

急性放射性分泌性中耳炎新西兰兔模型的建立及研究

张志钢¹, 陈洽鑫¹, 毛永林², 郑亿庆¹, 刘翔¹

(中山大学附属第二医院 1. 耳鼻咽喉—头颈外科, 2. 放疗科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】建立急性放射性分泌性中耳炎的新西兰兔动物模型,并观察不同辐射剂量、方式对中耳的影响。【方法】72 只健康的新西兰兔随机分成 4 组(每组 18 只),包括对照组(A 组)和 3 个实验组 B、C、D。B 组施加辐射剂量为 30 Gy/次 × 1 次, C 组为 10 Gy/次 × 3 次, D 组为 10 Gy/次 × 6 次。在照射前及照射后第 1 天, 第 1、2、4、8、12 周分别行耳内镜、中耳 CT、声阻抗检查,并在放疗后的每个观察时间点处死各个组的 3 只兔子,取其鼻咽黏膜、听泡行组织学检查。【结果】初步建立了急性放射性分泌性中耳炎的新西兰兔动物模型。【结论】利用新西兰兔建立放射性分泌性中耳炎的动物模型是可行的,但单次大剂量的电离辐射是成功建模的关键。

关键词: 辐射; 分泌性中耳炎; 动物模型

中图分类号: R76 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)05-0697-04

Animal Model of Radiological Secretory Otitis Media

ZHANG Zhi-gang¹, CHEN Qia-xin¹, MAO Yong-lin², ZHENG Yi-qing¹, LIU Xiang¹

(1. Department of Otolaryngology, 2. Department of Radiation Oncology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To establish a model of radiological secretory otitis media using New Zealand rabbits, and to observe the results of different radiation dosages and modalities. 【Methods】Seventy-two healthy New Zealand rabbits were randomly divided into four groups (18 for each), including one control group named group A, and three experimental groups named group B, C and D. Group B was administered with a radiation dose of 30 Gy per for once, while group C with 10 Gy per for three times and group D with 10 Gy per for six times. Before given the radiation and on the 1st day, 1st week, 2nd week, 4th week, 8th week and 12th week after, endoscopy was carried out respectively as well as CT, auditory impedance test. Meanwhile, 3 rabbits each group for each time were sacrificed and specimens of bullae and mucous membrane of nasopharynx were collected for histological examination. 【Results】Preliminary success was gained in the establishment of a animal model of secretory otitis media using New Zealand rabbits. 【Conclusions】Using New Zealand rabbits for establishing a model of radiological secretory otitis media is viable, and a large radiation dose for a single time is the key point.

Key word: radiation; secretory otitis media; animal model

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(5):697-700; 705]

放射治疗是鼻咽癌的首选治疗方法,放疗后常有腮腺、脑干、视神经等器官组织的放射性并发症见报道,而中耳功能上的改变较少受到关注^[1]。事实上,辐射引起分泌性中耳炎(secretory otitis media, SOM)是非常常见的,可严重降低患者的生存质量,且持续时间长,治疗困难。为了深入研

究其发病机制及探讨有效的防治方法,建立一个好的放射性分泌性中耳炎的动物模型是有必要的。目前的相关报道都局限于鼠类模型的研究中^[2],本实验尝试采用新西兰兔为实验动物,因其具有一定的优势,如对电离辐射及麻药的耐受力强,且更加接近人体结构,可模拟鼻咽癌放射治疗

收稿日期: 2010-04-26

基金项目: 广东省自然科学基金(7001684)

作者简介: 张志钢,副教授, E-mail: zhangzz0369@126.com

的方法建立一个合适的动物模型,并经此探讨不同辐射剂量、方式对中耳的影响,有助于理解急性放射性分泌性中耳炎的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 选择健康新西兰大白兔(雌雄不限)(由广东省动物实验中心提供——粤监证字:2008D006)72只,入选条件:体质量2.3($S = 0.2$) kg;耳内镜检查外耳道皮肤无红肿,鼓膜完整,无鼓室积液征;鼓室导抗图为A型曲线图;中耳CT提示正常。随机分为4组,A组为实验对照组,其余3组为实验组,即B、C、D组。参照文献[3-4]照射次数,同时模拟鼻咽癌患者放射剂量,对各组施加辐射照射:A组未予照射;B组(30 Gy/次,1次);C组(10 Gy/次,3次);D组(10 Gy/次,6次)。

