DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.042

表 1 积水耳与正常耳前庭膜长度的比较 (点计数值)

蜗管	正常耳	积水耳
C1	149.6± 14.7	228.8± 62.7*
C2	142.2± 9.2	234.4± 33.0*
C3	152.8± 6.7	228.9± 31.8*
C4	143.5± 15.5	210.3± 13.9
C5	157.7± 14.6	209.9± 30.0
C6	136.2± 11.0	184.6± 20.2
C7	145.5± 14.3	172.8± 13.3
C8	121.3± 22.0	129.4± 21.9

*: $P<0.01$ 与正常耳比较

表 2 积水耳中阶面积与正常耳中阶面积比较 (点计数值)

蜗管	正常耳	积水耳
C1	12443.0± 407.0	23366.8± 5045.8*
C2	11043.6± 528.1	21078.3± 5063.6*
C3	10572.7± 611.5	18912.0± 2873.1*
C4	10126.0± 787.4	16965.4± 1421.5*
C5	9501.7± 796.3	15585.0± 2287.7*
C6	9292.2± 756.8	13922.2± 1254.6*
C7	8725.4± 782.6	12376.3± 1400.6*
C8	7652.2± 1559.2	10202.0± 2927.9*

*: $P<0.01$ 与正常耳蜗管比较

3 讨论

近年来计算机图像分析及三维重建技术引入医学研究领域[3-5],使生物结构、形态学研究的定量和立体再现成为可能。由于定量、准确客观地记录结果,使研究结果更加科学、可靠。判断膜迷路积水传统的方法是在光镜下根据前庭膜向前庭阶膨隆情况分为轻、中、重度积水,此法在不同观察者,不同实验室之间具有很大差异,因而失去了观察结果的客观性、可比性。计算机图像分析技术的引入给内耳疾病的研究提供了科学、准确的数据,使实验结果更具说服力[4]。本实验选用两个参数:中阶面积(S),前庭膜长度(L);积水组蜗管各部(C1~C8)中阶面积均较正常组显著增加,而前庭膜长度只在底回(C1~C3)较正常组显著增加。选用面积参数敏度较高。

由于耳蜗结构的特殊性(多腔隙、迂回、脆弱),其病理制片较一般组织复杂,在脱钙、梯度浓度火棉胶浸胶等过程中很可能影响到耳蜗的自然形态。尤其基底膜、前庭膜组织呈悬浮状态,在制片、切片等步骤中都可能使基底膜移位,由此影响到实验结果的判断。以往的实验常见在正常耳蜗组织切片中前庭膜移位(膨隆或萎陷),在膜迷路积水实验中可能因制片的因素影响到对积水程度客观的判断。本实验借助计算机图像分析经统计处理得出正常耳蜗中阶面积和前庭膜长度的客观数值,为内耳疾病的研究确立了基础。

耳蜗截面积由底至顶呈螺旋形递减,过轴的切片在顶回难以保证所有切片方向与蜗管长轴相垂直,顶回部分切片可能呈斜截面积从而影响所测算截面积及前庭膜长度的准确性(测算值可能较实际值偏高),这一缺陷有待进一步探索和改进。

关键词 计算机图像分析;豚鼠;耳蜗积水
中图法分类号 R764.35

参考文献

1 Kimura R S, Skuknachet H F. Experimental production of endolymphatic hydrops. Otol Clinical of North America, 1968; 10: 457
2 刘东风,李新吾,汪磊等.实验性内淋巴积水内耳病理观察.中华耳鼻咽喉科杂志, 1988; 23: 80
3 王宜南,刘兆华.用计算机图像分析技术研究膜迷路积水.中华耳鼻咽喉科杂志, 1996; 3: 139
4 刘阳.计算机辅助颞骨结构三维重建.国外医学: 耳鼻咽喉科学分册, 1996; 20(3): 129
5 刘湘燕.多媒体技术在耳鼻咽喉领域的应用.国外医学: 耳鼻咽喉科学分册, 1996; 20(5): 288

(收稿: 1997-04-10;修回: 1997-06-16)
(编辑 仇玉福)

犬脑干缺血后血小板聚集功能的改变

Changes of platelet agregation gauge after brainstem ischemia in dogs

何 英* 王东武 邓志宽 张 蔚** (第三军医大学附属新桥医院神经内科)重庆, 400037

提 要 目的:观察脑干缺血后外周血血小板聚集功能(PAG)和脑干听觉诱发电位(BAEP)的变化。方法:建立犬局灶性脑干缺血模型。结果:犬局灶性脑干缺血后0.5、1、1.5、3、6和12h BAEP的Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ波潜伏

* 何 英,女, 30岁,主治医师,讲师,硕士
** 预防医学系医学统计学教研室 重庆, 400038

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

期(PL)及Ⅰ～Ⅲ、Ⅲ～Ⅴ、Ⅰ～Ⅴ波峰间期(IPL)均非常显著地延长;缺血后 0.5、1.5、3及 6 h PAG值也均非常显著地升高。结论:脑干缺血时血小板聚集功能加强。

