

快速旋转对豚鼠壶腹嵴毛细胞的损伤作用

王笃伦^① 陈增保 李朝晖 张 劼 朱新安

(中山医科大学人体解剖教研室; 广州, 510089)

摘 要 壶腹嵴在快速旋转运动中是否会受损伤, 检测毛细胞活力有助于其判断。用豚鼠 39 只, 8 只作对照, 11 只做脉冲噪声损伤实验, 另 20 只分成 4 组, 每组 5 只, 做旋转损伤实验, 其中 3 组分别以 500 r/min、1 000 r/min、1 400 r/min, 每次旋转 1 min, 等停稳后再重复实验, 如此 20 次。而其余 5 只做 1400 r/min 的 1 次旋转。全部完成后立即断头处死, 取出壶腹嵴, 分离毛细胞, 并用 1% 台盼蓝做毛细胞染色, 观察计数分析对毛细胞活力的影响。结果表明, 多次快速旋转实验组和脉冲噪声损伤组的蓝染毛细胞数及其比例明显高于对照组, 与噪声损伤组相似, 并且蓝染毛细胞 I 型和 II 型均有明显升高, I 型毛细胞升高更显著。推测毛细胞活力下降。提示, 多次快速旋转运动, 有可能会引起内耳壶腹嵴感觉上皮毛细胞活力损伤。一次性快速短时间旋转未立即出现明显的细胞活力损伤。快速多次和噪声损伤与长时期缓慢旋转运动损伤之间表现出一致性。

主题词 毛细胞/损伤; 旋转; 豚鼠

中图分类号 R 322.81; 331.3

内耳壶腹嵴是旋转变速运动的感受器。噪声可以损伤壶腹嵴, 尤其是对毛细胞的损伤^[1,2]。长时期缓慢旋转运动也会损伤壶腹嵴^[3]。那么, 快速旋转运动是否也会损伤壶腹嵴, 特别是其中感觉上皮的毛细胞? 国内外尚未见报道。随着航天航空技术的发展和体育娱乐设施的日新月异, 许多旋转乘工具的生理限速设计, 将成为亟待解决的问题。由于毛细胞损伤后活力会下降, 因而观察快速旋转运动对内耳壶腹嵴毛细胞活力的影响, 可以判断对壶腹嵴的损伤情况。本文应用无钙磷酸酶分离毛细胞和台盼蓝染色法^[4], 对经受不同速度快速旋转运动后的豚鼠壶腹嵴毛细胞活力, 进行了观察, 并与噪声损伤结果比较。

1 材料和方法

1.1 动物旋转实验及取材

选体重 200~250 g 的花色豚鼠 39 只(外耳道、鼓膜及耳廓反射阈均正常), 8 只做对照组, 11 只做噪声损伤实验。另外 20 只分成四组, 每组 5 只, 做快速旋转运动损伤实验。方法是, 将豚鼠装入转笼, 每笼 1 只, 分别以 500 r/min(A 组)、1 000 r/min(B 组)、1 400 r/min(C 组) 每次旋转 1 min, 等停稳后再

重复实验, 如此 20 次。而其中 5 只做 1 400 r/min 的 1 次旋转, 不重复(D 组)。全部完成后立即断头处死, 取出听泡, 放入 Hank 平衡液中, 在解剖镜下游离出壶腹嵴, 尽量除去感觉上皮周围的组织, 保留感觉上皮。

1.2 噪声损伤实验

豚鼠固定于语音室, 暴露于峰值 161 dSHPL 声源中, 每分钟 1 发, 共 10 发。声源由 D-86 电火花发生器发出, B&K2209 脉冲声级计的传感器置于外耳门 1 cm 处, 用峰值保持档测量声压级, 示波器显示脉宽为 0.5 ms, 结束后 5 min 断头处死, 解剖出壶腹嵴。

1.3 毛细胞分离及观察

将各个豚鼠的壶腹嵴感觉上皮移入盛有 300 μ L 的 0.125 g/L 胶原酶的凹载片上, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1 h, 吸管反复吹冲至细胞充分离散, 盖上多聚赖氨酸处理过的盖玻片, 停留 20 min 后换上 Hank 液, 置封闭的培养皿内待观察。用 Olympus 倒置相差显微镜放大 400 倍观察。被分离出的毛细胞按 I 型和 II 型分类, 标准是, 有明显长颈为 I 型, 否则为 II 型。

