

心脑血管事件发生率,因而小剂量他汀联合依折麦布可作为有效降脂的药物组合^[14]。

Meta 分析只是对前人研究的一种汇总并进行量化分析,其客观性和准确度较大的受文献质量高低的限制,本研究共纳入 6 篇文献,其研究质量高低不等,可能存在选择性偏倚、实施偏倚和测量偏倚;本研究尚有不足之处:①纳入研究没有列出两组试验的不良反应发生率;②纳入研究患者基本为老年人,但其成员组成男女性别比例有一定的差别,可能会影响实验结果;③纳入研究中治疗时间为 4 周以上,相对治疗时间较短,可能不会全面得出治疗效果。

参考文献

- Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary arterydisease[J]. Eur Heart J,1998, 19(Suppl A): A53 - A61
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, *et al.* Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia[J]. N Engl J Med,1995, 333 (20): 1301 - 1307
- Long - Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) study group. Prevention of cardiovascularevents and deaths with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels[J]. N Engl J Med,1998, 339(19): 1349 - 1357
- Ge L, Wang J, Qi W, *et al.* The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol - induced internalization of NPC1L1[J]. Cell Metab,2008,7(6):508 - 519
- Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, *et al.* Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines[J]. Circulation,2004,110(2): 227 - 239
- Yamazaki D, Ishida M, Watanabe H, *et al.* Comparison of anti - inflammatory effects and high - density lipoprotein cholesterol levels between therapy with quadruple - dose rosuvastatin and rosuvastatin combined with ezetimibe[J]. Lipids Health Dis,2013,12:9
- Moutzouri E, Liberopoulos E, Mikhailidis DP, *et al.* Comparison of the effects of simvastatin vs. rosuvastatin vs. simvastatin/ezetimibe on parameters of insulin resistance[J]. Int J Clin Pract,2011,65(11): 1141 - 1148
- Moutzouri E, Tellis CC, Rousouli K, *et al.* Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll - like receptor expression and lipopolysaccharide - induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic patients[J]. Atherosclerosis, 2012, 225 (2): 381 - 387
- Liberopoulos EN, Makariou SE, Moutzouri E, *et al.* Effect of simvastatin/ezetimibe 10/10mg versus simvastatin 40mg on serum vitamin D levels[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther,2013,18(3):229 - 233
- Piorkowski M, Fischer S, Stellbaum C, *et al.* Treatment with ezetimibe plus low - dose atorvastatin compared with higher - dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol - lowering enough to inhibit platelets [J]. J Am Coll Cardiol,2007,49(10):1035 - 1042
- Liu PY, Liu YW, Lin LJ, *et al.* Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho - associated coiled - coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation[J]. Circulation,2009,119(1):131 - 138
- Cho YE, Moon PG, Lee JE, *et al.* Integrative analysis of proteomic and transcriptomic data for identification of pathways related to simvastatin - induced hepatotoxicity[J]. Proteomics,2013, 13(8): 1257 - 1275
- Labonte ED, Camarota LM, Rojas JC, *et al.* Reduced absorption of saturated fatty acids and resistance to diet - induced obesity and diabetes by ezetimibetreated and Npc1^{-/-} mice [J]. Am J Physiol, 2008,295(4):G776 - G783
- LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D, *et al.* The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association[J]. Circulation,1990,81(5):1721 - 1733 (收稿日期:2014 - 04 - 20)
(修回日期:2014 - 05 - 26)

耳蜗听神经亚临床损伤模型的制备

毛小慧 李 聪 顾 健 敖华飞 孔德秋

摘 要 **目的** 采用庆大霉素联合呋塞米建立小鼠耳蜗听神经亚临床损伤模型。**方法** 5~6 周的 C57/BL6 小鼠 32 只,随机平均分成 4 组,分别取生理盐水(A 组)、20mg/kg(B 组)、30mg/kg(C 组)、40mg/kg(D 组)不同浓度的硫酸庆大霉素注射液液体皮下注射,后分别 40mg/kg 速尿腹腔注射。用药后 7、14 天测定各组小鼠的 ABR 值、行耳蜗组织切片 HE 染色及耳蜗基膜切片。**结果** A、B、C 3 组听性脑干反应(ABR)值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 D 组 ABR 值的升高存在明显差异($P <$

作者单位:201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院耳鼻咽喉 - 头颈外科

通讯作者:敖华飞,电子信箱:david5882004@126.com

0.05)。耳蜗组织切片 HE 染色显示:相对于 A 组,B 未见明显受损的螺旋神经元细胞,C 组开始出现受损的螺旋神经元细胞,D 组更多。基膜硝酸银染色铺片显示:A、B、C 3 组均可见内、外毛细胞及其表面的纤毛;而 D 组未见明显的内、外毛细胞,纤毛也缺失。**结论** 庆大霉素引起小鼠耳蜗听神经亚临床损伤模型的最小剂量为 30mg/kg。

