

• 实验研究 •

单次不同放射线剂量和时间对 Balb/c 小鼠 耳蜗显微和超微结构的影响*

杨衬¹ 张威¹ 刘小龙¹ 梁勇¹ 李鹏¹ 张奕¹ 袁亚维²

[摘要] 目的:观察单次不同放射剂量及时间对 Balb/c 小鼠耳蜗显微和超微结构的影响,探讨放射线所致感音神经性聋机制的形态学依据。方法:将 16 只健康 Balb/c 小鼠随机分成 4 组(对照组和 3 个实验组,每组 4 只),实验组分别给予 8、12、16 Gy 剂量的放射线照射,在照射后第 3、7 天处死小鼠,取耳蜗标本后行石蜡包埋、组织切片及苏木精-伊红染色,每组取耳蜗标本行扫描电镜观察。结果:扫描电镜观察发现,对照组内毛细胞及外毛细胞排列整齐,无倒伏、紊乱及缺失;各放射组内毛细胞出现轻微倒伏及排列紊乱,外毛细胞偶有缺失。苏木精-伊红染色结果示各放射组耳蜗内毛细胞、外毛细胞、血管纹细胞及支持细胞在照射后第 3、7 天与对照组比较未出现明显病理形态学异常。结论:在一次给予≤16 Gy 放射剂量照射后早期小鼠耳蜗形态仅有轻微改变。

[关键词] 小鼠;放射线;耳蜗;聋;感音神经性

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.13.017

[中图分类号] R764.35 **[文献标志码]** A

The influence of the single different radiation dose and time on the microscopic structure and ultrastructure of Balb/c mice

YANG Chen¹ ZHANG Wei¹ LIU Xiaolong¹ LIANG Yong¹

LI Peng¹ ZHANG Yi¹ YUAN Yawei²

(¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510000, China; ²Department of Radiotherapy, Nanfang Hospital, Southern Medical University)

Corresponding author: LIANG Yong, E-mail: yliang@smu.edu.cn

Abstract Objective: To observe the influence of the single different radiation dose and time on the microscopic structure and ultrastructure of Balb/c Mice. **Method:** Sixteen four-week-old mice were randomly divided into four groups, control group and three experimental groups, then every experimental group was randomly divided into two groups which were respectively sacrificed on the third and seventh day after exposure to different doses of 8, 12, 16 Gy radiation, then paraffin embedding, tissue section, HE staining and scanning electron microscope, observation were performed after a cochlear specimen collected. **Result:** Inner hair cells and outer hair cells arranged in order, no lodging, disorder or missing in control group under scanning electron microscope. Slight lodgy or disorder occurred in inner cells and outer hair cells were missing sometimes in exposed animals, which meat irrespective of irradiation dose. **Conclusion:** Slight changes of ultrastructure of Balb/c Mice occurred in the early period when given equal to or less than 16 Gy radiation.

Key words mice; radiation; cochlear; hearing loss; sensorineural

Borsanyi(1962)提出放射线对耳的影响以及放疗后患者会出现感音神经性聋。感音神经性聋为鼻咽癌患者放疗后常见的并发症之一,放射性内耳损伤引起的感音神经性聋主要表现为渐进性听力下降,听力损失以高频为主,甚至出现全聋。内耳损伤的发生严重影响了鼻咽癌放疗患者的生活

质量。1970 年 Winther 观察到放射线照射后内耳结构会出现不同程度的改变。由于人体病理标本难以采集,因而有关放疗后耳蜗形态学改变的研究大部分是以实验动物为研究对象,由于研究时所施加的放疗剂量及观察时间不同,所以结果各异。本研究将进一步探讨放射线照射后小鼠耳蜗形态学的改变,为探讨放疗所致的感音神经性聋的机制提供客观的形态学研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用正常出生后 4 周龄 Balb/c 小鼠 16 只

* 基金项目:广东省科技计划对外合作项目(No: 2010B050700021)

¹ 南方医科大学南方医院耳鼻咽喉头颈外科(广州,510000)

² 南方医科大学南方医院放射治疗科

通信作者:梁勇, E-mail: yliang@smu.edu.cn

(耳),雄性,耳廓反射灵敏,排除外耳道及中耳感染,体重17~22 g(由南方医科大学实验动物中心提供,符合实验动物标准和伦理要求)。随机分成4组:对照组(未接受照射),实验1组(8 Gy剂量照射),实验2组(12 Gy剂量照射),实验3组(16 Gy剂量照射);每个实验组4只(耳),每个实验组随机分成2组,各2只(耳),分别在照射后第3、7天进行形态学观察。

