

· 基础研究 ·

大鼠弥漫性脑损伤后内耳听觉脑干反应和 40Hz 听觉相关电位及多频稳态反应与 血红素加氧酶-1 的相关性研究

付兴华¹, 邓艳丽¹, 张萍¹, 张再兴¹, 卢鹤翔², 孙瑞军², 刘颖³, 赵君晖¹, 顾洪兰¹, 韩莉¹

(1. 河北联合大学附属医院耳鼻咽喉科, 河北唐山 063000; 2. 河北联合大学形态中心, 河北唐山 063009; 3. 河北联合大学附属医院肿瘤科, 河北唐山 063000)

摘要: 目的 探讨血红素加氧酶-1 (heme oxygenase, HO-1) 在弥漫性脑损伤 (diffuse brain injury, DBI) 大鼠耳蜗的表达, 分析听觉脑干反应 (auditory brainstem response, ABR)、40Hz 听觉相关电位 (40Hz auditory event related potential, 40Hz AERP) 和多频稳态反应 (auditory steady-state response, ASSR) 与 HO-1 表达的相关性。方法 建立 DBI 大鼠模型并随机分为 5 组, 即正常对照组、外伤 1、2、3、4 周组, 每组 30 只大鼠。采用 ABR、40Hz AERP、ASSR 测定, 光镜、免疫组织化学及扫描电镜观察各组动物 HO-1 表达及 ABR、40Hz AERP、ASSR 的变化。结果 对照组大鼠耳蜗 HO-1 无表达, 外伤后各组内耳 HO-1 表达有明显变化 ($P < 0.01$)。外伤后各组 ABR、40Hz AERP、ASSR 阈值之间比较有明显差别 ($P < 0.05$)。外伤各组内耳 HO-1 表达与 ABR、40Hz AERP、ASSR 阈值变化具有相关性 ($P < 0.05$)。结论 大鼠 DBI 对内耳 HO-1 表达及听功能均有不同程度的影响, ABR、40Hz AERP、ASSR 阈值变化可能与 HO-1 表达有关。

关键词: 弥漫性脑损伤; 耳蜗; 血红素加氧酶-1; 听觉脑干反应; 40Hz 听觉相关电位; 多频稳态反应

中图分类号: R651.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)05-0333-07

Correlation study on the expression of HO-1 in cochlear with the changes of ABR, 40 Hz AERP and ASSR in diffuse traumatic brain injury model rats

FU Xing-hua, DENG Yan-li, ZHANG Ping, et al.

(Department of Otorhinolaryngology, the Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To study the correlation between the expression of HO-1 in cochlear with the changes of auditory brainstem response (ABR), 40 Hz AERP and auditory steady-state response examination (ASSR) in diffuse traumatic brain injury model rats. **Methods** Diffuse traumatic brain injury model of rats were established and randomly divided into five groups, i. e. normal control, one week after trauma, 2, 3, and 4 weeks after trauma respectively. Then ABR, 40Hz AERP and ASSR, light microscope, electron microscope, immunohistochemistry technique were used to evaluate the changes of hearing function and morphology. **Results** The expression of HO-1 in the control group was normal, whereas there were obviously changes of HO-1 expression in inner ears of the traumatic groups. The differences of thresholds of ABR, 40Hz AERP and ASSR between the traumatic groups and the normal

基金项目:河北省科技厅科技支撑项目(08276101D-74)。

作者简介:付兴华,男,副主任医师。

通讯作者:张再兴,Email:zxx16812@163.com.

control group were obvious ($P < 0.05$). The expression of HO-1 in traumatic groups were significantly associated with the changes of auditory function ($P < 0.05$). **Conclusion** To varying degrees, the diffuse traumatic brain injury can influence the expression of HO-1 in the inner ear and auditory functions of model rats. The changes of thresholds of ABR, 40Hz AERP and ASSR may be associated with that of HO-1 expression in inner ear.

