

· 基础研究 ·

# 免疫性脑脊髓膜炎模型中听神经脱髓鞘病变 与听觉诱发电位的变化

陈小婉,仇志强,马春霞,张小兵

(兰州大学第一医院耳鼻咽喉头颈外科,甘肃 兰州 730000)

**摘要:** **目的** 探索实验性免疫性脑脊髓膜炎模型中听神经脱髓鞘病变和 ABR 随时间的变化,以及这两种变化之间的关系。**方法** 选取 Wistar 大鼠 60 只,随机分为实验组、对照组和正常组,分别皮下注射牛坐骨神经髓鞘碱蛋白和完全弗氏佐剂、完全弗氏佐剂、生理盐水。对所有实验动物在免疫前、免疫结束后 1、2、3、4、5、6 周进行 ABR 检查。每周随机抽取各组 2 只动物,2.5% 戊二醛活体灌注后处死,电镜下观察听神经的变化。**结果** 实验组动物听神经在给药后 1 周均出现脱髓鞘病变,给药后第 3 周达到高峰,随后自行缓解,在第 6 周基本恢复;ABR 的阈值各组间无明显差异,实验组Ⅲ波潜伏期延长。**结论** 免疫性脑脊髓膜炎模型中听神经的脱髓鞘病变发病后随时间自行缓解,与 ABR 的变化并不同步。

**关键词:** 神经;髓鞘碱性蛋白;脱髓鞘疾病;诱发电位

**中图分类号:** R764.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1007-1520(2010)04-0241-05

## Change of demyelinating disease in auditory nerve pathology and auditory brainstem response in mice with autoimmune auditory nerve encephalomyelitis

CHEN Xiao-wan, CHOU Zhi-qiang, MA Chun-xia, et al.

(Department of Otolaryngology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** **Objective** To study the pathological changes of auditory nerve and alteration of auditory brainstem response (ABR) in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), and the correlation between them. **Methods** Sixty Wistar mice were randomly divided into experimental group, control group and normal group. The animal model of EAE was established by subcutaneous injection of heterologous myelin basic protein (MBP) of peripheral nerve and complete Freund's adjuvant. Antigens were replaced by complete Freund's adjuvant and normal saline in the normal group and control group respectively. ABR was examined before and weekly after immunization for seven weeks' duration. Two rats of every group were killed weekly to observe the pathological changes of auditory nerve under electronic microscope. **Results** Demyelination was observed in the auditory nerve of experimental group at the first week after immunization, reached the peak at the third week, and got recovery at the 6th week with self-relief. Except prolonged latency of wave Ⅲ in experimental group, the differences of ABR thresholds among the three groups were statistically insignificant. **Conclusion** Auditory nerve demyelination in the model mice with EAE can be eased up with time and ABR will not change synchronously.

**Key words:** Nerves; Myelin basic protein; Demyelinating disease; Evoked potential

实验性免疫性脑脊髓膜炎模型常被用于  
听神经病的研究,但该模型具有自愈性。研  
究建立异体免疫性脱髓鞘模型,观察模型中

基金项目:甘肃省自然科学基金项目(编号 0710RJZA035)。

作者简介:陈小婉,女,硕士研究生。

通讯作者:仇志强,Email:zhiqiangchou@sohu.com.

听神经脱髓鞘病理改变和 ABR 随时间的变化,以及这两种变化间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取体重 180 ~ 220 g 的 Wistar 大鼠(兰州大学医学实验中心提供)60 只,雌雄各半。10% 水合氯醛(200 ~ 300 mg/kg)腹腔注射麻醉,筛除 ABR 阈值大于 30 dBnHL 者。

1.1.2 试剂 Folin 酚试剂盒,北京鼎国公司产品;透射电镜,日立 Hu212A 型;完全弗氏佐剂,北京鼎国公司产品。

1.2 方法

牛坐骨神经髓鞘碱蛋白的分离:取牛坐骨神经参照吴抒见<sup>[1]</sup>的方法分离纯化髓鞘碱蛋白(myelin basic protein, MBP),Lowry 法测蛋白浓度为 1 g/L。将筛查后的大鼠随机分成 3 组,分别为正常组、对照组、实验组各 20 只。将 MBP 与等量完全弗氏佐剂乳化后,以每 100 g 体重 300  $\mu$ g MBP 的剂量背部多点皮下注射;对照组动物以不含 MBP 的弗氏佐剂等量同时和相同部位采用相同的方法注射;正常组动物同时、相同部位给予等量生理盐水。

