ICC_s 减少,巨结肠根治术肠管切除范围应包括钡剂残留段肠管,否则会因保留 ICC_s 异常肠管而导致便秘复发。

【关键词】 Hirschsprung 病; 间质细胞; 灌肠

Relationship between the amount of residual barium after barium enema and the quantity of interstitial cells of Cajal LI Ning, WEI Jia, QIU Yin-rong, ZHAO Wen-tao, WANG Wen-mei, LIU Yu-long, FENG Jie-xiong.

Department of Pediatric Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: FENG Jie-xiong, Email: fengjixiong@126.com

【Abstract】 Objective To figure out the relationship between the amount of residual barium after barium enema and the quantity of interstitial cells of Cajal (ICC_s) of the bowel wall and to assess the significance of barium residue on choosing the length of bowel to be resected during pull-through operation.

Methods Thirty-four Hirschsprung's disease (HD) children who underwent pull-through procedure were enrolled in this study. During operations, 2 pieces of bowel wall were obtained at the proximal and distal ends of each resected sample respectively, for HE staining to exam ganglion cells. Another 3 pieces were obtained and divided into 3 groups, for immunohistochemistry to exam ICC_s. Samples in group A were taken from 3-5 cm below the level of barium residue, samples in group B were taken from the level of barium residue, samples in group C were taken from 3-5 cm above the level of barium residue. ImagePro-Plus software was used to compare the amount of ICC_s between the 3 groups. **Results** ICC_s in group A were significantly less than in group C, whereas ICC_s in group A and group B, group B and group C were not significantly different. The specificity and sensitivity of radiocinating ICC_s by residual barium were 95.5% and 71.7% respectively. **Conclusions** ICC_s are reduced in the bowel segments that hold up the barium. During the pull-through procedure, segments that hold up the barium must be resected, or constipation may recur because of ICC_s reduction.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.16.013

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金(2008-890);湖北省自然科学基金(2007ABA092)

作者单位: 430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院小儿外科

通讯作者: 冯杰雄, Email: fengjixiong@126.com

【Key words】 Hirschsprung disease; Stromal cells; Enema

先天性巨结肠的主要治疗方法为切除病变肠管,解除梗阻,使排便通畅。以前认为切除神经节细胞缺乏或减少的肠管就可达到根治目的。但近年的研究发现,先天性巨结肠病变肠管 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)减少,而且巨结肠根治术后便秘复发的重要原因之一是保留了部分 ICCs 减少的肠管,因此手术中不仅要切除神经节细胞缺乏肠管,还应完整切除 ICCs 减少段^[1-2]。但术中准确判定 ICCs 减少的肠管有一定的困难。我们以前的研究表明先天性巨结肠患儿钡灌肠 24 h 后钡剂残留的部位在一定程度上能反映病变的范围^[3]。因此,本研究拟比较 24 h 钡剂残留情况与相应肠管 ICCs 减少之间的关系,从而探讨其对判断肠管切除范围的指导意义。

资料与方法

一、一般资料

收集 2008~2009 年在我院就诊的 34 例先天性巨结肠患儿,其中男 27 例,女 7 例,年龄从 3 个月到 7 岁,平均 35 个月。所有患儿均以便秘和(或)腹胀为主要表现,采用扩肛、灌肠等保守治疗便秘缓解不明显。

二、术前检查

本组患儿通过钡剂灌肠、直肠肛管测压、直肠黏膜乙酰胆碱酯酶(AChE)染色诊断为先天性巨结肠。钡灌肠中,23 例患儿可见明显的狭窄段,所有 34 例患儿 24 h 后有钡剂残留,其中 6 例患儿钡剂残留水平位于结肠脾曲以上,其余 28 例钡剂残留水平位于降结肠或以下(图 1)。测压检查中,29 例可见直肠肛管抑制反射消失,另 5 例反射存在。AChE 染色示 32 例患儿阳性,仅 2 例阴性。

