

·方法与技术·

显示皮瓣神经纤维的超微结构的定位体会

颜玲¹, 乔东坊², 刘连璞²

(1. 中山医科大学附属第一医院显微外科, 广东 广州 510080; 2. 第一军医大学电镜室, 广东 广州 510515)

关键词: 外科皮瓣; 神经纤维/超微结构

中图分类号: R322 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0116-02

游离皮瓣的神经再生过程是一个缓慢而复杂的过程。要了解其再生成熟过程, 采用电镜进行超微结构观察是非常重要的手段。皮肤组织层次多、结构复杂, 密度不均, 神经纤维分布相对较少, 尤其是在失神经皮瓣的早期, 皮肤组织中再生神经纤维数量很少。因此, 要在电镜这样非常微小范围内准确找到位于皮肤组织中再生的神经轴突, 必须进行定位。我们结合组化方法对普通电镜标本定位进行了改进, 取得了满意结果。现将体会报告如下。

1 材料与方 法

1.1 固定、脱水和包埋

按电镜制作方法常规进行。

1.2 半薄切片

将标本固定在修块机上, 修成梯形, 左边作一小缺口。用玻璃刀进行半薄切片, 片厚 3 μm , 切下的半薄切片放在滴有水滴的载玻片上, 使其在水面自然展开后烤干, 采用 10 mg/L 甲苯胺蓝液(A 液: 甲苯胺蓝 1.0 g, 加双蒸水 100 mL; B 液: 碳酸氢钠 2.5 g, 加双蒸水 100 mL。取等量 A 液与 B 液混合, 搅拌均匀, 过滤使用)染色 3~5 min 后, 稍冲洗后, 光镜下观察切片是否呈皮肤全层纵断面(即表皮、真皮、皮下), 根据皮肤断面情况, 调整进刀的角度和方向, 使切片呈现皮肤全层断面。注意将半薄切片后置于载玻片上时, 使切片有缺口的左边仍置于载玻片左边, 即切片在玻片上的方向基本与修块机上标本方向相同, 以便于准确地修块。

1.3 组化染色

将切下的半薄切片, 用饱和 NaOH 脱去树脂, 按 Bielschowsky 改良染色法进行浸银染色, 在光镜下检查出染成黑色的神经纤维, 用红笔将此处作定位标记。

1.3.1 半薄切片脱树脂的方法 体积分数为 100%酒精加上 NaOH 至饱和, 沉淀 24 h, 取上清液滴入切片上 5~6 min, 体积分数为 100%酒精洗 3~4 次, 洗去 NaOH, 逐级入水。

1.3.2 Bielschowsky 改良染色法^[1] 氨银液配制: 200 g/L 硝酸银水溶液 30 mL, 无水酒精 20 mL, 将两液混合立即出现乳白色沉淀, 逐滴加入浓氨水, 使之形成的沉淀刚刚溶解, 滴加 5 滴浓氨水, 过滤后使用。操作步骤: 脱树脂后半薄切片蒸馏水洗 1~2 min; 用 200 g/L 硝酸银水溶液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内避光浸染 30 min, 蒸馏水洗 2~3 min; 用体积分数为 10%甲醛溶液还原数秒钟, 切片呈现黄色为止, 蒸馏水洗 3~5 min; 用氨银液滴染 20~40 s, 倾去染液直接用体积分数为 10%甲醛溶液再次还原 1~2 min, 更换 2 次溶液, 使切片呈现棕黄色, 蒸馏水洗 3~5 min; 用 2 g/L 氯化金水溶液调色 3~5 min, 蒸馏水洗 1~2 min; 用 50 g/L 硫代硫酸钠水溶液固定 3~5 min, 水洗 3~5 min, 然后用滤纸将切片周围水分吸干; 体积分数为 95%酒精及无水酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 光镜下观察, 并作定位标志。

1.4 定位修块

以切片左边缺口与切片机上的标本左边缺口相对应, 将标记好染色阳性的神经纤维区域, 对应

收稿日期: 2000-03-20

作者简介: 颜玲(1964-), 女, 安徽巢湖人; 1999年于第一军医大学博士毕业, 主治医师、讲师; 原单位为第一军医大学南方医院整形外科。
©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