1.2 实验方法

1.2.1 放疗早期感音神经性聋 Balb/c 小鼠模型的制备 小鼠称重,2%戊巴比妥钠溶液按0.3 ml/100 g的剂量行腹腔注射麻醉后,俯卧位固定,在X线下定位,确定内耳照射区域。然后用相同体位固定在直线加速器治疗床上。采用美国Varian2100直线加速器6 MeV电子线,剂量率为4 Gy/min,源皮距100 cm,用铅档块避免呼吸道、消化道受照。参考深度为皮下1.5 cm,实验组分别给予小鼠右耳单次8、12、16 Gy的照射剂量,在照射后第3、7天对各项指标进行检测。

1.2.2 耳蜗基膜铺片及扫描电镜观察 各照射组在照射后第3、7天处死小鼠,进行扫描电镜标本制备,步骤如下:将小鼠快速断头,迅速取出听泡。打开听泡后充分暴露耳蜗,在解剖显微镜下刺破圆窗膜,将镫骨底脱位暴露卵圆窗。在蜗顶钻一小孔,用微量注射器缓慢注入2.5%戊二醛溶液灌流固定,去除耳蜗骨壳和螺旋韧带,暴露corti's器,用生理盐水充分洗净标本后,将标本置于2.5%戊二醛溶液固定,用双蒸水冲洗,再经锇酸后固定,双蒸水冲洗,梯度乙醇脱水,临界点干燥,离子溅射真空镀膜。将标本置于扫描电镜下观察并拍照,比较照射前后耳蜗外毛细胞及内毛细胞的形态改变,如是否缺失、紊乱等。

1.2.3 小鼠耳蜗标本石蜡包埋及苏木精-伊红染色 在各照射组照射后第3、7天将小鼠快速断头,迅速取出听泡。打开听泡后充分暴露耳蜗,在解剖显微镜下刺破圆窗膜,将镫骨底脱位暴露卵圆窗,在蜗顶钻一小孔,用微量注射器缓慢注入4%的多聚甲醛溶液灌流固定2~3 h,之后使用15%的硝酸脱钙10~15 min。脱钙完成后放入全自动脱水机进行脱水、透明、浸蜡约12 h,取出标本进行石蜡包埋,切片,进行苏木精-伊红染色约45 min后封片。将标本置于显微镜下观察内耳的形态结构同时拍照,比较照射前后耳蜗外毛细胞、血管纹细胞及支持细胞的病理改变特点。

2 结果

2.1 扫描电镜结果

对照组耳蜗基膜铺片观察显示1排内毛细胞及3排外毛细胞排列整齐,无紊乱、倒伏及缺失现象(图1)。8 Gy照射后第3天顶回内毛细胞出现

倒伏;第7天底回内毛细胞出现轻微倒伏,外毛细胞偶有缺失(图2)。12 Gy照射后第3天顶回内毛细胞出现倒伏;第7天顶回内毛细胞出现倒伏(图3)。16 Gy照射后第3天顶回内毛细胞排列紊乱,顶回及底回外毛细胞偶有缺失;第7天顶回内毛细胞排列紊乱,底回外毛细胞偶有缺失(图4)。

