DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.039
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
338 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0338-02

豚鼠微血管通透性变化在内耳缺血性损伤中的作用

张学渊[1],汪吉宝[2] ([1]第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038;[2]同济医科大学协和医院耳鼻咽喉科,武汉 430000)

提 要:目的 研究豚鼠耳蜗微循环障碍动物模型的耳蜗微血管通透性变化特点,了解耳蜗微血管通透性变化在内耳缺血性损伤中的可能作用。方法 ①光化学法建立豚鼠耳蜗微循障碍动物模型;②改良伊文思蓝荧光法定量研究其耳蜗微血管通透性变化特点;③记录CAPN1阈值研究其听力损伤。结果 豚鼠耳蜗发生微循环障碍后2 h和4 h,伊文思蓝通过耳蜗微血管的渗出量分别为(1.709±0.769)μg/只和(2.849±0.653)μg/只($P<0.01$);CAPN1阈值分别增加(24.44±7.27) dBpeSPL和(38.33±7.91) dBpeSPL($P<0.01$)。结论 豚鼠耳蜗发生微循环障碍后其耳蜗微血管通透性明显增高并随时间的延长而加重,可能是微循环障碍致内耳听力损伤的重要机制之一。

关键词:微血管通透性;微循环;耳蜗;缺血
中图法分类号:R322.13;R764.83 文献标识码:A

Role of cochlea microvasculature permeability changes in guinea pigs after inner ear ischemia

ZHANG Xue-yuan, WANG Ji-bao (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the cochlea microvasculature permeability changes of the inner ear in guinea pigs, so as to clarify the possible role of the cochlea microvasculature permeability changes in the ischemic injury of inner ears. Methods Modified method of Evans blue fluorescence was used to observe the charges of permeability of the cochlea microvasculature in the animal model of cochlea microcirculatory disorders which was caused by photochemical reaction. CAPN1 threshold was recorded by using Madsen 2 250 to study the hearing loss. Results The amounts of Evens blue crossing the cochlea microvasculature were (1.709±0.769) and (2.849 ±0.653) μg/ per animal 2 and 4 h after the development of cochlea microcirculatory disorder in guinea pigs, respectively ($P<0.01$); and their hearing loss were (24.44 ±7.27) and (38.33±7.91) dBpeSPL in 2 and 4 h, respectively ($P<0.01$). Conclusion The permeability of the cochlea microvasculature increases along with the duration of cochlea microcirculatory disorder occur and the increase of cochlea microvasculature permeability might be one of the important mechanisms inducing cochlear ischemic lesions.

Key words: permeability; microcirculatory; cochlea; ischemia

血脑屏障通透性增高是缺血性脑梗死的重要原因,然而迄今尚不清楚耳蜗微血管通透性变化在微循环障碍致听力损伤机制中的作用[1,2]。本研究旨在用改良伊文思蓝荧光法定量研究豚鼠耳蜗微循环障碍动物模型的耳蜗微血管通透性变化特点,了解耳蜗微血管通透性改变在微循环障碍致内耳听力损伤中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 伊文思蓝荧光法的建立[3]

取5 μg伊文思蓝溶于1 ml甲酰胺溶液中,同量甲酰胺溶液为空白对照,荧光分光光度计(MPF-4, 日立)扫描,确定最佳激发光的波长和狭缝。

取500 μg伊文思蓝溶于2 ml甲酰胺中,梯度稀释,配制成不同浓度的标准管。用荧光分光光度计测定其相对荧光强度;用72-1型分光光度计测定其吸光度(A);分别绘制2种方法的标准工作曲线。

耳蜗组织中伊文思蓝回收率的测定:豚鼠离体耳蜗7只,用微量注射器经圆窗将伊文思蓝(5 μg/只)注入各耳蜗内,置室温下0.5 h后,移于1 ml甲酰胺液中,放置24 h(50 ℃),取浸出液测荧光值。

1.2 豚鼠耳蜗微循环障碍动物模型的耳蜗微血管通透性变化检测

实验组:健康白色豚鼠18只,体重250~350 g,雌雄不限,耳廓反射正常;光化学法在豚鼠右耳诱导耳蜗微循环障碍[4,5],将豚鼠随机分为2组:第1组(9只):光化学诱导后立即经股静脉注射伊文思蓝(40 mg/kg),2 h后开胸,等渗盐水经左心室灌注冲洗,直至右心房流出无色液体为止。断头取听泡,将耳蜗置于1 ml甲酰胺中(50 ℃)24 h,取浸出液用荧光分光光度计测其荧光值,标准曲线工作法计算浸出液之伊文思蓝量。第2组(9只):光化学诱导后2 h,经股静脉注入伊文思蓝(40 mg/kg),4 h后,同第1组处理。对照组(10只):除不光照耳蜗外,余处理同实验组。

作者简介:张学渊(1962—),男,云南省昭通市人,博士,副教授,主要从事内耳疾病方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754406

收稿日期:2000-10-23;修回日期:2001-03-02

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

1.3　$CAPN_1$ 检测方法[4]

按常规记录 $CAPN_1$ 阈值。

1.4　统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 分别用 t 检验。

2　结果

2.1　伊文思蓝甲酰胺液的激发光谱和荧光光谱

本实验条件下, 其激发光峰值在 635 nm 处, 荧光光谱峰值在687 nm 处。故激发光以波长635 nm、狭缝 10 nm, 发射光以波长 687 nm、狭缝 8 nm 为本实验荧光分光光度计的工作条件。