Key words: Diffuse traumatic brain injury; Cochlear; Heme oxygenase; Auditory brainstem response; 40 Hz Auditory event related potential; Auditory steady - state response

弥漫性脑损伤 (diffuse brain injury, DBI) 是一类较严重的脑组织外伤,常伴发听功能损伤而遗留听力下降,国外学者对此进行了探讨^[1-2]。而血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO-1) 在 DBI 后对听觉脑干反应 (auditory brainstem response, ABR)、40Hz 听觉相关电位 (40Hz auditory event related potential, 40Hz AERP) 和多频稳态反应 (auditory steady -state response, ASSR) 的影响,目前尚鲜见报道。笔者以 SD 大鼠 DBI 为实验模型,观察 3 种听力检测方法对 DBI 所致听力损伤在听力评估方面的相互关系和 HO-1 在 DBI 大鼠耳蜗内的表达与听功能损伤的相关性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物分组与试剂 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 150 只,体重在 250 ~ 270 g。实验动物由中国医学科学院实验动物研究所提供 [编号: SCXK (京) 2006-0003]。将其随机分为 5 组,正常对照组、外伤 1、2、3、4 周组,每组 30 只。实验大鼠均在 SPF 级动物中心,应用 Co60 辐照饲料分笼饲养。血红素氧合酶兔抗购于美国密理博 (Millipore) 公司,货号: AB1284;羊抗兔二抗试剂盒 (武汉博士德公司),DAB 显色试剂盒 (武汉博士德公司)。

1.1.2 DBI 动物模型的制作 采用自由落体颅脑损伤 (free weight-impact brain injury, FWI) 模型打击器^[3],将 SD 大鼠用乙醚麻醉,待其清醒前期,将大鼠取俯卧位固定于打击装置套管下面的海绵床上。将质量为 490g 的砝码自固定的高度 (1 m) 处自由落下,打击于大鼠顶部直径 20 mm、厚约 3 mm 的金属片上,后迅速将大鼠及海绵床一并撤除,避免再次打击。

1.2 实验方法

正常对照组不做任何处理,测试 ABR、40Hz

AERP 及 ASSR 后断头处死动物,打开听泡,暴露耳蜗,在 25 倍显微镜下于蜗顶部用耳科纤维手术器械挑开一小孔,取下镫骨暴露前庭窗,用 5 号针头的 2 ml 注射器由前庭窗灌注 10% 多聚甲醛固定液,灌注数次后将标本置于 10% 多聚甲醛固定液中,放置于 4℃ 冰箱内保存备用。

外伤模型组分别于打击后 1、2、3、4 周时间点检测 ABR、40Hz AERP 及 ASSR,检测完毕后,同上法处理、固定标本保存备用。

1.3 ABR V 波阈值、40Hz AERP 及 ASSR 测定

1.3.1 ABR V 波阈值测定 采用美国 ICS medical 公司生产 MCV-90XP 型脑干诱发电位仪测试 ABR。以 10% 水合氯醛 (4.8 ml/kg) 腹腔注射,使 SD 大鼠保持深度睡眠状态。用自制针形电极,参考电极刺入同侧耳后软组织内,地极刺入大鼠鼻根部,记录电极刺入近两耳之间,电极阻抗 $< 5 \Omega$ 。采用 click 短声单耳刺激,持续时间 100 ms,刺激频率为 21.1 次/s,叠加 1 024 次。耳道内置式耳机给声,低通滤波 50 Hz,高通滤波 3 000 Hz,刺激声强度由 80 dB 开始记录以 5 dB 间隔递减至 V 波消失,记录 V 波阈值。

1.3.2 40Hz AERP 测试 同仪器进行 40Hz AERP 测试,采用短纯音单耳刺激,扫描时间 100 ms,滤波范围 10 ~ 200 Hz,刺激频率 39.1 次/s,叠加 500 次,刺激声为 1 000 Hz 短纯音。

