

长期失神经支配人的环杓后肌形态观察的研究

张 贤¹, 郑宏良², 陈世彩²

(1. 南京军区福州总医院耳鼻咽喉科, 福州 350025; 2. 第二军医大学长海医院耳鼻咽喉科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨长期失喉返神经后人的环杓后肌形态学的变化规律, 为临床晚期喉神经修复的有效性提供理论依据。**方法:**不同时限喉返神经损伤的患者环杓后肌标本按神经损伤时限分为4个组: 6~12个月(12例)、1~2年(10例)、2~3年(8例)及大于3年组(8例)。以正常环杓后肌作为对照组(12例)。采用MASSON三色染色、图像分析系统定量分析失神经后喉肌截面的肌纤维和胶原结缔组织纤维截面积的变化; 采用肌肉琥珀酸脱氢酶(SDH)染色和运动终板胆碱酯酶(AchE)染色, 细胞计数分析失神经不同时限的环杓后肌两类肌纤维和运动终板数量的变化。**结果:**随着失神经时限的延长, 胶原纤维截面积逐渐增加, 而肌纤维的截面积逐渐减少。各组间比较均有显著性差异($P < 0.01$), 失神经0.5~2年内肌肉截面积/胶原截面积比率下降最为明显, 失神经2年以后肌纤维化明显减缓, 但失神经3年后仍残留肌纤维相对截面积为正常对照组的48%。长期失神经后会导致肌纤维类型发生变化, 红肌的比例逐渐上升, 白肌的比例逐渐下降, 各组间比较均有显著性差异($P < 0.01$)。运动终板的数量随失神经时限的延长而减少, 1年以上标本未观察到AchE染色的运动终板。**结论:**长期失神经喉肌和胶原结缔组织截面积变化提示失神经2年内是肌肉纤维化最严重时期, 但失神经3年后仍残留肌纤维相对截面积为正常对照组的48%。失神经后喉肌纤维类型的变化提示该变化的目的是为了减少肌细胞凋亡。人环杓后肌运动终板消失时限为1年。本实验表明晚期神经修复仍能获得部分或全部喉功能是有其形态学基础。

[关键词] 环杓后肌; 喉返神经; 创伤和损伤

[中图分类号] R 767.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)09-0946-05

Myofiber morphology of posterior cricoarytenoid muscles in patients with long-term denervation of recurrent laryngeal nerve

ZHANG Xian¹, ZHENG Hong-liang², CHEN Shi-cai² (1. Department of Otorhinolaryngology, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Otorhinolaryngology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the morphological changes of posterior cricoarytenoid muscles (PCM) in patients with long-term denervation of recurrent laryngeal nerve (RLN), so as to provide theoretical evidence for repair of recurrent laryngeal nerve at advanced clinical stage. **Methods:** Thirty-eight patients with damaged RLN were divided into 4 groups according to the duration of their RLN damage: 6-12 months group ($n=12$), 1-2 years group ($n=10$), 2-3 years group ($n=8$), and over 3 years group ($n=8$). Twelve subjects with normal PCM served as control. Trichrome Masson staining and imaging analyzing system were used to quantitatively analyze the transverse section areas of myofibers, collagen fiber and connective tissues. SDH and AchE staining and cell counting method were used to analyze changes of two kinds of myofibers and motor end plate numbers at different times after denervation of recurrent laryngeal nerve. **Results:** The transverse areas of myofibers gradually decreased and those of collagen fibers gradually increased with the prolongation of denervation; the difference was significant between different groups ($P < 0.01$). The ratio of transverse area of myofiber to that of collagen fibers reached the lowest level 0.5-2 years after denervation. The fibrosis of muscle obviously slowed down 2 years after denervation. The transverse section of 48% of myofibers remained 3 years after denervation. Long-term denervation resulted in the changes of muscle fiber types: the ratio of red muscles was increased and the ratio of white muscles was decreased after denervation; the difference was significant between different groups ($P < 0.01$). The number of motor end plate decreased with the prolongation of denervation and disappeared after 1 year. **Conclusion:** The morphological alteration in long-term denervation PCM indicates the worst myofibrosis occurs within 2 years of denervation, but 48% of myofibers remain 3 years after denervation. The type alteration of denervated muscles may decrease the apoptosis of skeletal muscle. The structure of myoceptors disappears within 1 year of denervation. Our experiment indicates that there is a morphological basis for regaining total or partial muscle function by nerve repair after long-term denervation.

