

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201306007

· 论著 ·

新生小鼠耳蜗基底膜体外培养的实验研究

陈杰, 高下

(南京大学医学院附属南京鼓楼医院耳鼻咽喉科, 江苏南京 210008)

摘要: **目的** 建立可靠的新生小鼠离体耳蜗基底膜的培养方法, 为内耳的研究提供新的条件和模型。**方法** 在显微镜下完整分离出新生1~5 d小鼠的耳蜗基底膜组织, 采用组织贴壁法在无血清培养基中进行培养, 免疫荧光法检测新生小鼠离体耳蜗基底膜培养组织中毛细胞及螺旋神经元的生长状态。**结果** 新生小鼠耳蜗基底膜离体培养24 h后, 显微镜下观察可见基底膜贴壁生长良好, 外周有新生上皮细胞和成纤维细胞长出; 高倍显微镜下可见耳蜗内外毛细胞和支持细胞等结构; 免疫荧光法检测可见毛细胞和螺旋神经元生长良好, 并能保持较长一段时间。**结论** 组织贴壁法无血清培养新生小鼠离体耳蜗基底膜是一种理想的耳科实验造模方法。

关键词: 小鼠; 耳蜗; 柯替器; 组织培养; 毛细胞; 螺旋神经元

中图分类号: R338.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2013)06-0505-04

In vitro cultivation of basilar membrane of cochlea from neonatal mouse

CHEN Jie, GAO Xia

(Department of Otorhinolaryngology, Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To establish a reliable method for tissue culture of basilar membrane of cochlea from neonatal mouse. **Methods** The basilar membrane of cochlea was acquired from neonatal mouse with (the method of) microdissection. Then, the tissue was cultured in serum-free culture medium. Finally, the activities of the hair cells and the spiral ganglions were detected with immunofluorescence. **Results** Twenty-four hours after tissue cultivation, new epithelia and fibroblasts were found around the tissue. Inner and outer hair cells, supporting cells and spiral ganglions grew well and could survive for a period of time. **Conclusion** Adherent cultivation of basilar membrane of cochlea in serum-free medium is an ideal method for otology research.

Key words: Mouse; Cochlea; Organ of Corti; Tissue cultivation; Hair cell; Spiral ganglion

耳蜗基底膜的离体培养研究是耳科实验研究的一种重要方法, 通过体外组织培养法建立起的体外耳蜗基底膜模型系统, 可进行许多受条件限制或不能在体内进行的实验研究, 其培养条件和方法无疑具有重要的意义。以往已有学者^[1]对新生大鼠的离体耳蜗基底膜的体外培养进行了报道, 并对其毛细胞的活性进行了检测^[2-3], 本实验报道了新生小鼠的离

体耳蜗基底膜的体外培养条件和方法, 并对新生小鼠离体耳蜗基底膜培养组织中毛细胞及螺旋神经的生长状态进行了检测。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

C57/B6小鼠(南京大学模式动物研究所); DMEM (SH30022-01, hyclone)、serum-free supplement (I-1884, sigma)、20%葡萄糖(G-2020, sigma)、谷氨酰胺(G-6392, sigma)、青霉素G(P-3414, sigma); 鼠尾胶(重庆吉盛); 肌

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30973302); 江苏省科教兴卫工程医学重点人才基金(RC2007010); 南京市医学重点科技发展项目(201108019)。

作者简介: 陈杰, 男, 硕士, 副主任医师

通讯作者: 高下, Email: xiagao213@yahoo.com.cn

球蛋白 VIIa 免疫荧光的 I 抗为兔抗肌球蛋白 VIIa (ab3481, abcam), II 抗为 CY3-绵羊抗兔(南京大学模式动物研究所);神经微丝免疫荧光的 I 抗为小鼠抗神经微丝(ab3966, abcam), II 抗为 FITC-山羊抗小鼠(南京大学模式动物研究所);Confocal 显微镜(Leica);荧光显微镜(E800, Nikon)。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠尾胶包被培养皿 取鼠尾胶适量加入到 35 mm 培养皿中,使胶淹没整个培养皿底部,然后在培养箱内放置约 1 h 后,吸干培养皿内鼠尾胶,再以 PBS 冲洗,自然晾干,备用。