基底动脉缺血引起的脑干损伤是脑血管疾病的重要死亡原因。我科成功建立局灶性犬脑干缺血模型,观察到缺血后脑干组织细胞内钙含量明显增高,电镜下耳蜗核处神经元缺血性改变随时间延长而加重[1],犬脑干听觉诱发电位Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ波潜伏期及Ⅰ-Ⅲ、Ⅲ-Ⅴ、Ⅰ-Ⅴ的波峰间期缺血后均显著延长[2]。为了进一步研究脑干缺血,使模型建立方法更成熟,我们设立本研究观察外周血血小板聚集功能的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用体重 10～14 kg成年杂种犬 25只,雌雄不限,随机分为两大组:假手术组 5只,脑干缺血组 20只。其中脑干缺血组设立 0.5、1.5、3、6 h 4个时相点,各时相点 5只犬。

1.2 犬脑干局灶性缺血模型的建立

犬用 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg静脉麻醉,行气管切开插管,参照 Joan等[3]的办法,经颈入路,枕骨基底开窗 3 cm×0.5 cm,暴露并结扎基底动脉全段;假手术组暴露但不结扎基底动脉。

1.3 取材与测定

血小板聚集功能(PAG)的测定:在犬缺血前和缺血后 0.5、1.5、3、6 h各抽取静脉血 4 ml入硅化后的玻璃管,抗凝剂采用枸橼酸钠,按常规方法分离富含血小板血浆(PRP)和贫血小板血浆(PPP),用上海通用电技术研究所生产的 TYXN-91智能血液凝集仪测量血小板聚集前后光通量的变化,来描述血小板聚集率。测定按仪器的程度进行,富含血小板血浆中加入血小板诱聚剂 ADP6 μm,分别测定第 1分钟,第 5分钟及最大血小板聚集率。TYXN-91智能血液凝集仪是目前国内唯一用计算机自动检测处理实验数据的用于血小板聚集功能测定的高技术产品,采用红外光比浊法检测,不受自然光干扰。仪器操作全部为触摸按键式,无需手工调零、调幅等,进一步提高测试精度。

2 结果

脑干缺血组与假手术组的血小板聚集功能(PAG)相比较,第 1分钟,第 5分钟及最大血小板聚集率均无差别($P > 0.05$);在缺血后 0.5、1.5、3、6则非常显著地升高($P < 0.01$),从 1.5 h后则各值渐降低,见附表。

附表　犬脑干缺血后积压组血小板聚集功能的变化($\bar{x} \pm s$)

	第 1分钟聚集率		第 5分钟聚集率		最大聚集率	
	假手术组	脑干缺血组	假手术组	脑干缺血组	假手术组	脑干缺血组
0 h	23.260± 1.457	33.760± 1.576	26.780± 1.297	27.340± 1.332	34.760± 2.449	35.160± 2.618
0.5 h	34.020± 2.445	74.340± 2.285**	26.100± 2.187	47.560± 1.436**	37.160± 2.652	81.940± 1.632**
1.5 h	35.340± 2.997	65.340± 3.320**	27.500± 0.992	38.360± 1.596**	38.280± 0.581	76.880± 2.327**
3 h	34.560± 1.117	45.500± 2.507**	25.920± 2.139	36.860± 1.893**	38.300± 1.239	51.620± 1.013**
6 h	35.180± 1.555	44.200± 2.451**	27.580± 1.535	35.960± 2.455**	38.620± 0.743	50.020± 0.823**

** : $P < 0.01$与假手术组比较

3 讨论

正常人体内血小板的聚集和解聚处于动态平衡状态,从而维持体内血流的畅通,在脑缺血时由于细胞内钙离子浓度升高,Ca^{2+}依赖性磷脂酶 A_2和 C的激活,细胞膜磷脂水解生成溶血性血小板活化因子,经乙酰转移酶的作用,转化为活性极强的血小板激活因子[4,5],且在脑组织存在血小板激活因子结合的位点,所以血小板被激活,血小板活化时释放的许多活性物质可正反馈地促进血小板聚集;又由于磷脂降解产物游离脂肪酸,特别是花生四烯酸增多,导致血栓烷 A_2和前列腺素的动态平衡被打破,血栓烷 A_2的活性相对过度增加,微血管过度收缩和血小板凝集,更加重缺血[6]。在血小板聚集功能(PAG)测定中,1 min聚集率反映血小板的原发聚集速度,5 min聚集率反映血小板的继发聚集速度,根据血小板聚集前后光通量的变化来描述。血小板在聚集剂的作用下可粘聚在一起,在聚集开始前测得一初始 D_0(OD值),一旦聚集剂被加到富含 PRP中,血小板随即慢慢聚成团,由于未聚集的血小板数不断减少和血小板团块不断增大,使 D_0值下降,D_0的下降与血小板聚集率成正比,本实验用 ADP作为聚集剂。