关键词 耳蜗 损伤模型 HE 染色 银染色法

[中图分类号] R764 [文献标识码] A

Preparation of Subclinical Injury Model in Cochlear Auditory Nerve. Mao Xiaohui, Li Cong, Gu Jian, Ao Huafei, Kong Deqiu. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The Third People's Hospital, Shanghaijiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Abstract Objective To establish the subclinical injury model of Cochlear auditory nerve in mice using gentamicin joint furosemide. **Methods** Postnatal 5-6 weeks C57/BL6 mice were randomly divided into four groups: saline (A group), 20mg/kg (B group), 30mg/kg (C group), 40mg/kg (D group) with different concentrations of gentamicin sulfate solution subcutaneous, after intraperitoneal injection of 40mg/kg furosemide respectively. After 7days, 14days of treatment, each group of mice was measured ABR values, cochlear HE staining, and Cochlear surface. **Results** ABR alues of A,B,C three groups were not significantly different ($P > 0.05$), while those of D group were significantly different ($P < 0.05$). Cochlear HE staining showed that compared with: A group, rats in B group was not obvious in the damaged spiral neurons, C group began to have the damaged spiral neurons, and D group were more. Silver nitrate staining of Cochlear surface showed that A,B,C rats in three groups were seen the inner and outer hair cells, surface cilia; while D group was not significant the inner and outer hair cells, surface cilia missing. **Conclusion** Preparation of model is successful. The subclinical injury of cochlear caused by gentamicin does of is 30mg/kg.

Key words Cochlear; Injury Model; Hematoxylin and eosin; Silver nitrate staining

耳蜗听神经包括传入和传出两部分,噪声、耳毒性药物和衰老是引起感音神经性聋和耳鸣等听觉系统疾病常见因素,听觉感受器毛细胞及耳蜗传入和传出纤维是常见的病变部位。在较强损伤因素作用下,毛细胞损伤和丢失可以导致听觉阈值提高,而较低强度的损伤因素可以在不改变听觉敏感度的情况下损伤耳蜗神经支配,引起以言语识别障碍为主要特征的功能性损失。本实验拟通过不同剂量庆大霉素结合速尿制备小鼠耳毒性耳蜗损伤模型,通过听性脑干反应(ABR)检测小鼠听觉敏感度,耳蜗组织切片 HE 染色、耳蜗基膜铺片明确螺旋神经节、毛细胞损伤情况,从而确定引起亚临床耳蜗损伤的庆大霉素剂量。

材料与方 法

1. 材料:(1)实验试剂:硫酸庆大霉素注射液(上海中西制药有限公司),注射用呋塞米(海南皇隆制药股份有限公司),多聚甲醛(北京北化恒信生物技术有限公司),EDTA(乙二胺四乙酸,石家庄杰克化工有限公司),硝酸银(AgNO_3 ,南京化学试剂有限公司)。(2)实验动物:清洁级 C57/BL6 雄性小鼠(5~6 周)32 只,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)2012-0002],合格证编号为 2007000549975。耳郭反射灵敏,动物均无强噪声暴露及耳毒性药物使用史。

2. 方法:(1)模型制备与分组:所选的 C57/BL6 小鼠在清洁安静的环境下适应性喂养 1 周,随后随机将 C57/BL6 小鼠平均分为 4 组,分别取生理盐水(A 组)、20mg/kg(B 组)、30mg/kg(C 组)、40mg/kg(D 组)不同浓度的硫酸庆大霉素注

