Sihler's 神经染色法再改良在中空器官中的应用

李 艳,黄小勇,邓义波,黄 建,陈道邦 (四川大学华西基础医学与法医学院,四川 成都 610041)

[摘 要] **目的** 探讨 Sihler's 肌内神经染色法再改良在中腔器官染色中的应用。**方法** 使用再改良的 Sihler's 肌内神经染色法整体染色人的食管、胃、膀胱。**结果** 各器官染色后,不需要剪开器官,支配食管、胃、膀胱的神经在器官壁内清晰可见,神经的分支以及分支间的联系可见。**结论** Sihler's 肌内神经染色法不仅适用于骨骼肌肌内神经染色,也适用于平滑肌,只要处理得当较大的器官不剪开的情况下也适用。

[关键词] Sihler's 神经染色法;中空器官;神经
[中图分类号] R322;R329-33 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)03-0246-04

Application of re-modified Sihler's nerve staining technique in tubular viscus

LI Yan, HUANG Xiao-yong, DENG Yi-bo, HUANG Jian, CHEN Dao-bang (Basic Medicine and Forensic Medicine of West China School, Sichuan University, Chengdu Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the application of the re-modified Sihler's nerve staining technique in tubular viscus. **Methods** Using the modified Sihler's nerve staining technique to stain the whole esophagus, stomach and bladder of human. **Results** Innervations of the esophagus, stomach, and bladder were clearly visible, small nerve branches and branch contact were visible without cutting the organs after staining. **Conclusion** Sihler's nerve staining technique is not only suitable for staining intramuscular nerves of skeletal muscle, but also suitable for smooth muscle. And it is also suitable for larger organs if this technique were handled properly.

Keywords: Sihler's staining nerve technique; tubular viscus; nerve

随着现代微创外科的发展,医生越来越重视术后病人的生活质量,如何才能在手术中尽可能地保留手术部位残留器官的功能以及减少相关并发症的发生是医生十分关注的问题。因此对器官壁内神经分布的了解有了更多的要求。一般对器官神经支配的研究是采用大体和显微外科解剖的方法,可以粗略显示神经在肌内分布情况,但是随着神经的不断分支,神经纤维越来越细小,变得难以与血管和结缔组织区别[1]。自从 19 世纪 Charles Sihler 采用 Sihler's 神经染色法进行完整肌内神经研究以来,经过学者的不断改良[2-4],到目前为止被认为是完整肌内神经分支分布研究优先选择的方法,主要应用于研究哺乳动物的骨骼肌。杨胜波等[5]用该法研究了人胃壁内迷走神经的分布;赵泽驹等[6]用该法研究了人膀胱肌内的神经支配及分布,认为 Sihler's 神经染色法也适用于研究平滑肌肌内神经的分布。但是在研究迷走神经的实验过程中沿胃大弯侧切开胃,研究膀胱壁内神经时自膀胱尖沿膀胱长轴纵行剪开膀胱前壁,这些切开破坏了器官结构的整体性,有可能破坏神经在切开区域的分布,且染色效果不好。本实验中在不切开中空器官的情况下应用再改良的 Sihler's 染色法完整清晰显示了神经在器官壁内的分布以补充解剖学的资料,为临床应用提供依据,也为以后研究中空器官提供一定的实验方法。

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201303005
[基金项目] 国家理科学人才培养基金能力提高项目(J1103604)
[通讯作者] 陈道邦,E-mail:chendaob@163.com
[收稿日期] 2013-04-27 [修回日期] 2013-05-03

1 材料与方法

1.1 材料

以合法途径取得人食管标本 15 例,胃标本 15 例,膀胱标本 15 例。从舌骨平面到十二指肠上部取食管和胃,保留食管两侧的组织结构;切取膀胱并保留双侧输尿管盆段约 4 cm。生理盐水冲洗,10% 福尔马林常温固定 6 周。

1.2 再改良的 Sihler's 肌内神经染色法

1.2.1 除色素 组织固定后用流水冲洗至无甲醛味,约 10 h。冲洗胃、食管时可以从胃幽门处插乳胶管,冲洗膀胱时可以从尿道内口插入带有特制玻璃管的乳胶管,缓慢冲洗胃、食管、膀胱内壁,水从食管端、输尿管端流出。为了加快冲洗膀胱壁可在膀胱壁上插入两个 5 号针头以便水流出。然后用 3% KOH 加 3% H_2O_2 溶液灌入胃、食管、膀胱内,除色素,液体变浑浊后及时更换,并随时观察标本中神经在器官壁内变化,此过程约需 3 ~ 4 周。