1.3 指标检测

1.3.1 ABR 测试 分别对所有实验动物在免疫前、免疫结束后 1、2、3、4、5、6 周进行 ABR 检查。将大鼠采用 10% 水合氯醛(200 ~ 300 mg/kg)腹腔麻醉后置于隔声电屏蔽室中,用 Intelligent Hearing Smart EP 诱发电位系统进行测试。刺激声为时程 100  $\mu$ s 的方波脉冲短声,滤波宽度 100 ~ 1500 Hz,扫描平均叠加 512 次,短声刺激重复率为 19.3 次/s。刺激强度从 70 dBnHL 开始,10 dB 一档递减至阈值附近

改为 2 dB,至 III 波消失为止。以刺激强度 70 dBnHL 为标准记录 I、III 波潜伏期。

1.3.2 听神经的电镜观察 在免疫结束后 1、2、3、4、5、6 周随机抽取各组 2 只动物,2.5% 戊二醛活体灌注后处死,取出听神经组织后经 2.5% 戊二醛固定,锇酸染色,梯度乙醇脱水,树脂包埋超薄切片,透射电镜 100 Kv 下观察神经超微结构变化。

1.4 统计学处理

用 SPSS 10.0 软件处理数据,采用重复测量方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义的检验标准。

2 结果

2.1 模型的建立

已有的听神经病研究实验均以 ABR 阈值增高 10 dB 为模型建立标准,本实验也采用这个标准。在免疫后 1 周检测实验动物的 ABR 阈值,取实验组动物 ABR 阈值较免疫前增高 10 dBnHL 者为模型动物。实验组仅有 15 耳 ABR 阈值增高大于 10 dBnHL,定为实验 1 组,阈值未增高者或增高小于 10 dBnHL 的动物为实验 2 组。

2.2 ABR 检查结果

实验 1、2 组动物均出现脱髓鞘改变,单独统计组间无统计学差异,故将其合并后比较 ABR 阈值和潜伏期的变化。各组免疫前和免疫结束后 1、2、3、4、5、6 周的 ABR 检查结果见表 1。免疫后 1 ~ 6 周各组间的 ABR 阈值比较无统计学意义,组内随着时间延长阈值无明显差异( $P > 0.05$ )。实验组 III 波潜伏期在每周和对照组比较差异无统计学意义(表 2);实验 1 组动物的 III 波潜伏期表现出延长的趋势,到免疫后第 4 周最为明显,随后有逐渐自然恢复的趋势。

表 1 各组给药前后 ABR 阈值的变化 ( $\bar{x} \pm s$ , dBHL)

组别	给药前	给药后 1 周	给药后 2 周	给药后 3 周	给药后 4 周	给药后 5 周	给药后 6 周
实验组	10.31 $\pm$ 4.90	14.06 $\pm$ 7.78	12.4 $\pm$ 7.58	10.00 $\pm$ 7.60	12.00 $\pm$ 6.37	11.3 $\pm$ 6.20	8.00 $\pm$ 5.42*
对照组	8.00 $\pm$ 5.97	11.50 $\pm$ 8.22	11.1 $\pm$ 7.36	10.80 $\pm$ 6.84	10.40 $\pm$ 3.96	9.57 $\pm$ 3.52	5.05 $\pm$ 2.21**
正常组	13.13 $\pm$ 5.54	11.50 $\pm$ 4.06	12.0 $\pm$ 4.58	12.50 $\pm$ 10.24	8.60 $\pm$ 2.68	9.00 $\pm$ 3.21	7.96 $\pm$ 4.77▲*