射液溶液皮下注射,40min 后分别予 40mg/kg 速尿腹腔注射。(2)观察指标用药后 7、14 天对每组小鼠测定 ABR 值:动物经腹腔注射戊巴比妥(80mg/kg)麻醉,在声电屏蔽室内接受功能检测,测试中由恒温加热垫维持体温。刺激信号的产生和诱导电位记录均由美国 TDT(System3)听觉诱发电位工作站完成。刺激声采用短纯音,刺激频率为 21.37 次/秒,范围为(8~32)kHz,采集放大倍数为 100k,采集宽度为(0.3~3.0)kHz,叠加次数为 500 次,测试从 90dB SPL 开始,以 III 波存在的最低声强为反应阈值。(3)取材脱钙:用药后第 15 天将每组小鼠迅速断头,即刻经颅骨背侧快速取出双侧听泡。止血钳咬开听泡,暴露耳蜗,修建掉耳蜗周围多余的骨壁,在解剖显微镜下放大 10 倍,用 1ml 注射器针头挑破前庭膜及盖膜,浸泡在 4% 多聚甲醛液中,4℃ 过夜;后将其用 10% EDTA 脱钙,每 2 天更换 1 次液体,约 1 周时间,脱钙完全。(4)耳蜗组织切片:HE 染色脱钙完全后,每组随机取 4 个耳蜗组织行常规石蜡包埋,切片均为与蜗轴平行的水平做以 4 μm 层厚切片,行常规 HE 染色。(5)基膜硝酸银染色铺片:灌注染色取剩余脱钙完全的耳蜗组织,抽取 0.5% 硝酸银溶液,经蜗顶小孔缓慢灌注,每只耳蜗约灌注 2~3ml,然后抽取蒸馏水同法灌注以冲洗耳蜗,一般 2 次即可。固定还原用 1ml 注射器抽取 10% 中性甲醛固定液同法灌注耳蜗 3 次,再放入 10% 中性甲醛固定液,将标本保留在 4℃ 冰箱内继续固定还原 4h。曝光显色将固定还原后的耳蜗标本移入盛有蒸馏水的玻璃皿中,在解剖显微镜下放大 10 倍,用小尖镊从开放的圆窗进入鼓阶,沿鼓阶走向撬开基底回的蜗壳,然后顺势向上以“脱帽”方式,将蜗壳连同螺旋韧带轻轻取下,保留完整的基膜附着于蜗

轴的骨螺旋板边缘。用小剥离子于底回的下方将蜗轴切断后,小尖镊细心夹起并放入盛有 10% 中性甲醛固定液的透明离心管中,置放于 100W 的白炽灯下,距离光源 10cm,10min 后左右标本即可变为棕褐色。基膜剥离将棕褐色蜗轴转入盛有蒸馏水的玻璃器皿内后,用尖镊固定蜗轴,以 1ml 注射器针头从底回向顶回逐步剥离,即可快速取下完整的基膜,用针头和小尖镊轻轻地分离并撕下前庭膜与盖膜。铺片小剥离子将耳蜗基膜按螺旋转数切成 4 段后逐一移放到清洁载玻片上,用滤纸吸干,在上面点 1 滴纯甘油。然后在解剖显微镜下检查、调整标本,正面朝上,铺放平整,放上盖玻片,周围用中性树脂封固,在高倍显微镜下观察并摄片。

结 果

1. ABR 阈值:模型制备后各组 ABR 阈值如表 1、表 2 所示。模型制备后第 7 天在 8k、16k 下 A、B、C 3 组各组之间 ABR 阈值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 D 组与 A、B、C 3 组之间的 ABR 比较明显升高,与 A、B、C 3 组均存在统计学差异($P < 0.05$)。模型制备后第 14 天再次观察各组 ABR 阈值,结果同前,A、B、C 3 组在 8k、16k 下 ABR 阈值均无统计学差异,而 D 组 ABR 阈值的升高与 A、B、C 3 组差异均有统计学意义。

表 1 7 天各组小鼠的 ABR 阈值(dB SPL)

分组	8k	16k
A 组	28.438 ± 3.52	25.938 ± 2.02
B 组	29.063 ± 3.75	26.250 ± 2.24
C 组	30.313 ± 3.86	27.500 ± 2.58
D 组	34.375 ± 3.59	30.938 ± 3.75

表 2 14 天各组小鼠 ABR 阈值(dB SPL)

分组	8k	16k
A 组	28.125 ± 3.59	25.625 ± 2.50
B 组	29.375 ± 3.59	26.250 ± 2.89
C 组	30.000 ± 3.65	27.188 ± 2.56
D 组	34.375 ± 4.03	30.625 ± 3.59

2. HE 染色切片:耳蜗组织切片 HE 染色观察形态学变化如图 1 所示。A 组为正常耳蜗组织切片,螺旋神经节区域可见大量的圆且深的神经元细胞,胞体较大、圆形。B 组和 A 组差别不大,未见明显的受损的螺旋神经元细胞。从 C 组螺旋神经区域可见神经元细胞数量开始减少,胞核较小,开始出现多处区域内无细胞存在,而 D 组更加明显,即随着庆大霉素的剂量的增加,螺旋神经节区域内的神经元细胞数量减少、胞核减小,区域内开始出现无细胞区。