1.2.2 脱钙 标本置于流水下冲洗 30 min,浸入 Sihler's Ⅰ溶液进行脱钙,在胃、食管、膀胱内灌入脱钙液,约每 4 d 换脱钙液 1 次。需要 3 周左右至透明。

1.2.3 染色 脱钙后的标本在流水下冲洗 30 min,在胃、食管、膀胱内灌入染色液,浸入 Sihler's Ⅱ溶液染色,每 1 ~ 2 周换

染色液 1 次,直至肌内神经染色为止,此过程需 2 ~ 3 周。

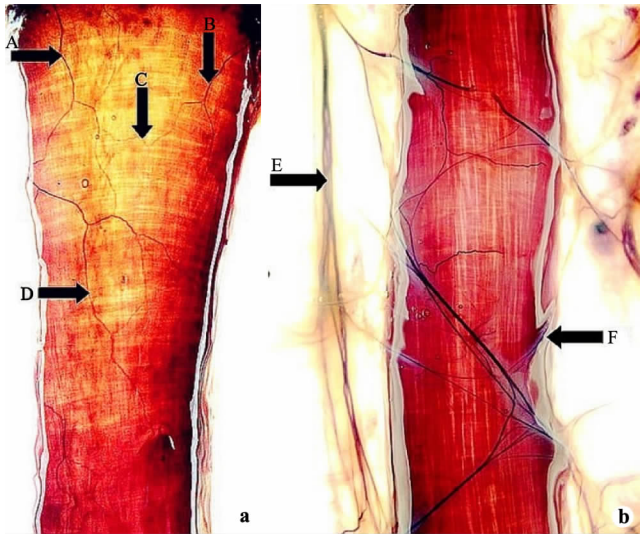
1.2.4 脱色 将染好色的标本置于流水下冲洗 30 min,然后将标本放入酸性分化液(由 1 份盐酸,100 份 70% 酒精溶液配制而成)进行脱色,随时在 X 线片阅片箱下观察肌内神经与肌肉颜色的对比度,直到肌内神经显示紫蓝色,肌肉呈棕红色为止。此过程时间视标本大小及肌肉厚度而不同。再次改良的方法不需要中和,脱色完毕后只需置于流水下冲洗 30 min。

1.2.5 透明 剔除筋膜,然后将标本依次放入 40%、60%、80%、100% 梯度甘油中进行透明,及时更换甘油。每个梯度透明 3 d,透明过程中注意观察,进行轻轻搅拌以透明均匀。避光保存在加入少许麝香草酚的 100% 甘油中。在 X 线片阅片箱下仔细观察肌内神经与血管的分支分布,照相。

2 结果

2.1 迷走神经在食管的分布

经染色处理后的食管成透明胶冻状,迷走神经在食管壁内的走行清晰可见(图 1)。食管上段前壁神经分支鲜见,后壁左右两侧均有迷走神经分支穿入,且两侧的神经分支之间有联系,吻合成不规则的多边形。两侧的迷走神经在食管中下段的前、后壁形成丰富的神经丛。右迷走神经发出分支形成食管后丛,部分神经纤维与左侧迷走神经形成食管前丛。左侧迷走神经分出的分支主要形成食管前丛,部分神经纤维参与右侧迷走神经形成食管后丛。

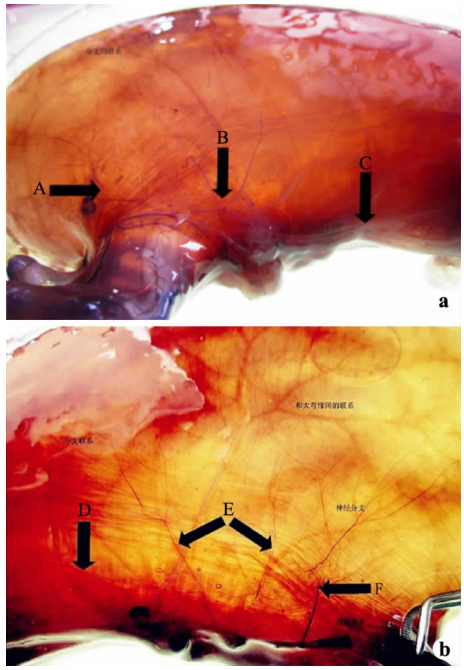


a:食管上段后壁神经分布及分支间的联系;b:食管中段前壁迷走神经的分布及分支间的联系;A:食管上段左侧迷走神经分支;B:食管上段右侧迷走神经分支;C:左右分间的联系;D:上下左右分间吻合成不规则多边形;E:右侧迷走神经;F:左侧迷走神经分支