2.2 苏木精-伊红染色结果

与对照组相比,各照射组耳蜗超微结构如内毛细胞、外毛细胞、支持细胞及血管纹细胞均未出现明显的变化,无细胞水肿、萎缩等病理改变。见图5~8。

3 讨论

头颈部肿瘤患者放疗后听力损失的发生率约为20%,主要出现感音神经性聋,而且以高频段为主^[1-6]。国内外已有大量研究证明鼻咽癌患者放疗后出现感音神经性聋的程度与放疗剂量、放疗时间密切相关^[7-11]。Low等^[12]认为患者在放疗后较长时期内听中枢的功能是相对正常的。头颈部肿瘤放疗后有关电离辐射对耳蜗超微结构的损伤特点国外学者也有研究,Tokimoto等(1985)给予豚鼠10 Gy剂量照射后6 h进行扫描电镜观察发现毛细胞没有明显变化。谢利红等^[13]给豚鼠60 Gy放射线照射后扫描电镜观察,可见照射组豚鼠耳蜗外毛细胞静纤毛排列发生改变,放疗后第1、4天出现轻微的纤毛排列紊乱、倒伏;第7天出现纤毛缺失;第30天大量外毛细胞纤毛缺失,内毛细胞纤毛排列紊乱、倒伏,这种变化在第3排外毛细胞比较明显,并随着放疗后时间的延长上述变化更为明显。崔广帅等^[14]及金大玉等^[15]的研究结果与之相近,发现放疗后6周出现耳蜗外毛细胞大量缺失,内毛细胞少许缺如,从底回到顶回这些变化都可观察到。Winther等(1970)还发现耳蜗底周病变重于顶周,为辐射听觉损伤以高频听力为主提供了一定的形态学证据。然而也有学者的研究结果不同,王家东等(1999)一次性用60 Gy对豚鼠进行放疗后7 d扫描电镜下可见外毛细胞纤毛排列整齐,内毛细胞表面纤毛出现散乱、倒伏现象。本实验给予小鼠8、12、16 Gy剂量照射后在第3、7天扫描电镜观察,发现内毛细胞出现轻微倒伏及排列紊乱,外毛细胞排列整齐,无倒伏,偶有缺失,结果与王家东等有相似之处。本实验进一步观察了耳蜗底回、顶回外毛细胞及内毛细胞的形态改变特点,发现从底回至顶回内毛细胞均出现了轻微倒伏,外毛细胞偶有缺失。尚需要进一步加大样本及定量实验研究放射性内耳损伤的形态学依据。

