

· 基础研究 ·

明胶海绵和透明质酸在地塞米松圆窗灌注中对豚鼠圆窗膜形态及功能的影响

唐月英,任基浩,王耀文,孙霞玲,殷团芳,卢永德

(中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科,湖南长沙 410011)

摘要: 目的 圆窗分别放置明胶海绵与透明质酸,观察地塞米松圆窗灌注对豚鼠圆窗膜形态及功能影响。方法 ① 36只豚鼠随机分为3组,Ⅰ组圆窗龛放置明胶海绵并在圆窗置管;Ⅱ组圆窗龛放置含2%透明质酸明胶海绵置管,Ⅲ组圆窗龛放置明胶海绵置管,Ⅱ组和Ⅲ组经圆窗置管向圆窗灌注地塞米松7d后。用光学显微镜和扫描电镜观察圆窗膜变化。36只豚鼠中随机取6只左耳作为正常对照(Ⅳ组)。②另取18只豚鼠,按给药时间分为1、4、7d3组,每组各取3只分为实验组和对照组,实验组圆窗放置透明质酸明胶海绵,对照组圆窗放置明胶海绵。各组经圆窗置管圆窗灌注地塞米松后,用LC-6A高效液相色谱仪测定外淋巴液中地塞米松浓度。结果 光镜和扫描电镜检查发现Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组圆窗膜厚度和形态与正常对照Ⅳ组比较无明显差异($P > 0.05$);圆窗放置透明质酸明胶海绵后豚鼠外淋巴液中地塞米松含量明显高于明胶海绵组($P < 0.01$)。结论 ①圆窗放置明胶海绵和透明质酸对豚鼠圆窗膜形态无明显影响。②透明质酸明胶海绵能提高地塞米松的圆窗膜通透性。

关键词: 圆窗膜;地塞米松;透明质酸;明胶海绵

中图分类号: R764.9

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2010)02-0100-05

Morphologic and functional study of round window membrane after administration of gelfoam and hyaluronic acid with intratympanic dexamethasone perfusion in guinea pig

TANG Yue - ying , REN Ji - hao , WAN Yao - wen , et al .

(Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery , the Second Xiangya Hospital , Central South University , Changsha 410011 , China)

Abstract: **Objective** To observe the morphologic and functional changes of round window membrane in guinea pigs after administration of gelfoam and hyaluronic acid with intratympanic dexamethasone perfusion. **Methods** ① Thirty - six healthy male guinea pigs were divided randomly into three groups ; a pipe was introduced into the round window in all animals . Gelfoam was placed in round window niche in group I and group III . Gelfoam soaked with hyaluronic acid was placed in group II . Dexamethasone was perfused through the pipe once a day for 7 days in group II and group III . The animals were sacrificed and the temporal bones were harvested at 1 day or 7 days after dexamethasone perfusion finished . The morphologic changes of round window membrane were studied with both light microscope and scanning electron microscope . ② Eighteen guinea pigs were divided into

three groups according to the course of dexamethasone administration; Dexamethasone was perfused through the pipe once a day for 1, 4, 7 days respectively. Each group was then subdivided into the experimental group and control group. Gelfoam alone and gelfoam with hyaluronic acid were placed in round window niche in the control group and experimental group respectively. The perilymph of the scala tympani was collected and the concentration of dexamethasone in the samples was assayed by HPLC. **Results** Under light microscope and scanning electron microscope, no significant changes were found in the thickness and morphology of round window membrane of guinea pigs between group I, II, III and the control group. The concentration of dexamethasone in the perilymph of the experimental group was higher than that of the control group. **Conclusion** Gelfoam and hyaluronic acid cause statistical insignificant morphological changes of round window membrane but can improve the penetration of dexamethasone through round window membrane.

