

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202290001

· 耳科学专栏 ·

实验动物前庭感觉毛细胞的定量观察

丁大连^{1,2,3}, 李鹏², 亓卫东⁴, 张建辉³

(1. 纽约州立大学布法罗大学, 纽约 布法罗 14214; 2. 中山大学附属第三医院耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510230; 3. 成都市第三人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 成都 610014; 4. 复旦大学附属华山医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200040)

摘要: **目的** 测量常用实验动物内耳前庭感觉区的实际面积和量化分析前庭各个感觉区的毛细胞总数或密度。**方法** ①制作 CBA/CaJ 小鼠、裸鼠、SD 大鼠、豚鼠、南美栗鼠、新西兰白兔和非洲黑长尾猴的球囊斑铺片和椭圆囊斑铺片及壶腹嵴铺片, 所有铺片样品来自每种受试动物的 6 个颞骨, 在放大 100 倍的光学显微镜下拍摄 2 个囊斑铺片的整体照片; ②应用 Image J 软件的图像测量程序, 测量了上述 7 种常用实验动物球囊斑和椭圆囊斑的实际面积; ③用网格将球囊斑铺片和椭圆囊斑铺片照片上的前庭感觉区划分为一个个方块区域。在放大 400 倍的光学显微镜下准确计数每个方格内的毛细胞数量, 然后将每个方格的毛细胞计数结果相加以获得每种受试动物球囊斑和椭圆囊斑上的毛细胞总数; ④应用前庭小视野定量观察技术计算出前庭各个感觉区小视野范围内的毛细胞密度。**结果** ①从小鼠、裸鼠、大鼠、豚鼠、南美栗鼠、白兔到猴的球囊斑面积依次为(0.193 ± 0.009)、(0.216 ± 0.008)、(0.323 ± 0.010)、(0.528 ± 0.035)、(0.687 ± 0.065)、(1.237 ± 0.075)、(1.371 ± 0.032) mm²; 椭圆囊斑的面积依次为(0.193 ± 0.020)、(0.208 ± 0.013)、(0.321 ± 0.011)、(0.526 ± 0.034)、(0.795 ± 0.017)、(1.224 ± 0.082)、(1.388 ± 0.048) mm²; ②从小鼠、裸鼠、大鼠、豚鼠、南美栗鼠、白兔到猴的球囊斑毛细胞的总数依次为(2 476.3 ± 64.4)、(2 389.8 ± 47.8)、(3 135.3 ± 191.6)、(4 882.2 ± 208.7)、(6 128.5 ± 242.9)、(10 572.2 ± 464.4)、(10 992.7 ± 397.4) 个; 椭圆囊斑毛细胞的总数依次为(2 491.4 ± 54.8)、(2 368.0 ± 46.1)、(3 218.8 ± 82.9)、(4 925.3 ± 271.1)、(7 794.0 ± 386.1)、(11 347.4 ± 435.7)、(11 114.5 ± 410.6) 个; ③从小鼠、大鼠、豚鼠、南美栗鼠、白兔和猴的球囊斑微纹区和周边区的毛细胞密度(毛细胞数量/0.007 mm²)依次为 101.0 ± 5.79(微纹区)/120.8 ± 4.15(周边区), 95.5 ± 3.91(微纹区)/109.2 ± 5.26(周边区), 78.4 ± 6.54(微纹区)/94.8 ± 4.38(周边区), 60.0 ± 4.74(微纹区)/84.6 ± 2.61(周边区), 57.2 ± 3.83(微纹区)/80.0 ± 3.54(周边区), 53.8 ± 4.21(微纹区)/68.0 ± 4.18(周边区)。从小鼠、大鼠、豚鼠、南美栗鼠、白兔和猴的椭圆囊斑微纹区和周边区的毛细胞密度(毛细胞数量/0.007 mm²)依次为 103.8 ± 5.02(微纹区)/119.2 ± 3.70(周边区), 91.2 ± 2.49(微纹区)/106.4 ± 4.16(周边区), 74.1 ± 3.54(微纹区)/90.8 ± 3.56(周边区), 60.4 ± 4.98(微纹区)/81.6 ± 2.07(周边区), 57.8 ± 1.92(微纹区)/77.8 ± 3.70(周边区), 54.0 ± 2.74(微纹区)/66.4 ± 2.51(周边区)。从小鼠、大鼠、豚鼠、南美栗鼠、白兔和猴的壶腹嵴毛细胞密度(毛细胞数量/0.007 mm²)依次为 112.4 ± 6.38, 105.5 ± 3.51, 95.2 ± 3.42, 84.0 ± 7.16, 78.2 ± 2.86, 70.8 ± 2.39。可见由于体型较小动物毛细胞的细胞体比体型较大动物毛细胞的细胞体小, 因而体型较小动物的前庭毛细胞密度高于体型较大动物的前庭毛细胞密度。另外, 每种实验动物球囊斑和椭圆囊斑微纹区的毛细胞密度相似, 周边区的毛细胞密度也大致相同, 但是同种实验动物囊斑微纹区的毛细胞密度却低于周边区的毛细胞密度。此外, 壶腹嵴毛细胞的密度与球囊斑和椭圆囊斑周边区的毛细胞密度几乎相同。鉴于某些损害因素往往具有选择性破坏囊斑微纹区毛细胞的表现, 因此囊斑微纹区的毛细胞密度应该与囊斑周边区的毛细胞密度区分开来分别予以病理学改变的定量评估。**结论** 本研究采用的前庭测量方法和获得的前庭各个感觉区的测量数据和毛细胞总数及毛细胞密度, 为前庭病理学研究的定量分析提供了有益的参考经验和必要的参考数据。

关键词: 前庭; 球囊斑; 椭圆囊斑; 壶腹嵴; 毛细胞

中图分类号: R764.3

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82071050); 广州市科技计划项目(201803010093); 中山大学重点发展项目(201812281965); 四川省医学科研课题计划(S20006)。

第一作者简介: 丁大连, 男, 博士, 教授。

通信作者: 李鹏, Email: lp76@163.net; 张建辉, Email: zhangjianhuiok@163.com; 丁大连, Email: dding@buffalo.edu

Quantitative observation of vestibular sensory hair cells in experimental animals