3. 基膜硝酸银染色铺片:基膜硝酸银染色铺片结

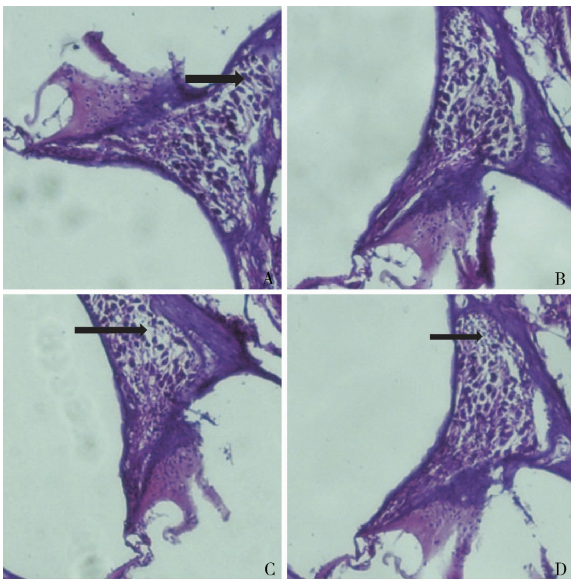


图 1 耳蜗组织切片 HE 染色(×10)

A. 生理盐水组,正常耳蜗组织,箭头示螺旋神经元;B. 20mg/kg 庆大霉素组,与 A 组差别不大;C. 30mg/kg 庆大霉素组;D. 40mg/kg 庆大霉素组,均可见受损的螺旋神经节,箭头所指为螺旋神经元,胞核减小,细胞密度减小

果如图 2 所示。A、B、C 3 组基膜铺片硝酸盐染色均可见内、外毛细胞及其表面的纤毛。D 组基膜铺片硝酸盐染色未见明显的内、外毛细胞,纤毛也缺失。

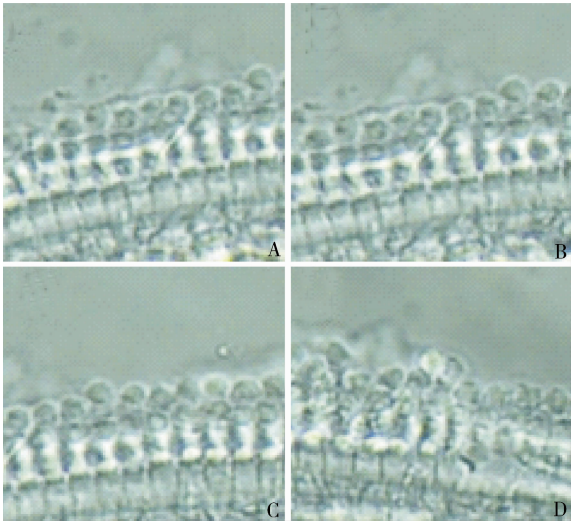


图 2 基膜硝酸银染色铺片(×10)

A ~ D 为 A ~ D 组

讨 论

噪音、耳毒性药物暴露和听觉衰老是引起感音神经性聋和耳鸣等听觉系统疾病常见因素。而听觉感受器毛细胞及耳蜗传入和传出纤维是常见的病变部位。在较强损伤因素作用下,毛细胞损伤和丢失可以

导致听觉阈值提高,即传统意义的听觉损失。如损伤因素强度较低,可以在不改变听觉敏感度的情况下只损伤耳蜗神经支配,造成亚临床耳蜗损伤^[1-3]。

耳蜗损伤引起两型传入和两型传出系统的退变将导致相应的听觉功能的改变。I 型螺旋神经节细胞与内毛细胞之间的突触或其树突退变,可能是听觉神经病的病理基础^[4-6]。而外毛细胞 II 型传入退变,可能导致对内毛细胞输入的反馈调节出现故障,引起听觉通路的超活性,可能与耳鸣症状有关^[7-9]。当毛细胞完整或仅散在丢失,传入纤维和神经节部分退变,听觉阈值可能正常,但影响噪声背景下的听觉辨别能力。周围传入和传出听觉神经纤维的退变还能导致脑干听觉环路的改变和听皮层的重组,使毛细胞和神经纤维完整的耳蜗区域在听皮层的代表区扩大,最终可能引起包括耳鸣、听觉过敏(对中等强度听觉刺激的耐受性降低)等听觉感知异常。