[KEY WORDS] posterior cricoarytenoid muscles; recurrent laryngeal nerve; wounds and injuries

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9): 946-950]

喉返神经损伤为平时常见伤病。微创甲状腺手术的兴起, 手术切口小, 手术视野狭小, 甲状腺手

[作者简介] 张 贤, 博士生, 主治医师。

E-mail: doczhangxian64@sina.com

术后引起喉返神经损伤有上升的趋势,造成不同程度的发音、呼吸及吞咽困难,严重影响患者的工作、生活。周围神经损伤,神经修复越早越好,但临床所遇喉返神经损伤患者病程往往较长,我科对病程3年内的患者实施喉返神经颈祥主支吻合术仍能较好恢复嗓音功能,但为何长期去神经后神经修复仍有效,其机制至今还不明确。本研究通过对长期失神经环杓后肌的形态学观察为上述现象的解释提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 第二军医大学长海医院2005年2月至2007年3月耳鼻喉科38例不同时限喉返神经损伤的患者和12例对照组患者,按神经损伤时限归入小于6~12个月、1~2年、2~3年、大于3年组及对照组。在行喉返神经探查修复术中确定喉返神经损伤为完全切断,损伤的远端神经及肌肉均有不同程度的萎缩。正常对照组选喉癌需行全喉切除术的患者,且肿瘤未侵及侧环杓后肌作为正常对照肌肉。

1.2 分组资料 6~12个月组:12例,男4例,女8例,平均年龄(38.5±8.1)岁(18~65岁)。1~2年组:10例,男4例,女6例,平均年龄(45.4±10.5)岁(22~63岁)。2~3年组:8例,男3例,女5例,平均年龄(40.8±8.6)岁(23~62岁)。大于3年组:8例,男4例,女4例,平均年龄(47.8±11.5)岁(17~64岁)。正常对照组:12例,男8例,女4例,平均年龄(52.4±7.5)岁(28~65岁)。

1.3 标本处理及研究方法

1.3.1 Masson三色染色法 将切片脱蜡至蒸馏水,苏木精染5~10 min,盐酸乙醇分化,流水蓝化,蒸馏水洗,丽春红酸性品红液中染5~8 min,蒸馏水洗,1%磷钼酸中染1~3 min,不用水洗直接进入苯胺蓝液5 min,水速洗,置60℃温箱中烘干,二甲苯透明,封固。结果:胶原纤维蓝色(苯胺蓝复染),肌纤维红色。

1.3.2 琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)方法 将肌肉的冰冻切片,放入SDH孵育液内,在37℃温箱内15 min,在此期间可见显微镜下观察肌纤维酶反应程度。白肌纤维呈浅蓝色。红肌纤维呈深蓝色,分清2种肌纤维型,即可停止孵育,水洗。甘油明胶封片。

1.3.3 乙酰胆碱酯酶(acetylcholin esterase, AchE)方法 将肌肉的冰冻切片,放入AchE孵育液内,在37℃温箱内,放20 min,取出放入1%硫化铵内1~2 min, H₂O冲洗。甘油明胶封片。运动终板呈棕色

的卵圆形和圆形。

1.4 肌纤维面积的测量、肌肉类型和运动终板计数 用Biosens高分辨彩色图像分析系统(由本校基础部提供)对其中所有失神经组及对照组Masson三色染色切片进行分析进行如下2个参数的测量:(1)参数A表示测量窗内肌纤维相对截面积,客观反映肌纤维截面积占测量窗总面积的百分比。(2)参数B表示测量窗胶原纤维相对截面积,客观反映胶原纤维截面积占测量窗总面积的百分比。

用Biosens高分辨彩色图像分析系统。将红肌表达灰度设为阳性阈值,每张切片测量不少于5个视野,至少100个肌纤维细胞,采用彩色图像分析系统,对红肌、白肌分别进行计数,计算各组红、白肌百分率及其相互比值。

将对对照组和失神经各组有运动终板表达的切片进行计数。

1.5 统计学处理 用统计软件SPSS 11.5处理所有数据,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,统计时先进行各组方差齐性检验,各组间由于例数不同,对检验结果进行加权。两组间比较用Bonferroni法。

