论著

文章编号:1000-5404(2012)10-0924-04

C57BL/6小鼠内耳前庭末梢器官的形态发育过程及Myosin Ⅵ的表达

邓安春[1],杨仕明[2],黄德亮[2],孙建和[2] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院耳鼻咽喉科[1];100853 北京,解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科,解放军耳鼻咽喉研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨C57BL/6小鼠内耳前庭末梢器官的形态发育过程及Myosin Ⅵ在该过程中的表达。**方法** 选择从E10到E20每个时间点的孕鼠,取E10~E17的胚胎头、E18~E20的胚胎内耳,通过冰冻连续切片、HE染色及免疫荧光观察小鼠内耳前庭末梢器官的形态发育过程及Myosin Ⅵ抗体标记阳性毛细胞出现的时间。**结果** 小鼠内耳前庭末梢器官发育早、过程短,E10是听囊,E11已经能区分出背侧较大的前庭囊和腹侧较小的耳蜗囊,E12的前庭囊和耳蜗囊区分已很明显,并且出现内淋巴囊和管、上和后半规管始基,E13可见到上和后半规管壶腹嵴始基,出现水平半规管始基和椭圆囊始基,E14形成球囊和水平半规管壶腹嵴始基,E15椭圆囊、球囊、膜半规管初具成熟形态,所有囊斑、壶腹嵴基本形成,E18形态发育基本完成。Myosin Ⅵ标记阳性表达的毛细胞在E15的所有壶腹嵴、囊斑里出现,未见支持细胞表达Myosin Ⅵ。**结论** Myosin Ⅵ在E15开始表达,这个时期可能是毛细胞成熟的关键时期。

[关键词] 内耳;前庭形态发育;Myosin Ⅵ
[中图法分类号] R322.923;R329.1;R329.28 [文献标志码] A

Morphological development process of periphery vestibular organs in inner ear and expression of myosin VI in C57BL/6 mice

Deng Anchun[1], Yang Shiming[2], Huang Deliang[2], Sun Jianhe[2] ([1]Department of Otolaryngology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, Institute of Otolaryngology, General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the morphological development process of periphery vestibular organs in inner ear and expression of myosin VI in C57BL/6 mice. **Methods** Using embryo heads from E10 to E17 old mice and embryo inner ears from E18 to E20 old mice, the morphological development process of periphery vestibular organs in C57BL/6 mice inner ear and expression of myosin VI in vestibule on different developmental stages were investigated through frozen serial section, HE staining and immunofluorescence assay. **Results** Vestibular development of mice initiated early and the process was short. Otic capsule arose at E10. The large dorsal vestibular sac (VS) and small ventral cochlear sac (CS) began to form at E11. The differentiation of VS and CS became obvious, and the endolymphatic sac and tube and the superior and posterior semicircular canal primordium arose at E12. The superior and posterior semicircular canal cristae primordium and the lateral semicircular canal and utricle primordium arose at E13. The lateral semicircular canal cristae and saccule primordium arose at E14. The mature structures of utricle, saccule and semicircular canal began to form, and all macula and crista ampullaris formed at E15. The morphological development completed at E18. The myosin VI-positive hair cells were found in all macula and crista ampullaris at E15, but no myosin VI expression was detected in supporting cells. **Conclusion** Expression of myosin VI begins at E15, which may be a critical period for hair cell maturation.

[**Key words**] inner ear; morphological development of vestibule; myosin Ⅵ

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30730040, 30571017, 30871398), the Start Funds of Overseas Returned Scholars of Chongqing (CSTC2010BB5032) and the Start Funds of Overseasor Returned Scholars of Third Military Medical University(2010XHG05). Corresponding author: Deng Anchun, E-mail: dane1971@gmail.com; Yang Shiming, E-mail: Yangsm301@263.net

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30730040);国家自然科学基金面上项目(30571017,30871398);重庆市回国人员启动基金(CSTC2010BB5032);第三军医大学回国人员启动基金(2010XHG05)
[通信作者] 邓安春,E-mail:dane1971@gmail.com;
杨仕明,E-mail:Yangsm301@263.net

