DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.014

乙酰唑胺对豚鼠内耳超微结构影响的研究

王 康* 刘兆华 (第三军医大学附属大坪医院耳鼻咽喉科) 重庆, 400042

提 要 目的:探讨乙酰唑胺对血管纹和内淋巴囊上皮细胞超微结构的影响。方法:静脉注射乙酰唑胺后,观察不同时相(0、15、30 min、1、2 h及7 d)血管纹、内淋巴囊超微结构的变化。结果:① 血管纹内淋巴腔面游离缘空泡在注射乙酰唑胺后30 min和1 h明显减少,1周后空泡消失,边缘细胞和中间细胞各种细胞器减少,线粒体变性;② 内淋巴囊上皮细胞超微结构在注射乙酰唑胺30 min后出现改变,1d时最为明显,主要表现为暗、亮细胞胞核电子密度下降,胞浆内核糖体、内质网及线粒体减少,顶浆区和底部的胞饮小泡明显减少,细胞间隙变窄,甚至塌陷。2 h后血管纹的内淋巴囊的变化基本恢复正常。结论:静脉注射乙酰唑胺可以使血管纹及内淋巴囊超微结构发生一系列病理改变,提示其可能抑制血管纹分泌及内淋巴囊的经上皮重吸收功能,使内淋巴囊分泌的重吸收率下降。

关键词 乙酰唑胺;血管纹;内淋巴囊;超微结构
中图法分类号 R764.3; R97

乙酰唑胺是一种碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CAH)抑制剂,它对内耳形态学的影响可反映CAH在内耳的作用[1]。本实验通过静脉注射乙酰唑胺,观察血管纹、内淋巴囊超微结构的变化,旨在探讨乙酰唑胺在内耳离子、液体转运过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用耳廓反射灵敏,耳镜检查双外耳道、鼓膜正常,体重250~400g的健康红目白色杂种豚鼠35只,雌雄不限,随机分为对照组和6个实验组,每组5只。6个实验组动物分别在用药结束后即刻、15、30min、1、2 h和7 d处死,各组观察的血管纹/内淋巴囊耳数分别为5/5、5/3、5/3、4/3、5/4、3/2和3/1。

1.2 药物

乙酰唑胺(Acetazolamide),美国 Lerderle公司生产,批号4466-96。实验时用生理盐水5ml配制成浓度为100 mg/ml注射液。

1.3 实验方法

1.3.1 麻醉及给药 1%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔内注射,麻醉后将豚鼠仰卧固定,手术暴露左侧静脉,用5号小儿头皮静脉针进行颈静脉注射。第1~5实验组动物注入乙酰唑胺100 mg/kg,分别于注射后即刻、15、30 min、1 h及2 h处死动物。第6实验组动物腹腔内注射乙酰唑胺200 mg/kg,每日2次(Brooks, 1982)。7 d后处死。对照组经颈静脉注射同剂量生理盐水(1 ml/kg)2 d后处死。

1.3.2 透射电镜标本制备 快速断头处死,沿矢状面将豚鼠头剪为两半,去除全部脑组织,用一线状刀将乙状窦划开,清除血凝块,并注入少量3%戊二醛固定液,取下有完整内淋巴囊的双侧颞骨。打开听泡,用尖钳于蜗尖骨壁钻孔,挑开蜗窗下缘骨壁,暴露耳蜗底回起始端的鼓阶,将蹬骨轻推入前庭池,使前庭窗开放。此操作过程在1~2 min内完成。

以3%戊二醛液常规前固定后,于解剖显微镜下切下内淋巴囊,继将整个螺旋韧带(包括血管纹)取下。常规透射电镜制样、定位后,行超薄切片,片厚为50 nm左右,双铅液片染。JEM-100SX型透射电镜观察,照像。

2 结果

2.1 对照组豚鼠的血管纹、内淋巴囊超微结构

2.1.1 血管纹 由边缘细胞、中间细胞、基底细胞和毛细血管构成。边缘细胞向深层伸出许多突起,直达血管纹的基底部,并围绕在毛细血管周围。胞浆内含有大量的线粒体,尤其在靠近表面常可见明显的致密区,致使内质网显示不清。此处还可见到许多高尔基体及空泡,见图1。中间细胞的突起与边缘细胞的突起互相交错,形成复杂的镶嵌构型。基底细胞为单层或多层,下螺旋韧带紧贴,其间没有基膜。血管纹毛细血管位于血管纹的中间部,边缘细胞和中间细胞之间,由狭窄的内皮细胞层和明显致密的基膜组成,血管纹细胞突起(主要是边缘细胞的突起)直接附着在基膜表面。

