DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.014
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0645-04

论著

豚鼠耳蜗血管纹黑色素的分布及其合成

钟时勋,刘兆华 (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 观察豚鼠耳蜗血管纹中黑色素和酪氨酸酶的分布特征,进而了解血管纹黑色素的合成。方法 对12只杂色豚鼠,分别在光镜和电镜下观察血管纹中黑色素和酪氨酸酶的分布及其超微结构特征。结果 黑色素主要分布于豚鼠血管纹中间细胞内,基底细胞含少量黑色素,边缘细胞内无黑色素分布。酪氨酸酶分布于中间细胞Golgi体的分泌面和GERL囊泡,边缘细胞和基底细胞内无酪氨酸酶分布。结论 杂色豚鼠血管纹中间细胞为黑素细胞,能主动合成黑色素,而边缘细胞和基底细胞不能合成黑色素。

关键词:黑色素;酪氨酸酶;血管纹
中图法分类号:R322.923 文献标识码:A

Distribution and synthesis of melanin in striae vascularis of the cochlea of guinea pigs

ZHONG Shi-xun, LIU Zhao-hua (Department of Otorhinolaryngology and Head-Neck Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the distribution of melanin and tyrosinase in order to study the synthesis of melanin in the striae vascularis of the cochlea of the pigmented guinea pigs. Methods The distribution of melanin and tyrosinase in the striae vascularis of 12 pigmented guinea pigs was studied with optical and electron microscopy. Results A large part of melanin was located in the intermediate cells of striae vascularis, a small part in the basal cells and no in the marginal cells. Tyrosinase was found in the trans-side of the Golgi apparatus and GERL sacs of intermediate cells and no tyrosinase in the marginal and basal cells. Conclusion Our study reveals that the intermediate cells are melanocytes which may synthesize melanin.

Key words: melanin; tyrosinase; stria vascularis

耳蜗组织在内淋巴液的代谢以及蜗内电位的产生与维持过程中具有重要意义。一些学者观察到在杂色动物耳蜗血管纹中分布有数量不等的黑色素,但在白色动物耳蜗血管纹中没有黑色素分布[1]。目前对内耳黑色素的功能意义,尚不完全清楚。为此,本研究观察了豚鼠耳蜗血管纹中黑色素的分布及其超微结构,并探讨了其功能意义。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康杂色豚鼠12只,雌雄不拘,体重约300~400 g,耳廓反射灵敏,采用随机数字表法将动物随机分为2组,每组各6只,分别在光镜和电镜下观察血管纹黑色素(Ⅰa和Ⅰb组)和酪氨酸酶(Ⅱa和Ⅱb组)。

1.2 血管纹黑色素的光镜及电镜观察

注射戊巴比妥钠40 mg·kg^{-1}于豚鼠腹腔,麻醉后开胸,心内灌注生理盐水冲净体内血液再灌注混合固定液2%多聚甲醛+0.1%戊二醛+0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液(CB)(pH 7.4),断头后取出颞骨,迅速打开听泡,推压镫骨撕裂前庭窗,在圆窗

作者简介:钟时勋(1972—),男,四川省成都市人,硕士,医师,主要从事耳科学方面的研究。电话:(023)68757240

收稿日期:1999-11-25;修回日期:2000-03-10

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

膜和蜗尖各钻一小孔，从蜗尖缓慢注入混合固定液体 3～5 ml，再将标本浸泡固定 24 h（4 ℃），Ⅰa 组以 EDTA 脱钙，常规石蜡包埋，沿蜗轴水平切片（5 μm）。切片染色分 4 组：①铵银染色；②漂白法；③常规 HE 染色；④不作任何染色。染色①和②如下述。

1.2.1 铵银染色[2] ①切片脱蜡，常规处理至水；②入 Fontana 银染液，置于室温下暗处 18～20 h；③入 0.2% 氯化金水溶液 10 min；④入 5% 硫代硫酸钠 2 min；⑤HE 复染；⑥脱水、透明封片。在上述步骤间均用蒸馏水洗涤 2 min×3 次。