哺乳动物内耳前庭末梢感受器包括3个半规管壶腹嵴和2个囊斑,分别感受角加速度和直线加速度,这些功能和精细三维结构是在发育过程中不断形成的。遗传性内耳疾病常常伴有前庭功能和结构的缺陷,对前庭发育的研究有助于对内耳疾病尤其是遗传性内耳疾病发病机制的认识,为治疗内耳疾病提供参考。内耳前庭的发育既包括外形的形成和改建又包括各种上皮细胞的定向分化,涉及诸多的基因参与,其中Myosin Ⅵ是其感觉上皮里毛细胞生存和具有功能的非常重要的物质,它的出现标志着毛细胞获得功能的开始[1-4]。与其他感觉系统相比,对前庭系统发育的研究相对较少。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与标本采集

挑选耳廓反应灵敏、健康的2个月龄C57BL/6小鼠(北京大学医学部实验动物中心提供)以雄∶雌=1∶2的比例作为种鼠,下午5:00左右合笼,次日晨8点观察母鼠阴道,若有阴栓,记为胚胎第1天(first embryonic,E1)。

动物统一编号,统一饲养。选取从E10到E20每个时间点的孕鼠各2只,共计22只孕鼠,每只孕鼠各取胚胎鼠2只,共计胚胎鼠44只。孕鼠全部在上午8:00处死。因E10~E17的胚胎鼠骨性内耳尚未发育,不能单独留取内耳,故采用留取胚胎头,而E18~E20的胚胎鼠直接留取内耳。动物的使用获得中国人民解放军总医院动物伦理委员会的授权。

1.2 主要方法与试剂

1.2.1 冰冻切片 将留取的胚胎头或胚胎小鼠内耳固定(4%多聚甲醛+2.5%戊二醛)、脱钙(10% EDTA)、脱水(20%蔗糖溶液)、浸透及包埋(OCT液),在包埋管中定位后于液氮液面冷气急冻40 s,取出黏托,然后切片:胚胎头平行于口-耳平面切片,内耳平行于蜗轴切片,均连续切片,片厚6 μm。镜下看到壶腹嵴和囊斑时,间断取片,-70 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 HE染色及免疫荧光检测 连续切片的标本进行常规HE染色,封片后观察内耳前庭的外形。免疫荧光染色按照试剂盒说明书操作。大致步骤包括:冰冻切片放至室温、60 ℃烤箱烤片30 min后用蒸馏水洗去OCT、高压抗原修复3 min、3% H_2O_2室温孵育10 min消除内源性过氧化物酶活性、滴加封闭血清室温孵育15 min、滴加一抗(1∶100 PBS稀释)4 ℃冰箱过夜、滴加二抗(1∶50 PBS稀释),37 ℃孵箱1 h后防淬灭封片剂封片,然后在荧光显微镜下观察并采集图像。一抗为兔来源Myosin Ⅵ抗体,购自美国Sigma生物技术公司,二抗为羊抗兔Alexa fluor 488荧光标记抗体,购自美国Molecular probes公司。

