DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.021
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1180 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1180-03

外耳道间断加压对豚鼠膜迷路积水及ANP表达的影响

徐志勇[1],刘兆华[2] ([1]解放军251医院耳鼻咽喉科,张家口 075000;[2]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所耳鼻咽喉-头颈外科,重庆 400042)

提 要:目的 研究外耳道20 cmH_2O间断加压对豚鼠膜迷路积水及耳蜗外侧壁心钠素(ANP)表达的影响。方法 建立豚鼠外耳道间断加压模型,常规火棉胶切片观察膜迷路积水的发展,用免疫组化S-P法研究ANP的表达。结果 20 cmH_2O间断加压对中耳及内耳均无明显损伤。间断加压使膜迷路积水程度减轻;加压组与对照组间反应阈无明显差异。加压耳蜗管外侧壁ANP表达减弱。结论 20 cmH_2O的压力相对安全,可以此为参考进行外耳道加压实验。间断加压可减缓膜迷路积水的发展,但对提高听功能无明显效果。耳蜗ANP阳性细胞可能有内分泌或旁分泌作用。

关键词:外耳道加压;心钠素;听觉诱发电位;膜迷路积水
中图法分类号:R764.34;R764.91 文献标识码:A

Effects of intermittent overpressure on external ear on the endolymphatic hydrops and expression of ANP in internal ear of guinea pigs

XU Zhi-yong, LIU Zhao-hua (Department of Otorhinolaryngology, 251 Hospital of PLA, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of intermittent overpressure on external ear on the endolymphatic hydrops and expression of atrial natriuretic peptide (ANP) in lateral cochlear wall of guinea pigs. Methods Intermittent pressure increase to 20 cmH_2O was delivered to external ear of normal guinea pig in an experimental model. The expression of ANP was investigated by immunohistochemical SP method. Histopathological changes of middle and internal ear were examined under light microscope. Auditory evoked potential (AEP) were recorded using tone-burst at 0.5, 1.0, 4.0, and 8.0 kHz. Results No obvious pathological change or hearing loss was observed in each ear. The expression of ANP decreased in the lateral cochlear wall after 2 week of intermittent pressure treatment. Certain difference was found in the area of scala media (SMA) between the treatment and control group. Conclusion Intermittent overpressure of 20 cmH_2O was safe in this experiment, and might be a reference for further studies pressure. ANP positive cells in the lateral cochlear wall might have autocrine/paracrine function. Intermittent pressure could minimize, but can not hold out the development of endolymphatic hydrops.

Key words: overpressure on external ear canal; atrial natriuretic peptide (ANP); auditory evoked potential (AEP); endolymphatic hydrops

利用外耳道及中耳压力改变治疗膜迷路积水是近年来研究的一个新课题[1],中耳腔正压形成可以使一些梅尼埃病患者眩晕减轻和听力提高[2],但原因不清。本研究采用外耳道间断加压模型,旨在观察外耳道间断加压对中耳和内耳的影响,并探讨其对膜迷路积水的作用,为临床治疗梅尼埃病提供有关的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

白色和杂色健康豚鼠共71只,雌雄不限,体重200~350 g,耳廓反射灵敏,耳镜检查双外耳道及鼓膜正常,均由第三军医大学实验动物中心提供。分为2组:加压实验组(n=36),包括膜迷路积水模型动物24只,其中12只在建立模型后立即加压14 d,12只在建立模型后第3~4周加压14 d,余12只为非手术动物;对照组(n=35),其中13只在积水术后2周处死,12只在积水术后4周处死,10只为假手术对照。以上各组颞骨标本随机分为二组,分别进行常规石蜡和火棉胶包埋。

作者简介:徐志勇(1966-),男,河北省固安县人,硕士,主治医师,主要从事耳科学方面的研究。电话:(0313)8783634

收稿日期:2000-06-18;修回日期:2001-04-30

1.2 实验方法

1.2.1 膜迷路积水模型制作 参照Konishi(1975)方法,采用枕后硬膜外入路,破坏内淋巴管并用骨蜡堵塞前庭导水管。全部动物右耳手术,左耳做对照。假手术对照动物按上述步骤仅暴露乙状窦。借动物麻醉状态同时修剪右耳廓,以备粘接通气管。

1.2.2 外耳道加压实验 豚鼠置于8 cm×8 cm×20 cm的固定盒内,检查并清洁外耳道。用聚丙烯酸脂粘合剂将与外耳道口直径近似的硅胶管粘于右外耳道口。呼吸机输出口经三通管分别与外耳道和压力调节管连接,使最大压力控制在20 cmH_2O水平。调整呼吸机输出频率为14次/min,吹气∶暂停=1∶3,每加压5 min间歇5 min,共持续1 h,1次/d。对照组动物处理过程同上:装入固定盒,右外耳道口粘管,但不加压。