研究者用噪音制备了暂时性阈值提高的亚临床耳蜗模型,用来研究噪声引起的兴奋性增加对 I 型耳蜗传入神经的毒性作用。Wei 等^[10]用顺铂制备的模型外毛细胞(OHC)大量减少,蜗神经核细胞兴奋性增加。毒毛花苷 G 动物模型 CAP 阈值增加,OHC 和 II 型螺旋神经节细胞(SGNs)保持完整。大鼠圆窗注射 b-银环蛇毒,毛细胞基本完整,SGNs 大量丢失,同时 ABR 阈值显著提高。水杨酸钠体外实验证实可以特异性地引起听神经退变,动物实验小剂量单次给药出现可逆性的听力损失和耳鸣,长期高剂量给药表现为永久性听力损失和耳鸣,伴 SGNs 大量丢失^[11]。总之,这些耳蜗损伤模型,尤其是耳毒性模型,不是毛细胞和 SGNs 一起损伤,就是听力阈值明显提高,不能符合亚临床耳蜗损伤研究的要求。

笔者以庆大霉素联合速尿制备亚临床耳蜗损伤模型,明确耳毒性药物是否可以在不导致明显毛细胞损伤和听觉阈值提高的情况下损伤内耳神经支配,并确定庆大霉素致耳蜗亚临床损伤的剂量,为亚临床损伤一类疾病机制的进一步研究提供模型。结果显示:①ABR 阈值,生理盐水组、庆大霉素 20mg/kg 组、庆大霉素 30mg/kg 组的小鼠之间差异无统计学意义,而庆大霉素 40mg/kg 组的小鼠则显著性提高;②耳蜗组织切片 HE 染色,生理盐水组、庆大霉素 20mg/kg 组的小鼠均未见明显受损的螺旋神经元细胞,而庆大霉素 30mg/kg 组的小鼠开始出现受损的螺旋神经元细胞,庆大霉素 40mg/kg 组小鼠更加明显;③基膜硝酸银染色铺片,生理盐水组、庆大霉素 20mg/kg

组、庆大霉素 30mg/kg 组的小鼠均可见内、外毛细胞及其表面的纤毛,而庆大霉素 40mg/kg 组的小鼠未见明显的内、外毛细胞,同时纤毛也缺失。由此可以得出,耳毒性药物庆大霉素联合速尿可以在不导致明显毛细胞损伤和听觉阈值提高的情况下损伤内耳神经,模型基本制备成功,引起亚临床耳蜗损伤的庆大霉素剂量为 30mg/kg。

本实验仅初步测定了引起亚临床耳蜗损伤的庆大霉素剂量,主要停留在形态性上,还需要进一步对不同程度损伤耳蜗进行定量病理学评估,进而明确传入和传出系统的退变病理学评估与生理学诊断方法的一致性,使之成为亚临床损伤的研究模型。

参考文献

- 1 Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise - induced hearing loss [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(45): 14077 - 14085
- 2 Sone M, Schachern PA, Paparella MM. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity [J]. *Hear Res*, 1998, 115(1-2): 217 - 223
- 3 Hequembourg S, Liberman MC. Spiral ligament pathology: a major aspect of age - related cochlear degeneration in C57BL/6 mice [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2001, 2(2): 118 - 129
- 4 Palmgren B, Jin Z, Ma H, *et al.* Beta - Bungarotoxin application to the round window: an in vivo deafferentation model of inner ear [J]. *Hear Res*, 2010, 265(1-2): 70 - 76
- 5 Bao J, Lei D, Du Y, *et al.* Requirement of nicotinic acetylcholine receptor subunit beta2 in the maintenance of spiral ganglion neurons during aging [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(12): 3041 - 3045
- 6 Irvine DR, Rajan R, McDermott HJ. Injury - induced reorganization in adult auditory cortex and its perceptual consequences [J]. *Hear Res*, 2000, 147(1-2): 188 - 199
- 7 Huang LC, Thorne PR, Houseley GD, *et al.* Spatiotemporal definition of neurite outgrowth, refinement and retraction in the developing mouse cochlea [J]. *Development*, 134(16): 2925 - 2933
- 8 Kaltenbach JA, Rachel JD, Mathog TA, *et al.* Cisplatin - induced hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus and its relation to outer hair cell loss: relevance to tinnitus [J]. *J Neurophysiol*, 2002, 88(2): 699 - 714
- 9 Schmiedt RA, Okamura H - O, Lang H, *et al.* Ouabain application to the round window of the gerbil cochlea: a model of auditory neuropathy and apoptosis [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2002, 3(3): 223 - 233
- 10 Wei L, Ding D, Salvi R. Salicylate - induced degeneration of cochlea spiral ganglion neurons - apoptosis signaling [J]. *Neuroscience*, 2010, 168(1): 288 - 299
- 11 Duan M, Agerman K, Emfors P, *et al.* Complementary roles of neurotrophin 3 and a N - methyl - D - aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside - induced ototoxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 7597 - 7602

(收稿日期: 2014 - 05 - 17)

(修回日期: 2014 - 05 - 26)