

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201605006

# 一种豚鼠耳蜗内铅含量的检测方法

吴学文<sup>1</sup>, 覃艾球<sup>2</sup>, 张燕妮<sup>1</sup>, 杨涛<sup>1</sup>, 谢邵兵<sup>1</sup>, 徐震航<sup>1</sup>, 丁大连<sup>1</sup>, 孙虹<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科耳鼻咽喉重大疾病湖南省重点实验室, 湖南长沙 410008; 2. 国防科学技术大学校务部医院耳鼻咽喉科, 湖南长沙 410022)

**摘要:** **目的** 介绍一种豚鼠耳蜗内铅含量的检测方法。**方法** 将10只成年豚鼠按数字随机法分成实验组及对照组(每组5只动物), 实验组用含浓度为2 mmol/L醋酸铅的纯净水喂养1个月, 对照组用不含醋酸铅的纯净水喂养1个月。实验结束时用10%水合氯醛溶液麻醉豚鼠后采血2 ml送检, 并在显微镜下解剖出耳蜗基底膜及螺旋韧带并用65%~68%浓硝酸溶解, 在原子吸收光谱仪中分别检测血铅及耳蜗组织中铅含量, 然后对两组结果进行对比分析。**结果** 实验组与对照组的血铅浓度分别为(73.26 ± 12.06)、(5.53 ± 1.25) μg/dL, 实验组血铅浓度明显增高, 与对照组比较其差异具有统计学意义( $t = 12.49, P < 0.001$ ); 实验组与对照组耳蜗内铅含量分别为(25.87 ± 14.60)、(29.31 ± 11.70) μg/g, 两组之间比较差异无统计学意义( $t = 0.74, P > 0.05$ )。**结论** 通过原子吸收光谱法检测豚鼠耳蜗内铅含量是一种简单有效的定量检测耳蜗内铅含量的方法。

**关键词:** 耳蜗; 铅含量检测; 原子吸收光度法; 豚鼠

中图分类号: Q95-3; R764.35 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2016)05-0362-04

## A method of detecting lead concentration in guinea pig cochlea

WU Xue-wen, QIN Ai-qi, ZHANG Yan-ni, YANG Tao, XIE Shao-bing, XU Zhen-hang, DING Da-lian, SUN Hong  
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To introduce a method for detection of lead concentration in guinea pig cochlea. **Methods** 10 adult guinea pigs with normal hearing were randomly divided into 2 groups (control and experimental group,  $n = 5$ ). They were fed 0 mmol/L or 2 mmol/L lead acetate water for one month, respectively. The blood and cochlear basal membrane as well as spiral ligament were harvested, and the cochlear tissues were dissolved in 65% to 68% nitric acid solution. After that, the lead concentrations of dissolved cochlear tissue and blood were measured by atomic absorption spectrophotometry. **Results** The blood lead concentrations of the control and the experimental groups were (5.53 ± 1.25) μg/dL and (73.26 ± 12.06) μg/dL respectively, and the difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). The cochlear lead concentrations of both groups were (29.31 ± 11.70) μg/g and (25.87 ± 14.60) μg/g respectively, and the difference was statistically insignificant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Detection of cochlear lead concentration by absorption spectrophotometry is a simple and useful quantitative assessment of lead concentration in cochlea.

**Key words:** Cochlea; Concentration detection of lead; Atomic absorption spectrophotometry; Guinea pig

铅污染已成为危害社会公众健康的一大全球性问题。近期美国密歇根州的弗林特市(Flint, Michigan)发生大范围的饮用水铅污染事件再次引起公众对铅污染的密切关注, 该事件导致该地区儿童的血

铅水平较饮用水铅污染前水平升高1倍以上<sup>[1]</sup>。铅进入人体后对全身各器官和系统均有毒性作用, 主要累及中枢神经系统引起认知和行为功能损害<sup>[1-2]</sup>。此外, 急性或慢性铅暴露可引起或加重人类及动物的听力损失<sup>[3-8]</sup>。但铅所致的听力损害具体机制未完全阐明, 短期或长期铅暴露后, 耳蜗内是否存在铅的聚积也不清楚。目前血铅的检测方法已经十分成熟, 但耳蜗内铅含量的定量检测方法仍未见有学者报道。鉴于此, 为更好的研究铅耳毒性的