1.2.2 漂白法 切片脱蜡至水后以 0.1%～0.25% $KMnO_4$ 溶液处理 2～4 h，水洗后用 1% 草酸处理 1 min，HE 复染。

Ⅰb 组待固定完成后，剥离出耳蜗第三回血管纹，1% 锇酸后固定，丙酮梯度脱水，环氧树脂 618 包埋，常规透射电镜超薄切片，双铅染色，JEM－2000EX 透射电镜下观察并照相。

1.3 血管纹酪氨酸酶的光镜及电镜观察

动物麻醉、固定方法同前，固定液为 2% 多聚甲醛＋2% 戊二醛＋0.1 mol/L CB（pH 7.4）。固定完成后剥离出双侧耳蜗第三回血管纹，其中一侧血管纹以 0.1 mol/L CB 洗涤 5 min×2 次后，在 0.1% L-DOPA 液（美国 sigma 公司产品）中孵育 18～24 h（37 ℃水浴），每 3～4 h 换孵育液 1 次，再以 0.1 mol/L CB 洗涤 5 min×2 次。对侧耳蜗血管纹如上法孵育，但孵育液中不加 L-DOPA 作为阴性对照。Ⅱa 组用上述混合固定液固定过夜，梯度酒精脱水，常规石蜡包埋、切片，HE 染色；Ⅱb 组以 1% 锇酸后固定，常规透射电镜超薄切片同前，JEM-2000EX 透射电镜下观察并照相。

2 结果

2.1 耳蜗血管纹中黑色素的分布及其超微结构

石蜡切片铵银染色显示，杂色豚鼠耳蜗各回血管纹中均可见到黑色颗粒状或成簇分布的黑色素，见图 1。HE 染色和不作染色也显示黑色颗粒呈点状散在或成簇分布，高锰酸钾漂白后这些黑色颗粒均消失。透射电镜下可见杂色豚鼠中间细胞与血管纹微血管紧密相邻，胞质突起较丰富，胞质及突起内线粒体、Golgi 体、GERL 等细胞器丰富，并含许多黑色素颗粒，主要由较多的Ⅲ、Ⅳ期和较少的Ⅱ期黑素体散在或成簇聚集而成，Ⅰ期黑素体少见。黑素体成簇聚集时可同时见到各期黑素体，Ⅰ期黑素体为球形膜性空泡，电子密度较低，Ⅱ期黑素体呈椭圆形，内含纤维样基质及板层结构，Ⅲ期黑素体基质变得致密，内部结构已看不太清，Ⅳ期黑素体则更为致密，电子不透明，已无法看清内部结构，见图 2。成熟期黑素体直径约 0.5～3 μm，外被一层被膜包绕。部分黑素体聚集于血管纹微血管周围，二者紧密相邻。部分基底细胞中也可见到少量的黑素体，呈散在或聚集分布，其超微结构与中间细胞内的黑素体相似。边缘细胞内未见有黑素体分布。

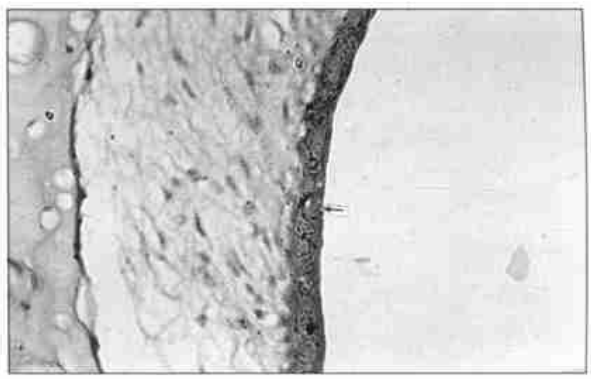


图 1 血管纹中黑色颗粒状分布的黑色素（↑）（铵银染色×400）

Fig 1 Dark granular distributed melanin in the stria vascularis（↑）（stained by Masson-Fontana method×400）

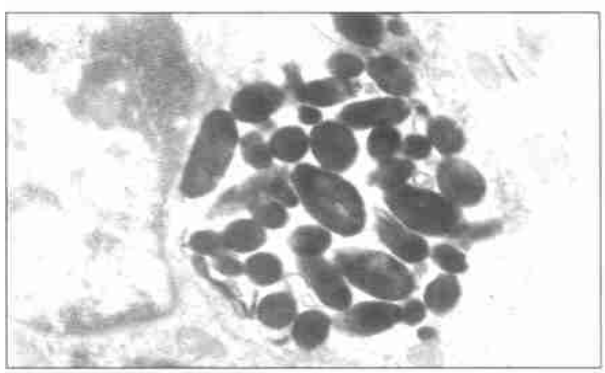


图 2 中间细胞内各期黑素体成簇聚集（TEM×15 000）

Fig 2 Different stages of melanosomes in clusters in the intermediate cells（TEM×15 000）