注:\* 对照组和实验组间比较  $P > 0.05$ ,▲ 正常组和实验组、对照组间相比  $P > 0.05$ ,☆ 组内比较  $P > 0.05$

表 2 各组给药前后Ⅲ波潜伏期的变化

组别	给药前	给药后 1 周	给药后 2 周	给药后 3 周	给药后 4 周	给药后 5 周	给药后 6 周
实验组	2.38 ± 0.23	2.26 ± 0.17	2.31 ± 0.18	2.19 ± 0.17	2.36 ± 0.29	2.3 ± 0.18	2.27 ± 0.13 <sup>☆</sup>
对照组	2.23 ± 0.17	2.14 ± 0.08	2.18 ± 0.10	2.17 ± 0.15	2.13 ± 0.13	2.2 ± 0.16	2.25 ± 0.20 <sup>☆</sup>
正常组	2.53 ± 0.19	2.33 ± 0.12	2.3 ± 0.19	2.38 ± 0.30	2.29 ± 0.22	2.35 ± 0.18	2.39 ± 0.20 <sup>▲</sup> <sup>☆</sup>

注：\* 对照组和实验组间比较  $P > 0.05$ , ▲ 正常组和实验组、对照组间相比  $P > 0.05$ , ☆ 组内比较  $P > 0.05$

2.3 听神经纤维的超微结构观察

实验 1、2 组动物在给药 1 周后听神经纤维均出现脱髓鞘现象，髓鞘板层从神经纤维靠近轴索周围疏松，层状分离、剥脱。病变于给药后第 3 周达到高峰，部分髓鞘板层断裂为小碎片或小泡状结构，轴索萎缩，轴索内细胞器肿胀，与髓鞘间出现大的空隙。随后髓鞘和轴索的病变逐渐恢复，给药后第

6 周髓鞘和轴索的病变基本恢复正常。对照组动物给药 1 周后出现节段性脱髓鞘病变，轴索内细胞器轻度肿胀，髓鞘近轴索侧较明显，但和实验组相比程度较轻，随实验时间变化无明显改变。正常组听神经纤维的髓鞘呈板层状排列，包裹中央的轴索，轴索内线粒体、小泡、微丝等细胞器清晰，实验期间无明显变化（图 1 ~ 8）。



图 1

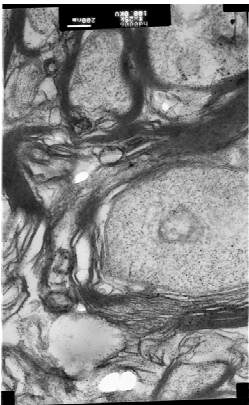


图 2

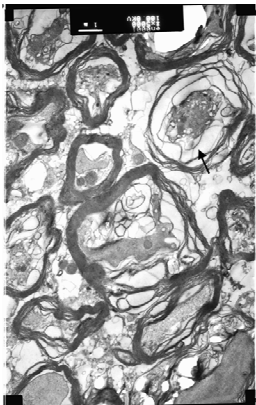


图 3

图 1 实验组给药 1 周后听神经髓鞘节段性疏松(箭头所示)(×25000) 图 2 实验组给药 2 周后听神经脱髓鞘的节段逐渐融合(×25000) 图 3 实验组给药 3 周后轴索萎缩,轴索内细胞器肿胀,与髓鞘间出现大的空隙(箭头所示)(×5000)

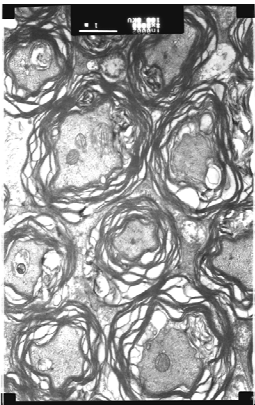


图 4

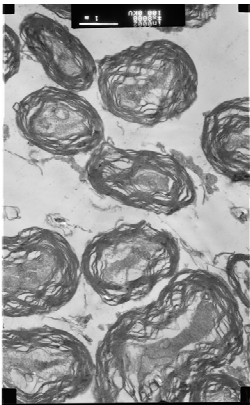


图 5



图 6

图 4 实验组给药 4 周后髓鞘板层均出现疏松,与轴索间的空隙减少(×8000) 图 5 实验组给药 5 周后髓鞘板层疏松逐渐减轻(×8000) 图 6 实验组给药 6 周后髓鞘和轴索病变逐渐恢复(×25000)