1.2.2 新生小鼠耳蜗基底膜的解剖与取材 取新生 1~5 d 的 C57/B6 小鼠,75% 乙醇浸泡消毒,眼科剪断头,剪开颅骨,去除脑组织,剪下颞骨部分,移入 PBS 培养液,去除多余组织及骨质,打开听泡,剥去蜗壳,用游丝镊沿蜗轴环行分离螺旋韧带,取下整个耳蜗基底膜组织,用尖刀切取基底膜片段。

1.2.3 无血清培养液的配置 96.4 ml DMEM、1 ml serum-free supplement、2.4 ml 20% 葡萄糖、1 ml 谷氨酰胺、0.2 ml 青霉素 G 配成 100 ml 无血清培养液。

1.2.4 离体耳蜗基底膜的培养 将切取的基底膜片段置于已经包被了鼠尾胶的 35 mm 培养皿中,组织块周围滴加数滴无血清培养液,培养箱内预孵 20 min 后取出,以使之贴壁良好,再加入无血清培养液,放回 37℃ CO₂ 培养箱中培养,以后隔日换培养液。

1.2.5 离体耳蜗基底膜生长状态的观察 培养 1 d 或数天后通过显微镜的低倍视野和高倍视野或通过 Confocal 显微镜观察离体耳蜗基底膜的生长状态。

1.2.6 离体耳蜗基底膜毛细细胞的检测 培养新生小鼠离体耳蜗基底膜 1 d 和 8 d 后,终止培养,行毛细细胞的标志蛋白肌球蛋白 VIIa 的免疫荧光检测,具体步骤如下:4% PFA 固定基底膜,经 0.3% TritonX-100 破膜和 5% BSA 封闭后,加稀释过的 I 抗:兔抗肌球蛋白 VIIa (1:500 稀释),放于湿盒,4℃ 过夜,经 PBS 清洗

后,加稀释过的 II 抗:CY3-绵羊抗兔(1:200 稀释),放于湿盒,避光,室温 2 h,经 PBS 清洗后,封片,荧光显微镜观察肌球蛋白 VIIa 表达情况,以了解离体耳蜗基底膜培养组织毛细细胞的情况。

1.2.7 离体耳蜗基底膜螺旋神经的检测 培养新生小鼠离体耳蜗基底膜 1 d 和 5 d 后,终止培养,4% PFA 固定基底膜,经 0.3% TritonX-100 破膜和 5% BSA 封闭后,加稀释过的 I 抗:小鼠抗神经微丝(1:800 稀释),使之完全覆盖基底膜,放于湿盒,4℃ 过夜,经 PBS 清洗后,加稀释过的 II 抗:FITC-山羊抗小鼠(1:500 稀释),放于湿盒,避光,室温 2 h,经 PBS 清洗后,封片,荧光显微镜观察拍照,以了解离体耳蜗基底膜培养组织螺旋神经的情况。

2 结果

2.1 新生小鼠耳蜗基底膜的离体培养

新生小鼠耳蜗基底膜无血清培养 24 h 后,在显微镜下观察,可见基底膜贴壁生长良好,外周有新生上皮细胞和成纤维细胞长出(图 1a),高倍显微镜或 Confocal 显微镜下可见耳蜗内外毛细胞和支持细胞等结构(图 1b)。

2.2 离体耳蜗基底膜培养组织毛细细胞的情况

新生小鼠耳蜗基底膜无血清培养 1 d 后,行毛细细胞的标志蛋白:肌球蛋白 VIIa 的免疫荧光检测,可见毛细胞呈荧光,没有毛细胞缺失的现象;培养 8 d 后,可见多数毛细胞仍存在,但也存在毛细胞缺失的现象:外毛细胞缺失较多,内毛细胞缺失很少,基底膜顶圈缺失较轻,底圈缺失较重;说明新生小鼠耳蜗基底膜无血清培养组织上的毛细胞能存活较长时间(图 2)。

2.3 离体耳蜗基底膜培养组织螺旋神经情况

新生小鼠耳蜗基底膜无血清培养 1 d 和 5 d 后,行神经微丝免疫荧光检测,可见螺旋神经微丝及螺旋神经节呈绿色荧光(图 3),说明新生小鼠耳蜗基底膜无血清培养组织上的螺旋神经能存活较长时间。

