

· 论 著 ·

快速老化小鼠耳蜗传出神经的增龄性变化*

刘强和, 黄鑫, 罗香林, 耿宛平, 刘芳贤

(桂林医学院附属医院耳鼻咽喉-头颈外科, 广西 桂林 541001)

摘要:目的 研究快速老化小鼠耳蜗传出神经的增龄性变化。方法 选择 1、3、5、7、9 月龄的快速老化小鼠亚系 1(SAMP 1)作为实验组,而同龄抗快速老化小鼠亚系 1(SAMR 1)作为 SAMP 系的正常对照组,观察其耳蜗传出神经末梢的增龄性变化。结果 第 7、9 月龄 SAMP 1 小鼠耳蜗传出神经纤维及末梢较同龄 SAMR 1 小鼠明显缺失($P < 0.05$),并伴有传出神经纤维突触结构损伤。结论 SAMP 1 小鼠随月龄增长耳蜗传出神经出现增龄性损伤。

关键词:快速老化小鼠;耳蜗传出神经;突触

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.006

中图分类号:R764.431

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)20-2713-02

Age-related morphologic changes of cochlear efferent nerve in the senescence accelerated mouse*

LIU Qiang-he, HUANG Xin, LUO Xiang-lin, et al.

(Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective The purpose of this study was to determine the age-related morphologic changes of cochlear efferent nerve in the senescence accelerated mouse. **Methods** The morphologic changes of cochlear efferent nerve terminals were studied in the senescence accelerated mouse/prone 1(SAMP 1) in 1, 3, 5, 7, 9 months. Normal aging control the senescence accelerated mouse/resistance 1(SAMR 1) was used. **Results** Compared with the SAMR 1, there were severe cochlear efferent nerve terminals loss in the SAMP 1 in 7, 9 months($P < 0.05$), and there were evident destroy on the construction of membrane of synapses. **Conclusion** There is age-related impairment of cochlear efferent nerve in the senescence accelerated mouse.

Key words: senescence accelerated mouse; cochlear efferent nerve; synapses

快速老化小鼠 SAM(senescence accelerated mouse, SAM)包括 SAMP(senescence accelerated-prone mouse, SAMP)和 SAMR(senescence accelerated-resistant mouse, SAMR)两种品系^[1]。SAMP 1 是 SAMP 的一个亚系,平均寿命只有 12.1 个月,其正常生长期只有 4~6 月龄,然后迅速出现老化特征;SAMR 1 是 SAMR 的一个亚系,表现为正常衰老,在实验研究中,常常作为 SAMP 的正常对照。既往的研究显示,SAMP 1 小鼠随月龄增长出现外毛细胞缺失、耳蜗螺旋神经元凋亡,同时伴有明显的老年性耳聋等特征^[2-3],在这一过程中,是否伴有增龄性耳蜗听觉传出神经损害尚有待研究阐明。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 所用实验动物包括 SAMP 1 和 SAMR 1 两种品系。其中 1、3、5、7、9 月龄 SAMP 1 各 6 只,雌雄各半,作为实验组;同时,选条件相同的同龄 SAMR 1 小鼠各 6 只,雌雄各半,作为正常对照组。

1.2 耳蜗铺片标本制备 各组动物以 2%戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后,依次用生理盐水、4%的多聚甲醛(Sigma 公司)PBS 固定液(0.1 M、pH 7.4)经左心室进行半身灌注处死(钳夹腹主动脉),断头,颞骨分左右侧游离听泡。解剖显微镜下在同种固定液中打开听泡,蜗尖钻孔,将听泡全部切除,剔除听骨及鼓膜,开放圆窗膜,再置于同种固定液中 4℃冰箱中过夜。第 2 天将标本取出,0.1 M、pH 7.4 PBS 缓冲液反复冲洗,放入 10%乙二胺四乙酸(pH 7.4)中连续脱钙 7 d。在解剖显微镜下剥去蜗壳,撕下螺旋韧带、前庭膜及盖膜。