图 7

图 7 对照组给药 1 周后髓鞘节段性疏松 (×25000)

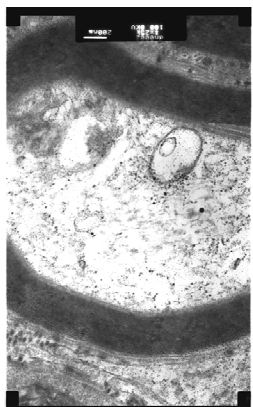


图 8

图 8 正常组给药 1 周后髓鞘致密,无明显病变 (×25000)

3 讨论

听神经病 (auditory neuropathy, AN) 是近年来逐渐为人们所认识的一种有特殊临床表现的感音神经性耳聋,其听力学特征为:患者电测听低-中频听力下降,而 ABR 检查完全引不出波形或波形严重异常,仅有 I 波或 V 波。患者有纯音听力,但 ABR 异常的原因可能包括:①听神经没有神经活动。②听神经传导阻滞。③听神经纤维非同步化放电或同步化放电遭到破坏。从听神经病患者存有可定量测定的听力,即有一定的神经冲动传入来看,第 3 种情况可能性较大。而导致有髓神经纤维非同步化放电最常见的原因是脱髓鞘。但人的内耳无法活检,导致听神经病的病理改变无法明确。免

疫性脑脊髓膜炎模型 (experimental autoimmune encephalomyelitis model, EAE 模型) 是研究多发性硬化的经典模型,动物发病后会出现共济失调、尾巴麻痹、后肢无力等症状,依此评分建立模型。由于动物具有神经系统脱髓鞘的病理改变,同时 ABR 检查出现异常,故被用于听神经病的相关研究,在研究时多采用 ABR 阈值增高  $\geq 10$  dB 为成模标准,我们在试验中沿用了这个标准。

EAE 模型的发病机制和变态反应、炎症有关。研究听神经病时常用的 EAE 模型为急性单相 (AM) 型,建立模型时常用的免疫物质有髓鞘碱性蛋白或提纯的髓鞘 P0 蛋白。急性单相型病程较短,脱髓鞘病变较轻,可完全恢复<sup>[2]</sup>。在近年来的研究发现, EAE 模型在动物发病前即有轴索损伤,且轴索损伤的程度和临床表现并不平行。早期轴索损伤的确切机制尚不清楚,有两种可能的损伤机制模式:①“由表及里”即轴索的损伤继发于髓鞘和 (或) 少突胶质细胞的损伤。在这一模式里,病变由外层的髓鞘和 (或) 少突胶质细胞逐渐发展到内层的轴索。②“由内到外”即轴索损伤先于脱髓鞘改变,病变的发展由内层的轴索到外层的髓鞘。本组试验中发现给药 1 周后实验组动物可以同时观察到轴索的萎缩、细胞器的肿胀和轴索周围髓鞘的层状分离、剥脱,内侧损伤较重。由此推测,轴索的病变可能先于髓鞘脱失<sup>[3,4]</sup>。

有髓神经髓鞘脱失后会导致神经动作电位传导阻滞,但在利用 EAE 模型的研究中听神经脱髓鞘的病变和 ABR 的变化之间的关系各个实验的结果不尽相同。李海英等<sup>[5]</sup>将内耳提纯的 P0 蛋白多次免疫 (免疫时间共 3 周) 豚鼠后,第 4 周电镜下观察听神经的变化,听力损失组 (阈值升高 15 dB) 大鼠的听神经发生明显的脱髓鞘改变,听力未损失组大鼠的听神经则未见明显变化。刘宏建等<sup>[6]</sup>采用豚鼠内耳提纯 P0 蛋白多次腹腔注射免疫后 (免疫时间共 10 周) 出现部分豚鼠听性脑干反应阈提高 10 ~ 25 dB; I、III 波潜伏期延长,到免疫后第 3 周最为明显,随后有逐渐恢复的趋势,其中 III 波潜伏期到第 6 周恢复正常;但第 6 周电镜