DING Dalian^{1,2,3}, LI Peng², QI Weidong⁴, ZHANG Jianhui³

(1. State University of New York at Buffalo, NY 14214, USA; 2. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510230, China; 3. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610014, China; 4. Department of Otolaryngology head and neck surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective To measure the actual area of the vestibular sensory area in the inner ear of commonly used experimental animals and quantitatively analyze the hair cells of each sensory area of the vestibule from the perspective of histopathological observation. **Methods** ①The macula of saccule, macula of utricle, and crista of ampulla were prepared as flat surface preparations in experimental animals of CBA/CaJ mice, nude mice, SD rats, guinea pigs, chinchillas, New Zealand white rabbits and African vervet monkeys. All samples were obtained from 6 temporal bones of each tested animal species. The photographs of each vestibular end-organs were taken under a light microscope at 100X magnification. ②Using the ImageJ software, the actual areas of the macula of saccule and the macula of utricle were measured in above seven experimental animals. ③A grid was used to divide the vestibular sensory areas of macula of saccule and macula of utricle on the photos into several square areas. The number of hair cells in each grid was accurately counted under the magnified image, and the hair cell counts in each grid were then summed to obtain the total number of hair cells in the macula of saccule and macula of utricle. ④The hair cell density was also calculated within the small visual field of each sensory area of the vestibule end-organs. **Results** ①The areas of macula of saccule from CBA/CaJ mice, nude mice, rats, guinea pigs, chinchillas, white rabbits to monkeys were (0.193 ± 0.009) , (0.216 ± 0.008) , (0.323 ± 0.01) , (0.528 ± 0.035) , (0.687 ± 0.065) , (1.237 ± 0.075) , (1.371 ± 0.032) mm²; and the areas of macula of utricle from above animal sequence were (0.193 ± 0.02) , (0.208 ± 0.013) , (0.321 ± 0.011) , (0.526 ± 0.034) , (0.795 ± 0.017) , (1.224 ± 0.082) , (1.388 ± 0.048) mm²; ②The total number of hair cells in the macula of saccule from mouse, nude mouse, rat, guinea pig, chinchilla, white rabbit to monkey were $2\,476.3 \pm 64.4$, $2\,389.8 \pm 47.8$, $3\,135.3 \pm 191.6$, $4\,882.2 \pm 208.7$, $6\,128.5 \pm 242.9$, $10\,572.2 \pm 464.4$, $10\,992.7 \pm 397.4$. The total number of hair cells in macula of utricle from above animal sequence were $2\,491.4 \pm 54.8$, $2\,368.0 \pm 46.1$, $3\,218.8 \pm 82.9$, $4\,925.3 \pm 271.1$, $7\,794.0 \pm 386.1$, $11\,347.4 \pm 435.7$, $11\,114.5 \pm 410.6$; ③The hair cell density (number of hair cells/0.007 mm²) in the striola area and marginal area of saccule in mouse, rat, guinea pig, chinchilla, rabbit and monkey were 101.0 ± 5.79 (in striola region)/ 120.8 ± 4.15 (in marginal region), 95.5 ± 3.91 (in striola region)/ 109.2 ± 5.26 (in marginal region), 78.4 ± 6.54 (in striola region)/ 94.8 ± 4.38 (in marginal region), 60.0 ± 4.74 (in striola region)/ 84.6 ± 2.61 (in marginal region), 57.2 ± 3.83 (in striola region)/ 80.0 ± 3.54 (in marginal region), 53.8 ± 4.21 (in striola region)/ 68.0 ± 4.18 (in marginal region), respectively. The hair cell density (number of hair cells/0.007 mm²) in the striola area and marginal area of utricle in mouse, rat, guinea pig, chinchilla, rabbit and monkey were 103.8 ± 5.02 (in striola region)/ 119.2 ± 3.70 (in marginal region), 91.2 ± 2.49 (in striola region)/ 106.4 ± 4.16 (in marginal region), 74.1 ± 3.54 (in striola region)/ 90.8 ± 3.56 (in marginal region), 60.4 ± 4.98 (in striola region)/ 81.6 ± 2.07 (in marginal region), 57.8 ± 1.92 (in striola region)/ 77.8 ± 3.70 (in marginal region), 54.0 ± 2.74 (in striola region)/ 66.4 ± 2.51 (in marginal region), respectively. The hair cell density (number of hair cells/0.007 mm²) in the crista of ampulla of mouse, rat, guinea pig, chinchilla, rabbit and monkey were 112.4 ± 6.38 , 105.5 ± 3.51 , 95.2 ± 3.42 , 84.0 ± 7.16 , 78.2 ± 2.86 , 70.8 ± 2.39 . It can be seen that the cell size of hair cells in smaller animals is smaller than that of larger animals, the density of vestibular hair cells in smaller animals is higher than that of larger animals. In addition, the density of hair cells in the striola region between macula of saccule and macula of utricle is similar, and the hair cell density in the marginal region between the macula of saccule and macula of utricle is also quite similar, but the hair cell density in the striola area is lower than hair cell density in the marginal area. Also, the density of hair cells in the ampulla crista was almost identical to that in the marginal areas in both maculae of saccule and utricle. In view of the fact that certain damage factors often have the performance of selectively destroying the hair cells in the striola area of maculae, the hair cell density in the striola area of maculae should be distinguished from the hair cell density in the surrounding marginal zone, and if

necessary, even type I hair cells and type II hair cells should be distinguished to quantify the pathological changes respectively. **Conclusion** The vestibular measurement method used in this study and the measurement data of each sensory area of the vestibule, the total number of hair cells and the density of hair cells provide useful reference experience and necessary reference data for the quantitative analysis of vestibular pathology.