1.3.3 ASSR 测试 滤波范围 20 ~ 300 Hz,双耳刺激声的载波频率分别为 0.5、1、2、4 kHz,调制频率左耳依次为 77、85、93、101 Hz,右耳依次分别为 81、89、97、105 Hz,声强度间隔为 10 dB,每频 (次) 扫描时间 3 min。

1.4 光镜、免疫组化及扫描电镜标本制作

选取多聚甲醛备用固定耳蜗标本,依次以 PBS 清洗、10% EDTA 脱钙 10 ~ 14 d, PBS 清洗,石蜡包埋,平行蜗轴切片,HE 染色切片,脱水,透明,封片,光镜观察。同时制备 HO-1 免

疫组化染色切片,免疫组化染色根据美国 Millipore 公司试剂盒说明进行染色。扫描电镜标本则由前庭窗灌注 2.5% 戊二醛,灌注数次后在显微镜下剔除骨蜗管骨壁,充分暴露基底膜,并将标本置于 2.5% 戊二醛固定液中 4℃ 冰箱内保存备用。用 1% 四氧化锇固定 2.5 h 后脱水,临界点干燥法干燥,并将脱水干燥后标本置于 k550X 型离子溅射仪内真空喷金镀膜,扫描电镜观察。

1.5 图像分析

应用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统分析各组大鼠耳蜗内毛细胞 (inner hair cell, IHC)、外毛细胞 (outer hair cell, OHC)、螺旋神经节细胞 (spiral ganglion cell, SGC) 中 HO-1 免疫组化染色的灰度值 (grey value, GV 值)。组织 GV 值的范围在 0~255,免疫组化染色程度与 GV 值呈反比关系,即组织免疫组化染色越深,GV 值越小;反之,染色程度越浅,GV 值越大。镜下取每张切片 IHC、OHC、SGC 相应部位,采集 60 个 GV 值数据,取其平均数。本研究以 GV 值为统计数据。

1.6 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析,

采用单因素方差分析进行组间差异分析,采用 Pearson 相关性分析,分析大鼠内耳 IHC、OHC、SGC 及 HO-1 表达与听力损伤的相关性, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜及免疫组化观察

脑组织挫伤,组织内出血,神经元水肿见图 1。HE 染色可见蜗管内出血,螺旋器结构改变,神经节细胞水肿,见图 2。IHC 染色可见螺旋器结构改变、水肿,IHC、OHC、SGC、血管纹内 HO-1 呈阳性着色,见图 3~6。

2.2 扫描电镜观察

正常组扫描电镜观察:耳蜗 OHC 纤毛形态正常,三排外毛细胞纤毛呈 V 形排列,且排列整齐有序,纤毛平行直立,见图 7,8。大鼠 DBI 后总体改变 1 周组镜下损伤改变明显,中顶转 OHC 损伤尤为突出,出现纤毛排列紊乱、倒伏、脱落、融合聚集,底转 OHC 损伤较中顶转减轻,但仍可见纤毛部分分离、融合、少许倒伏现象;DBI 后 4 周组镜下中顶转、底转损伤最轻,见图 9~16。