Key words: Round window membrane; Dexamethasone; Hyaluronic acid; Gelfoam

随着鼓室给药治疗内耳疾病研究的不断深入,观察圆窗膜表面结构的形态特征又重新为人们所关注^[1-2]。圆窗膜作为药物从中耳进入内耳的主要组织结构,其组织形态特征及通透性改变将直接影响药物的治疗效果。了解圆窗膜形态学特征及药物对其通透性的影响具有重要临床意义。近年地塞米松治疗内耳疾病临床研究逐年增多,但地塞米松等药物对圆窗膜组织形态有无影响未见报道。本研究通过建立圆窗置管动物模型,观察明胶海绵、透明质酸和地塞米松对豚鼠圆窗膜形态及功能影响,为临床鼓室应用类固醇激素治疗内耳疾病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物选择和分组

选用体重 250 ~ 350 g 健康纯白雄性红目豚鼠 36 只做形态学研究,右耳为实验耳,分为 3 组,每组 12 只。I 组(手术对照组):圆窗龛放置明胶海绵并在圆窗上方置管,但不予用药处理;II 组(透明质酸明胶海绵+地塞米松组):圆窗龛放置 2% 透明质酸的明胶海绵,III 组(明胶海绵+地塞米松组):圆窗龛放置明胶海绵,II 组和 III 组经圆窗置管分别灌注地塞米松 0.15 ml,每天 1 次,连续 7 d。以上各组分别在用药后 7 d 各处死 6 只动物,4 只用于光镜检查,2 只用于扫描电镜观察。另取左侧 6 耳作为正常对照 IV 组,不予任何处理。

另选 18 只豚鼠右耳,观察圆窗膜通透性改变,按给药时间随机分为 1 d 组、4 d 组和

7 d 组,每组 6 只,每组各取 3 只分为实验组和对照组,实验组圆窗龛放置 2% 透明质酸明胶海绵,对照组圆窗龛放置明胶海绵,经圆窗置管灌注地塞米松 0.15 ml,一天 2 次,于当天注药后 45 min 抽取外淋巴液。

1.2 实验方法

豚鼠采用 2% 戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉。取耳后切口暴露听泡,手术显微镜下于听泡后方钻一直径 0.5 cm 小孔。II 组将 2% 透明质酸明胶海绵覆于圆窗膜表面,III 组将明胶海绵覆于圆窗膜表面,再将直径 1.5 mm 腰麻管置于圆窗龛上方,与明胶海绵相抵,用牙科粘固剂封闭小孔和固定小管,腰麻管外露约 0.5 cm,并与周围组织缝合加固。保持实验耳朝上,用 1 ml 注射器经腰麻管缓慢灌注地塞米松磷酸钠溶液(5 mg/ml)0.15 ml 至充满听泡。

1.2.1 形态学研究 实验各期结束,麻醉动物后迅速断头,快速取出听泡,置于 2.5% 戊二醛液中,4℃ 冰箱过夜。第 2 天取出标本,0.1 M,PH7.4 PBS 缓冲液反复冲洗,10% EDTA 脱钙,连续 7 ~ 10 d。解剖显微镜下分离带有完整圆窗膜的圆窗骨龛,分别制作石蜡切片或电镜样品,行光镜和扫描电镜观察(日本电子 JEOL JSM-6360LV)。圆窗膜厚度由连接摄像系统的光学显微镜测定(日本 Olympus 公司),以 μm 为单位,选择圆窗膜中点和中点两边各一点为测定值,取平均值计算。

1.2.2 地塞米松浓度测定 LC-6A 高效液相色谱仪(日本岛津公司)测定外淋巴液中地塞米松浓度,各组在给药结束 45 min

后刺破圆窗膜,用特制微量取样器吸取外淋巴液 10 μ l,放入 - 20℃ 冰箱。色谱柱系 Diamonsil C 18 柱 (2 5 0 mm \times 4 . 6 mm , 5 μ m) ;流动相为乙腈 - 硫酸铵;流速为 1 0 ml / min ,柱温为 3 5℃ ;检测波长为 239 nm。取解冻淋巴液 10 μ l,加入 20 μ l 乙腈和 30 μ l 流动相,振荡离心后取上清 20 μ l,以外标法测定其浓度。地塞米松对照品由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 统计学分析