Keywords: Vestibule; Macula of sacculle; Macula of utricle; Crista of ampulla; Hair cell

内耳功能主要分为听觉功能和平衡功能,其中耳蜗是内耳的听觉器官,而前庭则是内耳的平衡器官。在每个内耳中的前庭感觉区包含2个感知线性加速度改变的耳石器(球囊斑和椭圆囊斑)和3个感知角加速度改变的壶腹嵴^[1-3]。位于这些前庭感觉区的毛细胞是前庭系统中感受自身运动状态和头位空间位置的平衡感受器,前庭毛细胞因运动或体位改变释放出的神经递质信号通过毛细胞底部的传入神经末梢经前庭神经节传送到脑干中的前庭核,然后再与其他参与平衡感知和调控的中枢神经核团建立间接的神经联系^[4-5]。由此可见,前庭毛细胞是内耳中接受平衡感觉刺激的唯一感受器,前庭毛细胞的破坏将直接造成内耳的平衡功能障碍甚至导致内耳的平衡功能丧失,这意味着前庭毛细胞的定量病理学评估对研究前庭性平衡障碍至关重要。

在内耳前庭感觉毛细胞的定量组织病理学研究中,对前庭感觉区连续切片进行毛细胞计数的方法因工作量过大和准确性欠佳而早已不再被采用^[6]。自前庭膜迷路铺片技术问世以来,由于该技术为实现各个前庭感觉区的毛细胞定量分析提供了非常理想的观察角度而日益得到更多的应用^[7-16]。

了解受试动物前庭感觉区的测量参数和确定各个前庭感觉区的前庭毛细胞数量或毛细胞密度,是定量观察前庭毛细胞病理学改变的基本要素。本实验旨在通过测量多种常用实验动物前庭各个感觉区及其毛细胞数量的重要数据,为进一步开展前庭组织病理学的定量观察和分析提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 受试动物种类

本实验测量了正常 CBA/CaJ 小鼠、裸鼠、SD 大鼠、豚鼠、南美栗鼠、新西兰白兔和非洲黑长尾猴等七种常用的成年实验动物(每种动物 6 只)的前庭感觉区的面积和毛细胞的数据。受试动物的一侧耳被用于本实验的球囊斑和椭圆囊斑面积测量及前庭各个感觉区毛细胞的定量观察,另一侧耳被用于其他实验。实验动物中除南美栗鼠和新西兰白兔的实

验程序得到复旦大学动物护理和使用委员会的批准之外,其余所有动物的样本制备程序均根据美国国立卫生研究院发布指南并得到布法罗大学实验动物管理委员会的批准。

1.2 各个前庭感觉区的取材铺片技术

将取出的受试动物的颞骨浸入到 10% 福尔马林固定液浸泡数小时,然后在解剖显微镜下摘除镫骨并打开前庭池外侧骨壁,充分暴露位于前庭池内的每一个前庭感觉区(图 1)。用分离针紧贴前庭池内侧骨壁截断球囊斑背侧穿入到中筛斑的神经纤维和血管,分离取下球囊斑,然后摘除覆盖在球囊斑表面的耳石膜。用分离针在上筛斑紧贴骨壁截断椭圆囊斑背侧的神经纤维和血管,分离取下椭圆囊斑,然后摘除覆盖在椭圆囊斑表面的耳石膜。用分离针分别在上筛斑和下筛斑处的前庭池骨壁截断外半规管壶腹嵴和上半规管壶腹嵴及后半规管壶腹嵴的神经纤维和血管,再分别截断 3 个膜半规管取下 3 个膜壶腹,最后打开膜壶腹暴露壶腹腔内的壶腹嵴。将取下并完成暴露的各个前庭感觉区常规染色后铺放在载玻片上的甘油滴中,盖上盖玻片^[7,9,17-19]。

1.3 球囊斑和椭圆囊斑的面积测量

首先对每种受试动物的球囊斑铺片和椭圆囊斑铺片在放大 100 倍的光学显微镜下拍摄两个囊斑铺片的整体照片,应用 Image J 软件的图像测量程序,分别测量 CBA/CaJ 小鼠、裸鼠、SD 大鼠、豚鼠、南美栗鼠、新西兰白兔和非洲黑长尾猴的球囊斑和椭圆囊斑的实际面积。见图 2。

1.4 球囊斑和椭圆囊斑毛细胞总数的计数方法

在光学显微镜下,将平整铺片的球囊斑和椭圆囊斑照片上的囊斑区域划分为面积相同的若干网格区域(图 3)。在放大图像下准确计数每个方格中的毛细胞数量,然后将每个方格的毛细胞计数结果相加,从而获得每种受试动物的球囊斑和椭圆囊斑上的毛细胞总数。

1.5 前庭各个感觉区局部毛细胞密度的测量

由于球囊斑和椭圆囊斑比较平整,因而容易制作成球囊斑铺片和椭圆囊斑铺片。从球囊斑和椭圆囊斑铺片进行毛细胞全计数的方法虽然可行,但是

耗时过长而且需要确保制作出完整无损的整个囊斑铺片,加上文献中报道的有关前庭各个感觉区毛细胞总数的参考数据由于各自存在的技术原因而具有相当大的差异,这些都给定量评估前庭两个囊斑上的毛细胞总数带来一定的困难。在光学显微镜高倍镜的放大条件下,对前庭感觉区铺片上的小视野范围内进行毛细胞计数,从而获取局部的毛细胞密度,不失为一种简便有效的前庭毛细胞定量观察方法(图4)。壶腹嵴具有一个立体的隆起的外形,在制作铺片时很难铺放平整而难免总有被遮挡的部位使之难以实现对整个壶腹嵴上所有毛细胞进行计数。但是,应用前庭小视野定量观察技术计算出前庭各个感觉区小视野范围内毛细胞密度的方法却既简单又可靠,还可以在同一个样品上对几个不同的区域进行毛细胞计数,再以平均值来代表该前庭感觉区的毛细胞密度^[8,20-21]。我们在预先设定的放大倍数下,首先拍摄取景框视野内显微测微尺的照片,从而计算出该放大倍数下摄影取景框的实际面积,然后对该放大倍数下摄影取景框内的毛细胞进行计数,这样就可获得该受试动物前庭各个感觉区的毛细胞密度(图4)。