1.3 右侧耳蜗乙酰胆碱酯酶组化染色、封片、传出神经纤维和末梢计数 取下基底膜,按回剪断,乙酰胆碱酯酶组化染色。(1)标本用 0.1 M PBS 洗涤;(2)0.1% H₂O₂ 消除内源性过氧化酶活性;(3)PBS 洗涤;(4)1% Triton-100 处理 1 h;(5)PBS 和 0.1 M 马来酸缓冲液分别洗涤;(6)置组化反应液(0.1 M 马来酸缓冲液中含 35 μmol 碘代乙酰硫化胆碱,5 μmol K₃Fe(CN)₆、30 μmol GuSO₄·50 μmol 枸橼酸钠)中作用 50 min;(7)Tris-HCl 洗涤;(8)置标记染色液(50 mM Tris-HCl 缓冲液含 0.04% DAB 和 0.3% 硫酸镍铵)中作用 5 min 后,再于含 0.003% H₂O₂ 的同一溶液中继续染色 10~15 min;(9)在 5 mmol Tris-HCl 中洗涤终止反应后用 PBS 清洗;(10)用梯度乙醇行脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,光镜下通过网格测距器测量各组底回 MOC 纤维和末梢的密度,测量 100 μm 范围内的耳蜗传出神经纤维和末梢数。

1.4 左侧耳蜗电镜制样、耳蜗传出神经观察 (1)充分冲洗已脱钙耳蜗标本;(2)用 2.5%戊二醛固定 24 h;(3)2%俄酸后固定 2 h;(4)梯度丙酮脱水;(5)环氧树脂和纯丙酮混合液浸泡 24 h;(6)耳蜗标本轴位包埋成块;(7)修块、定位、轴位半薄切片;(8)超薄切片;(9)电子染色,即醋酸铀、硝酸铅双重染色;(10)日立 H-600 型透射电镜观察、照片。

1.5 统计学方法 耳蜗传出神经纤维和末梢数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,试验组与对照组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SPSS12.0 统计软件处理,于 Windows XP 下操作。

* 基金项目:广西科技厅自然科学基金资助项目(0832270);广西卫生厅重点资助项目(200746);教育部春晖计划科研资助项目(Z2005-2-45002)。

2 结 果

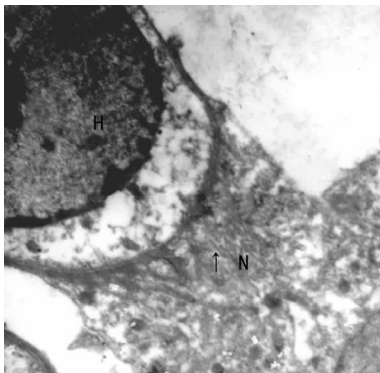
2.1 耳蜗传出神经纤维和末梢数据变化 (1)对照组:各年龄组 SAMR 1 小鼠耳蜗传出神经纤维和末梢呈褐色、排列整齐清晰(彩插 I 图 1)。(2)实验组:7、9 月龄组 SAMP 1 小鼠传出神经纤维和末梢均明显减少、且受损部位主要位于底回(彩插 I 图 2)。(3)耳蜗传出神经纤维和末梢数据计数显示,7、9 月龄 SAMP 1 小鼠与同龄 SAMR 1 小鼠比较,其耳蜗传出神经纤维和末梢数据差异有统计学意义(表 1)。

表 1 两组小鼠耳蜗底回耳蜗传出神经纤维和末梢数据比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1 月龄	3 月龄	5 月龄	7 月龄	9 月龄
对照组	1.2±1.33	1.3±1.37	1.5±1.38	2.5±2.21	5.0±1.26
实验组	1.5±1.76 [△]	2.2±1.47 [△]	2.3±1.63 [△]	12.5±4.51*	17.7±2.88*

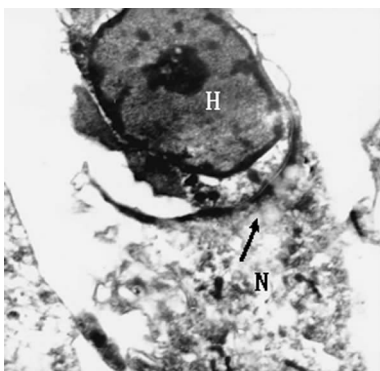
与对照组比较,[△]: $P>0.05$,*: $P<0.05$ 。

2.2 耳蜗传出神经电镜观察结果 (1)对照组:各年龄组 SAMR 1 小鼠耳蜗传出神经纤维结构基本清晰,毛细胞核完整,突触结构清晰(图 3)。(2)实验组:7、9 月龄组 SAMP 1 小鼠传出神经纤维严重空泡变性,突触前后膜结构近消失,胞浆线粒体肿胀(图 4)。