1.2.3 听觉诱发电位测定 动物麻醉后,以Nicolet Compass Ⅱ型诱发电位仪短纯音(Tone-burst)刺激,用40 Hz AERP测0.5和1.0 kHz反应阈;用ABR测4.0和8.0 kHz反应阈。叠加1 000次,以能够重复诱出电反应的最低强度为反应阈。

1.2.4 病理标本制备 动物按预定时间处死。活体灌注固定,取双侧颞骨,打开听泡,在手术显微镜下检查中耳。推压镫骨撕裂前庭窗膜,刺破圆窗,将4%多聚甲醛1 ml缓慢注入卵圆窗。颞骨置于相同的固定液中再固定24 h后,标本分为2组:一组用5%硝酸脱钙,火棉胶包埋,平行蜗轴连续切片,片厚15 μm,HE染色,光镜观察;另一组用8% EDTA脱钙3周,石

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蜡包埋, 平行蜗轴切片, 片厚 4 μm, 行免疫组化实验。

石蜡切片脱蜡至水, 甲醇双氧水室温孵育 5 min。抗原修复, 微波加热(90～95 ℃)5 min×2。分别滴加 0.3% Triton X-100 和 5%正常羊血清于 37 ℃下各孵育 30 min。将第一抗体(ANP 抗血清, 东亚免疫技术研究所, 稀释度为 1∶20)滴于玻片标本上, 4 ℃孵育 48 h。不加一抗者, 以羊血清替代, 作为阴性对照。滴加二抗(1∶200), 三抗(1∶200), 37 ℃, 各孵育 30 min。DAB 闭光显色 10 min, 显微镜下观察, 水洗终止显色。苏木素复染 20 s。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜观察。

1.2.5　图像分析　　用 CMIAS Ⅱ真彩色图像分析系统对火棉胶及免疫组化切片进行图像分析。火棉胶切片: 从每只动物的左右耳蜗切片中各选 2 张过中轴的切片, 将每个标本同一回中阶面积取平均值作为平均中阶面积(SMA), 计算 SMA 增加率=$\frac{\text{右耳 SMA}-\text{左耳 SMA}}{\text{左耳 SMA}}\times 100\%$。

免疫组化切片: 分析蜗管外侧壁的 ANP 表达改变。

1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 使用 Microsoft Excel 2000 对图像分析和听觉脑干诱发电位数据进行 t 检验及方差分析, 以百分率表示的数据用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　积水模型手术后动物的一般表现

积水模型手术后动物表现为一过性体重下降, 向术侧斜颈, 有 9 只动物出现自发性眼震, 其中 5 只快相向术侧, 4 只快相向对侧, 频率为 16～60 次/min, 眼震在 3 d 内消失, 体重在 1 周后恢复。动物在加压过程中比较安静, 加压后活动正常, 未出现行走不稳或自发性眼震。

2.2　间断加压及积水对反应阈的影响

正常耳加压 2 周及假手术对照耳各频率反应阈无明显改变。

积水手术耳主要是低频(0.5、1.0 kHz)反应阈提高, 术后 4 d 平均阈移为 6.95 dB。但术后 14 d 积水加压组(8.96 dB)与对照组(9.37 dB)比较, 术后 4 周积水加压组(11.67 dB)与对照组(12.72 dB)比较, 差异均不显著($P>0.05$)。

2.3　组织病理学改变

正常耳加压后, 鼓膜紧张度正常, 弹性好, 听骨链正常。内耳未见明显异常。

积水手术后 2 周所有耳蜗均有轻度积水, SMA 增加率在加压组为 20.8%～54.9%, 平均 30.3%, 在对照组为 25.5%～71.78%, 平均 46.3%。两组比较差异非常显著($P<0.01$)。毛细胞无缺失。

积水手术后 4 周各耳蜗均有轻度至中度积水, 前庭膜无破裂。加压组 SMA 增加率为 43.4%～95.1%, 平均 68.5%; 3/6 例标本可见顶回外毛细胞缺失, 内毛细胞正常。对照组 SMA 增加率为 71.8%～125.6%, 平均 89.5%, 与加压组比较有非常显著差异($P<0.01$); 5/6 例标本可见顶回外毛细胞缺失, 内毛细胞正常; 底回毛细胞无改变。

假手术对照耳均未出现积水或毛细胞缺失。

2.4　免疫组化结果

Corti 器毛细胞及支持细胞均呈阳性。螺旋韧带的各型纤维细胞均有表达, 但从底回到顶回逐渐减少。其中以基底嵴下方的阳性细胞减少最明显。血管纹的基底细胞、中间细胞、边缘细胞均为阳性。螺旋缘的上皮细胞和基质细胞呈强阳性。ANP 在螺旋神经节细胞呈强阳性表达, 阳性颗粒分布于胞浆, 而耳蜗神经纤维呈弱阳性。