2.1.2 内淋巴囊 内淋巴囊中间部上皮由亮、暗两种不同类型的细胞所构成。亮细胞比较规则,电子密度较低。胞浆基质较稀疏,丰富的细胞器主要位于核上区域及胞底部。腔面有很多微绒毛,相邻细胞间可见指状突起。暗细胞胞浆电子密度较高,细胞器较亮细胞为少,胞体顶部微绒毛也较少,其底部常可

* 王 康,男,31岁,主治医师,硕士

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

见不规则的突起突向上皮下组织,使基底部呈波浪状。亮、暗细胞间以连接复合体相连接。中间部的上皮下组织为富含毛细血管的疏松网状型结缔组织,见图2

2.2 实验组血管纹,内淋巴囊超微结构的改变

静脉注射乙酰唑胺后:

2.2.1 血管纹

2.2.1.1 即刻及15 min组 血管纹各部分超微结构基本保持正常,未见明显改变。

2.2.1.2 30 min组 边缘细胞及中间细胞的胞核电子密度下降,边缘细胞胞浆内有空泡形成,并逐渐出现轻度水肿,管腔端胞膜隆起,细胞间紧密连接清晰可见,未见有增宽现象。靠近内淋巴腔的游离缘空泡减少。中间细胞胞浆较正常稀疏,胞浆内核糖体、线粒体、内质网等细胞器减少。

2.2.1.3 1 h组 边缘细胞、中间细胞胞浆水肿进一步加重,胞浆疏松,中间细胞变化更明显,各种细胞器减少,细胞间隙因水肿出现增宽现象。部分线粒体肿胀,嵴断裂,并可见少数空泡化的线粒体,部分内质网扩张。边缘细胞间的紧密连接轻度增宽,游离缘空泡明显减少,整个血管纹组织因水肿而增厚,但正常情况下所见的靠近内淋巴腔面的致密区变窄。

2.2.1.4 2 h组 血管纹的组织病理改变除仍有部分细胞间水肿存在外,已基本恢复正常。

2.2.1.5 7 d组 血管纹游离缘的空泡基本消失,见有明显的胞浆内及组织间水肿,见图3

2.2.2 内淋巴囊

2.2.2.1 即刻和15 min组,内淋巴囊超微结构基本正常。

2.2.2.2 30 min及1 h组,内淋巴囊上皮细胞变化最为明显。暗细胞核电子密度明显下降,边界不清,核仁不能辨别,胞浆电子密度尚高但细胞器明显减少,整个胞浆显得很"空旷",有的可见内质网,但其上的核糖体丢失,未见多核糖体。亮细胞的胞核、胞浆的变化基本上同暗细胞,比较有特点的变化是顶浆区的胞饮小泡和胞浆内的空泡基本消失,管腔面的微绒毛肿胀。细胞间隙(LIS)变窄,有的甚至塌陷。