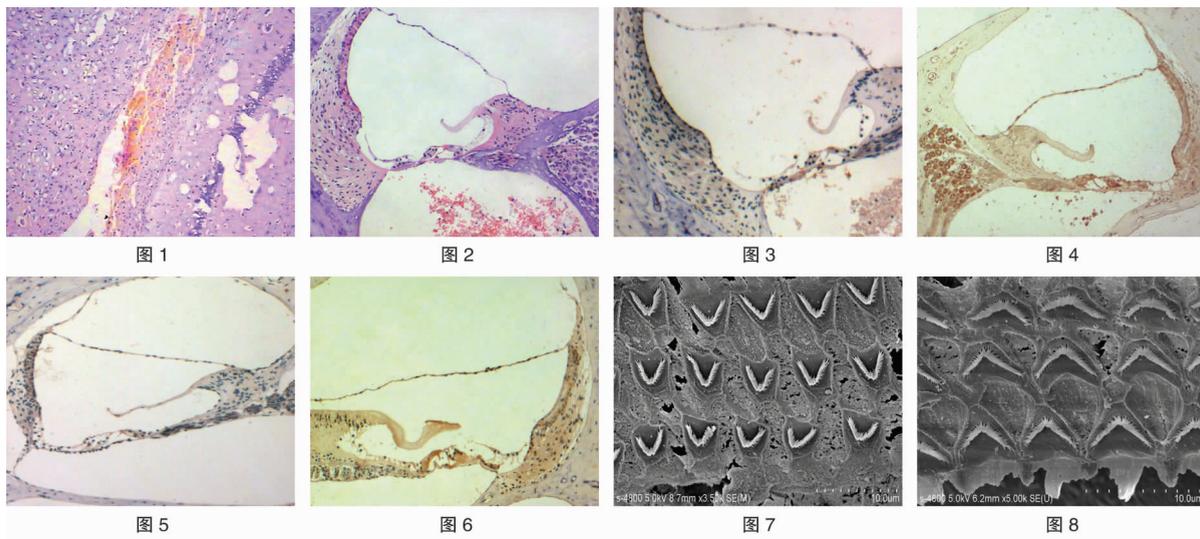


图 1 脑组织挫伤,周围神经元水肿伴出血 (HE ×100) 图 2 DBI 后耳蜗内出血及螺旋器结构改变 (HE ×100) 图 3 DBI 1 周蜗管内出血,HO-1 表达明显 (IHC ×100) 图 4 DBI 2 周蜗管内出血,HO-1 表达明显 (IHC ×100) 图 5 DBI 3 周 HO-1 表达减弱 (IHC ×100) 图 6 DBI 4 周 HO-1 表达减弱 (IHC ×100) 图 7 正常耳蜗中顶转 OHC (扫描电镜 ×3 500) 图 8 正常耳蜗底转 OHC (扫描电镜 ×5 000)