2 结果

2.1 长期失神经支配环杓后肌肌肉和纤维的形态学研究 Masson三色染色法显示肌纤维为红色,胶原纤维为蓝色,对照组肌纤维排列整齐,无明显肌纤维细胞萎缩,肌细胞间有少量胶原结缔组织包绕(图1A)。失神经6~12个月组可见肌纤维因萎缩而导致肌纤维截面积缩小,肌纤维间的距离因胶原结缔组织增生而增宽,染色为蓝色的胶原结缔组织的数量明显增加(图1B)。失神经1~2年组、2~3年组和大于3年组随着失神经时限的延长,肌纤维截面积逐渐缩小,胶原纤维的截面积逐渐增大(图1C~1E)。失神经示大于3年组可见大量的胶原结缔组织增生,肌纤维萎缩明显,原肌纤维占据的空间被大量的胶原结缔组织所取代(图1E)。

图像分析系统能显示各组肌肉组织内单位截面积的肌纤维与纤维结缔组织的相对面积和肌肉/纤维面积比见表1,失神经支配的五组及正常对照组之间两两比较均有非常显著性差异($P < 0.001$)。失神经6~12个月组肌纤维相对截面积最大,随着失神经时间的延长,肌纤维相对截面积不断减少,而纤维结缔组织相对截面积不断增加,肌肉纤维结缔组织面积比不断下降,但失神经3年以上组肌肉相对截面积仍残留约36%,为正常对照组的48%(表1)。

表 1 5组环杓后肌肌组织及纤维组织相对截面积和肌肉/纤维组织面积比

Tab 1 Changes of relative transverse section of muscle and fibrous tissue in long-term denervated PCAMs ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	Transverse area of muscle	Transverse area of fiber	Muscle/fiber transverse area
Control	12	77.4±2.89	22.6±2.88	3.50±0.57
6-12 months	12	62.5±3.09	37.5±3.10	1.28±0.23
1-2 years	10	52.3±1.94	47.7±1.96	1.10±0.86
2-3 years	8	42.1±1.74	57.1±1.71	0.73±0.52
Over 3 years	8	35.9±1.19	64.1±1.10	0.73±0.52

For all the 3 parameters, $P < 0.01$ for a comparison between every 2 groups

2.2 长期失神经支配环杓后肌肌纤维类型观察
肌纤维 SDH 染色见图 2, 经图像分析统计换算后得出在正常状态(有神经支配)下, 环杓后肌的红肌细胞约占总细胞数的 52.9%, 而白肌细胞数占总细胞数 48.1%; 失神经 6~12 月组, 红肌细胞约占总细胞数的 59.6%, 而白肌细胞数占总细胞数 40.4%; 失神经 1~2 年组, 红肌细胞约占总细胞数的 80.2%, 而白肌细胞数占总细胞数 19.8%; 失神经 2~3 年组, 红肌细胞约占总细胞数的 90.8%, 而白肌细胞数占总细胞数 9.2%; 失神经大于 3 年组, 红肌细胞约占总细胞数的 93.6%, 而白肌细胞数占总细胞数 6.4%。随失神经时限的延长, 白肌细胞所占的比例逐渐下降, 而红肌细胞的比例逐渐上升, 红肌细胞数与白肌细胞数的比值逐渐上升(图 2)。上述 3 个指标进行图象分析及统计学处理, 结果显示各组间比较均有显著性差异($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 失神经不同时限环杓后肌红肌细胞数、白肌细胞数和红白肌细胞比
Tab 2 Changes of muscle types in long-term denervated PCAMs ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	Red muscle proportion	White muscle proportion	Red/white ratio
Control	12	54.4±4.8	50.3±2.4	1.1±0.1
6-12 months	12	61.5±2.5	41.9±3.6	1.5±0.2
1-2 years	10	52.3±1.9	18.4±4.2	4.3±1.3
2-3 years	8	73.9±4.0	8.5±3.4	11.4±4.9
Over 3 years	8	89.2±4.8	6.1±2.9	20.0±13.1