Bohne等(1985)用寿命可达10~20年的栗鼠进行实验,各组动物给予照射总量分别达40~90 Gy后继续饲养2年。经光学显微镜观察发现,

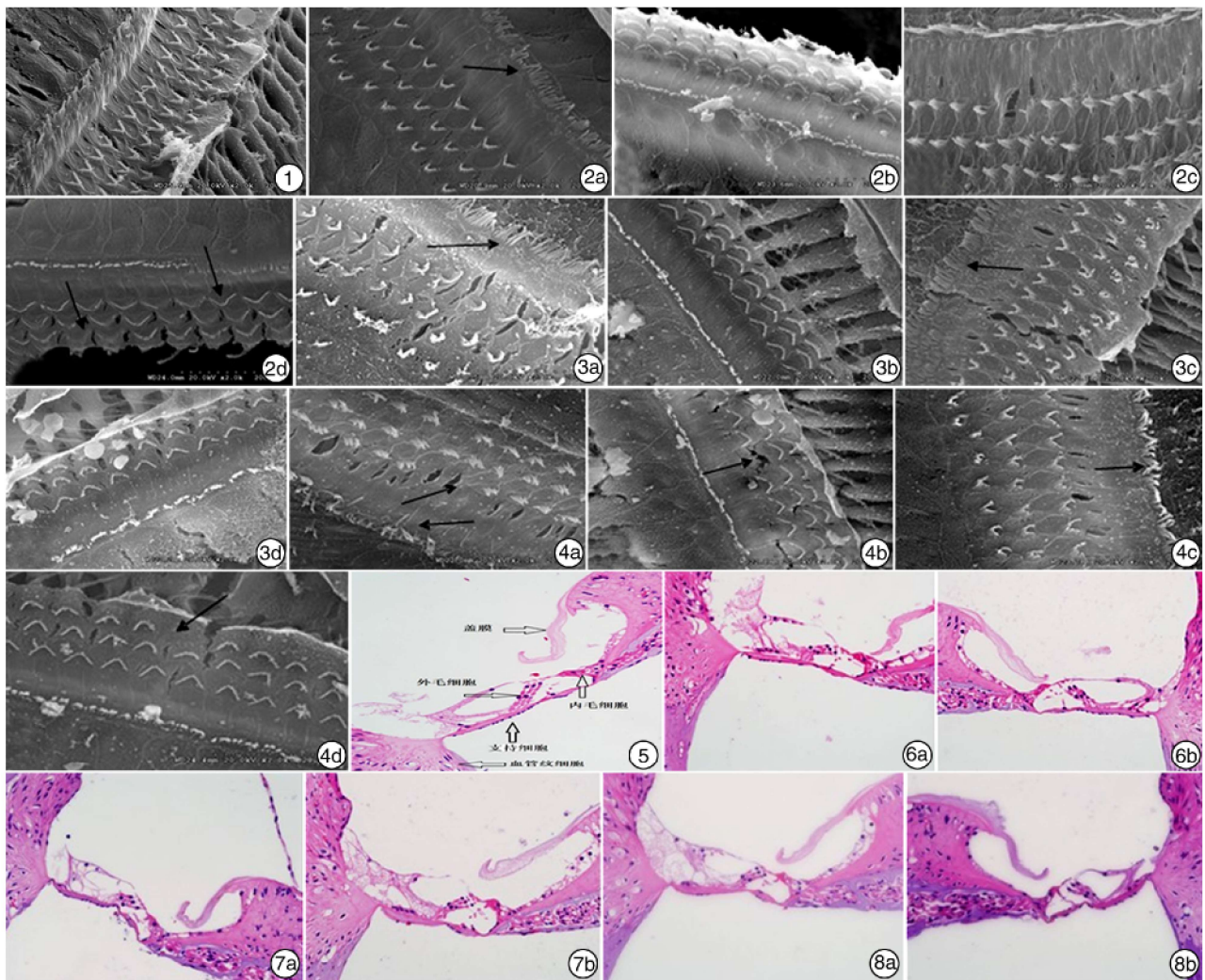


图 1 对照组的耳蜗扫描电镜结果；图 2 8 Gy 照射后第 3、7 天扫描电镜结果 2a、2b:照射后第 3 天耳蜗的顶回、底回,顶回内毛细胞出现倒伏(箭头所示);2c、2d:照射后第 7 天耳蜗的顶回、底回,底回内毛细胞出现轻微倒伏,外毛细胞偶有缺失(箭头所示);图 3 12 Gy 照射后第 3、7 天扫描电镜结果 3a、3b:照射后第 3 天耳蜗的顶回、底回,顶回内毛细胞出现倒伏;3c、3d:照射后第 7 天耳蜗的顶回、底回,顶回内毛细胞出现倒伏;图 4 16 Gy 照射后第 3、7 天耳蜗形态变化 4a、4b:照射后第 3 天耳蜗的顶回、底回,顶回内毛细胞排列紊乱,顶回及底回外毛细胞偶有缺失;4c、4d:照射后第 7 天耳蜗的顶回、底回,顶回内毛细胞出现排列轻微紊乱,底回外毛细胞偶尔缺失;图 5 对照组耳蜗超微结构;图 6 8 Gy 照射后耳蜗超微结构变化 6a:第 3 天;6b:第 7 天;图 7 12 Gy 照射后耳蜗超微结构变化 7a:第 3 天;7b:第 7 天;图 8 16 Gy 照射后耳蜗超微结构变化 8a:第 3 天;8b:第 7 天。

内耳感觉细胞、支持细胞、神经纤维变性,大量毛细胞特别是外毛细胞缺失并出现瘢痕性修复,corti's 器内出现放射线损伤特征性的嗜银颗粒,血管纹萎缩、变性,边缘细胞淡染,中间细胞核固缩,细胞质空泡变,部分螺旋韧带萎缩。其损伤程度明显高于照射结束后 3 周内的短期组,剂量越大病损越严重。Gamble 等(1968)采用不同剂量的 X 线照射豚鼠耳部,2 周后进行组织学观察发现,接受 30 Gy 以上照射的大部分豚鼠标本中内淋巴囊膨胀,轻至中度积水,部分毛细胞崩解。本研究给予 8、12、16 Gy 照射剂量后第 3、7 天对小鼠耳蜗行组织病理切片观察,发现血管纹细胞、支持细胞、内毛细胞及

外毛细胞较照射前并无明显的改变,表明在放射线照射早期耳蜗并没有出现明显的病理改变。但结合文献资料结果可以提示,随着放射线照射剂量及时间的增加,耳蜗才会出现细胞水平的病理改变,而且这种改变与放射剂量、时间具有相关性。

虽然有学者进行过有关电离辐射对内耳损伤的人体颞骨病理学研究,但由于这种病理标本并不容易获得,因此实验动物模型仍是目前重要的研究方法。本研究结果表明,放射线照射后早期的耳蜗组织学形态结构变化并不明显,随着照射剂量及时间的增加耳蜗形态结构的损伤逐渐加重,且底回病变重于顶回。这些结果为放射性听觉损伤常以高频听力为主的临床特征提供了形态学实验证据,也