耳蜗传出神经传出神经纤维(N)结构基本清晰,毛细胞核(H)结构完整,突触结构(↗)清晰。

图 3 7 月龄 SAMR 1 小鼠耳蜗传出神经电镜观察($\times 8000$)



传出神经纤维(N)严重空泡变性,突触前后膜结构近消失(↗),胞浆线粒体线粒体肿胀。

图 4 7 月龄 SAMP 1 小鼠耳蜗传出神经电镜观察($\times 8000$)

3 讨 论

老年性聋是指因听觉系统老化而引起的耳聋;与机体衰老过程密切相关,既与其他组织器官的老化息息相关,也有自己的独特性。随着老龄人在人口结构中比例的逐渐增加,对老年

性聋病因的分子机制、细胞和亚细胞水平的改变以及老年性聋的电生理的探讨研究日趋活跃^[2-9]。

SAMP 1 增龄过程中出现许多与衰老相关的功能紊乱,如伴有或不伴有脑萎缩的学习记忆功能障碍等,其许多病理学特征与人类衰老时的病理学特征非常相似。有研究显示,在增龄过程中,SAMP 1 听觉功能快速出现减退,而且 SAMP 1 的增龄性听力丧失明显早于 SAMR 1;同时,增龄过程中 SAMP 1 耳蜗出现与听功能变化相一致的组织病理变化,即耳蜗外毛细胞缺失、螺旋神经元发生凋亡;这些改变与人类衰老时耳蜗形态学改变相似^[10-12]。

老年性聋是由于听觉器官退化所致,其病理变化发生部位可以累及外耳、中耳、内耳、蜗神经及其中枢传导通路和皮质的整个听觉系统;近年来,关于听觉传出神经在维护听觉敏感度及分别力、听觉调控及听觉防护等方面起重要作用的观点也已被广大学者接受^[13],但是,对于听觉传出神经与老年性聋的关系的研究报道并不太多。本研究显示,在增龄过程中,随着 SAMP 1 听觉功能快速出现减退,同时出现耳蜗传出神经纤维和末梢数据出现部分缺失,同时伴有耳蜗传出神经纤维空泡变性以及突触结构损伤。因此,这也进一步证实了耳蜗传出神经纤维的增龄性损害可能与老年性聋相关,而 SAMP 1 可以作为探讨老年性聋听觉传出神经损害的动物模型。

参考文献:

- [1] 聂伟,张永祥.快速老化小鼠——研究衰老及衰老相关疾病的动物模型[J].中国药理学通报,2000,16(2):132.
- [2] 刘强和,罗香林,耿宛平,等.快速老化小鼠的听功能和耳蜗毛细胞的增龄性变化[J].华夏医学,2008,21(2):213.
- [3] 刘强和,罗香林,耿宛平,等.快速老化小鼠的听功能和耳蜗螺旋神经元的增龄性变化[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(3):215.
- [4] 方耀云,姚行齐,姜泗长,等.老化豚鼠耳蜗毛细胞和螺旋神经节细胞定量研究[J].中国电视学与图像分析,1996,1(1):64.
- [5] 方耀云,杨旭春,姜泗长,等.不同年龄组大鼠耳蜗核细胞定量分析[J].临床耳鼻咽喉科杂志,1997,11(3):99.
- [6] 凌惠,龚树生,宋鹏.老年大鼠耳蜗酪氨酸羟化酶及单胺氧化酶-B 基因的表达[J].中华耳科学杂志,2003,1(2):4.
- [7] 李朝军,刘兆华.耳聋发生机制及防治研究现状与展望[J].重庆医学,2006,35(5):585.
- [8] 谢利红,唐安洲.耳蜗血管纹对内淋巴电位的影响及其意义[J].广西医学,2004,26(4):528.
- [9] 杨燕珍,余怀生,林怀洁,等.老年高血压患者耳蜗电图的临床研究[J].广东医学,2004,25(10):1158.
- [10] 翟所强,方耀云,王沛英,等.老年大鼠听力与耳蜗组织化学、免疫组织化学变化实验观察[J].军医进修学院学报,1997,18(1):1.
- [11] 方耀云,姜泗长,李玉,等.老年人螺旋神经节形态变化及定量的研究[J].中华老年医学杂志,1998,17(5):297.
- [12] 杜波,丁大连,蒋海燕,等.C57BL/10J 小鼠内耳形态学观察[J].听力学及言语疾病杂志,2007,15(1):57.
- [13] 刘强和,耿宛平,雷迅.听觉传出神经系统研究进展[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(5):429.