1.6 前庭感觉区毛细胞损害模型的定量观察

为了验证上述前庭感觉区毛细胞定量观察技术的实际应用价值,我们将测量前庭毛细胞密度的定量观察方法应用于以下几种前庭毛细胞损害的不同实验模型。①从对准大鼠外耳道口的冲击波发生器释放出的加压空气冲击波的峰值压力达到 20 帕斯卡(Pascals),爆震声强达到 196.8 dB SPL。受试大鼠在爆震暴露 2 周后终止实验,常规制备前庭感觉区铺片后用苏木素染色并在光学显微镜下对毛细胞进行病理学观察;②将装载进微渗透泵(Osmotic pump)的每 mL Hank's 溶液含有 400 μ L 庆大霉素的溶液通过插入到南美栗鼠上半规管开出的小孔以每小时 0.5 μ L 的速率向前庭池内持续缓慢灌注 7 d。在停止灌注后的第 14 天终止实验,常规在光学显微镜下对琥珀酸脱氢酶染色后制备的前庭感觉区铺片进行毛细胞的定量观察;③按照每公斤体重 100 毫克的剂量向南美栗鼠腹腔内一次性注射卡铂,在注射卡铂 30 d 后终止实验,常规制备前庭感

觉区铺片后用苏木素染色,然后在光学显微镜下对毛细胞进行定量观察。

2 结果

2.1 实验动物球囊斑和椭圆囊斑的实际面积和毛细胞总数

按照材料与方法中对“球囊斑和椭圆囊斑的面积测量”方法的描述和“球囊斑和椭圆囊斑毛细胞总数的计数方法”,我们对 CBA/CaJ 小鼠、裸鼠、SD 大鼠、豚鼠、南美栗鼠、新西兰白兔和非洲黑长尾猴的球囊斑铺片和椭圆囊斑铺片实施了面积测量。并获得了每种受试动物球囊斑毛细胞的总数和椭圆囊斑毛细胞的总数。具体数据见表 1、图 5。

2.2 实验动物各个前庭感觉区局部的毛细胞密度

每个前庭感觉区上不同部位的毛细胞密度见表 2。每个前庭感觉区的毛细胞都包含着两种类型的毛细胞,它们分别是 I 型毛细胞和 II 型毛细胞。外形呈烧瓶状的 I 型毛细胞体型较胖,主要集中在球囊斑和椭圆囊斑的微纹区以及壶腹嵴的顶部;而外形呈柱状的 II 型毛细胞体型较瘦,主要分布在球囊斑和椭圆囊斑的周边区和壶腹嵴的两侧。由于 I 型毛细胞比 II 型毛细胞占据着更大的空间,因此, I 型毛细胞聚集的球囊斑微纹区和椭圆囊斑微纹区的毛细胞密度要显著低于这两个囊斑周边区的毛细胞密度。人们早就发现松鼠猴囊斑周边区的毛细胞密度平均要比微纹区的毛细胞密度高 1.62 倍^[22]。有鉴于此,球囊斑微纹区和椭圆囊斑微纹区的毛细胞密度应该与这两个囊斑周边区的毛细胞密度区分开来分别进行统计学分析(图 4、6)^[12,21,23]。

测量球囊斑和椭圆囊斑局部小视野中的毛细胞密度,除了应该对微纹区和周边区的毛细胞密度区分计数之外,根据实验观察的需要,有时还需要对 I 型毛细胞和 II 型毛细胞进行区分计数。例如卡铂选择性破坏南美栗鼠的 I 型毛细胞,我们通过对椭圆囊斑铺片的小视野范围内的 I 型毛细胞和 II 型毛细胞进行区分计数,就可以从两种毛细胞存活密度的改变来证明这个特殊现象。具体数据见表 2、图 7~9。

表 1 7 种实验动物球囊斑和椭圆囊斑的实际面积与球囊斑和椭圆囊斑上的毛细胞总数 ($\bar{x} \pm s$)

项目	小鼠	裸鼠	大鼠	豚鼠	南美栗鼠	新西兰白兔	非洲黑长尾猴
球囊斑的面积(mm ²)	0.193 ± 0.009	0.216 ± 0.008	0.323 ± 0.010	0.528 ± 0.035	0.687 ± 0.065	1.237 ± 0.075	1.371 ± 0.032
椭圆囊斑的面积(mm ²)	0.193 ± 0.020	0.208 ± 0.013	0.321 ± 0.011	0.526 ± 0.034	0.795 ± 0.017	1.224 ± 0.082	1.388 ± 0.048
球囊斑毛细胞总数(个)	2 476.3 ± 64.4	2 389.8 ± 47.8	3 135.3 ± 191.6	4 882.2 ± 208.7	6 128.5 ± 242.9	10 572.2 ± 464.4	10 992.7 ± 397.4
椭圆囊斑毛细胞总数(个)	2 491.4 ± 54.8	2 368.0 ± 46.1	3 218.8 ± 82.9	4 925.3 ± 271.1	7 794.0 ± 386.1	11 347.4 ± 435.7	11 114.5 ± 410.6

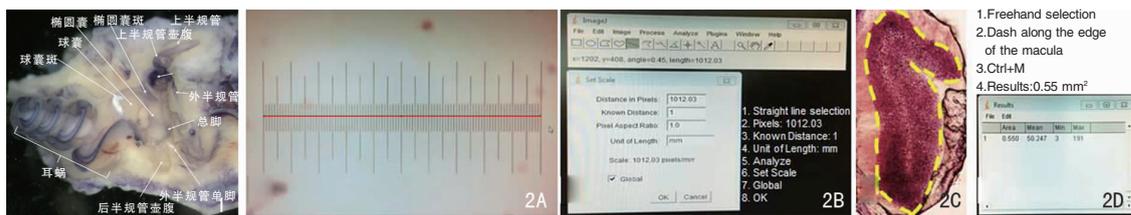


图1 打开豚鼠内耳腔的外侧骨壁,充分暴露前庭池中的各个前庭感觉区(琥珀酸脱氢酶×15)