提示耳蜗听觉功能对电离辐射的作用是敏感的,而且有可能早于形态学的改变,并表现出明显的量-效和时-效的正相关系。

参考文献

- [1] 陆雪官,刘志勇,张力元,等. 鼻咽癌放射治疗后感音神经性耳聋的临床分析[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005,25(3):264—266.
- [2] RAAIJMAKERS E, ENGELEN A M. Is sensorineural hearing loss a possible side effect of nasopharyngeal and parotid irradiation? A systematic review of the literature[J]. Radiother Oncol, 2002,65:1—7.
- [3] WANG L F, KUO W R, HO K Y, et al. A long-term study on hearing status in patients with nasopharyngeal carcinoma after radiotherapy[J]. Otol Neurotol, 2004,25:168—173.
- [4] AKMANSU H, ERYILMAZ A, KORKMAZ H, et al. Ultrastructural and electrophysiologic changes of rat cochlea after irradiation[J]. Laryngoscope, 2004, 114:1276—1280.
- [5] PETSUKSIRI J, SERMSREE A, THEPHAMONGKHOL K, et al. Sensorineural hearing loss after concurrent chemoradiotherapy in nasopharyngeal cancer patients[J]. Radiat Oncol, 2011,6:19—21.
- [6] SCHULTZ C, GOFFI-GOMEZ M V, PECORA L P, et al. Hearing loss and complaint in patients with head and neck cancer treated with radiotherapy[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2010,136:1065—1069.
- [7] YILMAZ Y F, AYTAS F I, AKDOGAN O, et al. Sensorineural hearing loss after radiotherapy for head and neck tumors: a prospective study of the effect of radiation[J]. Otol Neurotol, 2008,29:461—463.
- [8] JERECZEK-FOSSA B A, ROND E, ZAROWSKI A, et al. Prospective study on the dose distribution to the acoustic structures during postoperative 3D conformal radiotherapy for parotid tumors: dosimetric and audiometric aspects[J]. Strahlenther Onkol, 2011,187: 350—356.
- [9] 陈平,唐安洲,张哲,等. 鼻咽癌放疗后突发感音神经性聋 14 例临床分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2011,46(9):705—708.
- [10] 郭运凯,杨新明,谢鼎华,等. 鼻咽癌患者放疗后引起感音神经性聋的临床观察[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005,40(11):805—809.
- [11] ZUUR C L, SIMIS Y J, LAMERS E A, et al. Risk factors for hearing loss in patients treated with intensity-modulated radiotherapy for head-and-neck tumors[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009,74:490—496.
- [12] LOW W K, BURGESS R, FONG K W, et al. Effect of radiotherapy on retro-cochlear auditory pathways[J]. Laryngoscope, 2005,115:1823—1826.
- [13] 谢利红,唐安洲,尹时华,等. 大剂量 60Co 放疗后内耳形态学改变及 Caspase3 的表达[J]. 实用医学杂志,2011,27(17):3112—3114.
- [14] 崔广帅,金大玉,邢巍巍,等. 电离辐射对听功能影响的实验研究[J]. 听力学及言语疾病杂志,2010,18(1):65—66.
- [15] 金大玉,邢巍巍,谷京城,等. 山莨菪碱对耳蜗辐射防护作用的动物实验研究[J]. 锦州医学院学报,2006, 27(1):29—31.

(收稿日期:2013-12-16)

北京大学人民医院第 21 期鼻内镜微创外科培训班通知

由卫生部批准的国家级继续教育项目“第 21 期鼻内镜微创外科培训班”将于 2014 年 8 月 21~25 日在北京如期举行[项目编号 2014-07-01-171(国),国家级继续教育学分 8 分]。主要培训内容:鼻腔鼻窦解剖及影像学,鼻内镜外科手术操作技巧、围手术期处理,鼻内镜在鼻-鼻窦炎以及鼻眼、鼻颅底和鼻腔鼻窦肿瘤方面的应用,鼻内镜微创外科技术新进展,鼻-鼻窦炎和变应性鼻炎规范诊治,国内知名专家专题讲座,一对一尸头解剖训练,手术示教等。鼻科学乃我院传统优势学科,此培训项目已连续举办 20 期,学员遍布全国,深受好评,许多学员经过培训已经成为所在医院的学术骨干,欢迎有一定鼻内镜外科基础的国内同道参加,学习期满合格者,授予 I 类继续教育学分,本期拟招收学员 40 人,因名额有限,尸头标本紧张,请报名者从速。培训费:2500 元/人(含解剖、资料费),800 元/人(不参加解剖)。外地来京学员可安排食宿(费用自理)。

地址:北京大学人民医院耳鼻咽喉科(北京市西直门南大街 11 号,邮编:100044)。联系电话:(010) 66583750(66583751, 66583754),13661025303(电话或短信);E-mail: szuchi1228@hotmail.com, happytuidui@163.com;联系人:邵森垚、王思祁、王旻。报名方式:需要学分证的学员,必须网上报名注册。注册网址: <http://jjgl.bjmu.edu.cn> (项目报名→鼻窦内镜微创外科学习班),可电话或 E-mail 索取纸质版通知。

北京大学人民医院耳鼻咽喉科