2.2 耳蜗血管纹中酪氨酸酶的分布及其超微结构

石蜡切片经 L-DOPA 组织化学反应后，光镜下可见杂色豚鼠耳蜗各回血管纹中均分布有棕黑色颗粒，这些颗粒是酪氨酸酶的特征性反应颗粒，见图 3。阴性对照切片的血管纹中未见有反应颗粒。

透射电镜下，可见耳蜗血管纹中间细胞内 Golgi 体的分泌面和与其紧邻的 GERL 囊泡上有酪氨酸酶活性反应产物，为电子密度很高的黑色颗粒状沉淀，Golgi 体的形成面没有此反应产物，见图 4。边缘细胞和基底细胞内均未见有酶活性反应产物分布。阴性对照血管纹的各类细胞中亦未见有酪氨酸酶活性反应产物分布。

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

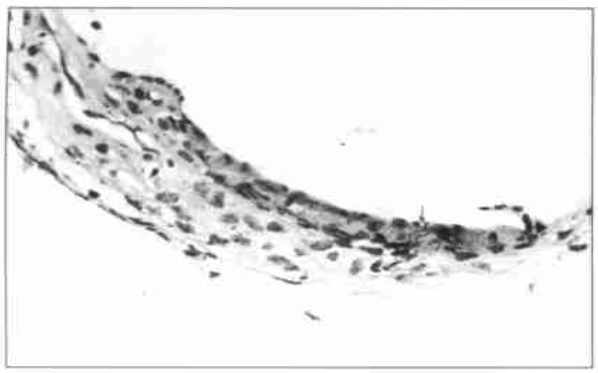


图 3　血管纹内棕黑色酪氨酸酶反应产物颗粒(↑)　(HE× 400)

Fig 3　Granules(↑) of brownish-black tyrosinase reaction products in the stria vascularis　(HE× 400)

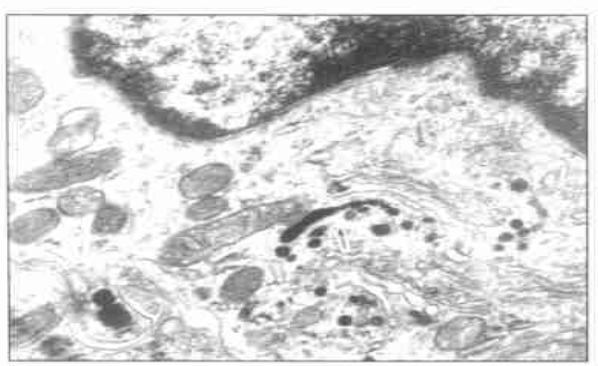


图 4　中间细胞内 **Golgi** 体分泌面和 **GERL** 囊泡上黑色酪氨酸酶反应产物颗粒(↑)　(TEM× 12 000)

Fig 4　Reaction products of tyrosinase on trans-side of Golgi apparatus and GERL sacs in intermediate cells(↑)　(TEM× 12 000)

3　讨论

本研究采用铵银染色、HE 染色及不经任何染色, 在光镜下可见杂色豚鼠耳蜗各回血管纹都有黑色颗粒分布, 但经高锰酸钾漂白后黑色颗粒完全消退, 证实这些颗粒确为黑色素[2]。电镜观察显示, 血管纹黑色素主要分布于中间细胞内, 而基底细胞内较少, 边缘细胞内则没有, 此与大鼠血管纹中的黑色素分布相似[1]。部分黑素体与血管纹微血管紧密相邻, 可能意味着这些黑色素与微血管间能相互交换物质成分。成熟期黑素体呈椭圆形, 大小约 0.5 ~ 3 μm, 散在或聚集成簇, 内部为纤维样基质及板层结构, 表现出真黑素的超微结构特征。不过在猫及灰鼠血管纹中的黑色素则被认为是褐黑素, 这可能与物种差异有关[3,4]。