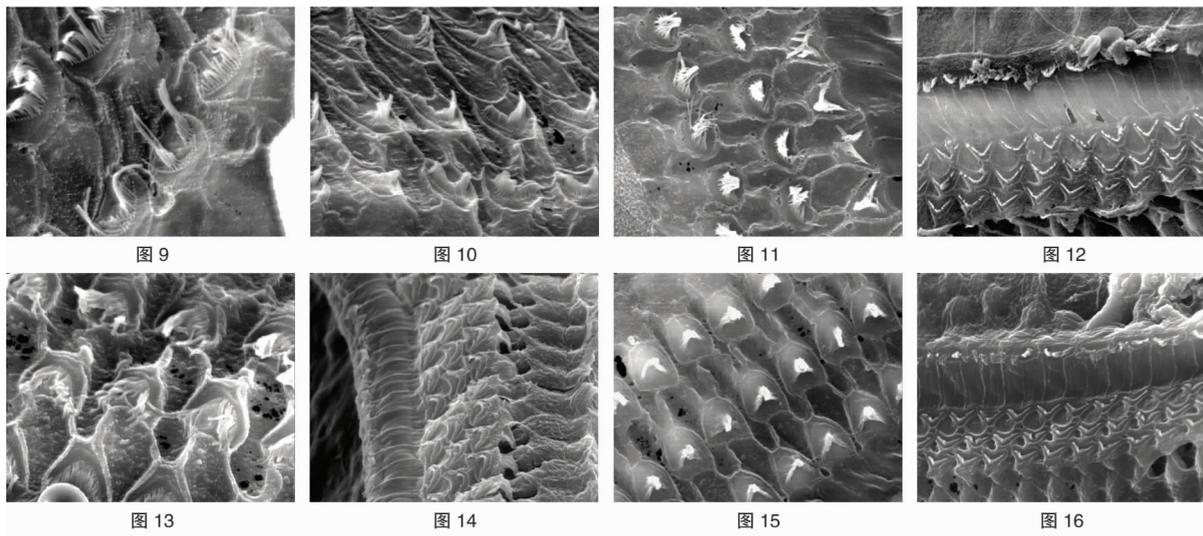


图 9

图 10

图 11

图 12

图 13

图 14

图 15

图 16

图 9 DBI 1 周中顶转纤毛排列紊乱,脱落明显(扫描电镜 × 5 000) 图 10 DBI 1 周底转纤毛部分排列紊乱(扫描电镜 × 5 000) 图 11 DBI 2 周中顶转纤毛排列紊乱倒伏,聚集(扫描电镜 × 3 000) 图 12 DBI 2 周底转纤毛排列尚齐部分分离或聚集(扫描电镜 × 2 000) 图 13 DBI 3 周中顶转纤毛排列紊乱(扫描电镜 × 5 000) 图 14 DBI 3 周底转纤毛部分排列紊乱(扫描电镜 × 2 000) 图 15 DBI 4 周中顶转纤毛排列整齐可见聚集(扫描电镜 × 3 000) 图 16 DBI 4 周底转纤毛排列整齐(扫描电镜 × 2 000)

2.3 ABR V 波阈值、40Hz AERP 及 ASSR 测试结果

正常对照组与 DBI 各组听觉功能测试结果,经单因素方差分析,正常对照组与 DBI 各组组间比较差异均具有统计学意义 $P < 0.05$ (表 1),DBI 后 1 周组与 2 周组之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 3、4 周组比较,具有统计学意义 ($P < 0.01$),除 DBI 后 3 周组 V 波阈值外,2 周组与 3、4 周组比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 周组与 4 周组组间比较,除 ASSR 1kHz 具有统计学意义外,

其他各组均无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

2.4 HO-1 GV 值分析

正常对照组与 DBI 各组内耳 HO-1 GV 值结果,经单因素方差分析,正常对照组与 DBI 各组组间比较均有统计学意义 ($P < 0.01$)。DBI 1 周组与 2 周组 SGC 组间比较,差异具有统计学意义;与 3、4 周组组间比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);DBI 2 周组与 3、4 周组组间比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);3 周组与 4 周组比较 OHC、IHC 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$,表 2)。

表 1 各组听觉功能测试结果 (dBHL, $\bar{x} \pm s$)

	耳数	ABR V 波阈值	40Hz AERP	ASSR 0.5 kHz	ASSR 1 kHz	ASSR 2 kHz	ASSR 4 kHz
正常对照组	60	1.17 ± 2.13	2.50 ± 2.68	51.50 ± 9.36	31.67 ± 12.10	22.67 ± 12.60	22.83 ± 8.04
1 周组	60	18.50 ± 7.83	36.17 ± 8.90	83.00 ± 14.06	77.17 ± 15.19	62.50 ± 16.74	53.50 ± 15.27
2 周组	60	18.42 ± 8.81	33.92 ± 8.34	81.00 ± 11.89	73.50 ± 16.03	61.17 ± 16.88	51.67 ± 16.17
3 周组	60	16.00 ± 7.12 ^a	30.08 ± 7.45 ^{ab}	76.00 ± 9.78 ^{ab}	65.33 ± 17.32 ^{ab}	53.00 ± 17.40 ^{ab}	43.50 ± 10.22 ^{ab}
4 周组	60	14.58 ± 6.78 ^{ab}	27.83 ± 10.39 ^{ab}	74.17 ± 9.26 ^{ab}	59.33 ± 18.49 ^{abc}	50.17 ± 16.10 ^{ab}	39.50 ± 8.72 ^{ab}
<i>F</i>		3.749	10.782	7.922	13.719	7.805	15.697
<i>P</i>		0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ^a 代表 1 周组; ^b 代表 2 周组; ^c 代表 3 周组

表2 正常对照组与外伤各组 HO-1 GV 值组间比较 ($\bar{x} \pm s$)