所有计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件处理。单样本均数差异的统计学处理采用配对 *t* 检验,多个样本均数差异统计学处理采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 动物一般情况和耳蜗大体解剖观察

各组动物实验期无行走不稳、行为异常、死亡等,术后置管无脱落,局部软组织无炎症、无感染征象。取材时观察所置明胶海绵与圆窗膜接触,窗膜无破裂,无明显中耳炎症和中耳腔出血。

2.2 光镜观察

IV 组圆窗膜外上皮层、纤维层及内上皮层分层清晰,各层间无炎症细胞浸润 (图 1)。I、II 和 III 组各期动物圆窗膜形态与 IV 组相似。各组间圆窗膜厚度比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05 ,表 1)。

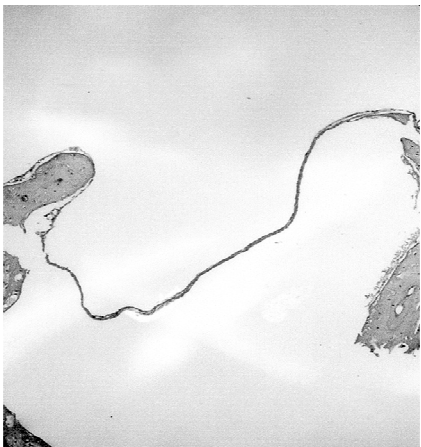


图 1 光镜扫描正常组圆窗膜 (HE 染色, $\times 100$)

表 1 各组圆窗膜厚度比较 ($\bar{x} \pm s$, μ m)

组别	例数	时间		<i>P</i> 值
		1 d	7 d	
I 组	4	11.35 \pm 0.48	11.20 \pm 0.71	0.744
II 组	4	11.45 \pm 0.53	11.13 \pm 0.50	0.344
III 组	4	11.25 \pm 0.65	11.26 \pm 0.70	0.975
IV 组	4	11.21 \pm 0.64	11.21 \pm 0.64	-
<i>P</i> 值		0.937	0.992	

2.3 扫描电镜观察

2.3.1 圆窗膜鼓室面 IV 组可见多边形的单层矮立方上皮细胞紧密排列 (图 2), 细胞间呈紧密连接 (图 3), 细胞表面及紧密连接带状区布满微绒毛丛。I、II 和 III 组各期动物圆窗膜鼓室面形态与 IV 组相似。

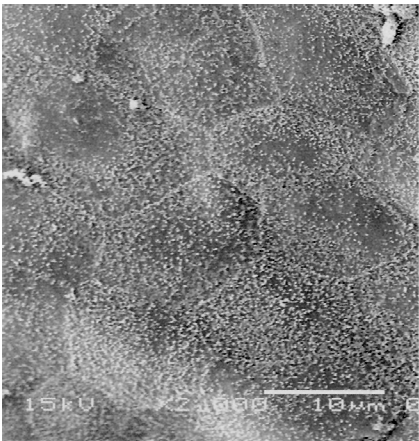


图 2 电镜扫描正常圆窗膜鼓室面 ($\times 2000$)

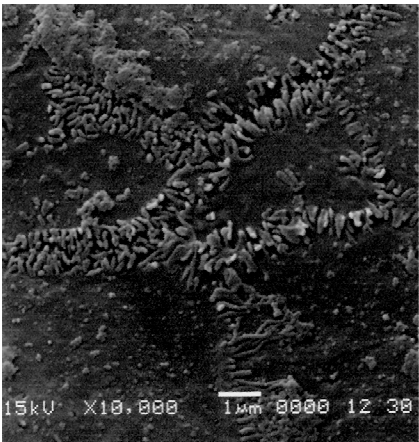


图 3 电镜扫描上皮细胞间紧密连接 ($\times 10000$)