下观察,见听力损失大于 10 dB SPL 组大鼠的听神经发生脱髓鞘和螺旋神经节的减少,听力损失小于 10 dB SPL 组大鼠的听神经则未见明显变化。本实验采用异种动物的髓鞘碱蛋白一次免疫大鼠,免疫 1 周后随机抽取听力减退动物和未减退动物,发现均出现脱髓鞘的变化,但仍仅有部分动物的 ABR 阈值增高;实验 1 组动物免疫后Ⅲ波潜伏期较对照组、正常组表现出延长趋势,随髓鞘病变的减轻而恢复。刘宏建等的实验表明Ⅲ波潜伏期恢复正常后,仍可见听神经脱髓鞘等病变。宋鹏等<sup>[7]</sup>在实验中采用异种髓鞘碱蛋白免疫豚鼠,发现有部分动物出现潜伏期延长而无阈值增高,但病理检查见听神经脱髓鞘改变。国外学者 Watanabe 等<sup>[8]</sup>的研究证实缓解期的 EAE 大鼠的听神经和 ABR I 波都得到了改善。这些不同的结果可能和以下因素有关:①动物品系和免疫方法。不同种属或品系的动物 EAE 易感性不同,不仅和动物种属间的遗传背景有关,还和非 MHC 基因有关,免疫反应、炎症介质、中枢神经系统的细胞代谢特征、抗原、佐剂等都会影响模型的形成。不同的种属、免疫原会导致 EAE 模型出现不同的病情和临床病程<sup>[9]</sup>。李海英等两个实验动物采用豚鼠,抗原均为同种异体 P0 蛋白和完全佐剂,免疫时间较长,多次免疫;本实验采用大鼠,抗原为异种髓鞘碱蛋白和完全佐剂,一次免疫,这些可能会影响实验动物脱髓鞘的病理改变和病程。②急性单相型的自愈性。所有的模型均属于 EAE 模型中的急性单相型,急性单相型病程短,具有自愈性。前两个实验处死动物时分别为第 1 次给药后第 7 周和 16 周,刘宏建等的实验表明Ⅲ波潜伏期延长后逐渐自行恢复;处死动物时可能为较轻的病变已自行恢复至正常,导致听力损失小组动物病变已恢复。③病变的程度和范围。同样的抗原导致实验组大鼠均出现脱髓鞘病变,但只有部分动物表

现为阈值增高,是否和病变程度不一或不均匀脱髓鞘,而残存正常的髓鞘及轴索有关。④听神经脱髓鞘后出现实验动物 ABR 阈值的部分增高和潜伏期的延长,但并没有表现出 ABR 引不出或严重异常,听神经病的病变部位或病理性质仍需进一步研究。

要明确 ABR 的变化和听神经脱髓鞘病变间的这些问题,还需要进一步的对比和研究。

#### 参考文献:

- [1] 吴抒忆,陈娟,朱高发,等.豚鼠实验性变态反应性神经炎模型的建立及电生理、免疫等指标的观察[J].中华神经精神科杂志,1995,28(6):366-369.
- [2] 王维治.如何选用实验性自身免疫性脑脊髓炎动物模型[J].中华神经科杂志,2005,38(10):601-603.
- [3] 王起,戚晓昆,张文洛.实验性自身免疫性脑脊髓炎动物模型早期轴索损伤[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2009,16(1):21-24.
- [4] 戚晓昆.中枢神经系统特发性炎症性脱髓鞘病临床进展(专论)[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2008,10(3):141-143.
- [5] 李海英,张榕,林熹,等.纯化内耳 P0 蛋白诱发听神经脱髓鞘的实验研究[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2009,23(2):38-41.
- [6] 刘宏建,王璟,董明敏,等.自身免疫性听神经病动物模型的建立及听性脑干反应和畸变产物耳声发射的变化[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41(02):132-138.
- [7] 宋鹏,龚树生,罗凌惠,等.周围神经脱髓鞘豚鼠模型听神经病变及听功能研究[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(10):461-465.
- [8] Watanabe T, Cheng KC, Krug MS, et al. Brain stem auditory evoked potentials of mice with experimental allergic encephalomyelitis [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1996, 105(11):905-915.
- [9] 吴志英,赵振华,林毅,等.实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立和长期观察研究[J].中风与神经疾病杂志,2009,26(3):300-302.

(修回日期:2010-05-29)