2 结果

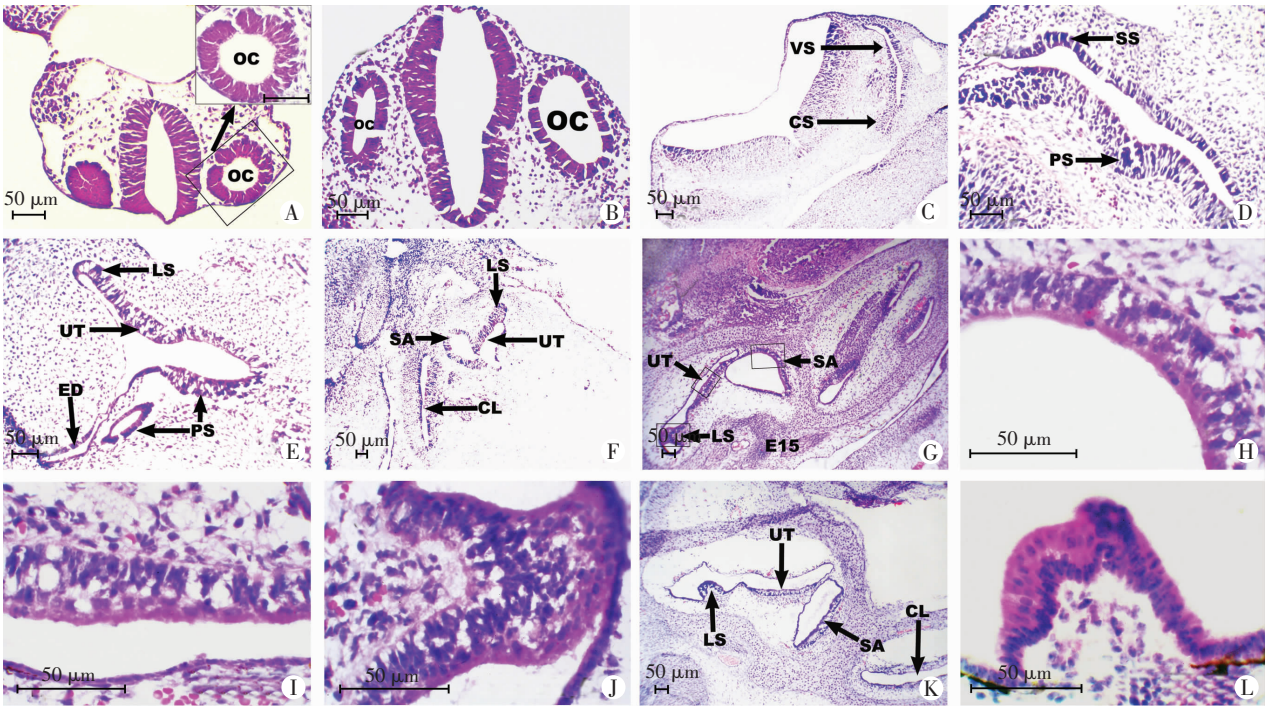
在胚胎第10天仍然是听囊;第11天的听囊可能已经区分出背侧较大的前庭囊和腹侧较小的耳蜗囊;第12天前庭囊和耳蜗囊的区分已很明显,在前庭囊可以分辨出内淋巴囊和管始基,也能看到紧靠内淋巴囊和管始基前方的上皮细胞层增厚,形成上、后半规管始基;第13天前庭增长迅速,上、后半规管开始形成,可见到上、后半规管壶腹嵴始基,出现水平半规管始基和椭圆囊始基;第14天时椭圆囊进一步发育,在椭圆囊的腹侧,靠近耳蜗一端部分向前伸展形成球囊始基,水平半规管开始形成,可见到水平半规管壶腹嵴始基。第15天椭圆囊、球囊、膜半规管初具成熟形态,椭圆囊球囊管和连接耳蜗的耳蜗球囊管逐渐形成,所有囊斑、壶腹嵴基本形成;第16天膜迷路形态更趋成熟,通过椭圆囊球囊管相连的椭圆囊和球囊分成2个独立的部分。第18天时,囊及囊斑、壶腹及壶腹嵴等三维空间结构发育基本完成,此后只存在空间的扩大和细胞分化的成熟。各感觉器官的出现和发育在时间上有部分重叠(图1)。

尽管在胚胎第13天就可看到半规管壶腹嵴始基和椭圆囊始基,在第14天水平半规管壶腹嵴始基和球囊始基均已出现,但没有发现Myosin Ⅵ标记阳性表达的毛细胞,在胚胎第15天时,所有壶腹嵴、囊斑里均出现了Myosin Ⅵ阳性表达毛细胞,未见支持细胞表达Myosin Ⅵ(图2)。