基金项目: “973”国家重大科学研究计划项目(2014CB943003); 国家自然科学基金面上项目(81170912); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81300819)。

作者简介: 吴学文, 男, 博士, 主治医师。

通信作者: 孙虹, Email: shjhaj@vip.163.com

相关作用机制,我们探索出一种简单有效的定量检测耳蜗内铅含量的方法,现介绍如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与分组

健康成年黑目花色豚鼠 10 只,购自中南大学湘雅医学院动物实验中心,体重均在 200 ~ 220 g,雌雄不限,外耳道干净,鼓膜标志明显,对声刺激反应灵敏。按数字随机法分成对照组与实验组(每组 5 只动物),实验组用含浓度为 2 mmol/L 醋酸铅的纯净水喂养 1 个月,对照组用不含醋酸铅的纯净水喂养 1 个月。所有动物均在同一环境里饲养(SPF 级),食物供应一致。

### 1.2 血样采集

在实验结束时所有动物均用 10% 水合氯醛溶液(中南大学湘雅医院自制)腹腔注射麻醉。麻醉成功后抽取豚鼠心脏内血液标本 2 ml 送检。

### 1.3 耳蜗标本处理

麻醉成年豚鼠后用生理盐水进行心脏灌注,再快速断头处死取出颞骨、打开听泡暴露耳蜗,即刻在显微镜下进行解剖分离耳蜗基底膜及螺旋韧带,其具体方法详见<sup>[9-11]</sup>。收集耳蜗基底膜及螺旋韧带组织于圆形滤纸上晾干,电子天平称重后,用 1.5 ml 的 EP 管盛装,加入 0.6 ml 浓度为 65% ~ 68% 的浓硝酸充分溶解 7 d 至溶液清亮后用浓硝酸定容至 1 ml,然后送检。

### 1.4 铅含量检测方法

采用 BH2101S 型钨舟原子吸收光谱仪(北京博晖创新光电技术股份有限公司)进行铅含量检测。取待检测标本 40  $\mu$ l,加入专用稀释液中摇匀后放入 4℃ 的恒温冰箱保存,2 d 内完成检测。检测含铅样品的采集参照卫医发(2006)10 号《血铅临床实验技术规范》执行,实验室严格按照卫医发(2006)73 号《医疗机构临床实验管理办法》的通知实施管理,检测过程中采用国家质量监督检验检疫总局批准 GBW(E)090033 - 090036《全血铅成分分析标准物质》鉴定、校正和评价和分析样品中铅元素的分析方法的可靠性及数据的准确性。

### 1.5 统计学方法

所有获得的血铅及耳蜗铅含量数据均输入 GraphPad Prism 5 软件系统,应用 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

实验组动物在饮用铅水 1 个月后,其平均的血铅浓度为  $(73.26 \pm 12.06) \mu\text{g/dL}$ ;而对照组的平均血铅浓度分别为  $(5.53 \pm 1.25) \mu\text{g/dL}$ ;与对照组比较,实验组平均血铅浓度明显升高并且较对照组升高 10 倍以上,其差异比较具有统计学意义( $t = 12.49, P < 0.001$ )。实验组动物在饮用铅水 1 个月后,其耳蜗组织中铅含量在 10.50 ~ 44.10  $\mu\text{g/g}$ ,平均值为  $(25.87 \pm 14.60) \mu\text{g/g}$ ;而对照组的耳蜗组织中铅含量为 11.25 ~ 42.14  $\mu\text{g/g}$ ,平均值为  $(29.31 \pm 11.70) \mu\text{g/g}$ ;与对照组比较,实验组动物的耳蜗组织平均铅含量并无明显升高,反而稍有下降,但两组之间比较耳蜗内铅含量差异无统计学意义( $t = 0.74, P > 0.05$ ),如表 1 所示。由此说明,在铅暴露 1 个月内,铅进入成年豚鼠体内后,由于血迷路屏障的存在,铅并未在耳蜗组织内出现明显的聚积。