2.3.2 圆窗膜鼓阶面 IV 组扁平内皮细

胞排列欠规则,部分呈半球型隆起,带有较长的侧突结构,微绒毛少或缺如(图4);边缘处可见附着于骨性蜗壳的胶元纤维束,呈网状,排列较规则。I、II和III组各期动物鼓阶与IV组无明显差异。

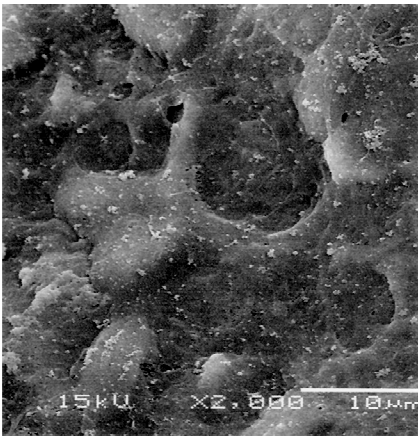


图4 电镜扫描正常圆窗膜鼓阶面(×2000)

2.4 圆窗膜通透性观察

实验组圆窗放置透明质酸明胶海绵后外淋巴液中地塞米松的浓度明显高于对照组($P < 0.01$);而实验组中,不同用药时间组间豚鼠外淋巴液中地塞米松的浓度无明显差异($P > 0.05$)(表2)。

表2 各组地塞米松含量比较 ($\bar{x} \pm s$, mg/L)

时间	例数	实验组	对照组	P 值
1 d	6	8.59 ± 0.21	4.34 ± 0.28	<0.01
4 d	6	8.89 ± 0.37	4.98 ± 0.19	<0.01
7 d	6	8.62 ± 0.37	4.68 ± 0.38	<0.01
P 值		>0.05	>0.05	-

3 讨论

随着鼓室用药治疗内耳疾病方法的临床广泛应用,圆窗膜作为中耳与内耳间的唯一膜性自然通道,其形态及功能改变将直接影响到临床治疗效果,了解其形态特征及药物对其通透性的影响具有重要意义。地塞米松作为鼓室治疗常用药物,其对圆窗膜的形态学有无影响报道很少,地塞米松和透明质酸联合作用及圆窗放置吸收性明胶海绵

对圆窗膜形态学的影响未见报道。

明胶海绵因具有止血、填充和药物载体作用,而常规用于鼓室成形等中耳乳突手术。采用圆窗龛放置吸收性明胶海绵以增加治疗药物在外淋巴液的浓度,对于治疗内耳疾病具有重要临床意义。然而,以往的研究发现中耳放置吸收性明胶海绵可导致中耳黏膜纤维化和鼓膜增厚^[34],但是否可引起圆窗膜的增厚,尚未见报道。本研究中我们在豚鼠圆窗放置吸收性明胶海绵1、7 d后,观察圆窗膜的形态学改变,发现圆窗膜的厚度与正常对照组差异无显著性($P > 0.05$),扫描电镜观察其上皮细胞排列紧密,细胞间呈紧密连接,微绒毛丰富。表明明胶海绵对圆窗膜形态无明显影响。

透明质酸由于生物相容性好,具有渗透作用^[5],对内耳无明显毒副作用而被作为内耳用药的易化剂。Laurent 等^[6]在大鼠中耳放置透明质酸和吸收性明胶海绵,光学显微镜观察透明质酸对中耳黏膜的影响,认为透明质酸明胶海绵混合应用与单独使用吸收性明胶海绵比较,前者可显著减少中耳黏膜纤维结缔组织的形成。Li 等^[7]的研究也证实透明质酸是无毒性的填充材料,与中耳黏膜有高度的生物相容性,可作为中耳理想的填充材料。以上研究均重点观察了透明质酸对内耳的结构和中耳黏膜的影响,对圆窗膜是否有影响也未见报道。本组实验将透明质酸与明胶海绵颗粒混合后置于圆窗膜,局部灌注地塞米松,1、7 d后观察圆窗膜的形态学改变,发现圆窗膜无炎症细胞浸润,各层分层清晰,厚度与正常组无显著性差异($P > 0.05$),上皮细胞间呈紧密连接。表明透明质酸在该用药方式下对圆窗膜形态无明显影响。