图 1 食管壁迷走神经的分布及分支间的联系

2.2 胃迷走神经的分支分布

染色后的胃成透明胶冻状,神经分支较细小,有胃底支、胃体支、幽门前支、幽门后支。分支间在临近胃小弯 1/3 处开始有分支,向胃大弯发出各级分支,呈扇形分支分布,且分支间有吻合联系。在胃大弯侧胃前支和胃后支有吻合(图 2)。

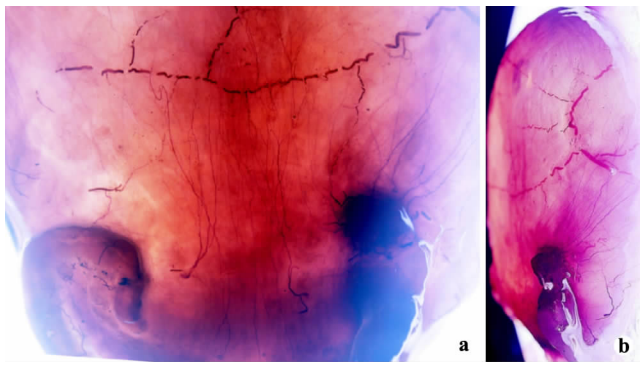


a:胃迷走神经前干的分支分布;b:胃迷走神经后干分支分布;A:胃底支;B:胃体支 C:幽门前支;D:胃体支;E:胃体支;F:胃底支

图 2 胃迷走神经的分支分布

2.3 膀胱壁内神经的分支分布

染色后的膀胱成透明状,在左右输尿管附近有较多的神经分布,向前下走行,沿途发出分支,分支间有交叉连接,支配膀胱两侧面及膀胱尖。右侧输尿管附近神经较左侧多。左右输尿管口之间有较多的神经纤维分布,神经纤维向前延伸(图 3)。膀胱三角区神经密集,是否和膀胱三角区一些疾病的发生存在联系,有待进一步研究。膀胱前壁神经分布较少。



a:两输尿管间的神经向前延伸;b:膀胱右侧面观(神经向侧面走行)

图 3 膀胱壁内神经的分支分布

3 讨论

Sihler's 染色法是目前研究骨骼肌内神经分布的优先选择方法,从实验结果可以看出,此法不仅适用于骨骼肌肌内神经的染色,同样适用于平滑肌肌内神经的染色。虽然杨胜波、赵泽驹等[5-6]用该法研究了胃和膀胱壁内的神经分布,但是都不同程度地破坏了器官

的完整性。现就Sihler's神经染色法在空腔器官中的应用以及笔者在实验中的一些经验加以讨论。

3.1 关于空腔器官的固定

王林波等[7]在消化道肿瘤切缘伸缩性的研究中指出:空腔器官离体后就有不同程度的回缩,切除标本离体后食管回缩44.5%、胃回缩13.6%。标本在固定的过程中又有一定的回缩,不同的器官回缩率不等,以固定后6~8 h回缩率明显,超过12 h后标本基本不再回缩。因此在固定空腔器官时,应当把空腔器官内腔用生理盐水冲洗干净,在腔内灌入适量固定剂使空腔器官处于适当充盈状态以维持器官的正常形态。固定1周后固定液浑浊要更换固定液。

3.2 器官的除色素

在用流水冲洗的过程中,为了加快甲醛被冲洗去除的速度,可以在空腔器官内放置连有特制玻璃管的乳胶管。冲洗后向空腔内灌入适量除色素的液体以加快除色素的速度和保证除色素内外壁均匀。不需要切开空腔器官以保证器官的完整性。在除色素的过程中器官组织会变软,组织间隙也会增大,因此每次换液时操作要轻柔以免折断在器官外的神经干。

3.3 除钙和染色

在除钙和染色的过程中,每次流水冲洗时都应该冲洗器官的内壁,除钙液和染色液都要适量灌入空腔器官内以达到器官除钙和染色均匀。由于空腔器官软化后体积增大,壁变薄,在X线片阅片箱上观察时器官也应灌入适量相应的液体,以免空腔器官前后壁重叠,影响观察效果。