表 1 实验组与对照组中血铅及耳蜗内铅含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	血铅浓度( $\mu\text{g/dL}$ )	耳蜗内铅含量( $\mu\text{g/g}$ )
实验组	5	$73.26 \pm 12.06$	$25.87 \pm 14.60$
对照组	5	$5.53 \pm 1.25$	$29.31 \pm 11.70$
<i>t</i>		12.49	0.74
<i>P</i>		<0.001	>0.05

## 3 讨论

铅作为一种不可降解重金属污染物,可在自然环境中长期存在,进入机体内后无法进行有效的分解代谢,铅可长期蓄积在人体内,对全身各器官和系统造成毒性作用。许多研究均证实铅暴露可以引起听觉功能损伤,铅对听觉神经系统具有毒性已基本明确,但其具体机制仍未完全清楚,并且铅毒性对外周听觉器官如耳蜗基底膜毛细胞、蜗管外侧壁血管纹等组织细胞是否存在毒性作用仍存在一定的争议<sup>[4]</sup>。林建云等<sup>[6]</sup>研究发现成年豚鼠经隔日一次腹腔注射 0.25% 醋酸铅溶液 40 mg/kg,共 7 次后在停药 1 周就已出现耳蜗外毛细胞的损害。Liu 等<sup>[8]</sup>研究显示铅暴露 8 周后可以引起大鼠和豚鼠的耳蜗外毛细胞的形态改变及缺失,同时血管纹上内皮细胞与边缘细胞之间的紧密连接出现破裂与缺失。然而其他作者则发现一定时间内铅暴露并未引起耳蜗

外毛细胞的损伤, Buchanan 等<sup>[7]</sup>对 53 例铅暴露儿童进行血铅及 DPOAE 检测,发现铅暴露儿童与对照儿童的 DPOAE 幅值比较无统计学差异。王卫国等对 100 例无神经系统阳性体征的铅中毒儿童进行纯音测听及 DPOAE 检测时,发现患儿纯音测听及 DPOAE 均正常,提示耳蜗毛细胞不受影响<sup>[5]</sup>。同样,本课题组前期在体外培养实验中发现高浓度铅( $\geq 2$  mmol/L)持续暴露 72 h 后新生大鼠的耳蜗螺旋神经节细胞已出现明显的凋亡,但耳蜗外毛细胞仍无明显损害<sup>[3]</sup>。由此可见,如果能在实验过程中检测出耳蜗内铅含量的变化,结合耳蜗内的形态学观察指标及听功能数据,可以更加有力的确认铅暴露对耳蜗组织细胞的影响。

既往研究已证实,血-迷路屏障的关键部位(血管纹、螺旋韧带)在形态与功能上与血-脑屏障相似<sup>[12-13]</sup>。血-脑屏障由脑毛细血管内皮细胞、基膜和神经胶质膜构成。脑的毛细血管内皮细胞之间以封闭小带封闭,内皮外有基板、周细胞及星形胶质细胞突起的脚板围绕;血-迷路屏障在结构上只依赖内耳毛细血管内皮细胞的紧密连接相关蛋白和内皮内活跃的胞饮颗粒。血管纹主要由边缘细胞、中间细胞和基底细胞构成,中间细胞之间贯穿着数量众多的毛细血管网。边缘细胞是阻挡外界物质进入内淋巴液的天然屏障,而基底细胞是阻挡外界物质进入外淋巴液的天然屏障<sup>[13]</sup>。由于药物通过血迷路屏障主要通过弥散作用<sup>[14-15]</sup>,因此有毒物质进入机体后,若要到达耳蜗基底膜的 Corti's 器部位需要经过多个环节,首先需要进过血液循环达到内耳的终末动脉及其毛细血管网,然后经相关离子转运蛋白转运方式或胞饮方式穿越毛细血管壁到达毛细血管外,再穿透边缘细胞层或基底细胞层才能进入内淋巴液或外淋巴液,最后对浸泡在外淋巴中的毛细胞胞体或浸于内淋巴液中的纤毛及表皮板产生毒害作用。本实验中,我们发现实验组平均血铅浓度高于对照组平均血铅浓度 10 倍以上,由此说明铅暴露后 1 个月时,铅浓度在血液中已经出现明显升高;然而正常对照组豚鼠耳蜗内平均铅含量与实验组耳蜗内铅含量水平大致相当,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),该结果说明,此时铅并未在耳蜗组织中明显聚积。因此,在本实验中,我们推测其耳蜗组织中未出现明显铅聚积的原因可能与血-迷路屏障的存在以及耳蜗内、外淋巴液离子交换有关,血-迷路屏障对避免铅在耳蜗内的聚积及对耳蜗毛细胞的损伤起到了重要的保护作用,但其具体机制尚需进一步研