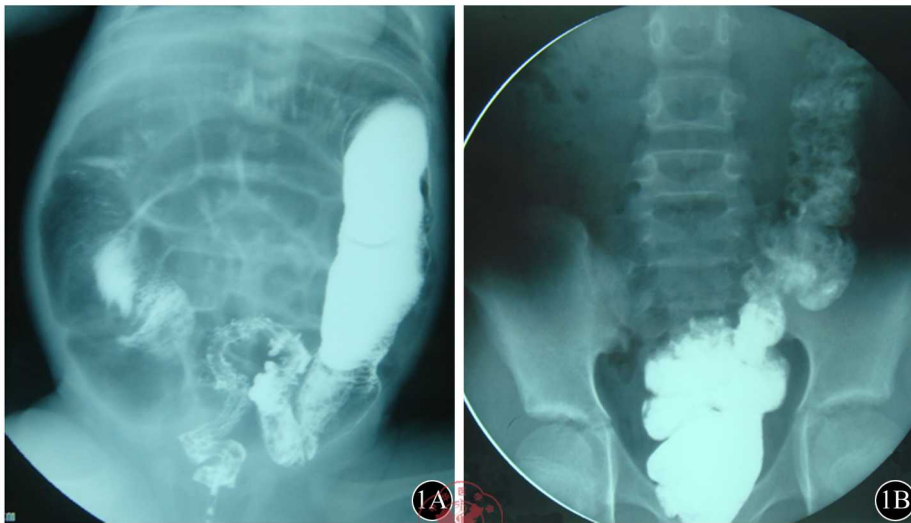


图1 患儿术前钡灌肠检查24 h后有钡剂残留。1A: 钡剂残留水平位于结肠脾曲; 1B: 钡剂残留水平位于乙状结肠

三、标本与染色

所有患儿均行巨结肠根治术治疗,手术中根据钡剂残留水平决定切除范围,使切除肠管包括钡剂残留段。每段切除肠管在近端与远端各取一块标本进行 HE 染色,用于观察神经节细胞。

每段肠管另取三块标本进行 ICCs 染色,分别位于钡剂残留水平以下 3~5 cm(A 组)、残留处(B 组)以及残留水平以上 3~5 cm 处(C 组),后者作为对照组。每块标本均包含肠壁全层。40% 甲醛固定 24 h 后,常规石蜡包埋、切片。采用 ABC 法染色,一抗为 1:500 稀释兔抗人 c-kit 抗体(Dako,美国)。DAB 显色,染色为棕黄色者为阳性。

四、图像处理与统计分析

ICCs 染色标本在 100 倍放大、相同曝光条件下通过显微镜照相,每张切片在肌层中拍摄 5 个视野,应用

ImagePro-Plus 6.0 图形分析系统,对 ICCs 的平均光密度进行检测。

将 A 组与 B 组中每个标本 5 张图片的均值与 C 组总体均值比较,分别判断每个标本 ICCs 是否减少。并计算用钡剂残留判断肠壁 ICCs 减少的敏感性和特异性。

五、术后随访

所有患儿术后 1 个月、3 个月、12 个月均来我院巨结肠及便秘门诊随访。随访内容包括大便次数与性状以及大便控制情况等。

六、统计学方法

用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析检验三组之间均值是否有差异,然后用 *q* 检验具体比较每两组之间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、HE 染色结果

HE 染色示 34 例肠管远端标本均未见神经节细胞。近端标本肌间及黏膜下神经节内均可见丰富的神经细胞。

二、ICCs 免疫组化结果

C 组标本中,肌间神经丛、环形肌和纵行肌内、黏膜下层中均可见大量棕黄色梭形 ICCs。肌间 ICCs 包绕神经丛生长,部分位于神经丛内;平滑肌内 ICCs 平行于肌纤维方向,相互之间可见“突触”连接成网络;黏膜下层中 ICCs 较稀疏;黏膜固有层中几乎未见梭形 ICCs,但有较多椭圆形的肥大细胞因表达 *c-kit* 而染色阳性。B 组标本中,ICCs 密度差异较大。大部分标本内可见丰富的 ICCs,少数标本肌间与肌内 ICCs 减少较明显。A 组标本中,绝大部分肠壁全层 ICCs 显著减少,黏膜下层 ICCs 几乎消失(图 2)。