2.2.2.3 1 h组内淋巴囊上皮细胞的超微结构基本恢复正常。

2.2.2.4 7 d组 内淋巴囊腔隙轻度增宽,其中浮游细胞及一些细胞碎屑较正常为多,暗、亮细胞胞浆内各种细胞器减少,细胞侧间隙变窄,见图4

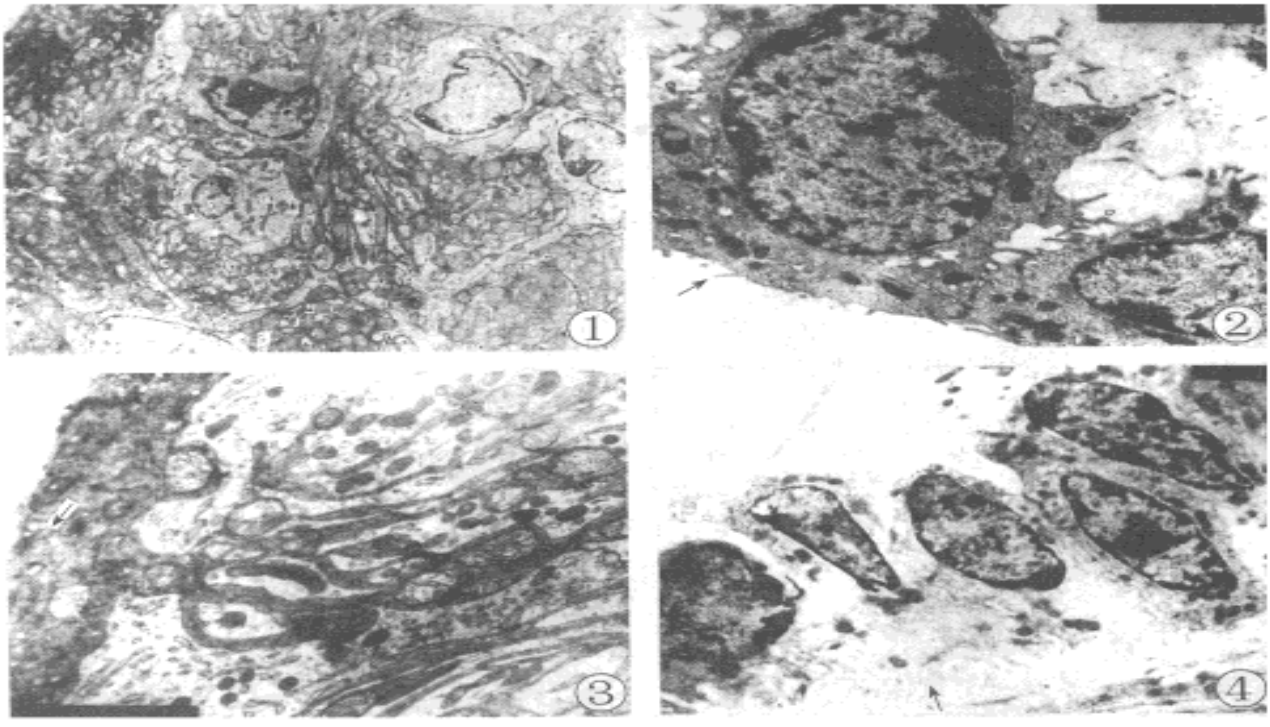


图1 正常血管纹边缘细胞 (TEM× 3000)

Fig 1 The marginal cells of stria vascrlaris in control animals (TEM× 3000)

图2 正常内淋巴囊中间部上皮细胞 (TEM× 6000)

Fig 2 The epithelial cells in the intermediate portion of endolymphatic sac in control animals (TEM× 6000)

图3 血管纹边缘细胞顶部空泡减少 (TEM× 8000)

Fig 3 The number of vaculoes and vesicles along the endolymphatic surface of the stria vascularis decreased (TEM× 8000)

图4 内淋巴囊上皮细胞,胞浆空旷 (TEM× 4000)

Fig 4 "Empty" appearance of the epithelail cells in endolymphatic sac (TEM× 4000)

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

3　讨论

3.1　CAH在内淋巴液分泌及重吸收过程中的作用

通过对豚鼠静注乙酰唑胺,抑制其 CAH活性,观察不同时相豚鼠血管纹、内淋巴囊超微结构的变化发现:① 乙酰唑胺可使血管纹向内淋巴腔的分泌减少,细胞内水份潴留,并进而向细胞间扩散。先出现胞浆内水肿,说明离子和液体在血管纹转运主要是经细胞途径。线粒体的变化表明血管纹的有氧代谢过程也受到影响。7d组动物观察到血管纹内淋巴腔面游离缘空泡消失,未发现明显的胞浆内及细胞间水肿,这可能是机体的代偿作用所致。② 内淋巴囊病理改变最明显的是暗、亮细胞的胞核电子密度下降,边界欠清,微绒毛轻度水肿,胞浆内显得很"空旷",各种细胞器成分减少。其中暗细胞的变化更明显,这可能与其具有高代谢活性有关。另外实验中还观察到上皮细胞侧间隙变窄,有的地方甚至出现塌陷,这可能与暗、亮细胞超微结构变化有关。以往的研究表明离子和液体的转运有经细胞和细胞间两种途径[2]。在内淋巴管和内淋巴囊近心部主要是经细胞间途径,而在内淋巴囊中间部,则以经细胞途径为主[3]。此外,静注乙酰唑胺后,亮细胞内的胞饮小泡和空泡大大减少,而这些空泡被认为参与细胞和离子的转运过程[1,2]。本实验的结果,从形态学的角度提示了静脉注射乙酰唑胺可使豚鼠内淋巴囊上皮对离子和液体的经细胞转运下降,内淋巴囊的重吸收率降低。由此可见,CAH在内淋巴液分泌及重吸收过程中都可能具有很重要的作用。