究。我们还推测铅暴露后,铅对骨骼、肝脏、肾脏、心脏等其他器官或脏器的损害作用要早于对内耳的损害作用。

耳蜗是一个精密的听觉感受器官,耳蜗内微量元素的动态变化对听觉的感受起着重要的调节作用。由于耳蜗器官细小并且耳蜗内组织量较少,检测耳蜗内相关微量元素的含量存在一定的困难。近期,国外有学者首次用电感耦合等离子体质谱仪(inductively coupled plasma mass spectrometry)定量检测出成年大鼠耳蜗内锰、铁及锌的含量<sup>[16]</sup>。到目前为止,仍未有其他相关文献报道耳蜗内铅含量的检测方法。本课题组经过反复探索,利用钨舟原子吸收光谱仪测得成年豚鼠耳蜗内的铅含量,与前述国外学者用电感耦合等离子体质谱仪所检测耳蜗内微量元素检测的精确度大致相当,均在微克水平。经过本课题的反复验证,该方法简便有效,是一种耳蜗内铅含量的可靠定量检测方法。

#### 参考文献:

- [1] Hanna-Attisha M, LaChance J, Sadler RC, et al. Elevated Blood Lead Levels in Children Associated With the Flint Drinking Water Crisis: A Spatial Analysis of Risk and Public Health Response [J]. *Am J Public Health*, 2016, 106(2): 283-290.
- [2] Hanna-Attisha M, Kuehn BM. Pediatrician Sees Long Road Ahead for Flint After Lead Poisoning Crisis [J]. *JAMA*, 2016, 315(10): 967-969.
- [3] Wu X, Ding D, Hong Sun. Lead neurotoxicity in rat cochlear organotypic cultures [J]. *Journal of Otolaryngology*, 2011, 6(2): 45-52.
- [4] 吴学文, 王凤君, 孙虹. 铅对听觉系统毒性作用的研究进展 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 50(9): 790-792.
- [5] 王卫国, 王义明, 冯连栋. 铅中毒对学龄儿童听性脑干反应的影响 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2005, 40(12): 896-898.
- [6] 林建云, 陈泉东, 郭亚丽, 等. 铅暴露对豚鼠耳蜗毛细胞损害的定量分析 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2007, 15(6): 472-474.
- [7] Buchanan LH, Counter SA, Ortega F. Environmental lead exposure and otoacoustic emissions in Andean children [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2011, 74(19): 1280-1293.
- [8] Liu X, Zheng G, Wu Y, et al. Lead exposure results in hearing loss and disruption of the cochlear blood-labyrinth barrier and the protective role of iron supplement [J]. *Neurotoxicology*, 2013, 39(2): 173-181.
- [9] 高可雷, 李鹏, 蒋海燕, 等. 大鼠内耳解剖结构及其取材技术 [J]. *中华耳科学杂志*, 2015, 13(1): 18-24.

(下转第 369 页)