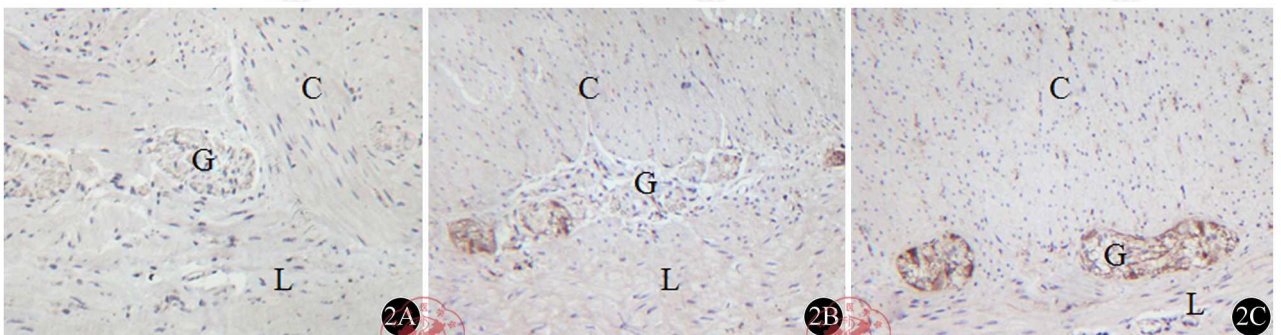


图2 三组标本免疫组化结果(ABC×100)。2A: A组标本中肌内ICCs和肌间ICCs显著减少;2B: B组标本中,部分标本可见ICCs减少;2C: C组标本中肌间神经丛、环形肌和纵行肌内可见丰富的染为棕黄色的ICCs。C: 环形肌;G: 神经节;L: 纵行肌

三、统计分析结果

应用 ImagePro-Plus 6.0 软件测量三组标本平均光密度,结果见表 1。单因素方差分析示,三组标本的平均光密度有统计学差异($P < 0.05$)。采用 *q* 检验进一步分析两两间差异,结果显示 C 组与 B 组间差异不明显,而 C 组和 B 组的平均光密度均显著大于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

比较 A、B 两组与 C 组 ICCs 数量后,绘制四格表(表 2)。

表 1 三组标本 ICCs 数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	平均光密度
A 组	0.73 ± 0.31
B 组	2.67 ± 1.30
C 组	3.04 ± 1.21

表2 钡灌肠与 ICCs 减少结果的比较(例)

ICCs 免疫组化结果	钡灌肠结果	
	A 组(钡剂残留以下)	C 组(钡剂残留以上)
ICCs 减少	33	13
ICCs 正常	1	21

根据钡剂残留判断 ICCs 减少的敏感度为 71.7%, 特异度为 95.5%。

四、随访结果

所有患儿大便次数从术后 1 个月的 2~5 次/d 减少为术后 1 年 1~3 次/d, 大便均能自控, 无便秘复发。

讨 论

判断肠管切除范围是巨结肠根治手术的难点。如果切除范围不足, 可能引起便秘复发^[4]; 如果为了保证切除所有的病变肠管而过多地切除了正常肠管, 又可能导致术后严重腹泻。特别是当病变范围达到降结肠或脾曲时, 到底选择左半结肠切除还是结肠次全切除, 即使对于很有经验的临床医师也存在一定困难^[5]。

Corazziari 等^[6]对 78 例 2 个月至 12 岁的正常儿童行结肠传输试验, 发现肠内容物从回盲部到排出肛门外的时间大约是 25 h。我们在临床工作中发现, 正常儿童在钡剂灌肠检查后 24 h 内应将钡剂全部排尽, 如果 24 h 后有钡剂残留于肠管内, 提示可能该肠管蠕动功能减低, 需手术切除; 如果残留的钡剂达到或超过脾曲, 即使狭窄段位于脾曲以下, 也应行结肠次全切除, 否则易导致便秘复发^[3]。在本次研究中, 我们发现钡剂残留段肠管的 ICCs 与正常肠管相比显著减少, 提示肠管内钡剂残留是因为 ICCs 数量减少所致, 且根据钡剂残留判断 ICCs 减少的特异性为 95.5%。本研究结果说明上述便秘复发的原因是保留了 ICCs 减少的肠管, 为以上判定标准提供了理论依据。