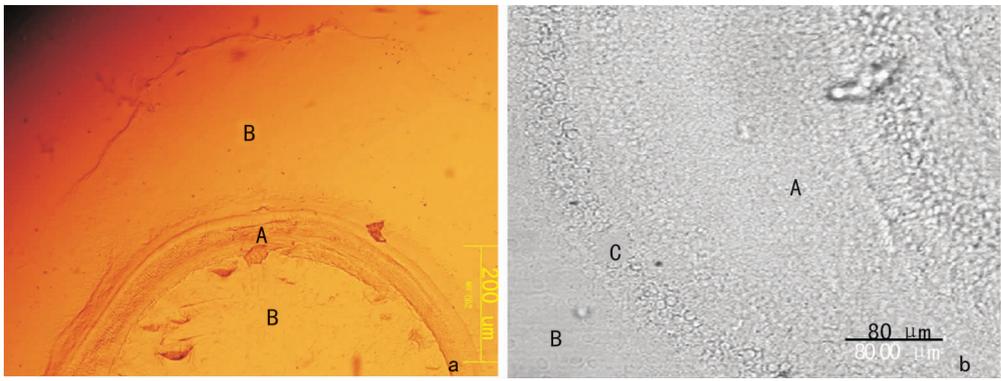


图1 耳蜗基底膜离体培养图 显微镜下可见基底膜(A)贴壁生长良好,外周有新生上皮细胞和成纤维细胞长出(B),并可见耳蜗内外毛细胞(C)

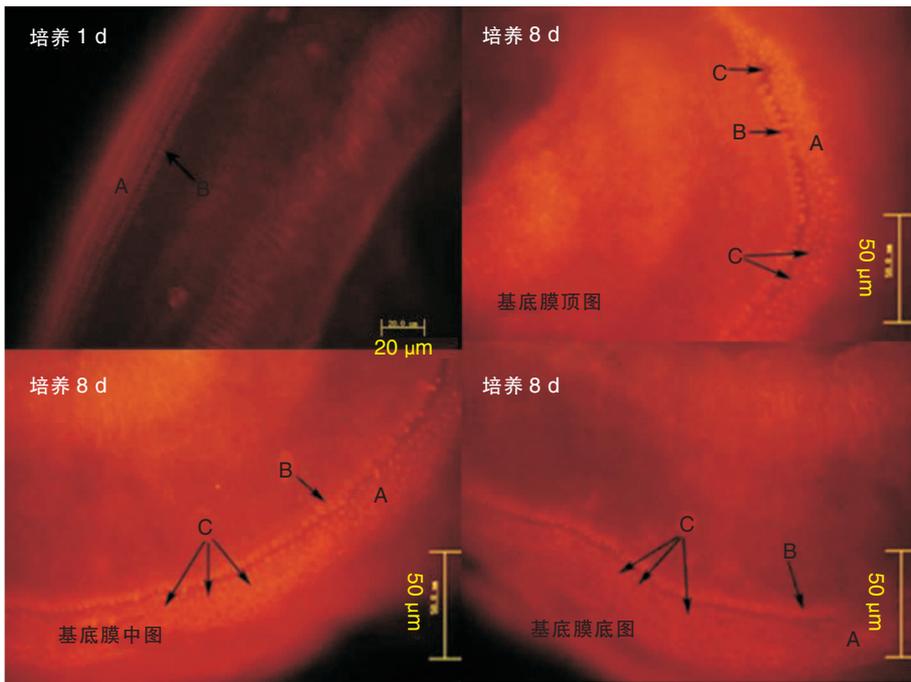


图2 耳蜗基底膜培养组织肌球蛋白VIIa的免疫荧光检测图 毛细胞呈荧光,其中三排外毛细胞(A),一排内毛细胞(B)。培养1 d,未见毛细胞缺失现象;培养8 d,多数毛细胞仍存在,但也存在毛细胞缺失的现象(C),外毛细胞缺失较多,内毛细胞缺失很少,基底膜顶圈缺失较轻,底圈缺失较重