地在标本进行标记, 定出所需保留的象限后, 修去未作标记部分组织。

1.5 超薄切片

修块后标本切片, 200 目铜网捞片, 醋酸铀-柠檬酸铅染色后, 在 JEM-1200EX 高压透射电镜观察, 每个标本观察 2 张铜网。

2 结 果

经过本方法制作的电镜切片标本, 可以清晰地观察到游离皮瓣移植 1 月时, 大部分神经轴突发生不同程度溃变, 巨噬细胞可见溶酶体、吞噬碎片和大小不等颗粒。2~4 月后在表皮下, 可见再生轴突, 被雪旺细胞包裹形成轴突-雪旺细胞复合体, 这种复合体旁边常可见细小血管, 并随着时间延长, 再生的轴突中无髓纤维减少, 有髓纤维逐渐增多(图 1)。6 月后再生轴突髓鞘厚度增加, 有大量正常结构的有髓纤维。

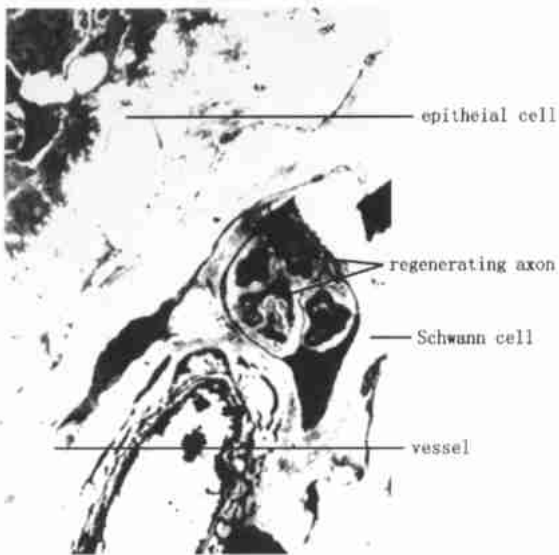


图 1 雪旺细胞包裹再生神经轴突超微结构

Fig. 1 Schwann Cell wrap regenerating nerve axon
(electronmicroscope $\times 3\ 000$)

3 讨 论

标本不进行定位, 要在电镜这样非常微小范围内准确找到位于皮肤组织中的神经轴突, 如同大海捞针, 十分困难。免疫电镜定位包埋是通过免疫细胞化学反应染色后, 对染色后标本切取阳性结构进行超薄切片观察的方法。该方法是一种准确可行的方法, 但组织必须经过免疫细胞化学反应染色, 程序复杂、时间长, 对组织的超微结构有一定的损伤, 因此对组织的超微结构保存不如普通电镜标本; 而一般的普通电镜标本定位, 主要是在行半薄切片、甲苯胺蓝染色后, 显示出组织结构的轮廓, 对所需结构进行标本定位修块。由于上述特殊性, 我们在此基础上结合组织化学方法, 对电镜标本定位进行了改进, 改进后的方法有以下优点: ①操作容易、定位准确。Bielschowsky 组化染色是一种较常用的组化染色方法, 对神经纤维结构容易准确地辨认和标记; 半薄切片的方向与修块机上标本的方向一致, 故以此切片作标本的定位对照时, 在切片机上, 可以精确、快速地定出所需保留部位, 修去其它部分的组织; ②对组织超微结构保存好。本方法是以半薄切片组化染色定位作对照, 再在原电镜标本上标记、修块后行超薄切片, 故标本未经过染色等复杂过程处理, 结构无损伤, 保存良好, 可以准确地观察到不同时间在皮肤组织中神经轴突的再生、成熟过程, 定位准确率高, 方法容易掌握, 可有效地避免了超薄切片和电镜观察的盲目性, 为观察皮肤组织神经轴突提供了一种良好的方法。

参考文献:

- [1] 张 哲, 陈 辉. 实用病理组织染色技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1988. 100~102.

(编辑 黄小延)