3.4 脱色与透明

在脱色的过程中,器官腔内灌入适量脱色液使壁内、壁外同时脱色,脱色过程中,标本放在适当的容器内在摇床上震荡以脱色均匀。据实验观察发现:支配空腔器官壁内的神经相对细小。在脱色的过程中要不断观察,及时终止脱色过程以防脱色过度。使用的酸性分化液脱色快,其中含有的70%酒精具有部分脱水作用,脱色的过程中有透明效果,脱色后就可以看到神经之间的细小分支。透明过程中,不同梯度浓度的甘油适量灌入器官腔内增加透明的速度,标本完全浸泡在甘油溶液中。标本在低浓度的甘油溶液中会有部分脱色,注意观察,适当缩短标本在低浓度甘油溶液中的时间。拍照时,避免器官壁重叠,在器官腔内灌入适量100%的甘油。

国内外学者应用Sihler's染色法对骨骼肌进行了大量的研究,但该方法本身也有局限性[8]。其优点首先是,Sihler's染色法能在不切开或者不对标本切片的条件下,在完整的标本上观察到细小神经。其次,可以显示神经分支之间的联系。再者,整体染色不需要切片,能够清楚显示相邻结构之间的毗邻关系。可以同时观察到内在神经和动脉血管。Sihler's染色法还是存在一定的局限:①不能区分运动神经元和感觉神经元,只是选择性的使包绕神经轴突的髓鞘着色,神经种类的辨别只能追踪到穿入标本的神经干。②与其他实验方法相比,该方法十分费时,并且成功与否与实验者的经验相关。每一步骤的终止都依赖于实验者的经验。③由于是整体标本的染色方法,染色的质量会随着标本的大小和肌肉厚薄的不同而有差异。王启明等[9]通过对Sihler's染色法中固定、脱色、除钙、透明这几个步骤改良,研究家兔不同形态肌的神经分布,得出再改良后的Sihler's肌内神经染色法较再改良前更省时、更经济、更实用。但是总体来看整个染色过程还是较长。

随着修复重建外科以及微创外科等相关学科的发展,对肌内和中空器官壁内神经分支分布有了更高的要求,Sihler's染色技术的开展可以指导选择和切取部分肌肉用作移植,尽最大可能地减少肌肉内的神经损伤,保证肌肉移植后具有正常的神经支配,以重建其运动功能,尽可能地保留供区的各项功能。1964年Nielsen[10]指出:迷走神经切断治疗十二指肠溃疡可以引起胆结石的形成,同时胰腺的降低分泌反应,失去胰岛素反应,小肠扩张,肠绒毛减少,脂肪的吸收降低。研究中空器官壁内的神经分支分布有助于临床工作中对中空器官手术入路和手术方式的选择,最大限度地保护手术区器官功能,同时保留与相邻器官之间的功能关系。本文认为Sihler's染色法的进一步应用和改良尚需要深入探索。

[参考文献]

[1] Serlin DM, Schieber MH. Morphologic regions of the multitendoned extrinsic finger muscles in the monkey forearm[J]. Acta Anat (Basel), 1993, 146(4): 255-266.

[2] Liem RS, Douwe van Willigen J. In toto staining and preservation of peripheral nervous tissue[J]. Stain Technol, 1988, 63(2): 113-120.

[3] Wu BL, Sanders I. A technique for demonstrating the nerve supply of whole larynges[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1992, 118(8): 822-827.

[4] Liu J, Kumar VP, Shen Y, et al. Modified Sihler's technique for studying the distribution of intramuscular nerve branches in mammalian skeletal muscle[J]. Anat Rec, 1997, 247(1): 137-144.

[5] 杨胜波,薛 黔,蒋彦军,等. 人胃壁内迷走神经和动脉血管分布的应用解剖[J]. 贵州医药, 2008, 32(11): 967-969.

[6] 赵泽驹,苗向阳,陆 立,等. 人膀胱肌内神经分布及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(3): 386-388.

[7] 王林波,宋向阳,陈文军,等. 消化道肿瘤切缘伸缩性的研究[J]. 中华外科杂志,2002,40(4):271 -273.
[8] Mu L,Sanders I. Sihler's whole mount nerve staining technique: a review[J]. Biotech Histochem,2010,85(1):19 -42.
[9] 王启明,薛 黔,杨胜波. Sihler's 肌内神经染色法的再改良[J]. 遵义医学院学报,2003,26(4):322 -324.
[10] Nielsen JR. The development of cholelithiasis following vagotomy[J]. Am J Dig Dis,1964,9:506 -508.