1.4 毛细胞染色与计算

1% 台盼蓝染色, 有损伤仍有活力细胞染成淡蓝, 无活力细胞染成深蓝, 计算每个壶腹嵴所有已分

^① 第一作者, 1944 年出生, 男, 讲师, 本校进修教师, 现在广东药学院工作。(510224)

离的毛细胞和受损毛细胞数量以及深、淡蓝染各型毛细胞占分离细胞总数的百分比。

2 结果

2.1 不同转速结果比较

不同速度快速旋转运动组和对照组豚鼠, 平均每个壶腹峭分离毛细胞及其台盼蓝染色, 蓝染细胞计数及占分离细胞数的百分比见表1。

表1 不同转速分离毛细胞及其台盼蓝染色细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, 个)

	壶腹峭计数	分离细胞计数	淡蓝染细胞		深蓝染细胞		总蓝染细胞	
			计数	(%)	计数	(%)	计数	(%)
对照组	48	523±96	50±11	(9.6)	1±1	(0.2)	51±12	(9.8)
旋转A组	30	517±104	146±35	(28.2)	73±12	(14.1)	219±54	(42.4)
B组	30	521±98	194±30	(37.2)	91±20	(17.5)	275±78	(52.8)
C组	30	509±99	198±32	(38.9)	117±24	(23.0)	317±91	(62.3)
D组	30	511±102	102±27	(20.0)	17±9	(2.0)	119±33	(23.3)

A、B、C组与对照组的淡蓝染、深蓝染及总蓝染细胞数相比, P 皆 <0.01 , 与D组的深蓝染总蓝染细胞数比, $P < 0.01$; B、C组与D组的淡蓝染细胞数比较, $P < 0.05$

2.2 旋转与噪声损伤比较

每个壶腹峭分离毛细胞, 台盼蓝染色, 蓝染细胞数及占分离细胞数的百分比见表2。

多次快速旋转组与噪声损伤组和对照组, 平均

表2 旋转与噪声损伤分离毛细胞及其台盼蓝染色细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, 个)

	壶腹峭数	分离细胞数	淡蓝染细胞		深蓝染细胞		总蓝染细胞	
			计数	(%)	计数	(%)	计数	(%)
ABC组	90	514±101	179±34	(34.8)	90±24	(17.5)	269±72	(52.3)
噪声组	66	497±96	192±36	(38.0)	114±28	(23.2)	306±83	(60.8)
对照组	48	523±96	50±11	(9.6)	1±1	(0.2)	51±12	(9.8)
D组	30	511±102	65±12	(12.7)	10±2	(2.0)	75±13	(14.7)

ABC组与噪声组的淡蓝染、深蓝染和总蓝染细胞数与D组及对照组比较, P 皆 <0.01

2.3 两实验组细胞分型比较

多次快速旋转组和噪声损伤组, 平均每个壶腹峭分离毛细胞及其台盼蓝染色中, I型和II型细胞蓝染细胞数及其所占分离细胞数的百分比见表3。

旋转组与噪声组的I型和II型各蓝染细胞数均无显著性差异, 但I/II的比值均大于对照组的59/41, 深蓝染细胞尤为明显。说明蓝染细胞数的增加以I型更为明显。

表3 旋转与噪声损伤两型毛细胞台盼蓝染色细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, 个)

	多次快速旋转组				噪声损伤组			
	淡蓝染细胞		深蓝染细胞		淡蓝染细胞		深蓝染细胞	
	计数	%	计数	%	计数	%	计数	%
I型细胞	137±25	(26.7)	76±13	(14.8)	142±28	(28.6)	91±11	(18.3)
II型细胞	42±10	(8.2)	14±7	(2.7)	50±13	(10.1)	23±8	(4.6)
比例	77/23		84/16		74/26		80/20	