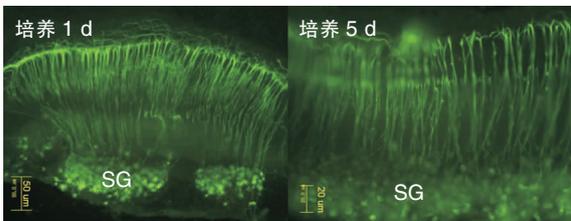


图3 耳蜗基底膜培养组织神经微丝的免疫荧光检测图 螺旋神经微丝及螺旋神经节(SG)呈绿色荧光。即使无血清培养5 d,螺旋神经仍能较多存在

3 讨论

既往内耳研究常采用在体造模法^[4],尽管其反映了活体状态,但也存在着造模困难、不方便实时观察动态观察等弊端。本实验成功建立了新生小鼠耳蜗基底膜的体外无血清培养方法,为耳科实验提供了一种好的体外耳蜗基底膜的模型系统,其具有下面优点:①保持了原有组织器官的组织结构特征,接近在体生活状

态;②易于施用各种物理、化学和生物因素,具有可控制性、易操作性;③便于使用相差显微镜、荧光显微镜等各种不同的技术方法来观察和研究,甚至可以使用摄影、电影和电视等方法进行记录^[5];④经济、耗资少,可提供大量生物性状相似的实验对象;⑤P1-5小鼠的耳蜗基底膜获取方法简单;⑥无血清培养技术可有效地消除血清培养基组成复杂的影响,通过增减培养基中的已知成分,达到筛选和分析的目的。

在这种体外耳蜗基底膜培养组织的模型系统中,毛细胞和螺旋神经都得到了良好的保存,并且能存活较长的时间。在本实验中,在耳蜗基底膜培养8d后,虽然观察到少数毛细胞的缺失,但多数毛细胞仍存在;而在耳蜗基底膜培养5d后,螺旋神经微丝的数量仍较多存在,与培养1d耳蜗基底膜培养组织上的螺旋神经微丝数没有太大差别;说明本离体耳蜗基底膜模型系统具有较好的稳定性。

在这种模型系统中,我们发现:毛细胞在培养8d后有少部分缺失的现象,并且发现:①外毛细胞缺失较多,内毛细胞缺失很少,这说明

外毛细胞更容易受到环境因素的损伤;②基底膜顶圈低频区缺失较轻,底圈高频区缺失较重,这说明底圈高频区的毛细胞更容易受到环境因素损伤,这与临床上感音性耳聋常见高频听力下降的现象一致。

参考文献:

- [1] 原红艳,李树华,李兴启.新生大鼠耳蜗柯替器体外培养的初步报告[J].听力学及言语疾病杂志,2005,13(1):53-54.
- [2] 原红艳,张淑香,李兴启,等.丫啶橙-碘化丙啶双染色法观察大鼠耳蜗基底膜毛细胞活性[J].听力学及言语疾病杂志,2006,14(5):377-378.
- [3] 丁大连,王坚,付勇,等.对灰鼠延迟性神经元死亡模型中螺旋神经节细胞缺损的评估[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2010,16(3):169-175.
- [4] 巴云鹏,董明敏,董民声,等.丁胺卡那霉素诱发豚鼠耳蜗外毛细胞凋亡的实验研究[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2001,7(2):11-13,68.
- [5] 董民声,董明,娄卫华.内耳疾病研究进展[M].郑州:河南医科大学出版,1993:408-412.

(修回日期:2013-09-04)

(上接第504页)

- Dorfman disease: involvement of eye, nose and trachea [J]. Acta Otolaryngol, 2006, 126(6): 657-660.
- [11] Hagemann M, Zbären P, Stauffer E, et al. Nasal and paranasal sinus manifestation of Rosai-Dorfman disease [J]. Rhinology, 2005, 43(3): 229-232.
 - [12] 温彬彬,管进,顾克明,等.鼻腔鼻窦结外 Rosai-Dorfman 病 1 例及文献复习 [J]. 中华现代眼耳鼻喉杂志, 2011, 6(4): 232-234.
 - [13] 许振跃,洪斌,林金成,等.以鼻出血为主要症状的鼻腔 Rosai-Dorfman 病 1 例 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科

杂志, 2012, 47(11): 955-956.

- [14] 陈琼荣,杨菲,王明伟,等. Rosai-Dorfman 病误诊为鼻硬结症 1 例 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 45(4): 338-339.
- [15] Mebazaa A, Trabelsi S, Denguezli M, et al. Extensive purely cutaneous Rosai-Dorfman disease responsive to acitretin [J]. International Journal of Dermatology, 2007, 46(11): 1208-1210.

(修回日期:2013-07-17)