1.1.2 麻醉药品 将购自中山大学的德国产戊巴比妥钠配置成30 mL/L浓度。

1.1.3 CT参数 德国西门子,sensation 64,层厚0.6 mm,CTD 32.32 G,电压:120 kV,电流146 mA,Kernel:u75sharp++。

1.2 方法

1.2.1 辐射照射 用3%戊巴比妥钠将新西兰兔成功麻醉后,按文献[3-4]照射方法,俯卧位照射,照射野10 cm × 15 cm,源皮距60 cm,剂量深度2.5 cm。照射中心位于双中耳之间,表面加盖一厚约1 cm的湿毛巾作为补偿膜,实验对照组也麻醉后予以假照射。

1.2.2 动物标本制作及检测指标 在施加辐射前及辐射达到总剂量后的第1天及第1、2、4、8、12周均依次行声阻抗、中耳CT和耳内镜检查,观察外耳道、鼓膜、鼓室内的改变。同时在每个观察时间点上随机处死各组中的3只兔子,取鼻咽部黏膜组织(部位:咽鼓管咽口的上方2~3 mm处),再解剖游离出听泡,将取出组织浸泡在配置好的40 g/L多聚甲醛溶液中固定36 h(听泡必须预先钻孔注入多聚甲醛溶液)后,将后者在50 mL/L硝酸溶液中脱钙24 h,取出在听泡后经鼓岬垂直切开,酒精脱酸、脱水,常规石蜡包埋切片,HE染色观察鼻咽部、听泡内的组织变化。

2 结果

2.1 中耳CT检查结果

施加辐射照射后各时间点分别做中耳CT检查,可见A、C、D组均未出现异常表现(图1a、c);而B组则在第8周时有3只兔子单侧鼓室内出现积液征(图1b)。

2.2 耳内镜检查结果

施加辐射照射前健康兔外耳道无充血、肿胀,鼓膜形态正常,无充血或光锥改变(图2a)。B组照射后第8周时出现中耳积液,耳内镜下见外耳道皮肤充血、肿胀,鼓膜增厚,光锥缩短、分散(图2b),与其CT结果一致。C组照射后8周时无中耳炎迹象(图2c)。D组照射后8周时外耳道及鼓膜明显肿胀(图2d)。

2.3 声阻抗检查结果

鼓室导抗图测试图型按Liden/Jerger分类法,正常兔子麻醉状态下均为A型图或As型图,本文统称有峰型图。施加辐射照射前的导纳值、峰压值、耳道容积及梯度值范围分别为0.2~1.0 mL、-500~+950 Pa、1.89~2.55 mL和0~0.58。其中峰压值范围在-500~+500 Pa之间的占91.6%,平均水平为(-90 ± 150) Pa,具体分布见表1。施加辐射照射后,鼓室导抗图测试144耳中有45耳为C型鼓室曲线,其中最大的负压为-1 200 Pa,3耳为B型图,41耳为A型图,6耳因外耳道炎不能测鼓室导抗图。总体观察造模后的声纳值变大,峰压值均向负值方向变化,梯度值变化不大。

2.4 HE染色组织学检查结果

A组(对照组):鼻咽部黏膜被覆假复层纤毛柱状上皮,内有杯状细胞,固有层中混有混合腺体,腺体无增生(图3a)。鼓岬黏膜扁平上皮完整,黏膜下组织无水肿,无血管无张、纤维增生(图4a)。B组:切片中见鼻咽部假复层纤毛柱状上皮凌乱、脱落,杯状细胞增多(图3b)。鼓岬黏膜上皮完整,黏膜下组织水肿,毛细血管明显扩张,纤维组织增生(图4b)。C组:鼻咽部被覆假复层纤毛柱状上皮,杯状细胞和腺体无增生(图3c)。鼓岬黏膜上皮完整,黏膜下血管无扩张,无明显纤维增生及水肿(图4c)。D组:鼻咽部假复层纤毛柱状上皮尚完整,杯状细胞和腺体增生(图3d)。鼓岬黏膜上皮为扁平上皮,黏膜下血管稍扩张,纤维增生和水肿不明显(图4d)。

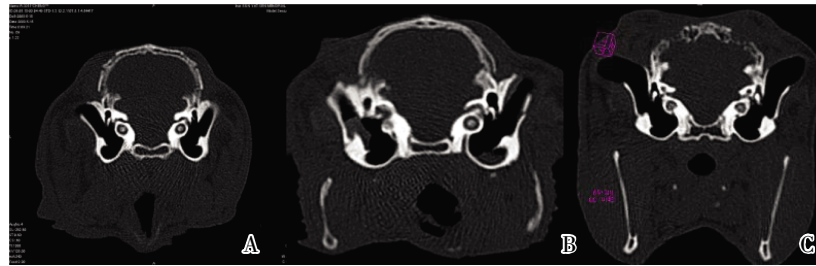


图 1 中耳 CT 检查结果

Fig.1 CT images of middle ear

A: Image of normal rabbit middle ears; B: Showing effusion in the tympanic cavity (Right); C: No inflammation sign or effusion of the middle ear mucosa was found in this group after radiation