ICCs 在控制肠道运动中起重要作用^[7-8]。首先, ICCs 是肠道慢波活动的起搏细胞。在小肠中, 发挥起搏作用的 ICCs 位于肌间神经丛(ICC-MY), 而在大肠中位于黏膜下丛(MY-SMP)。它们相互交织成网状, 产生类似于窦房结细胞的自律性电活动, 使胃肠道平滑肌发生节律性的收缩。在小肠 ICC-MY 缺失的 W/W^v 突变小鼠, 其节律运动消失。其次, ICCs 也是神经信号的传导细胞, 该类 ICCs 主要位于平滑肌内(ICC-IM)。ICC-IM 表面有多种神经递质受体, 对多种兴奋性或抑制性神经递质, 如 5-羟色胺、胆囊收缩素 A、神经激肽、肠血管活性多肽等敏感。并且 ICC-IM 分别与肠神经细胞以及肠平滑肌细胞形成突触样连接(synapse-like contacts)和缝隙连接, 介导它们之间的信号传递。W/W^v 突变小鼠的胃底 ICCs-IM 缺失, 使其对一氧化氮和胆碱能神经刺激的反应都减弱。另外, 还有研究推测 ICC-IM 也是肠道中的牵张感受器。因此, 即使肠管中神经节细胞无异常而 ICCs 细胞的数量下降, 也将导致运动功能障碍, 使得粪便或钡剂残留。Bettolli 等^[2]研究证实, 巨结肠根治术中保留 ICCs 减少的肠管是导致术后便秘复发的重要原因之一, 因此手术中对于 ICCs 减少的肠管应完整切除。

巨结肠患儿 ICCs 下降的原因至今不明确, 推测可能与下列因素有关。(1)炎症因子: 研究表明巨结肠病变肠管多种炎症因子升高, 而 TNF- α 、IL-1 等炎症介质会影响 ICCs 表面受体 c-kit 的 mRNA 合成。c-kit 对维持 ICCs 的正常功能有重要作用, 它的合成减少可导致 ICCs 数量减低^[9]。(2)细胞凋亡: Gibbons 等^[10]在人结肠标本中检测到 ICCs 的凋亡, 并推测正常情况下 ICCs 的凋亡与再生保持动态平衡, 任何原因打破这种平衡都会导致 ICCs 下降。(3)神经细胞异常: 干细胞因子(SCF)是 c-kit 的配体, 而神经细胞是 SCF 的重要来源之一, 巨结肠及其同源病神经细胞消失或异常, 使得 SCF 分泌降低, 可能导致 ICCs 数量减少^[11]。(4)原发性减低: 导致肠神经细胞发育异常的基因或微环境因素也可能引起 ICCs 发育的异常。

本研究基于 Bettolli 等^[2]的 ICCs 减少会导致便秘复发的研究结果, 检测到钡灌肠 24 h 后钡剂残留段肠管 ICCs 减少, 证实巨结肠根治术中钡剂残留段必须切除, 对临床上掌握肠管的切除范围有一定的指导意义。但本研究样本量尚少, 且病例缺乏远期随访, 临床意义仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 宣晓琪,魏明发,周学峰,等. Cajal 间质细胞在先天性巨结肠和巨结肠同源病结肠中的分布研究. 中华普通外科杂志, 2007, 22: 619-622.
- [2] Bettoli M, De Carli C, Jolin-Dahel K, et al. Colonic dysmotility in postsurgical patients with Hirschsprung's disease. Potential significance of abnormalities in the interstitial cells of Cajal and the enteric nervous system. J Pediatr Surg, 2008, 43: 1433-1438.
- [3] Wu X, Feng J, Wei M, et al. Patterns of postoperative enterocolitis in children with Hirschsprung's disease combined with hypoganglionosis. J Pediatr Surg, 2009, 44: 1401-1404.
- [4] 刘向阳,白锡波,苏永红,等. 经肛门 Soave 术治疗新生儿巨结肠症[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5: 891-892.
- [5] 魏明发,吴晓娟,易斌,等. 巨结肠根治术后便秘复发的原因探讨. 临床外科杂志, 2008(5): 324-326.
- [6] Corazzari E, Cucchiara S, Staiano A, et al. Gastrointestinal transit time, frequency of defecation, and anorectal manometry in healthy and constipated children. J Pediatr, 1985, 106: 379-382.
- [7] Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, et al. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. Nat Med, 1998, 4: 848-851.
- [8] Garcia LP, Garcia MV, Martinez Murill R, et al. Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. Brain Res Rev, 2009, 61: 154-169.
- [9] Roskoski R Jr. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338: 1307-1315.
- [10] Gibbons SJ, De Giorgio R, Pellegrini MS, et al. Apoptotic cell death of human interstitial cells of Cajal. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21: 85-93.
- [11] Wu JJ, Rothman TP, Gershon MD. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand. J Neurosci Res, 2000, 59: 384-401.

(收稿日期: 2011-05-10)

(本文编辑: 戚红丹)

李宁, 韦佳, 邱银荣, 等. 先天性巨结肠患儿钡剂残留与 Cajal 间质细胞相关性的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(16): 4684-4688.