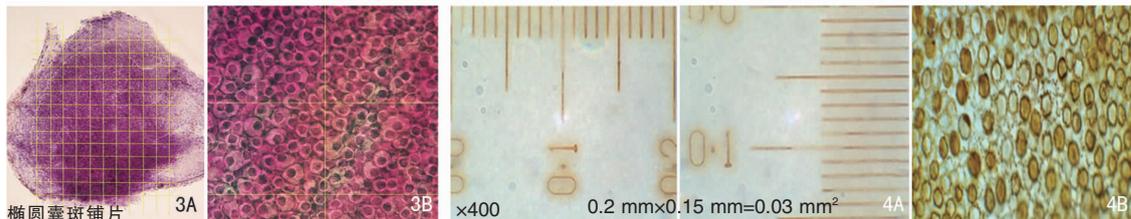
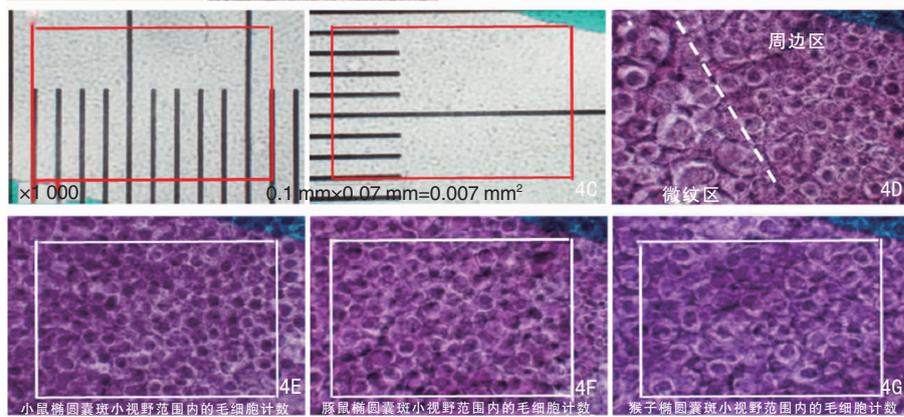
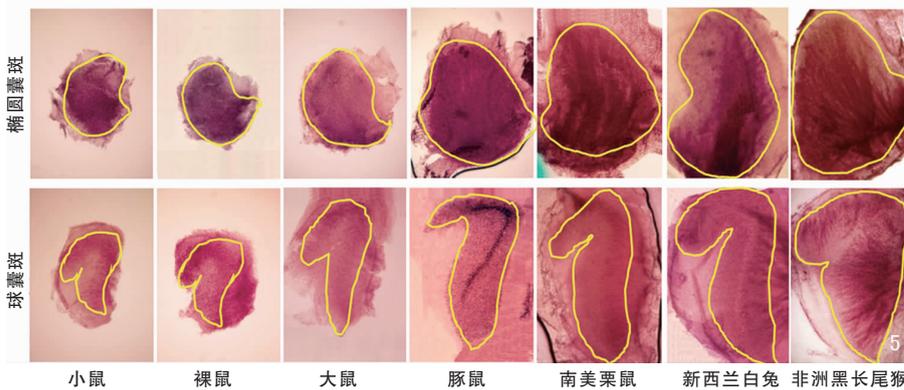


图2 应用Image J软件测量实验动物球囊斑的面积



2A:在放大100倍的光学显微镜下拍摄1mm长的显微测微尺;2B:在Image J的图像窗口中选择直线函数沿显微测微尺绘制一条直线(图2A中的红线);在Image J软件窗口显示图A整条红线的像素大约是1012.03。在已知距离窗口中填1,在单位窗口中填写毫米,最后选择Global后再点击OK,即完成了测量标准的设置;2C:在Image J软件选择手绘功能,沿着感觉毛细胞与外围支持细胞的边界勾勒出整个球囊斑,然后同时按下Ctrl键和M键(琥珀酸脱氢酶×100);2D:Image J软件系统自动显示被测球囊斑的实际面积为0.55mm²



3A:大鼠椭圆囊斑铺片。用网格将球囊斑和椭圆囊斑铺片划分为若干个小方块区域(苏木素×100);3B:在高倍放大倍数下,对每个正方形网格内的毛细胞进行准确计数。然后将每个网格内的毛细胞计数结果相加,即可得到该囊斑上的毛细胞总数(苏木素×1000) 图4 毛细胞密度测量 4A:显微测微尺在摄影取景框的长度是0.2μm,摄影取景框的宽度是0.15μm(×400);4B:每一个毛细胞的表皮板都清晰可数(硝酸银×1000);4C:显微测微尺在摄影取景框范围内的长度是0.1mm,摄影取景框的宽度是0.07mm(×1000);4D:囊斑微纹区的毛细胞体型略大于周边区毛细胞的体型,微纹区I型毛细胞坐落的“神经杯”也大于周边区I型毛细胞坐落的“神经杯”,因此囊斑微纹区的毛细胞密度低于周边区的毛细胞密度;4E:小鼠毛细胞的体型较小,因而毛细胞的密度较高;4F:豚鼠毛细胞的体型略大于小鼠毛细胞的体型,因而毛细胞的密度略低于小鼠毛细胞的密度;4G:非洲黑长尾猴的毛细胞体型显著大于小鼠和豚鼠的毛细胞体型,因而非洲黑长尾猴的毛细胞密度显著低于小鼠和豚鼠的毛细胞密度(4D-F:苏木素×1000) 图5 7种实验动物椭圆囊斑和球囊斑的铺片及其面积测量方法(苏木素×100)

表2 6种实验动物球囊斑和椭圆囊斑及壶腹嵴在光学显微镜下前庭小视野毛细胞平均密度的参考数据(毛细胞/0.007mm²,1000倍, $\bar{x} \pm s$)

项目	小鼠	大鼠	豚鼠	南美栗鼠	新西兰白兔	非洲黑长尾猴
球囊斑微纹区	101.0 ± 5.79	95.4 ± 3.91	78.4 ± 6.54	60.0 ± 4.74	57.2 ± 3.83	53.8 ± 4.21
球囊斑周边区	120.8 ± 4.15	109.2 ± 5.26	94.8 ± 4.38	84.6 ± 2.61	80.0 ± 3.54	68.0 ± 4.18
椭圆囊斑微纹区	103.8 ± 5.02	91.2 ± 2.49	74.1 ± 3.54	60.4 ± 4.98	57.8 ± 1.92	54.0 ± 2.74
椭圆囊斑周边区	119.2 ± 3.70	106.4 ± 4.16	90.8 ± 3.56	81.6 ± 2.07	77.8 ± 3.70	66.4 ± 2.51
壶腹嵴	112.4 ± 6.38	105.4 ± 3.51	95.2 ± 3.42	84.0 ± 7.16	78.2 ± 2.86	70.8 ± 2.39