	耳数	OHC HO-1	IHC HO-1	SGC HO-1
正常对照组	60	203.80 ± 8.70	202.48 ± 8.22	200.00 ± 13.57
1 周组	60	91.80 ± 7.01	94.50 ± 12.05	94.23 ± 11.13
2 周组	60	95.95 ± 14.54	97.83 ± 12.70	99.41 ± 13.02 ^a
3 周组	60	100.88 ± 14.82 ^{ab}	103.45 ± 17.01 ^{ab}	106.01 ± 15.11 ^{ab}
4 周组	60	106.43 ± 16.52 ^{abc}	108.58 ± 16.00 ^{abc}	110.47 ± 13.78 ^{ab}
<i>F</i>		12.718	10.876	17.284
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

注:^a代表1周组;^b代表2周组;^c代表3周组

2.5 ABR V波阈值、40Hz AERP、ASSR 与 IHC、OHC、SGC HO-1 GV 值的相关性分析

经 Pearson 检验相关性分析,可见 IHC、OHC、SGC 中 HO-1 GV 值在 DBI 1、2 周组与 ABR V波阈值、40Hz AERP、ASSR 0.5、1 kHz 具有相关性(r 值范围为0.394 ~ 0.892, $P < 0.01$)。在个别频率40 Hz AERP、ASSR 0.5、

1 kHz, r 值范围为 0.233 ~ 0.327, $P < 0.05$ 。IHC、OHC、SGC 中 HO-1 GV 值在 3、4 周组除与 ABR V波阈值、40Hz AERP、ASSR 0.5、1 kHz、低频区有相关性外,在 ASSR 2、4 kHz 高频区也具有相关性; r 值范围为 0.284 ~ 0.905。但在 4 周组 40Hz AERP、ASSR 4 kHz IHC、SGC 无相关性(表 3 ~ 5)。

表3 ABR V波阈值、40Hz AERP、ASSR 与 IHC HO-1 的相关性分析 (r)

	正常对照组	1 周组	2 周组	3 周组	4 周组
ABR V波阈值	-0.149	0.872 ^a	0.622 ^a	0.445 ^a	0.403 ^a
40Hz AERP	-0.174	0.455 ^a	0.394 ^a	0.609 ^a	0.059
ASSR					
0.5 kHz	-0.173	0.418 ^a	0.560 ^a	0.325 ^b	0.336 ^a
1 kHz	0.046	0.476 ^a	0.367 ^a	0.526 ^a	0.532 ^a
2 kHz	-0.19	0.216	0.223	0.905 ^a	0.874 ^a
4 kHz	0.071	0.18	0.194	0.699 ^a	0.159

注:^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

表4 V波阈值、40Hz AERP、ASSR 与 OHC HO-1 的相关性分析 (r)

	正常对照组	1 周组	2 周组	3 周组	4 周组
ABR V波阈值	0.046	0.829 ^a	0.507 ^a	0.635 ^a	0.892 ^a
40Hz AERP	-0.036	0.468 ^a	0.233 ^b	0.680 ^a	0.527 ^a
ASSR					
0.5 kHz	-0.003	0.447 ^a	0.438 ^a	0.205	0.326 ^b
1 kHz	-0.011	0.472 ^a	0.267 ^b	0.317 ^b	0.834 ^a
2 kHz	-0.025	0.213	0.177	0.427 ^a	0.413 ^a
4 kHz	0.053	0.185	0.116	0.566 ^a	0.284 ^b

注:^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

表 5 ABR V 波阈值、40Hz AERP、ASSR 与 SGC HO-1 的相关性分析(r)

	正常对照组	1 周组	2 周组	3 周组	4 周组
ABR V 波阈值	0.199	0.672 ^a	0.604 ^a	0.434 ^a	0.394 ^a
40Hz AERP	0.221	0.396 ^a	0.273 ^b	0.611 ^a	0.121
ASSR					
0.5 kHz	-0.057	0.327 ^b	0.533 ^a	0.297 ^b	0.381 ^a
1 kHz	0.184	0.253 ^b	0.432 ^a	0.541 ^a	0.524 ^a
2 kHz	0.255	0.166	0.168	0.888 ^a	0.792 ^a
4 kHz	-0.003	0.244	0.222	0.694 ^a	0.098