For all the 3 parameters, $P < 0.01$ for a comparison between every 2 groups

2.3 长期失神经支配环杓后肌运动终板的形态观

察 形态学观察显示对照组 200 倍光镜下即清晰可见神经纤维末梢进入肌纤维, 肌纤维上可见多个 AchE 染色的运动终板, 结构完整(图 3A)。失神经 6~12 月组终板 AchE 染色明显变淡, 运动终板明显减少, 终板结构欠清晰, 但 400 倍光镜下仍可见运动终板结构(图 3B)。失神经 1 年以上各组均未见清晰的终板结构(图 3C 示失神经 1~2 年组)。

3 讨论

周围运动神经损伤后将导致肌肉组织发生一系列的变化, 在形态学上最主要变化是骨骼肌发生失神经肌萎缩, 肌间隙纤维组织增生, 运动终板的退变以及肌纤维为了适应失神经状态而发生肌纤维类型的转化。失神经后短期内(半年内)人四肢骨骼肌及犬环杓后肌形态学的变化已有报道^[1-2], 但长期失神经人环杓后肌肌纤维截面积的变化、纤维类型如何重塑及运动终板的形态学变化至今未见报道, 观察上述变化有助于了解长期失神经后肌肉及运动终板的形态学基础, 为确定晚期神经修复的时限提供理论依据。

周围神经损伤后, 骨骼肌因失去神经及废用而发生萎缩^[3], 随着失神经时间的延长, 肌肉内的结缔组织增生, 肌组织被无收缩能力及无伸展性的结缔组织所代替, 严重影响神经修复后的肌功能的恢复。因此长期失神经后肌肉截面积/胶原截面积比率可从一个侧面反映神经修复后肌功能恢复的程度。本实验显示: 随着失神经时限的延长, 肌纤维细胞逐渐萎缩, 截面积减小, 胶原纤维细胞逐渐增加, 胶原纤维截面积增加。肌肉截面积/胶原截面积比率逐渐下降。在失神经后 0.5~2 年内肌肉截面积/胶原截面积比率下降最为明显, 但失神经 3 年以上组肌肉相对截面积仍残留约 36%, 为正常对照组的 48%。

大多数脊椎动物的骨骼肌含有 3 种类型的肌纤维, 即红肌纤维、白肌纤维以及介于两型之间的中间型纤维。红肌纤维收缩缓慢而持久, 又称慢缩纤维, 或 I 型纤维; 白肌纤维收缩反应迅速, 也称快缩纤维, 或 II 型纤维。两型肌纤维在形态结构和化学成分上都存在着差异。本研究采用 SDH 的染色方法, 根据酸呈色反映的强弱, 将肌纤维分白、红两种类型。本实验表明正常环杓后肌两种肌纤维型都有, 比例相当, 以红肌纤维略占优势, 可能是此肌需兼顾既要快速收缩, 又不易疲劳的特点。

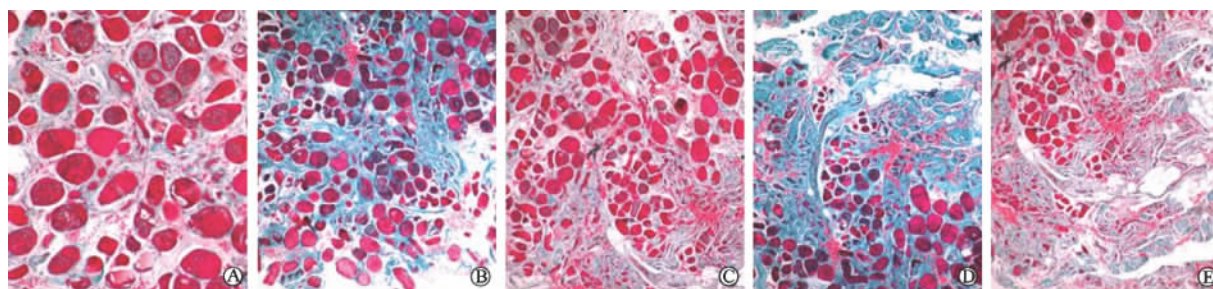


图 1 失神经不同时限环杓后肌 Masson 三色染色

Fig 1 Trichrome Masson staining of denervated PCAMs at different time points(SP, ×100)

A:Control group;B:The 0. 5-1 year denervation group;C:The 1-2 years denervation group;D:The 2-3 years denervation group;E:Over 3 years denervation group