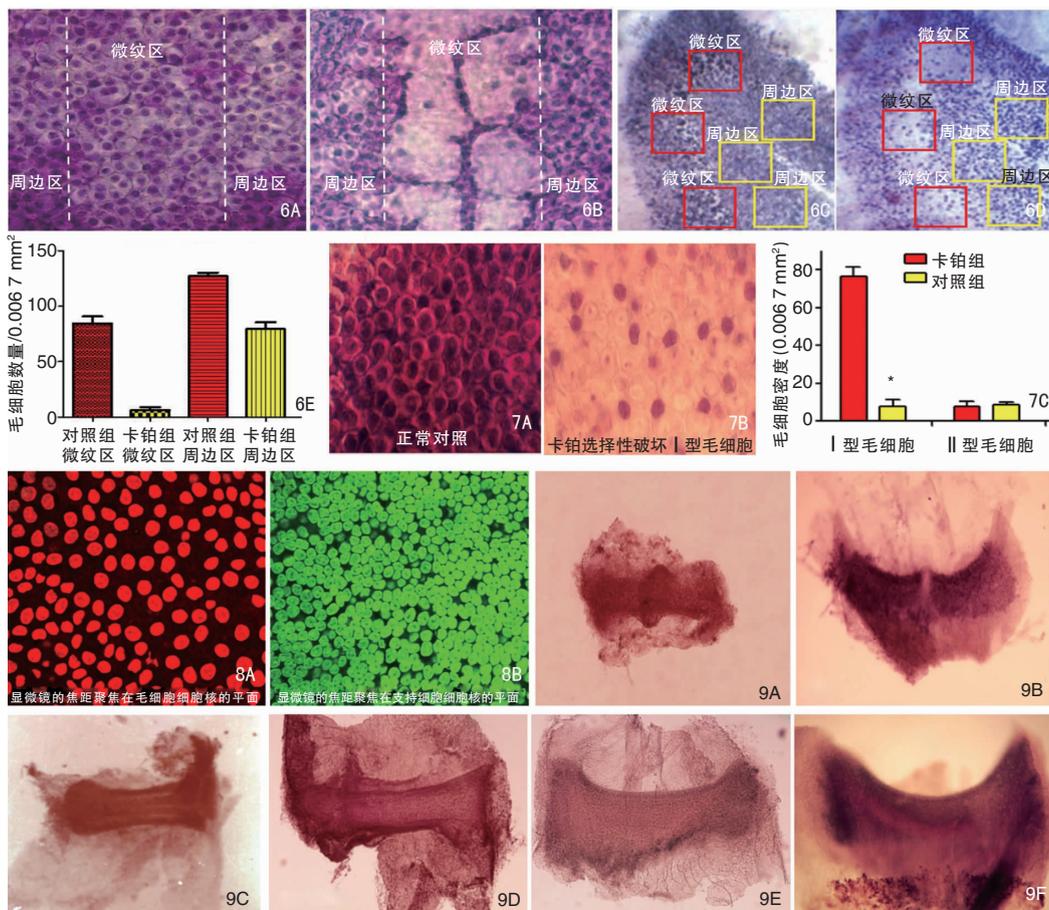


图 6 毛细胞观察 6A:大鼠椭圆囊斑微纹区的正常毛细胞密度;6B:冲击波暴露造成了椭圆囊斑微纹区毛细胞的严重破坏,但并未破坏椭圆囊斑周边区的毛细胞;6C:南美栗鼠球囊斑微纹区和周边区的正常毛细胞密度。红色方框显示球囊斑微纹区内的小视野,黄色方框显示球囊斑周边区的小视野;6D:庆大霉素造成南美栗鼠球囊斑微纹区毛细胞严重损害;6E:毛细胞密度直方图显示庆大霉素造成的南美栗鼠球囊斑微纹区毛细胞的损坏程度显著高于周边区 (6A、B:苏木素 ×400;6C、D:琥珀酸脱氢酶 ×200) **图 7** 南美栗鼠椭圆囊斑铺片对毛细胞定量观察 7A:正常对照南美栗鼠的 I 型毛细胞在细胞核平面的周围就有一个圆环样的 I 型传入神经末梢,II 型毛细胞细胞核平面的周围则不具备圆环状的神经末梢结构;7B:一次性注射卡铂(100 mg/kg 体重)后 30 d,椭圆囊斑铺片上残存的毛细胞只剩下不具备圆环状神经末梢的 II 型毛细胞,说明卡铂选择性破坏南美栗鼠的 I 型毛细胞,但是并不损害南美栗鼠的 II 型毛细胞;7C:毛细胞密度直方图中的星号显示南美栗鼠的前庭 I 型毛细胞确可被卡铂选择性破坏 (7A、B:苏木素 ×1 000) **图 8** 大鼠椭圆囊斑铺片相同视野下的毛细胞细胞核平面和支持细胞细胞核平面的照片 (ToPro-3 ×630) 8A:当显微镜的焦距对准在毛细胞的细胞核平面时,可见毛细胞的细胞核和细胞之间的间隙都比较大;8B:当显微镜的焦距对准在毛细胞下方支持细胞的细胞核平面时,可见支持细胞的细胞核和细胞之间的间隙都很小。说明毛细胞的细胞密度显著低于支持细胞的细胞密度 **图 9** 6 种实验动物的壶腹嵴铺片 (苏木素 ×100) 9A:小鼠;9B:大鼠;9C:豚鼠;9D:南美栗鼠;9E:羊;9F:猴

3 讨论

3.1 球囊斑和椭圆囊斑面积测量及毛细胞计数检测方法的可靠性问题

Crile 于 1940 年提出了一个计算前庭感觉上皮面积和前庭感觉区毛细胞数量与实验动物体重之间的 $A = aBW^b$ 的幂函数计算公式^[24],这个计算公式被沿用至今^[25-26]。这个计算公式的意思是每个前