3 讨论

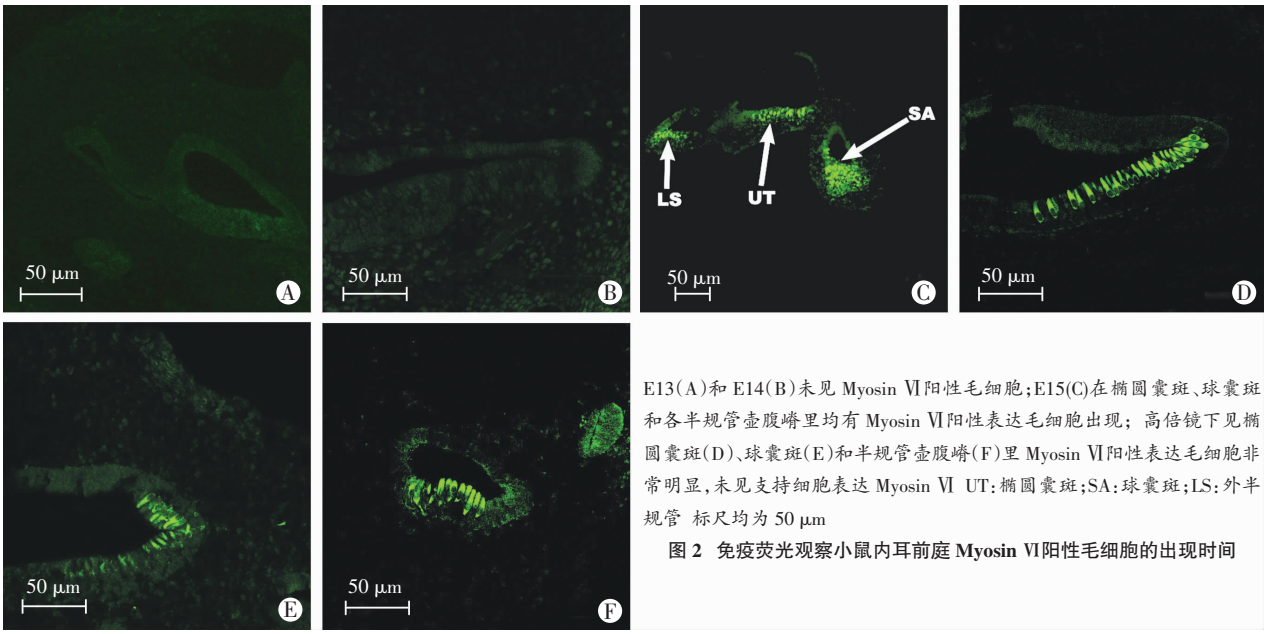
与其他感觉系统相比,对前庭系统发育的研究相对较少。Morsli[5]将显微注射技术与基因表达的原位杂交技术、三维重建技术相结合,较清楚地阐述了感觉器官的发生与大体解剖发育的联系。内耳发育研究中使用的小鼠品系不一,有CD1、CBA及C57BL等,虽然在发育的具体时间上有少许差异,但一般发生过程基本一致[5-7]。Morsli描述的时间比大多数研究要早1 d,他认为是分期不同造成,结合实验结果(比他的描述要晚),我们认为与取材的时间点和观察的方法关系更大。小鼠内耳的发育在这个时期的变化以小时计算,小鼠受精发生在前半夜还是后半夜,上午8:00取材还是11:00取材,结果会不一样,所以我们取材时间严格控制在上午8:00。

本研究观察的时间点从E10开始,可以明确此时的听囊就是以后要发育为内耳的部分。此后分化为前庭囊和耳蜗囊,经过"暴发"发育,到E15各囊及囊斑、壶腹及壶腹嵴就全部出现,E18时内耳三维空间结构就基本定型。理论上说,容纳感觉斑的器官要比感觉斑发育得早,但这些组织何时开始发育、何时成熟,没有特异的标记物来标记,只能依靠外形来粗略判断。Morsli用BMP4、Fng、Brn3.1、NT3等来标记,也只能说明其为前感觉区域,至于由前感觉区域转变为感觉区域的时间点、界限在哪里,不得而知。



A:听囊在E10胚胎鼠脑中清晰可见;B:E11时听囊逐渐分化为背侧较大的前庭囊和腹侧较小的耳蜗囊;C:E12胚胎鼠脑中前庭囊和耳蜗囊的区分很明显,D:高倍镜下可见上半规管和后半规管始基开始形成;E:E13可见到上、后半规管壶腹嵴始基,内淋巴管、水平半规管和椭圆囊始基开始出现;F:E14时在椭圆囊的腹侧,靠近耳蜗一端形成球囊始基(SA),可见到水平半规管壶腹嵴始基;G:E15时椭圆囊、球囊、膜半规管初具成熟形态,囊斑、上、外、后半规管壶腹嵴基本形成,H:高倍镜下其球囊斑、I:椭圆囊斑、J:壶腹嵴初步成熟;K:E18时囊及囊斑、壶腹及壶腹嵴等三维空间结构发育基本完成,L:高倍镜下显示其囊斑、壶腹嵴形态已经成熟 OC:听囊,VS:前庭囊,CS:耳蜗囊,CL:耳蜗,SS:上半规管,LS:外半规管,PS:后半规管,UT:椭圆囊,SA:球囊,ED:内淋巴管 标尺均为50 μm