2.2　伊文思蓝甲酰胺液的荧光法标准曲线和比色法标准曲线

本实验条件下, 伊文思蓝荧光法检测下限为 0.122 μg/ml, 比色法检测下限为 3.90 μg/ml, 荧光法较比色法灵敏度高 31.97 倍。

2.3　耳蜗组织中伊文思蓝的回收率

注入耳蜗伊文思蓝量 5 μg/只, 伊文思蓝甲酰胺浸出液中伊文思蓝量为(4.68±0.286) μg/只, 故其回收率为 93.33%±5.51%。

2.4　耳蜗微血管通透性变化

2.4.1　实验组　　光化学法诱导豚鼠耳蜗发生微循环障后 0~2 h, 伊文思蓝通过耳蜗微血管的渗出量为(1.709±0.769) μg/只, 2~4 h 为(2.849±0.653) μg/只; t 检验, 两组比较, $t=3.3904>t_{0.01}(16)=2.921$, $P<0.01$, 示 0~2 h 组和 2~4 h 组耳蜗微血管通透性变化相差非常显著。

2.4.2　对照组　　荧光法检测未发现有伊文思蓝通过正常耳蜗微血管渗出。

2.5　CAPN1 阈值

2~4 h 实验组 $CAPN_1$ 阈值增加 38.33±7.91 dBpeSPL, 0~2 h 实验组 $CAPN_1$ 阈值增加 24.44±7.27 dBpeSPL, 两组比较, $t=3.90$, 大于 $t_{0.01}(16)=2.921$, $P<0.01$, 示二组听力损伤程度相差非常显著; 对照组 $CAPN_1$ 阈值无有意义的变化。

3　讨论

伊文思蓝被广泛用于血管通透性的研究[2,6]。由于伊文思蓝在甲酰胺液中的溶解度高, 且性质稳定, 故用甲酰胺摄取漏入组织中的伊文思蓝, 再将伊文思蓝甲酰胺溶液进行比色即可测定伊文思蓝的含量。但比色法所需样本量较大且欠灵敏, 而耳蜗组织较小, 即使耳蜗微血管通透性发生变化, 其渗出量亦少, 常在比色法检测下限之外, 故伊文思蓝比色法不能用于研究耳蜗微血管通透性的变化。

参照 Saria[3] 伊文思蓝荧光法并加以改良, 作者建立了伊文思蓝荧光法以定量研究内耳微血管通透性的变化。在本实验条件下, 其检测下限为 122 ng, 灵敏度是比色法的 32 倍。将 5 μg 伊文思蓝用微量注射器注入离体耳蜗内, 测定甲酰胺从耳蜗组织中摄取伊文思蓝的能力, 其回收率为(93.33±5.51)%。结果表明, 伊文思蓝荧光法可用于耳蜗微血管通透性的研究。在预实验中作者发现, 只要在取材前从左心室注入生理盐水, 充分冲洗血管床, 直至右心房流出无色液体为止, 则所测结果是可靠的, 且每次实验均建立标准工作曲线, 亦可排除其它因素的干扰。

微循环障碍是内耳疾病的重要原因, 本研究表明, 豚鼠耳蜗发生微循环障碍后, 其听力损失随时间的延长而加重; 然而、迄今尚不清楚耳蜗微血管通透性改变在微循环障碍致内耳听力损失机制中的可能作用[1]。本实验提示: 伊文思蓝不能通过正常豚鼠耳蜗微血管; 在豚鼠耳蜗发生微循环障碍后, 伊文思蓝通过耳蜗微血管的渗出量随时间的延长而明显增加。在实验中观察活体豚鼠耳蜗时作者注意到, 耳蜗发生微循环障碍后即静脉内注入伊文思蓝, 30 至 60 min 后耳蜗逐渐蓝染; 耳蜗发生微循环障碍后 120 min 才静脉注入伊文思蓝者, 10 余分钟后耳蜗即明显蓝染。本研究另文报告的形态学结果也表明[4,5]: 豚鼠耳蜗发生微循环障碍后即可见耳蜗外侧壁血管内皮细胞损伤, 但内皮细胞膜和内皮细胞间连接完整, 边缘细胞、中间细胞和基底细胞形态及细胞间连接均正常, 可能此时其屏蔽血液中大分子物质通过血迷路屏障的能力尚存; 在豚鼠耳蜗发生微循环障碍后 5 min, 耳蜗外侧壁微血管内皮细胞坏死脱落; 15~30 min 血管纹及螺旋韧带微血管周围间隙水肿, 并随时间的延长而加重; 24 h 后蜗管明显积水; 同样提示耳蜗发生微循环障碍后耳蜗微血管通透性明显增加, 可能是耳蜗微循环障碍致听力损伤的重要机制之一。

参考文献:

[1] Juhn S K, Li W, Kim J Y. Effect of stress-related hormones on inner ear fluid homeostasis and function[J]. Am J Otol, 1999, 20(5): 800—806.

[2] Dietrich W D, Watson B D, Busto R, *et al*. Photochemically induced cerebral infarction, early microvascular alteration[J]. Acta Neuropathol, 1987, 72(4): 315—325.

[3] Saria A, Lundberg J M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues[J]. J Neurosci Method, 1983, 8(1): 41—49.

[4] 张学渊, 汪吉宝. 光化学法建立豚鼠耳蜗微循环障碍模型的初步报告[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1995, 30(5): 285—287.

[5] 张学渊, 汪吉宝. 光化学诱导豚鼠耳蜗微血栓形成的超微病理研究[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1995, 9(1): 13—14.

[6] 田　牛 著. 微循环方法学[M]. 北京: 原子能出版社, 1993. 47—48.

(编辑　陈聪连)

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