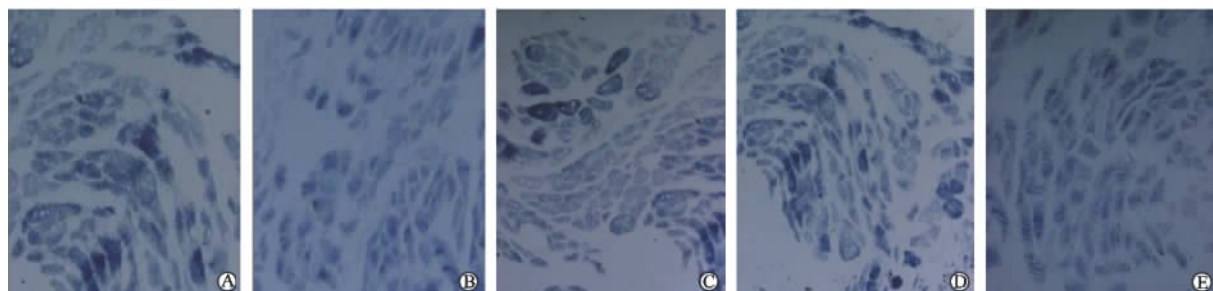


图 2 失神经不同时限环杓后肌 SDH 染色

Fig 2 Succinate dehydrogenase staining of denervated PCAMs at different time points(SP, ×200)

A:Control group;B:The 0. 5-1 year denervation group;C:The 1-2 years denervation group;D:The 2-3 years denervation group;E:Over 3 years denervation group



图 3 失神经不同时限运动终板 AchE 染色

Fig 3 Acetylcholinesterase staining of denervated PCAMs at different time points(SP)

A:Control group(×200);B:The 0. 5-1 year denervation group(×400);C:The 1-2 years denervation group (×200)

以往实验报道失神经后肌细胞核逐渐凋亡,促使肌卫星细胞(SC)共同协作来补充肌细胞核,力图阻止肌肉进一步萎缩^[5-6]。但是不同肌纤维类型在失神经后其肌细胞核丧失的速度是不同的^[7],白肌肌细胞核丧失的速度比红肌快^[8]且伴随着神经再生和神经再支配,这些肌纤维又回转到正常的模式^[9]。这些失神经后肌肉类型的改变的趋势与本实验结果是一致的。改变的速度有所差异,这可能与不同部位的肌肉及不同的失神经时限有关。许多实验提示在失去神经支配的状态下,红肌纤维和白肌纤维百分率的变化可能是白肌纤维比红肌纤维更依赖于神

经提供的营养和神经的电刺激,更难适应失神经的状态^[10-12]。我们推测长期失神经后肌纤维的重组可能是延缓肌纤维萎缩的重要步骤。关于快肌容易凋亡的机制至今未明确,但近来研究表明与快肌超氧化物歧化酶(SOD1)较丰富有关,Kostrominova等^[13]将快肌伸趾长肌(EDL)的SOD1基因敲除,发现快肌失神经后的凋亡率大为减低。

运动终板是神经与肌肉之间相连的特有结构。神经肌肉接头是典型纯胆碱能神经传导,神经发放的冲动只有通过运动终板才能将神经递质 Ach 传递给肌肉,从而引起肌肉收缩运动。AchE 对 Ach 有

特异性水解作用,主要分布于运动终板、研究运动终板区 AchE 含量的多少、能够反映运动神经元的功能状态和终板退变及再生状况^[14]。周围神经损伤后运动终板消失的时限,由于不同种属和不同的观察方法而各有不同^[15-17]。本实验运用乙酰胆碱酯酶的组织化学方法对长期失神经人的环杓后肌运动终板的观察显示运动终板数量随着失神经时限的延长而下降,1年后未发现运动终板结构。本研究观察终板消失的时限较以往研究为长,可能与人环杓后肌的肌肉特异性相关。