图1 HE染色观察小鼠内耳前庭的外形



E13(A)和E14(B)未见Myosin Ⅵ阳性毛细胞;E15(C)在椭圆囊斑、球囊斑和各半规管壶腹嵴里均有Myosin Ⅵ阳性表达毛细胞出现; 高倍镜下见椭圆囊斑(D)、球囊斑(E)和半规管壶腹嵴(F)里Myosin Ⅵ阳性表达毛细胞非常明显,未见支持细胞表达Myosin Ⅵ UT:椭圆囊斑;SA:球囊斑;LS:外半规管 标尺均为50 μm

图2 免疫荧光观察小鼠内耳前庭Myosin Ⅵ阳性毛细胞的出现时间

刘少锋等[7]用扫描电镜和透射电镜发现小鼠E12时就有大量微绒毛和原始纤毛的内耳毛细胞出现,认为内耳感觉细胞已经开始分化。Myosin Ⅵ是毛细胞生存和具有功能的非常重要的物质,它的缺失将导致毛细胞死亡,而且它只在内耳感觉上皮的毛细胞里出现,支持细胞里没有,是毛细胞特有的标志物[1-2,9]。本研究发现Myosin Ⅵ阳性表达毛细胞在E15时开始出现,与而高维强等[8]发现E15时前庭里开始出现钙视网膜蛋白(Calretinin)阳性表达毛细胞相一致。在E12时感觉上皮细胞出现的微绒毛和原始纤毛可能并不特异,成年小鼠感觉上皮的支持细胞表面也有微绒毛,Calretinin和Myosin Ⅵ等毛细胞行使功能所必需的

标志物似乎更加特异。在 E15 这个时间点上,前体毛细胞的主要有丝分裂活动基本结束,完成了量上的准备,下一步要想完成质的变化就必需分化。因此,毛细胞的成熟更可能是从 E15 开始的,此后毛细胞逐渐获得其特有的功能。尽管出生后毛细胞与前庭中枢的联系还在进一步建立,但 E12 ~ E15 无疑是这个过程中最为重要的阶段[10-13]。

参考文献:

[1] Mochizuki E, Okumura K, Ishikawa M, *et al*. Phenotypic and expression analysis of a novel spontaneous myosin VI null mutant mouse[J]. Exp Anim, 2010, 59(1): 57-71.
[2] Roux I, Hosie S, Johnson S L, *et al*. Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(23): 4615-4628.
[3] Brown S T, Martin K, Groves A K. Molecular basis of inner ear induction[J]. Curr Top Dev Biol, 2003, 57: 115-149.
[4] Beisel K W, Wang-Lundberg Y, Maklad A, *et al*. Development and evolution of the vestibular sensory apparatus of the mammalian ear[J]. J Vestib Res, 2005, 15(5/6): 225-241.
[5] Morsli H, Choo D, Ryan A, *et al*. Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs[J]. J Neurosci, 1998, 18(9): 3327-3335.
[6] Freyer L, Aggarwal V, Morrow B E. Dual embryonic origin of the mammalian otic vesicle forming the inner ear[J]. Development, 2011, 138(24): 5403-5414.
[7] 刘少锋, 周梁, 李华伟, 等. 小鼠前庭器官的形态发生[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2005, 13(6): 427-429.
[8] Zheng J L, Gao W Q. Analysis of rat vestibular hair cell development and regeneration using calretinin as an early marker[J]. J Neurosci, 1997, 17(21): 8270-8282.
[9] 徐延军, 杨仕明, 胡吟燕, 等. C57BL/6 小鼠内耳形态学和年龄相关性听力损失的研究[J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(4): 398-402.
[10] McCluskey S U, Marotte L R, Ashwell K W. Development of the vestibular apparatus and central vestibular connections in a wallaby (Macropus eugenii)[J]. Brain Behav Evol, 2008, 71(4): 271-286.
[11] Xu Y, Zhang H, Yang H, *et al*. Expression, functional, and structural analysis of proteins critical for otoconia development[J]. Dev Dyn, 2010, 239(10): 2659-2673.
[12] Martinez-Monedero R, Yi E, Oshima K, *et al*. Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons[J]. Dev Neurobiol, 2008, 68(5): 669-684.
[13] Rot I, Kablar B. The influence of acoustic and static stimuli on development of inner ear sensory epithelia[J]. Int J Dev Neurosci, 2010, 28(4): 309-315.