黑色素是由酪氨酸酶催化酪氨酸形成多巴, 再经一系列化学反应逐步合成的[5]。因此, 本实验采用多巴作底物, 经组织化学反应, 检测其反应产物来检测酪氨酸酶活性反应产物的分布。电镜下, 黑色的反应产物颗粒分布于中间细胞内 Golgi 体分泌面及紧邻的 GERL 囊泡, 边缘细胞和基底细胞内无酶反应产物颗粒分布, 与 Fukazawa[5] 的研究结果一致。而白色动物则正是由于其酪氨酸酶存在着遗传性缺陷, 因而中间细胞不能合成黑色素[6]。

Wright 等[4] 发现, 灰鼠血管纹中的黑色素主要分布于黑素细胞中, 其细胞质较少, 除黑素颗粒外其它细胞器较少。绝大部分色素由大小约 0.5 ~ 3 μm 含致密色素颗粒的物质成簇堆积而成, 细胞内 Golgi 体和 GERL 很少见。而中间细胞体积较大, 内有小而散在的致密色素颗粒, Golgi 体和 GERL 系统丰富, DOPA 反应强阳性。Conlee 等[3] 在猫血管纹中也观察到类似的现象。这两种不同形式的中间细胞, 可能代表着两种不同的细胞类型, 或者只是同一种细胞不同发育期的表现, 即为无活性和有活性黑素细胞的表现。

在本实验中, 豚鼠中间细胞与黑素细胞超微结构特征基本一致, 并且胞质内也含有酪氨酸酶, 意味着其能主动合成黑色素, 证实豚鼠中间细胞就是黑素细胞。基底细胞虽含少量黑色素, 但没有酪氨酸酶表达, 而边缘细胞既无黑色素, 也无酪酸酶分布, 表明这两种细胞自身不能合成黑色素, 基底细胞内的黑色素是从中间细胞转运而来的。

研究表明, 耳蜗血管纹黑色素具有重要功能。杂色豚鼠与白色豚鼠相比, 前者中间细胞体积及其与血管纹体积之比 Vv 都比后者大, 而边缘细胞 Vv 则比后者小, 且以耳蜗顶回的差异更为显著, 这可能与前者耳蜗黑色素含量从底回向顶回增多及后者耳蜗缺乏黑色素有关[7]。氨基糖甙类抗生素作用后, 杂色豚鼠血管纹内的黑色素含量显著增加, 且中间细胞内的黑素体向边缘细胞及内淋巴腔移动[8], 边缘细胞体积无明显变化, 而白色豚鼠血管纹边缘细胞体积则显著减少, 且其听功能损害亦显著大于杂色豚鼠, 此即所谓的色素依赖性机制, 表明内耳黑色素具有减轻氨基糖甙类抗生素耳毒性的作用[7]。此外, 内耳黑色素还可作为某些二价离子的储存库参与内淋巴离子成分的调节过程, 也可作为自由基的捕获剂而捕获并灭活内耳中的毒性自由基, 从而防止自由基的损害作用造成细胞

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

DNA 链断裂、碱基破坏及形成 DNA-蛋白交联等[9]。这些都表明，内耳黑色素对于内耳功能具有重要意义，但其作用机制仍有待于进行更深入的研究。

参考文献：

[1] Hilding D A, Ginzburg G D. Pigmentation of the stria vascularis [J]. Acta Otolaryngol (Stockh), 1977, 84(1): 24—37.

[2] 刘介眉，严庆汉，路英杰. 病理组织染色的理论方法和应用[M]. 北京：人民卫生出版社，1983. 116—267.

[3] Conlee J W, Parks T N, Schwartz I R, *et al*. Comparative anatomy of melanin pigment in the stria vascualris. Evidence for a distribution between melanocytes and intermediate cells in the cat [J]. Acta Otolaryngol (Stockh), 1989, 107(1-2): 48—58.

[4] Wright C G, Lee D H. Pigmented cells of the stria vascualris and spiral ligament of the chichilla[J]. Acta Otolaryngol (Stockh), 1989, 108(3-4): 190—200.

[5] Fukazawa K, Sakagami M, Umemoto M, *et al*. Developmemt of melanosomes and cytochemical observation of tyrosinase activity in the inner ear[J]. ORL, 1994, 56(5): 247—252.