3.2　乙酰唑胺的临床价值评估

Shinkawa的研究表明乙酰唑胺可以减轻动物内淋巴积水模型的积水程度[1],但临床上使用该药治疗梅尼埃病疗效不佳。本实验发现:乙酰唑胺对血管纹和内淋巴囊上皮的离子、液体转运都有抑制作用,也就是说它既抑制内淋巴液的分泌,也抑制其重吸收。本实验尚无法区别哪一种作用占优势,但在一些特殊情况下,如梅尼埃病患者,其内淋巴囊已有病理改变(如囊周纤维化等),重吸收功能已受到损害。在梅尼埃病急性发作期,内淋巴分泌较多,此时使用乙酰唑胺,其对内淋巴分泌的抑制较对重吸收的抑制占优势,所以乙酰唑胺对梅尼埃病的原发病因无作用,因此不能预防其发作,对其病程的发展也无影响[4]。乙酰唑胺用于梅尼埃病的诊断,主要是利用乙酰唑胺可以使该病患者出现暂时听阈升高,而这种情况是其它耳蜗前庭疾病所没有的[5]。对于具有波动性听力下降的患者,其内淋巴囊的病变可能还不太严重,静脉注射乙酰唑胺将抑制内淋巴囊的重吸收,使内淋巴积水加重出现听阈升高。此外,乙酰唑胺除作用于血管纹和内淋巴囊的原发作用外,还可引起一些继发改变,如血浆 PCO_2升高,代谢性酸中毒(H^+积聚)、脑脊液压力升高及血浆渗透压暂时下降等,也可引起内淋巴积水加重,导致听阈升高。因此乙酰唑胺可产生重要的耳蜗局部作用,但全身代谢和生理的改变亦不容忽视。

参考文献

1 Shinkawa H. Kimura R S. Effect of diureties on endolymphatic hydrops. Acta Otolaryngol, 1986, 101(1): 43

2 Ichimiya I, Adams J C, Kimura R S. Immunolocalization of Na^+, K^+-ATPase, Ca^{++}-ATPase, calcium-binding proteins, and carbonic anhydrase in the guinea pig inner ear. Acta Otolaryngol (Stockh), 1994, 114(2): 167

3 Fukazawa K, Sakagami M, Umemoto M *et al*. Endocytosis and transepithelial transport of endolymph in the endolymphatic sac. Hear Res, 1995, 86(1-2): 82

4 Corvera J. Long-term effect of acetazolamide and chlorthalidoneon the hearing loss of Meniere's disease. Am J Otol, 1989, 10(2): 142

5 Tsujikawa S, Yamashita T, Tomodak *et al*. Effects of acetazolamide on acid-base balance in the endolymphatic sac of the guinea pig. Acta Otolaryngol Suppl, 1993, 500(1): 50

(收稿: 1997-04-15;修回: 1997-09-04)

(编辑　张大春)

Effects of acetazolamide on inner ear ultrastructure in guinea pigs

Wang Kang, Liu Zhaohua (Department of Otorhinolaryngology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract **Objective**: To explore the effects of acetazolamide on the ultrastructure of stria vascularis and endolymphatic sac. **Methods**: After the guinea pigs were intravenously injected with acetazolamide, the changes of the ultrastructure of stria vascularis and endolymphatic sac were observed at the different time