注: ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

3 讨论

近年来,血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)的生理作用,特别是在脑损伤后血红素加氧酶系统所具有的保护和损害双重作用备受关注,但 DBI 对耳蜗听力学的影响,从 HO 角度进行的基础研究国内外鲜见报道。HO-1 是分解血红素的起始酶和限速酶,它在生物体许多组织中广泛表达,发挥着重要的生物学功能。HO-1 催化血红素生成气体介质一氧化碳、铁和胆绿素。胆绿素和它的代谢产物胆红素都是有效的抗氧化剂,同时铁诱导的铁蛋白和一氧化碳也发挥着各自的保护作用。当 DBI 后常合并有不同程度的听功能下降,有报道外伤合并听觉损害的比例为 7% ~ 50%^[4]。客观评估伤后听功能损伤程度,对于伤后听力损失的早期干预、治疗、康复以及听力伤残等级的鉴定等都有其重要意义,目前临床上多采用纯音测听、ABR、40Hz AERP 等相关主客观听力测试来综合考量评估听力损失情况,但在听力损失评估中,纯音测听检查受其损伤时间、主观因素影响较大,故增加了评估难度,有学者认为 ABR 是客观评价听觉行为阈值的一种技术,不受人为因素影响,有很强的可靠性和较高的准确性。V 波是 ABR 各波中最后消失的波,故 V 波的阈值可用于估测听阈,识别伪聋^[5],但是由于 ABR 检查的反应阈仅作为频率 2 ~ 4 kHz 范围听力的指标,用于评定言语频率的听觉功能状态受到一定限制,不能对低频听阈进行有效评估^[6],40Hz 稳态诱发电位虽能较好反应低频区听力损失,但很难对高频区听力损失做出评估和判断,因此两者均各有其局限性。笔者

应用 ASSR 对 DBI 后听功能改变进行了观察,发现正常对照组 ASSR 0.5 ~ 4 kHz 阈值分别为 51.50、31.67、22.67、22.83 dB,明显高于 ABR、40Hz 阈值,国内陶征等^[7]报道,正常听力成年人的 ASSR 反应阈在 39.29 ~ 43.64 dB,本研究结果与其基本相似,ABR、40Hz AERP 阈值(分别为 1.17、2.50 dB),笔者在外伤后各组所测阈值中去除正常对照组阈值后对比发现,外伤后 40Hz AERP 和 ASSR 0.5 Hz 两者听力损失平均差值为 2.46 dB;与 ASSR 1 kHz 两者听力损失平均差值为 7.66 dB。ASSR 高频的 2、4 kHz 与 V 波阈值之间平均差值,前者为 17.17 dB,后者为 7.34 dB。发现外伤后在不同的听力检测方法测试结果中,多个同频率区段听力损伤程度存在着一致性,曾国庆等^[8]证明,ASSR 的测试结果与纯音听阈无论在听力损失者还是听力正常者都有一定的相关性。经数据观察笔者认为 3 种听力检测方法,存在互补与相互印证及准确评估伤后听力损伤程度的可行性。因此,了解和掌握客观听觉功能检查方法之间的互补性及差异性至关重要。

观察发现 DBI 除造成听力损伤导致听力下降外,同时也可导致耳蜗细胞的形态学结构发生改变与耳蜗组织细胞内代谢的变化,实验中 HO-1 的免疫组化检测和扫描电镜结果能够充分说明这种变化的存在。当外伤导致 SD 大鼠听力损伤最为明显的 1 周时,HO-1 的表达上调最为明显,但随着损伤时间的延长,当听力相对有所恢复时 HO-1 表达则也相应的呈现表达下降,统计发现正常对照组及外伤各组听力阈值改变的组间比较,与 IHC、OHC、SGC 中 HO-1 表达的组间比较结果相互吻合,均显示

(下转第 344 页)