[6] Witkop C J, Quevedo W C, Fitzpatric T B. Albinism[A]. In: Stanbury J B, Wyngaarden D S, Frederickson J L, *et al*. eds. The metabolic basis of inherited disease[M]. New York: McGraw-Hill, 1983. 301—346.

[7] Conlee J W, Jensen R P, Park T N, *et al*. Turn-specific and pigment-dependent differences in the stria vascularis of normal and gentamicin-treated albino and pigmented guinea pigs[J]. Hear Res, 1991, 55(1): 57—69.

[8] Yoshihara T, Mita N, satoh M, *et al*. Effects of gentamicin on the melanosomes in stria vascularis of pigmented guinea pigs[J]. Acta Otolaryngol(Stockh), 1997, 528(Suppl): 25—29.

[9] 钟时勋，刘兆华. 内耳黑色素对氨基糖甙类抗生素耳毒性的影响[J]. 第三军医大学学报，1999，21(8 增刊)：S19—S22.

（编辑 薛国文）

（上接 644 页）

表 **1** 中风患者神经功能恢复及计分的变化

	治疗组(n=23)		未治疗组(n=23)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
RD	2.98±0.87	1.87±0.96☆★	2.96±0.88	2.43±0.92
抑郁自评量表	57.4±8.4	36.7±9.6☆★	58.6±8.7	46.7±9.1
汉密尔登抑郁量表	32.17±9.41	10.64±8.26☆	34.41±9.12	29.16±8.70

☆：P＜0.001 与治疗前比较；★：P＜0.001 与未治疗组比较

3 讨论

3.1 中风后抑郁发生的机制

中风后抑郁的发生率很高，国内外文献报道约 25%～60%[1]。我们发现中风后抑郁的发生率约为 47.9%，这与国内外报道相一致，中风后抑郁发生的机制不十分清楚，可能与以下因素有关：①生活事件的应激[2]；②与病变的部位及大小有关[3]；③与中风后局部脑组织低灌流有关[4]；④Koide 认为，中风后抑郁与神经递质如神经肽 Y、去甲肾上腺素改变[3]、血管分成及解剖通路的改变有关；⑤Ramasubbu[5] 认为中风后抑郁的可能原因是中风后 5-HT 能的低功能发挥(Serotogergic Hypofunctioning)。

3.2 抑郁对中风后神经功能恢复的影响

近年来发现，患者中风后的情绪改变在神经功能恢复中起重要的作用。Clark 等[6] 发现 PSD 的发生及其严重程度明显地影响患者神经功能的恢复，且可增加中风患者的病死率。

我们的观察发现，在年龄匹配的条件下，治疗组和非治疗组 RD 评分没有显著性差异，经抗抑郁治疗后，治疗组的神经功能明显改善，不仅明显好于抗抑郁治疗前，而且明显好于非抗抑郁治疗组。这一结果提示，抑郁可明显影响中风后神经功能恢复，抗抑郁治疗可以促进中风后神经功能的恢复。

关键词：中风；抑郁；神经功能；抗抑郁治疗

中图法分类号：R743.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] Brola W, Szafraniec L. Depression as a complication of stroke [J]. Przegl Lek, 1996, 53(9): 690—694.

[2] Black S A, Goodwin J S, Markides K S. The association between chronic diseases and depressive symptomatology in older Mexican Americans[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1998, 53(3): 188—191.

[3] Gonzalez Torrecillas J I, Mendlewicz J, Lobo A. Analysis of intensity of post-stroke depression and its relationship with the cerebral lesion location[J]. Med Clin Barc, 1997, 109(7): 241—244.

[4] Bokura H, Robinson R G. Long-term cognitive impairment associated with caudate stroke[J]. Stroke, 1997, 28(5): 970—973.

[5] Ramasubbu R, Flint A, Brown G, *et al*. Diminished serotonin-mediated prolactin responses in nondepressed stroke patients compared with healthy normal subjects[J]. Stroke, 1998, 29(7): 1 293—1 297.

[6] Clark M S, Smith D S. The effects of depression and abnormal illness behaviour on outcome following rehabilitation from stroke[J]. Clin Rehabil, 1998, 12(1): 73—77.

（编辑 张大春）

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