ANP 在加压耳的蜗管外侧壁表达减弱; 在非加压耳无明显改变, 见图 1、2。

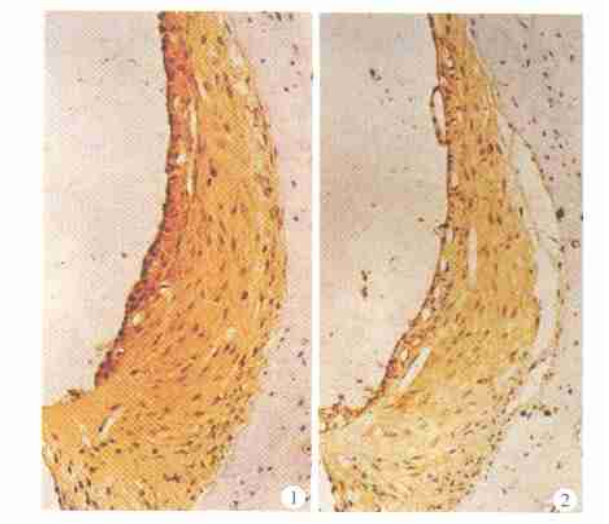


图 1　**ANP** 在蜗管外侧壁的正常表达　(S-P× 100)

Fig 1　Expression of ANP in normal lateral cochlear wall　(S-P× 100)

图 2　间断加压后蜗管外侧壁 **ANP** 表达减弱　(S-P× 100)

Fig 2　Expression of ANP decreased in lateral cochlear wall after pressure treatment　(S-P× 100)

3　讨论

研究表明, 外耳道压力变化可经鼓膜-听骨链-卵圆窗途径及鼓膜-中耳腔-圆窗途径传入内耳。鼓膜-圆窗途径在压力传导中作用较大。豚鼠的咽鼓管在±20 cmH_2O 的中耳压力下是关闭的[3], 中耳压力随外耳道压力呈平行改变, 中耳正压较负压对迷路的影响更大。

文献[1]曾用 49.2 cmH_2O 的压力对膜迷路积水模型进行实验性治疗, 但未报道反应阈改变情况。我们在实验中发现 49 cmH_2O 的压力对听功能有损伤作用, 各频率反应阈平均提高 12.09 dB; 对中耳结构可造成明显的损伤, 主要是鼓膜松弛, 锤骨柄周围及听泡粘膜下出血; 但对内耳无明显影响, 与文献[4]报道一致。20 cmH_2O 间断加压对豚鼠中、内耳结构无明显损伤, 鼓膜紧张度及弹性正常, 也未出现听功能下降。所以可参考此压力进行类似实验。

ANP 是一种心脏分泌的激素, 其在心房肌细胞中以颗粒形式存在, 在心房受牵张时释放入血, 作用于靶组织, 对水、电解质平衡起调节作用。已证实耳蜗内 ANP 受体存在于血管纹、壶腹部和椭圆囊的分泌上皮, 以及螺旋韧带和圆窗膜。本实验发现, ANP 在血管纹和螺旋韧带表达阳性, 在加压耳表达减弱, 提示耳蜗外侧壁的 ANP 阳性细胞有自分泌或旁分泌功能, 其分泌方式可能与心房肌细胞相似: 内外淋巴压力提高使阳性细胞内 ANP 移向细胞外。ANP 有抑制 Na^+,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

K^+-ATP 酶并影响 Ca^{2+}, PO_4^{3-} 和 Mg^{2+} 重吸收的作用, 对维持内淋巴 Ca^{2+} 平衡可能有重要意义。

术后 2 周和 4 周积水对照耳 SMA 分别增加 46.32%和 89.49%, 同期积水耳经间断加压作用后, SMA 分别增加 30.31%和 68.54%。说明间断加压可减缓膜迷路积水的发展, 但不能消除已有的积水。积水减轻有几种可能的原因: ①中耳压力提高导致外淋巴压力增加, 有助于内淋巴排出。②外耳道加压有助于氧向内耳弥散, 改善血管纹 Na^+, K^+-ATP 酶及细胞色素氧化酶的活性, 使内淋巴 Ca^{2+} 浓度降低及渗透压下降, 从而减轻积水。文献[5]报道, 向积水模型动物的中耳放入通气管, 可以减轻膜迷路积水的发展。这可能与中耳氧张力增加有关。③有实验表明, 内耳可能存在容量感受器。ANP 在螺旋神经节、耳蜗神经的表达提示其与神经传导有关, 而且已在外侧网状核、孤束核、蓝斑、中间纵束以及下丘脑发现 ANP 阳性神经元。内耳压力变化是否会通过这些 ANP 阳性神经元来调节内耳液体的稳定, 有待进一步研究。

参考文献:

[1] Sakikawa Y, Kimura R S. Middle ear overpressure treatment of endolymphatic hydrops in guinea pigs[J]. ORL, 1997, 59(1): 84—90.
[2] Densert B, Densert O, Arlinger S, *et al*. Immediate effects of middle ear pressure changes on the electrocochleographic recordings in patients with Meniere's disease: A clinical placebo-controlled study[J]. Am J Otol, 1997, 18(6): 726—733.
[3] Gyo K, Nishhara S, Yanagihara N. Pressure transmission properties from the external ear canal to the inner ear[J]. Acta Otolaryngol (Stockh), 1988, 456(Suppl): 87—91.
[4] Sakikawa Y, Wall C, Kimura R S. Vestibular responses of normal and hydropic ears of the guinea pig to middle ear pressure application[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1999, 108(3): 271—276.
[5] Kimura R S, Hutta J. Inhibition of experimentally induced endolymphatic hydrops by middle ear ventilation[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 1997, 254(5): 213—218.

(编辑 潘式文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)10-1182-01

大剂量甲氨蝶呤治疗成人急性淋巴细胞白血病的临床观察

Clinical observation on the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with high-dose methotrexate

张 曦, 陈幸华, 王庆余, 刘 林, 彭贤贵 (第三军医大学附属新桥医院血液内科, 重庆 400037)

我院自 1997 年 5 月至 2000 年 10 月, 采用大剂量甲氨蝶呤(High-dose methotrexate, HDMTX)与吡喃阿霉素(Piranubicin, THP)、长春新碱(Vincristine, VCR)、环磷酰胺(Cytoxan endoxan, CTX)、强的松(Prednison, Pred)组成联合化疗方案 HDMTX+CTOP(环磷酰胺、吡喃阿霉素、长春新碱、强的松)治疗成人急性淋巴细胞性白血病(急淋)32 例, 取得较好疗效, 现报告如下。

1 材料和方法

病例选择: 32 例住院病人, 均符合急淋诊断标准[1]。男 21 例, 女 11 例, 年龄 16~48 岁, 平均 28 岁。按 FAB 分型, L1 型 7 例, L2 型 21 例, L3 型 4 例; 初治 22 例, 复发 6 例, 难治 4 例, 其中并发中枢神经系统白血病(Centre nervous system leukemia, CNSL)14 例。复发与难治病例均使用过标准的"VDLP(长春新碱, 柔红霉素, 左旋门冬酰胺酶, 强地松)"方案无效。

化疗方案: VCR 2 mg 静注第 1 天, CTX 400~600 mg 静滴第 2 天, THP 20~30 mg 静注第 3~5 天, Pred 60 mg/d 口服第 1~7 天, MTX 1~3 g 静滴第 8 天, 持续静滴 4 h, 间隔 24 h 后用甲酰四氢叶酸钙 6 mg 肌注 1/6 h 解救治疗 3 d。前后疗程间歇 14~21 d, 2 疗程未达完全缓解(Complete remission, CR)者更换方案。CNSL 病人化疗同时行鞘内注射 MTX 10 mg+阿糖胞苷(Cytosine arabinoside, Ara-C)50 mg+地塞米松 5 mg, 2 次/周, 直到脑脊液检查连续 3 次正常。

缓解后治疗: 完全缓解后, 使用同方案强化 1~2 个疗程, 再分别换用"CMOP(环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱、强的松)"、"VTLP(长春新碱、吡喃阿霉素、左旋门冬酰胺酶、强的松)"等方案交替行巩固治疗。有条件者行造血干细胞移植。

支持治疗: 化疗期间, 给予止吐、保肝、补充能量、液体。体温>38.5 ℃达 2 h 以上, 排除非感染因素外经验使用广谱抗生素(舒普深+丁胺卡那、复达欣、泰能等)。WBC<1.0×10^9/L 时用惠尔血针(150 μg/d), 并酌情给予成分输血、止血等治疗。采用成纤维细胞生长因子(贝复剂)局部喷洒治疗口腔溃疡。

疗效标准: 按文献[1]标准判定。

2 结果

2.1 缓解率

完全缓解(CR)率 62.5%(20/32), 部分缓解(PR)率 18.8%(6/32), 总有效率 81.3%。其中初治者 CR 率 68.2%(15/22), PR 率 18.2%(4/22), 有效率 86.4%; 复发、难治者 CR 率 50%(5/10), PR 率 20%(2/10), 有效率 70%。14 例中枢神经系统白血病患者 13 例脑脊液缓解, 缓解率 92.9%。

(下转 1185 页)

作者简介: 张 曦(1972—), 男, 重庆市人, 主治医师, 讲师, 主要从事造血干细胞移植、造血重建方面的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023)68755300

收稿日期: 2001-03-26; 修回日期: 2001-06-20

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net