3 讨 论

3.1 快速旋转运动对内耳壶腹嵴毛细胞活力的损伤

快速旋转运动是否会损伤壶腹嵴,特别是感觉上皮的毛细胞?考虑到细胞损伤后活力会降低,应该检测毛细胞的活力。检测毛细胞活力的方法有多种,Housley^[5]采用毛细胞分离,锥蓝染色法观察毛细胞活力,发现活力好的不着色,受损而有活力的着淡蓝色,无活力的着深蓝色。莫玲燕^[4]等人用无钙镁胶原酶分离毛细胞,台盼蓝染色的方法,使壶腹嵴感觉上皮分离毛细胞更容易,染色效果与锥蓝一致。我们采用后一方法,对经历不同速度的连续多次快速旋转运动豚鼠壶腹嵴毛细胞,进行了分离染色,观察计数,并与脉冲噪声引起的壶腹嵴毛细胞损伤结果做了比较。发现多次快速旋转运动和脉冲噪声两者结果之间很相似,无论是淡蓝染毛细胞数、深蓝染毛细胞数和蓝染毛细胞总数都未见明显差别,而它们与对照组比较,上述诸项均有非常显著的增加。推测,多次快速旋转运动可以象脉冲噪声一样,也能损伤壶腹嵴毛细胞的活力。但500~1400 r/min的3种转速的多次快速旋转之间没有发现有统计学意义的差别。这三者却都与单次旋转组之间的深蓝染毛细胞数和蓝染毛细胞总数都有显著差别。较高速的多次旋转组与其单次组的淡蓝染细胞数,也有显著的差别($P < 0.05$)。单次组与对照组所有诸项均无明显差别($P < 0.05$)。这可能与多次快速旋转运动的严重损伤立即表现有关。而单次快速旋转运动的损伤,可能还没有完全明显地立即表现出来,但此时活力受损伤的毛细胞数已开始明显增加,而丧失活力的细胞增加还不明显。从而,也说明毛细胞活力的损伤程度,与快速旋转实验重复的次数有关。但重复次数掩盖了速度的影响。因此,应当进一步反复调整实验的重复次数和旋转速度,探讨最低损伤条件。这项研究的继续,将为快速旋转乘工具的生理限速设计及其人员培训和安全防护等有直接指导价值。

3.2 I型和II型毛细胞损伤的比例

A、B、C快速旋转运动损伤组及脉冲噪声损伤

组,淡蓝染毛细胞数、深蓝染毛细胞数和蓝染毛细胞总数均明显高于对照组,被蓝染的I、II型毛细胞比值,前者都明显大于D组和对照组。而对照组分离细胞I、II型的比值59/41,与有关资料的60/40^[6]十分吻合。旋转损伤组与脉冲噪声组之间无明显差别。说明多次快速旋转运动和脉冲噪声损伤的毛细胞,I型和II型毛细胞都明显损伤,以I型毛细胞损伤更为突出。而且,多次旋转损伤组和噪声损伤组结果极为相似。这里提示,上述两种损伤作用,可能存在着某种联系,待进一步研究。

3.3 噪声损伤、长时期缓慢旋转损伤和快速多次旋转损伤之间的一致性

Hozawa^{al}^[3]用扫描电镜观察到,长时期缓慢旋转运动对豚鼠壶腹嵴中心区可造成显著损害。李琳^[2]也用扫描电镜观察到,脉冲噪声引起的前庭损伤,主要是壶腹嵴损伤,壶腹嵴中央区毛细胞的纤毛弯曲、紊乱、破坏、消失。而多次快速旋转运动,对毛细胞活力的损伤与噪声损伤的结果较为相似。而长时期缓慢旋转运动损伤和快速旋转运动损伤都是旋转运动损伤。这样看来,三者损伤之间似乎存在着某种一致性。

参 考 文 献

- 1 王丽雯,于阿丽,周安姣,等.爆震性前庭震荡的实验研究.解放军医学杂志,1984,9(1):37
- 2 李琳,刘 铤,秦廷权,等.强噪声对豚鼠内耳平衡系统的影响.中华耳鼻咽喉科杂志,1990,25(5):286
- 3 Hozawa J, Kimura N, Kamata S, *et al.* Influence of long-term repetitive rotatostimulations on lateral semicircular canals. Acta Otolaryngol Suppl Stockh, 1984, 406:245
- 4 莫玲燕,苏鸿禧,刘 铤,等.豚鼠毛细胞分离法.中华耳鼻咽喉科杂志,1993,28(3):131
- 5 Housley GD, Amano H, Devau G. Electrophysiological properties and morphology of hair cells isolated from the semicircular canal of frog. Hear Res, 1987, 18:259
- 6 Ohtani M, Yamashita T, Amano H, *et al.* Isolation of and calcium mobilization in vestibular hair cells of the guinea pig. O R L J Otorhino laryngol Relat Spec, 1990, 53:82