庭感觉区的表面积和毛细胞总数等于系数 a 乘以受试动物的体重再乘以系数 b。对于体重小于 4 kg 的实验动物,计算球囊斑和椭圆囊斑的面积及毛细胞总数的系数 a 和系数 b 分别是 0.045 ± 0.01 和 0.45 ± 0.03 ;计算壶腹嵴毛细胞的系数 a 和系数 b 则分别是 0.025 ± 0.013 和 0.44 ± 0.07 。对于体重大于 4 kg 的实验动物,体重与球囊斑面积之间幂律关系的斜率为 0.45,体重与椭圆囊斑面积之间幂律关系的斜率为 0.44。虽然这个计算公式看上去似

乎可以通过简单测量动物体重得知每个测试动物各个前庭感觉区的表面积和毛细胞总数,但是,这种既不测量实际前庭感觉区面积也不对前庭毛细胞进行实际计数的体重换算法,其可靠性和合理性及实用性都值得被怀疑。试想一只豚鼠在出生后1个月的体重大约为100 g,到出生后12个月其体重可以增加至800 g左右。那么,在系数a和b不变但体重增加了8倍的情况下,难道这只豚鼠的前庭感觉区的表面积和毛细胞总数也会增加8倍吗?这显然是完全不可能的。可以确定的是,成年哺乳类动物内耳的感觉毛细胞不会再有增殖,因此,内耳毛细胞的数量绝不可能随着动物体重的增加而变得更多。假设这个体重换算公式真能换算出前庭各个感觉区的表面积和毛细胞的总数,那么如果毛细胞被耳毒性药物永久破坏之后,难道体重也会发生改变吗?我们认为前庭毛细胞的数量和动物体重之间没有任何必然的联系。仅凭称量动物体重来推算前庭各个感觉区表面积和毛细胞总数的算法,对前庭毛细胞的定量病理学评估毫无价值。

3.2 毛细胞计数检测方法的可靠性问题

我们把从每个囊斑上记录到的实际毛细胞总数与早先的论文报导做了相互比较,除了那些通过体重换算得到的囊斑毛细胞总数结果不具备可比性之外,一些发表文章报道的毛细胞总数与我们的毛细胞计数结果有一定的出入。例如,Lindeman在20世纪60年代应用相差显微镜对戊二醛四氧化钨双重固定的豚鼠球囊斑和椭圆囊斑毛细胞的实际计数结果与我们所得结果就存在着显著差异^[27]。虽然四氧化钨可以染色脂肪小滴和髓鞘,但是由于前庭毛细胞既不含有脂肪小滴也不含有髓鞘,因此,Lindeman实际上观察的是未经染色的前庭囊斑铺片。我们的计数结果显示豚鼠球囊斑和椭圆囊斑的毛细胞总数分别为 $(4\ 882.2 \pm 208.7)$ 个和 $(4\ 925.3 \pm 271.1)$ 个,可是Lindeman记录到的豚鼠球囊斑和椭圆囊斑的毛细胞总数却分别为7 500 $(6\ 018 \sim 7\ 983)$ 个和9 000 $(7\ 118 \sim 10\ 760)$ 个。为什么同样是在显微镜下对毛细胞进行实际计数却会出现如此大的总数差异?我们在共聚焦显微镜下对同一区域的毛细胞层和支持细胞层中的细胞数量分别进行了计数,我们发现由于毛细胞细胞核的大小显著大于支持细胞的细胞核,因而同一区域的毛细胞数量远远少于同一区域支持细胞的数量。我们在一个放大630倍的显微镜下的毛细胞细胞核的聚焦平面,在视野中可以识别约有130个毛细胞的细胞

核,但是在这个相同视野毛细胞层下方的支持细胞的细胞核的聚焦平面,支持细胞的数量却几乎超过毛细胞一倍(图8)。由此我们推测,Lindeman是否在对未经染色的囊斑铺片进行观察时,不得不通过辨别细胞间相互连接的折光明暗来勉强识别每一个细胞间的轮廓。在这种情况下,随着显微镜焦距的上下移动,支持细胞或许有可能与毛细胞相互混淆而都被当作毛细胞被计数。我们得到的荧光染色的毛细胞计数结果则完全是来自染色清晰的完整的囊斑铺片样品,所有的图像资料都是在共聚焦显微镜区清晰区分出囊斑铺片的毛细胞层面,因此我们不可能将支持细胞误认作是毛细胞。为了确保我们的毛细胞计数结果不与支持细胞相混淆,我们在实验中还专门用硝酸银对豚鼠球囊斑和椭圆囊斑的表面实施了金属沉淀法的镀银染色^[8,28],经镀银染色后,在光学显微镜下可以清晰分辨囊斑表面呈圆形的毛细胞表皮板轮廓,而不可能将支持细胞的不规则形表皮板误认为是毛细胞的表皮板(图4C)。囊斑表面镀上的这一层金属膜使细胞不再透明,因而不仅不能看到毛细胞的细胞核而且也不能看到毛细胞层下方的支持细胞层面。由此可见,前庭感觉区上皮的表面镀银染色也为我们提供了一种可靠的鉴别毛细胞的方法。诚然,如果应用Myosin VI等抗体对毛细胞施行特异性染色标记后再对标记的毛细胞进行计数,相信结果一定会更有说服力。但是,根据毛细胞与支持细胞大小形态的显著差异和毛细胞圆形表皮板的典型特征,无论是对共聚焦显微镜下获得的单层毛细胞图像实施对毛细胞的计数,还是在光学显微镜下对表面镀银的毛细胞表皮板进行计数,我们都可以做到准确无误。因此,我们相信我们获得的前庭毛细胞定量观察结果是可靠的。

3.3 在壶腹嵴铺片上展现壶腹嵴上所有毛细胞的可能性问题

由于壶腹嵴在壶腹腔内呈一个横位小峰样隆起而高低不平^[18,29-31],因而从壶腹嵴铺片的观察平面只能看到壶腹嵴面对物镜的感觉上皮,如果壶腹嵴铺片呈侧位,则不可能看到壶腹嵴背侧区域的毛细胞;如果壶腹嵴铺片的嵴顶部朝上,则不可能看到壶腹嵴双侧与观察视线平行区域的毛细胞(图9)。由此可见,要想从壶腹嵴铺片的一个平面上获取整个壶腹嵴多个不同平米上所有毛细胞的计数结果,从技术上来说存在着难以克服的困难。尽管有人主张应用酶分离方法尝试将壶腹嵴的上皮层从壶腹嵴上剥离下来再制作成平整的铺片^[25],但是由于剥离壶

腹嵴上皮细胞层的制作难度较大而并未得到多数人的认可和赞同。然而,从前庭小视野局部区域的毛细胞计数结果得到前庭毛细胞在壶腹嵴上的平均密度,或许比尝试从凹凸不平相互遮挡的壶腹嵴铺片上找到每一个毛细胞更能有效解决壶腹嵴毛细胞的定量观察问题^[6,8,12,20,23,28,32]。

参考文献:

[1] 丁大连,姜泗长.豚鼠内耳解剖检验技术手册[M].上海:学林出版社,1989:24-35.