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

phases. Results: 1) 30 min and 1 h after the injection, the number of vacuoles and vesicles along the endolymphatic surface of the stria vascularis was markedly decreased and even disappeared 1 week later. The number of all kinds of organelles in the marginal and intermediate cells was reduced. Degeneration of some mitochondria and intracellular and intercellular edema were seen. 2) 30 min after the injection, prominent changes in the endolymphatic sac epithelial cells could be seen. The changes were even more obvious 30 min later. The most conspicuous change was a general reduction in the density of the dark and light cells which was accompanied with a decreased number of cell organelles to give these cells an 'empty' appearance. The space between the epithelia were narrow and even totally collapsed. 2 h after the injection, the normal cell structure of stria vascularis and endolymphatic sac were almost reconstructed. Conclusion: The intravenous injection of acetazolamide may cause pathological changes of stria vascularis and endolymphatic sac, which suggests that acetazolamide might inhibit the functions of secretion and reabsorption of the cochlear endolymph.

Key words acetazolamide; stria vascularis; endolymphatic sac; ultrastructure; guinea pig

NM23-H1在原发性肝癌伴肝内转移中的地位及作用机理的初步研究

A study on the effects of NM23-H1 on primary hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis

张开泰* 韩本立 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 400038

近年来,现代外科由于其技术的不断完善而取得了可喜的进展,已成为治疗肿瘤的首选措施,手术切除率明显提高。因此,癌肿在局部的复发率较以前有所下降,但是转移的频率则没有变化。临床所确诊的肿瘤中约60%已发生临床可见的或显微镜下的转移。患者的命运常常不是由原发灶而是转移来决定。肿瘤的浸润、转移已成为肿瘤防治领域中最为棘手的问题之一。

原发性肝癌以血行转移为主,淋巴结转移约占25%。其转移方式是多样的。肝静脉是远处转的主要途径,通过肝内门静脉系统形成的肝内转移是最常见的转移方式。临床肝叶切除术后肝癌复发的病例中大部分是由于经门静脉形成的肝内转移所致。肝内转移严重的影响着患者的预后。

NM23(NM意即Non-metastasis, 23表示被检查到的第23个克隆基因)是由Steeg等于1988年通过消减杂交法(substractive hybridization)在7种不同转移潜力的鼠黑色素瘤细胞中筛选出来的。此后,人NM23-H1 NM23-H2 cDNA也被相继克隆。它们与鼠NM23存在90%以上的同源性。蛋白产物是核苷二磷酸激酶(NDPK),主要维持细胞内三磷酸核苷(NTP)池的平衡,参与细胞内信息传导。NM23-H1与肿瘤转移的关系最为密切,其抑制肿瘤转移的生物学功能已在乳腺癌、黑色素瘤等人体肿瘤的体外实验中得到证实。它的发现为研究癌细胞转移表型的获得,揭示肿瘤转移机制带来了新的希望。

本研究采用逆转录酶联聚合反应(RT-PCR)对30例原发性肝癌nm23-H1 mRNA丰度进行了检测。同时运用基因转染技术观察了nm23-H1转基因肝癌细胞在浸润及转移能力方面的变化。结果表明,nm23-H1 mRNA低表达与原发性肝癌的肝内转移、门静脉癌栓形成、癌细胞低分化等病理改变明显相关性。转染nm23-H1 cDNA后,癌细胞内nm23-H1的表达显著提高,其在裸鼠肝内的转移能力受到一定程度地抑制;体外侵袭、迁移、生长等能力也受到不同程度地影响。

此外,nm23-H1的表达还与与细胞内游离Ca^{2+}以及N-Ras基因的表达存在相关性。结论如下:① 原发性肝癌伴肝内转移与癌细胞获得高侵袭力与克隆生长能力有关,NM23-H1功能的丧失可能是获得这种能力的较为主要的原因之一。② 提高NM23-H1在原发性肝癌细胞中的表达强度有助于抑制肝癌细胞的浸润、转移能力。③ NM23-H1抑制原发性肝癌细胞转移的可能机制是通过影响癌细胞的信息传导产生:抑制肝癌细胞对基低膜的侵袭。抑制肝癌细胞的迁移运动。抑制肝癌细胞的克隆生长。调节细胞内游离钙离子影响细胞的迁移以及其它方面的生物学行为。调节N-ras基因的表达降低癌细胞的早期增殖速度。

关键词 原发性肝癌;基因治疗

中图法分类号 R735.7

(收稿: 1997-10-22;修回: 1997-12-06)

(编辑 王红)

* 张开泰,男,34岁,主治医师,博士研究生

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