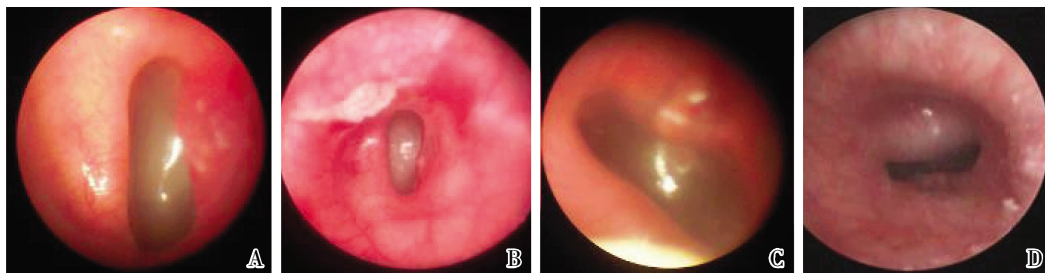


图 2 耳内镜检查结果

Fig.2 Appearance of endoscopy

A: Normal appearance of ear canal and tympanum; B: Edema of tympanum and ear canal skin, and shortening and scattering of the cone of light; C: No edema of tympanum or effusion was seen in this group after radiation; D: Showing edema of tympanum and ear canal skin

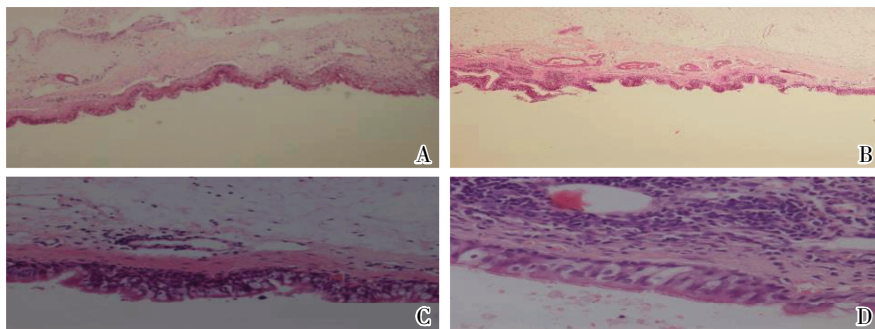


图 3 鼻咽黏膜组织 HE 染色光镜检查结果

Fig.3 HE staining under optical microscope of nasopharynx mucosa

A: Normal tissue of nasopharynx mucosa, $\times 40$; B: Showing vessel dilatation, $\times 40$; C, D: Infiltration of inflammatory cells, gland hyperplasy and absence of cilium were detected, $\times 100$

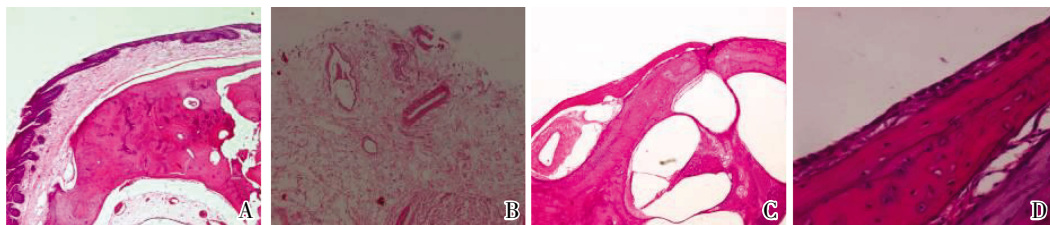


图 4 鼓室黏膜组织 HE 染色光镜检查结果

Fig.4 HE staining under optical microscope of tympanic mucosa

A: Normal tissue of tympanic mucosa, $\times 40$; B: Showing lesion of squamous epithelium, and hyperplasy of vessels and collagen fiber, $\times 200$; C: No lesion was found on the promontorium mucosa, $\times 40$; D: Vessel dilatation was seen, while hyperplasy and edema not visible, $\times 200$

表 1 施加辐射前鼓室导抗图峰压值分布

Table 1 Distribution of peak in tympanogram before radiation

Peak/Pa	Ears	Percentage/%
-500 ~ 10	48	33.3
0 ~ 490	84 ¹⁾	58.3
500 ~ 990	12	8.3

1) including a flat curve type B.