[2] 丁大连,李明,姜泗长,等.内耳形态学[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2001:10-17.

[3] 丁大连,亓卫东,曲雁,等.内耳解剖[A]//丁大连.内耳科学[M].北京:中国科学技术出版社,2010:1-8.

[4] 丁大连,徐先荣,李鹏,等.涉及平衡感知调控中枢神经核团的解剖与功能[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2021,27(3):250-255.

[5] 丁大连,徐先荣,李鹏,等.单侧前庭毁损引起的中枢平衡代偿[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2021,27(3):256-262.

[6] Ding D, Wang J, Salvi RJ. Early damage in the chinchilla vestibular sensory epithelium from carboplatin[J]. *Audiol Neurootol*, 1997,2(3):155-167.

[7] 丁大连,赵纪余,皇甫慕三,等.豚鼠全内耳膜迷路取材术[J].临床耳鼻咽喉科杂志,1987,1(1):9-11.

[8] 丁大连,陈学明,金西铭.前庭终器小视野定量观察技术[J].中华耳鼻咽喉科杂志,1992,27(4):202-203.

[9] 丁大连,骆松明,金西铭.豚鼠内耳前庭终器分离取材术[J].上海医学,1986,9(3):153-154.

[10] 于栋帆,丁大连,殷善开,等.硫酸链霉素对体外培养大鼠前庭毛细胞的损害作用[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,44(1):53-56.

[11] 刘洪,丁大连,孙虹,等.CBA小鼠内耳感觉上皮的参考数据[J].中华耳科学杂志,2011,9(2):224-231.

[12] 丁大连,蒋海燕,王家东,等.卡铂损害灰鼠前庭神经元和前庭I型毛细胞的定量观察[J].听力学与言语疾病杂志,2002,10(3):170-173.

[13] Yu D, Ding D, Jiang H, et al. Mefloquine damage vestibular hair cells in organotypic cultures[J]. *Neurotox Res*, 2011, 20(1):51-58.

[14] Ye H, Xing Y, Zhang L, et al. Bilirubin-induced neurotoxic and ototoxic effects in rat cochlear and vestibular organotypic cultures[J]. *Neurotoxicology*, 2019, 71:75-86.

[15] Ding D, Manohar S, Jiang H, et al. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin causes massive damage to the developing auditory and vestibular system[J]. *Hear Res*, 2020, 396:108073.

[16] Ding D, Jiang H, Fu Y, et al. Ototoxic effects of carboplatin in organotypic cultures in chinchillas and rats[J]. *J Otol*, 2012, 7(2):92-101.

[17] Ding D, Jiang H, Zhang J, et al. Cisplatin-induced vestibular hair

cell lesion-less damage at high doses[J]. *J Otol*, 2018, 13(4):115-121.

[18] 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.

[19] 于进涛,丁大连,李鹏,等.幼鼠内耳单个器官培养技术细节[J].中华耳科学杂志,2015,13(1):64-70.

[20] Yu J, Ding D, Wang F, et al. Pattern of hair cell loss and delayed peripheral neuron degeneration in inner ear by a high-dose intratympanic gentamicin[J]. *J Otol*, 2014, 9(3):126-135.

[21] Li M, Ding D, Zheng XY, et al. Vestibular destruction by slow infusion of gentamicin into semicircular canals[J]. *Acta Otolaryngol Suppl*, 2004, 13:35-41.

[22] Igarashi M, Watanuki K, Miyata H, et al. Vestibular end organ mapping in the squirrel monkey[J]. *Arch Otorhinolaryngol*, 1975, 211(3):153-161.

[23] 丁大连,王坚, Hofstetter P, 等. Carboplatin对灰鼠前庭系统的影响[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,1998,6(1):1-5.

[24] Crile G, Quiring D. A record of the body weight and certain organ and gland weights of 3690 animals[J]. *Ohio J Sci*, 1940, 40:219-259.

[25] Desai SS, Ali H, Lysakowski A. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. II. Cristae ampullares[J]. *J Neurophysiol*, 2005, 93(1):267-280.

[26] Desai SS, Zeh C, Lysakowski A. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Saccular and utricular maculae[J]. *J Neurophysiol*, 2005, 93(1):251-266.

[27] Lindeman HH. Studies on the morphology of the sensory regions of the vestibular apparatus[J]. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch*, 1969, 42(1):1-113.

[28] 丁大连,郭毓卿,罗德峰,等.豚鼠全内耳终器硝酸银染色法[J].上海第二医科大学学报,1989,9(4):326-327.

[29] 丁大连,亓卫东,Salvi R.前庭毛细胞的反相激活模式[J].中华耳科学杂志,2017,15(6):667-672.

[30] Abercrombie M, Johnson ML. Quantitative histology of Wallerian degeneration; nuclear population in rabbit sciatic nerve[J]. *J Anat*, 1946, 80(1):37-50.

[31] 李鹏,高可雷,丁大连,等.大鼠颞骨的特殊解剖结构[J].中华耳科学杂志,2015,13(1):7-12.

[32] 丁大连,金西铭,张志坚,等.红目和黑目豚鼠对庆大霉素不同易感性的研究.[J]耳鼻咽喉学报,1995,9(2):70-74.

(收稿日期:2022-09-01;网络首发:2022-09-29)

本文引用格式:丁大连,李鹏,亓卫东,等.实验动物前庭感觉毛细胞的定量观察[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2022,28(6):11-18. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202290001

Cite this article as:DING Dalian, LI Peng, QI Weidong, et al. Quantitative observation of vestibular sensory hair cells in experimental animals[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2022, 28(6):11-18. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202290001