(编辑:余汇洋)

·个案与短篇·

类风湿性关节炎累及环杓关节致呼吸障碍 1 例

彭 雪,黄茂华 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

[关键词] 类风湿关节炎;环杓关节炎;呼吸障碍
[中图分类号] R593.22 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2013)03-0249-01

类风湿性环杓关节炎具有较高的发病率,1/4 的环杓关节炎患者患有类风湿性关节炎[1]。该病多见于成人,由于临床症状不典型,且症状和体征易被误诊为喉炎、声带麻痹等其他喉部相关疾病,因此得不到及时合理地检查和治疗。本文就我科诊断的 1 例类风湿性关节炎累及环杓关节病例报告如下。

1 资料与方法

患者,女,31 岁,现因声音嘶哑 6 个月,呼吸困难 4 个月,症状加重 7 d 后于 2013 年 2 月 26 日以"Ⅱ度呼吸困难待查"收入我院,就诊于耳鼻咽喉科。入院后给予持续低流量吸氧,予以雾化吸入布地奈德混悬液 2 mg,每日 2 次。完善患者相关检查,电子鼻咽喉镜示(图 1):喉黏膜稍充血,表面尚光滑,声门裂较窄,左杓会厌襞固定,右杓会厌襞动度可。磁共振(头颈 MRI)检查提示:左侧声带形态不规则,局限性隆起,右侧声带增厚,声门变窄。双侧梨状窝形态正常。双侧颈部未见明显肿大淋巴结影。超声(小器官)检查提示:甲状腺超声未见明显异常。RF(胃肠检查)检查提示:食管吞钡检查未见明显异常。追问病史,患者反复多关节肿痛 18 年余,多关节畸形 10 年,经外院确诊类风湿性关节炎并间断治疗该病 10 年余。根据患者病史、症状、体征诊断为Ⅱ度呼吸困难:类风湿性环杓关节炎。

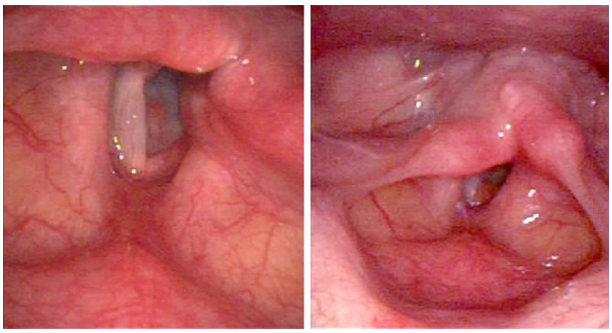


图 1 电子鼻咽喉镜检查

2 结果

建议行气管切开术加杓状软骨切除术加声带切除术,但患者拒绝手术治疗,要求出院,经反复劝说无效,于 2013 年 2 月 28 日出院。出院时患者仍诉声嘶,平静时无呼吸困难,稍运动后呼吸困难可达Ⅱ度。

3 讨论

类风湿关节炎是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病。在耳鼻咽喉科的特殊表现以环杓关节炎为临床特征,其主要表现有声嘶、喉痛、呼吸困难等。对于类风湿性关节炎病史短或者未曾确诊的患者临床应该与由各种原因引起的声带麻痹相区别。特别是有上诉主要表现的类风湿性关节炎患者或有关节痛史者应考虑环杓关节炎的存在。并利用辅助检查,如喉 CT、颈部磁共振、超声等以排除咽喉和甲状腺肿瘤,以及肺、食管、纵膈等胸腔疾病。该病例类风湿性关节炎诊断明确,以后出现声嘶、呼吸困难,检查见左杓会厌襞固定,右杓会厌襞动度可,声门裂较窄,其原因为类风湿关节炎致环杓关节固定。

环杓关节炎还应区别于病毒感染引起的双侧喉返神经麻痹或者急性喉炎。此类患者多有上感史,后出现声嘶。但喉腔检查无明显环杓关节僵硬、固定。该病例无上感史,无支持喉返神经炎和急性喉炎的根据。针对环杓关节炎患者的治疗,主张一旦确诊尽早开始规则联合使用非甾体抗炎药物,耳鼻咽喉科对症治疗,如雾化吸入等。若保守治疗无效且出现呼吸困难应及时行气管切开术。对于慢性声带固定患者可行杓状软骨拨动术、杓状软骨黏膜下切除并声带外移动术等[2]。

[参考文献]

[1] 吴学愚. 耳鼻咽喉科全书·喉科学[M]. 第 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2000:192 -194.
[2] 杨 芳,郑亿庆,陈秋坚,等. 类风湿关节炎伴发环杓关节炎的诊断与治疗[J]. 广东医学,2002,23(S1):43 -44.

(编辑:杨 颖)

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201303006
[收稿日期] 2013-03-25 [修回日期] 2013-04-10