3 讨论

3.1 急性放射性分泌性中耳炎兔动物模型的建立

目前已知的动物模型:①放射性分泌性中耳炎的豚鼠模型——国外仅有 Ohashih 等^[2]和国内刘建平^[3]都利用豚鼠制造中耳黏膜的辐射研究模型;②多数分泌性中耳炎动物模型是经鼓膜给变应原建立的^[5];③Russell 和 Giles 则采用堵塞咽鼓管中段及向骨部走行处的方法建立了小鼠的分泌性中耳炎模型,可长期保持无菌的分泌性中耳炎。总的来说,目前的相关报道多局限于鼠类的研究中。本实验则尝试了另一种动物模型——新西兰兔,初步建立了放射性分泌性中耳炎的动物模型。在使用单次 30 Gy 大剂量的辐射照射后第 8 周时出现了 SOM,而分次小剂量(10 Gy/次,总剂量为 30 Gy 和 60 Gy 的 2 个组)的照射却不会造成放射后早期中耳黏膜的明显改变和鼓室积液,可见单次大剂量电离辐射是成功建模的关键。

合适实验动物的选择对于模型的成功建立也有重要的意义。选择新西兰兔作为动物模型有一定的优势:①对电离辐射的耐受力强。文献报道^[3]豚鼠电离辐射实验死亡率达 14.5%(35 只豚鼠死亡 5 只),且既往实验研究分次照射动物死亡率高,而本实验中兔子无论采用一次大剂量照射还是分次照射,均无 1 例死亡。②对麻药的耐受力很强。邢冶刚等^[4]认为保证动物生存的麻醉次数最多不宜超过 6 次,本实验为保证新西兰兔照射野的固定并配合耳内镜等检查,几乎每个项目都采用静脉麻醉,麻醉次数最多的可达 15 次,但并未有因麻醉致死,这说明选用兔子建模更有优势,也间接说明 3%戊巴比妥钠是相对安全的。③兔子中耳听泡大^[6],解剖结构与人类更接近,模拟效果更好。可见利用新西兰兔建立放射性分泌性中耳炎的动物模型是可行的。当然选用兔子作为研究对象也有局限性:①兔子外耳道深,一旦发生了外耳

道炎则难以痊愈,易并发化脓性中耳炎。②外耳道感觉敏感,为配合外耳道操作,本实验采用静脉麻醉使兔子达到一定的麻药深度,并加用丁卡因表面麻醉外耳道,要注意动作轻柔,忌损伤外耳道影响视野。③本实验也注意到兔子倾斜的鼓膜大部分被外耳道深部两侧的骨性突起遮盖(图 2A),对于要求观察鼓膜全貌变化的实验是有一定受限的。

3.2 急性放射性分泌性中耳炎发病机制的探讨

3.2.1 电离辐射剂量、方式与 SOM

本实验基本建立了 SOM 的兔动物模型,急性放射性分泌性中耳炎发生率约为 16%,这与有关文献的报道相一致^[7-8]。目前对于放射性分泌性中耳炎的发病机制尚不清楚,一般认为与感染、鼓室及咽鼓管黏膜损伤相关,其中与咽鼓管功能障碍关系密切。但并非任何辐射剂量或方式都会产生急性放射性分泌性中耳炎。我们的实验中 B 组的单次 30 Gy 的照射剂量在第 8 周时出现鼓室积液及鼓室、咽鼓管黏膜炎性改变,而分次小剂量照射则未出现中耳炎。有文献报道^[9]电离辐射累积总照射剂量越大发生 SOM 的机率越高,但本实验发现,在辐射总剂量达 60 Gy 的 C 组并没有出现 SOM,这说明累积总剂量并不是在电离辐射急性期内造成 SOM 的决定因素。由此可见,单次大剂量(30 Gy 或以上)辐射对新西兰兔中耳和鼻咽部黏膜的急性损伤是明显的,这和文献^[10]的研究结果一致。故临床上,在保证治疗剂量的前提下,分次小剂量照射具有明显的治疗优势,可减少 SOM 的发生机率。

3.2.2 中耳渗出与 SOM

本实验中 B 组产生鼓室积液时,听泡 HE 染色显示组织内腺体增生、血管扩张(图 3A-D)等黏膜渗出的病理学改变,而 A、C、D 组并没有非常明显的急性渗出改变,故认为照射后中耳黏膜的急性损伤、渗出是导致 SOM 的主要因素,与文献^[2]报道一致。

3.2.3 咽鼓管功能与 SOM

有文献^[11]认为照射后出现 SOM 和咽鼓管的功能密切相关,但本实验的声阻抗结果说明放疗急性期对咽鼓管的影响不明显,认为后期由于辐射照射的后效应,出现咽鼓管张闭相关肌肉的纤维化或是咽鼓管失神经支配,导致咽鼓管功能障碍,才加重、加快渗出的形成^[12]。故认为咽鼓管功能在急性放射性分泌性中耳炎不扮演主要角色,电离辐射后中耳黏膜的急性损伤、渗出才是主要环节。

(下转第 705 页 to page 705)