通过圆窗置管,注射地塞米松一定时间后采集外淋巴液,分别测定实验组和对照组外淋巴液中地塞米松的浓度来了解透明质酸对地塞米松通过圆窗膜的促渗作用,动物实验结果表明,放置透明质酸明胶海绵后豚鼠外淋巴液中地塞米松的含量明显高于对照组,差异有显著性($P < 0.01$)。而实验组中,不同的治疗时间豚鼠外淋巴液中地塞米松的含量无明显差异($P > 0.05$)。结果

说明透明质酸明胶海绵能提高地塞米松的圆窗膜通透性,为临床应用提供了理论依据。

我们的研究也再次证明,明胶海绵、地塞米松及透明质酸对圆窗膜的形态学无明显影响,在鼓室用药治疗内耳疾病中使用是可行的。

参考文献:

- [1] Jackson LE, Silverstein H. Chemical perfusion of the inner ear[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2002, 35(3): 639 - 653.
- [2] 侯东明,吴皓,杨军,等. 不同方式鼓室内给药后豚鼠耳蜗外淋巴液中地塞米松代谢动力学征[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 19(7): 307 - 310.
- [3] Liening DA, Lundy L, Silberberg B, et al. A comparison of the biocompatibility of three absorbable hemostatic agents in the rat middle ear[J]. Otolaryngol Head Neck Surg,

1997, 116(4): 454 - 457.

- [4] Bahadir O, Aydin S, Caylan R. The effect on the middle-ear cavity of an absorbable gelatine sponge alone and with corticosteroids[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2003, 260(1): 19 - 23.
- [5] Chandrasekhar SS, Rubinstein RY, Kwartler JA, et al. Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 122(4): 521 - 528.
- [6] Laurent C, Hellstrom S, Stenfors LE. Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: an experimental study[J]. Am J Otolaryngol, 1986, 7(3): 181 - 186.
- [7] Li G, Feghali JG, Dinces E, et al. Evaluation of esterified hyaluronic acid as middle ear-packing material[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001, 127(5): 534 - 539.

(修回日期:2010-02-01)

· 消息 ·

第六届全国听力与耳聋基础和临床新进展研讨会 暨第十六届全国0~6岁儿童听力筛查诊断和康复培训班通知

中南大学耳科研究所、湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科和湖南省听力医学中心与中国人民解放军耳鼻咽喉科研究所、首都医科大学耳鼻咽喉科学院、中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会听力学组、中国聋儿康复研究中心、湖南省卫生厅、畅听未来和奥地利 MED-EL 人工耳蜗公司,拟于2010年6月17~20日在长沙合作主办第六届听力与耳聋基础和临床新进展研讨会暨第十六届全国0~6岁儿童听力筛查诊断和康复培训班。会议内容涵盖耳聋的基础与临床研究新进展,新生儿听力筛查和诊断的方法、诊断策略和管理,儿童听力损失诊断、听觉及言语发育评估、耳聋的影像学诊断、儿童听力损失的治疗及干预策略,助听器及人工耳蜗技术和听觉言语康复技术的临床应用等。届时将邀请全国人工耳蜗植入定点医院、畅听未来中国听力高级顾问委员会部分专家教授及中国聋儿康复研究中心、丹麦瑞声达听力集团、奥地利 MED-EL 人工耳蜗公司的专家讲学。欢迎全国各地耳鼻咽喉科临床医师、听力学工作者和从事新生儿听力筛查、儿童听力诊断及保健和听觉言语康复的医师、技术人员、特教和管理人员参加。参加人员将授予国家级继续教育 I 类学分 10 分。报名者通过电话、电子邮件或信函联系,即寄发正式通知。

通讯地址:长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈科,邮编 410011

联系人:刘玉媛(0731-85295135,13873161804),刘嘉(0731-85292197,13637402279),电子邮件:weijwu@163.com;xiaozian@sina.com