(1996-10-10 收稿 1997-03-27 修回)

INJURIES INFLICTED BY FAST ROTATION ON THE HAIR CELLS OF AMPULLAR CRISTA OF INNER EAR OF GUINEA PIGS

Wang Dulun Chen Zengbao Li Zhaohui Zhang Jie Zhu Xinan

(Department of Anatomy, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Measuring the vitality of hair cells on the ampulla crista may be helpful in estimating whether there is injury to the ampulla crista. Forty nine guinea pigs(GP) were used for experimental study. Eight of them used as normal control, 11 for pulse intense sound injury, 20 for fast rotation injury. The 20 for fast rotation injury were divided into 4 groups 5 in each group. GP in 3 groups were submitted to fast rotation under the speed of 500, 1000 and 1 400 r/min respectively. They were rotated 20 times, 1 min for each time under the said speed. GP in another group only rotated once under 1 400 r/min. All animals were killed after the experiment by decapitation. The ampulla cristae were taken and hair cells isolated and stained by 1% trypan blue. The vital hair cells stained light blue while the nonvital cells stained dark blue. Under 400x inverted microscope the percentage of these 2 kinds of cells were calculated. The results indicated that the percentage of nonvital cells far exceeded normal group in animals injured by sound as well as high speed rotation. Both type I and type II hair cells showed increase of nonvital percentage. Type I exceeded type II. Unlike the repeated high speed rotation, rotation for one time did not show marked harmful effect.

Subject headings hair cells; injuries; rotation; guinea pigs

·简讯·

《原位肝移植治疗终末期肝病的实验及临床研究》已通过鉴定

中山医科大学附属第一医院黄洁夫教授等的《原位肝移植治疗终末期肝病的实验及临床研究》成果于日前通过了由卫生部、省科委联合组织的鉴定。

在黄洁夫教授带领下,该课题组获得了国家自然科学基金、卫生部科研基金、国家教委博士点基金、广东省科委重点攻关项目等8项基金的资助。从1988年开始了长达5年的动物实验,对肝移植的各个环节进行深入的研究。在动物实验中掌握了体外静脉转流下原位肝移植的方法、体外静脉转流下受体血流动力学、血生化变化的特点及处理方法;探讨了背驮式肝移植、减体积肝移植以及原位节段性辅助性肝移植的手术方法;成功地建立了大鼠肝移植胆汁外引流动物模型,成为研究肝移植术后胆汁细胞学、胆汁成分变化较理想的动物模型;并且研究了UW液灌注及保存下供肝缺血的最大耐受时限,以及供肝的保存时间,为临床应用提供了参考依据;研究者利用RT-PCR技术检测移植肝及胆汁中细胞因子基因表达的特征,确定了胆汁IFN- γ mRNA对排斥反应的诊断价值。1993年9月该课题组肝移植正式步入临床应用阶段,建立了适合中国国情的快速尸体原位灌注多器官联合切除方法,临床应用已有6例,取得了满意的效果。还先后成功地开展了小儿肝移植1例、背驮式肝移植1例、减体积肝移植1例、急诊肝移植1例及肝肾联合移植1例。还建立了HLA配型、CSA监测以及移植肝、胆汁中细胞因子基因表达的检测方法。

以著名外科专家夏穗生教授为主任委员的鉴定专家组等7人及吴孟超院士写来的书面鉴定书中,一致认为中山医科大学是全国做肝移植手术最多的单位,而且该成果总结了许多宝贵经验和教训,对我国开展肝移植研究起到了很重要的促进作用,并认为该成果学术水平高,是90年代以来处于国内领先水平,有部分技术达国际先进水平。

(冯世容)