周围神经损伤修复手术疗效与神经损伤性质、程度、部位等诸多因素有关,而肌肉组织及运动终板状况无疑是重要因素。有学者报道对晚期周围神经损伤进行修复手术,仍可取得 47% 优良率^[18]。本研究结果显示:随着失神经时限的延长,胶原纤维截面积逐渐增加,而肌纤维的截面积逐渐减少。失神经 0.5~2 年内肌肉截面积/胶原截面积比率下降最为明显,提示失神经 2 年内是肌肉纤维化最严重时期,失神经 2 年以后肌纤维化明显减缓,但失神经 3 年后仍残留肌纤维相对截面积为正常对照组的 48%,这可能与长期失神经后肌纤维类型的变化从而延缓肌萎缩的速度有关。虽然本实验观察长期失神经后人环杓后肌运动终板消失的时限为 1 年左右,但本课题组晚期喉神经修复 2~3 年后又可获得喉功能的现象已得到动物实验研究的证实^[19-20],可见神经修复后运动终板可以再生。因此,我们实验表明晚期神经修复仍能获得部分或全部喉功能是有其形态学基础。但长期失神经后神经修复而致喉肌功能恢复的机理非常复杂,本研究仅局限于喉肌的形态学观察,要进一步阐述其机制还需作大量的实验研究。

[参考文献]

- [1] 梁振江, 娄卫华. 功能性神经肌肉刺激对犬神经再支配后环杓后肌纤维类型的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10: 98-100, 插 2.
- [2] Zheng H, Li Z, Zhou S, et al. Update: laryngeal reinnervation for unilateral vocal cord paralysis with the ansa cervicalis[J]. Laryngoscope, 1996, 106(12 Pt 1): 1522-1527.
- [3] Sunderland S. Nerve injuries and their impair: a critical misal [M]. New York: Churchill Livingstone, 1991: 241-263.
- [4] 徐建广, 顾玉东, 李继峰. 大鼠失神经支配骨骼肌退变的实验研究[J]. 上海医科大学学报, 1999, 26: 265-267.
- [5] Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation[J]. J Neurosci, 1995, 15(5 Pt 2): 3886-3895.
- [6] Irintchev A, Draguhn A, Wernig, A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation[J]. Neuroscience, 1990, 39: 231-243.
- [7] Schmalbruch H, Lewis D M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles[J]. Muscle Nerve, 2000, 23: 617-626.
- [8] Viguie C A, Lu D X, Huang S K, et al. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat[J]. Anat Rec, 1997, 248: 346-354.
- [9] Carraro U, Morale D, Mussini I, et al. Chronic denervation of rat hemidiaphragm: maintenance of fiber heterogeneity with associated increasing uniformity of myosin isoforms[J]. J Cell Biol, 1985, 100: 161-174.
- [10] Kostrominova T Y, Dow D E, Dennis R G, et al. Comparison of gene expression of 2-modernated, 2-mostimulated-denervated, and control rat skeletal muscles[J]. Physiol Genomics, 2005, 22: 227-243.
- [11] Hyatt J P, Roy R R, Baldwin K M, et al. Activity-unrelated neural control of myogenic factors in a slow muscle[J]. Muscle Nerve, 2006, 33: 49-60.
- [12] Zhou Z, Cornelius C P, Eichner M, et al. Reinnervation-induced alterations in rat skeletal muscle[J]. Neurobiol Dis, 2006, 23: 595-602.
- [13] Kostrominova T Y, Pasyk K A, Van-Remmen H, et al. Adaptive changes in structure of skeletal muscles from adult Sod1 homozygous knockout mice[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327: 595-605.
- [14] 殷琦, 陆裕朴, 胡蕴玉, 等. 肌肉失神经后运动终板早晚期退变实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1995, 9: 35-38.
- [15] 徐建广, 顾玉东. 失神经支配骨骼肌退变组织形态学及电生理实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13: 202-205.
- [16] 白伟良, 王玮, 何平, 等. 犬甲杓肌肌纤维型及其运动终板分布的研究[J]. 中国医科大学学报, 2002, 31: 426-427.
- [17] 梁力, 马惟力. 神经再支配环杓后肌运动终板的三维分布[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1993, 28: 19-21.
- [18] 殷琦, 陆裕朴, 褚晓朝, 等. 晚期周围神经损伤治疗临床及实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1995, 15: 596-599.
- [19] Zheng H, Zhou S, Chen S, et al. An experimental comparison of different kinds of laryngeal muscle reinnervation[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 1998, 119: 540-547.
- [20] Zheng H, Li Z, Zhou S, et al. Experimental study on reinnervation of vocal cord adductors with the ansa cervicalis[J]. Laryngoscope, 1996, 106(12 Pt 1): 1516-1521.

[收稿日期] 2007-05-29

[修回日期] 2007-07-18

[本文编辑] 曹静