在正常人和脑血栓恢复期病人的血小板聚集功能测定中,脑血栓形成者 1 min和 3 min血小板聚集率均升高,以 3 min血小板聚集率升高最明显,由 37%±20%升至 61%±13%。脑血栓组以血小板的继发性聚集性增高为主,所形成的血小板不易解聚,进一步形成脑血栓[7]。在本实验中我们观察到:犬脑干缺血后第 1分钟、第 5分钟和最大血小板聚集率均升高,以第 1分钟血小板聚集率升高最明显,在缺血 0.5 h即由 33.8%±1.6%升至 74.3%±2.3%。脑干缺血组以血小板的

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

原发性聚集性增高为主,所形成的血小板容易解聚。

脑缺血患者血小板聚集功能增强,本实验证实脑干缺血时血小板聚集功能亦加强,这为临床应用抗血小板聚集药物防治脑血栓形成具有现实意义。

关键词 脑缺血;脑干;血小板;聚集功能

中图法分类号 R743.31

参考文献

1 何 英,王东武,邓志宽等.犬脑干缺血后细胞内钙含量和超微结构的改变.第三军医大学学报,1996;18(2):135

2 何 英,王东武,邓志宽等.犬脑干缺血后脑干听觉诱发电位的研究.临床脑电学杂志,1996;5(3):160

3 Joan C. Basilar artery occulation in rats. Stroke, 1990; 22(2): 247

4 Siesjo B K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part I: Pathophysiology. J Neurosurg, 1992; 77(2): 169

5 刘晓勤,季晓鹏,苗 莉等.抗钙和抗血栓素 A_2治疗急性缺血性脑卒中的疗效观察和生化研究.中风与神经疾病杂志,1994;11(1):72

6 Kochanek P M, Dutka A J, Aumaroo K K *et al*. Effects of prostacyclin indornethacin and heparin on cerebral blood flow and platelet adhension after multifocal ischemia of canine brain. Stroke, 1988; 19: 693

7 孙荣华,秦建新,李华林等.高血压病和脑血栓形成患者血小板聚集性的变化.第一军医大学学报,1993;13(2):128

(收稿:1997-10-10;修回:1998-01-07)

(编辑 刘 鹏)

人胚腱细胞体外培养及其生长特性观察

In vitro culture of human embryo tenocytes and its growth characteristics

康庆林* 蒋祖言 王爱民 冀振亮** (第三军医大学附属大坪医院骨科)重庆,400042

提 要 目的:建立肌腱生物学研究的体外模型。方法:贴块培养人胚腱细胞,观察原代及传代腱细胞生长、形态及遗传学特征,用 Vimentin及 Fn免疫组化法鉴定腱细胞。结果:腱细胞生长汇合后呈平行致密排列并表现为接触抑制,传至16代仍保持稳定的遗传特征,原代腱细胞 Vimentin阳性而 Fn呈阴性反应。结论:培养的人胚腱细胞为研制新型人工肌腱提供了实验生物材料。

如何最大限度激发由腱细胞参与肌腱愈合是解决肌腱粘连的关键。体外培养是研究腱细胞生理生化特征的重要手段,国外早在70年代就用酶解离法分离培养了鸡胚腱细胞[1],但有关人腱细胞培养一直少有报告,我们成功地用贴块法培养了人胚腱细胞,并观察了其生长特征。

1 材料与方法

1.1 原代细胞培养

无菌条件下切断引产胎儿鞘内屈指肌腱,将其从鞘内快速抽出,D-Hanks液漂洗3次,0.25%胰蛋白酶+0.1%胶原酶混合消化整段肌腱40 min,D-Hanks液再次漂洗后,眼科剪将肌腱段剪至1 mm^3大小碎块,用吸管将腱块均匀接种于培养瓶,行贴块培养,培养条件为5% CO_2、95%空气、饱合湿度、37℃。培养基用 DMEM。

1.2 细胞传代培养

原代细胞生长融合成单层后,进行传代[2]。

1.3 生长曲线及分裂指数曲线绘制

取第3代细胞,按鄂征[2]方法绘制细胞生长曲线及分裂指数曲线。

1.4 细胞遗传学检测

取原代、7代及16代细胞,按鄂征[2]方法检测染色体众数。

1.5 细胞免疫组化染色

取长有原代腱细胞的小玻片,进行 Vimentin和 Fn免疫组化染色(ABC法)。

1.6 细胞形态学观察

倒置显微镜下观察细胞生长及形态学特征,透射电镜观察细胞超微结构。

2 结果

2.1 原代细胞培养

组织块置入第4天,倒置镜下见,其周边即有腱细胞呈放射状迁移萌出,方向与组织块边缘垂直,常很快脱离腱块,向远处

* 康庆林,男,28岁,主治医师,硕士,现在解放军第107医院骨科 烟台,264002

** 解放军第256医院骨科 正定,050800

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