(**收稿**:2011-11-28;**修回**:2011-12-15)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2012)10-0927-01

个案与短篇

儿童肥大细胞增生症 1 例

胡 琦,桂 芹 (400038 重庆,第三军医大学西南医院儿科)

[**关键词**] 肥大细胞增生症;儿童
[**中图法分类号**] R364.31 [**文献标志码**] B

肥大细胞增生症(mastocytosis)由 Nettleship1869 年首先报道,其特点为组织学上肥大细胞增生性浸润。主要侵犯皮肤,也可累及其他系统或器官,通常为良性过程,只有少数是恶性疾病。各型肥大细胞增多症临床上均少见,2011 年我科收治肥大细胞增生症患儿 1 例,现报告如下。

1 临床资料

患儿,女性,41 d,因"发现全身结节、斑丘疹 34 d,发热 3 h"入院。家长于患儿生后 7 d 发现其头顶部有一个 0.5 cm × 0.5 cm 大小结节,颜色暗红,半透明,质地中等,压之无哭吵,此后此结节逐渐增至 1.0 cm × 1.0 cm 大小,颜面部逐渐出现数个类似结节,四肢及躯干出现散在暗红色斑丘疹及结节。患儿系第 1 胎第 1 产,足月顺产,母乳喂养,无异常生产史,无传染病及性病接触史,家族中无类似患者。

体格检查:生长发育正常,头面部、躯干、四肢及足底可见多处 0.3 cm × 0.3 cm ~ 1.5 cm × 1.5 cm 大小结节及斑丘疹,呈暗红色,质地中等,摩擦后未见风团。鼻梁处可见结节压迫致呼吸不畅;躯干及四肢可见散在分布暗红色斑丘疹,无水疱,无破溃及渗液,双侧掌跖未见皮疹,Darier 征阴性,全身浅表淋巴结未及肿大,肝脾未及肿大(图 1)。实验室检查:入院时血常规:WBC 2.93×10^9/L, L 87.04%, N 10.34%, Hb 102 g/L, PLT157 $\times 10^9$/L;出院时血常规:WBC 3.87×10^9/L, L 95.6%, N 2%, Hb 112 g/L, PLT 339×10^9/L;白细胞分类计数:中性杆状核细胞 1%,中性分叶核粒细胞 4%,淋巴细胞 94%,异形淋巴细胞 1%;骨髓细胞学未见异常;肝功、心肌酶谱均无明显异常;免疫球蛋白指标:IgG 7.07 g/L, IgM 0.17 g/L, IgA 0.152 g/L;血总 IgE 2.0 KU/L,婴儿吸入过筛实验 0 KU/L,食物过筛实验 0 KU/L。T 细胞亚群:CD3 71.9%, CD8 25.1%, CD4 44.7%, CD4/CD8 1.9。TORCH 均阴性。腹部彩超示肝脾肾未及异常。



A:患儿头面部可见多个 1.0 cm × 1.0 cm ~ 1.5 cm × 1.5 cm 大小肿块,呈暗红色,质地中等;B:患儿躯干及双侧下肢可见散在暗红色斑丘疹及结节,无水疱,破溃及渗液,摩擦后未见风团

图 1 肥大细胞增生症患儿头、躯干表现

[**通信作者**] 胡 琦,电话:(023)68766013,E-mail:dsrhq77010717@163.com

(下转 932 页)