

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202424356

· 耳科疾病专栏 ·

# 鼓室注射庆大霉素引起的内耳神经系统继发病变

丁大连<sup>1,2,3,4</sup>, 石林<sup>5</sup>, 邢雅智<sup>1</sup>, 李鹏<sup>3</sup>, 亓卫东<sup>6</sup>, 张建辉<sup>4</sup>, 蒋海燕<sup>1</sup>, 时海波<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200233; 2. 纽约州立大学布法罗大学, 纽约布法罗 14214; 3. 中山大学附属第三医院耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510630; 4. 成都市第三人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 成都 610014; 5. 大连医科大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 辽宁 大连 116011; 6. 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** 对鼓室注射庆大霉素大鼠模型的内耳原发病变和继发损害进行全方位定量评估。**方法** 16只(32耳)成年大鼠被平均分为正常对照组(8耳)、鼓室注射庆大霉素(40 mg/mL)后7 d组(8耳)、鼓室用药后30 d组(8耳)及鼓室用药后60 d组(8耳)。受试大鼠的一侧耳被制作成全内耳膜迷路铺片用以定量评估各个感觉上皮区的毛细胞密度,另一侧耳被制作成颞骨矢状面切片用以定量评估耳蜗和前庭神经元密度及其外周端和中枢端神经纤维的密度。**结果** 对全耳蜗膜迷路铺片的毛细胞定量分析结果显示鼓室注射庆大霉素后各观察时间点的毛细胞损害范围和程度基本相同,说明鼓室注射庆大霉素对毛细胞的一次性破坏没有对存活毛细胞发生明显的继发性破坏作用。对颞骨矢状面切片的内耳神经系统定量分析结果显示,随着鼓室用药后时间的推移,耳蜗和前庭神经元外周端神经纤维在毛细胞死亡后30 d已经消失殆尽,但是内耳神经元的细胞体及其中枢端神经纤维在毛细胞死亡后30 d尚未发生病变,直到毛细胞死亡后60 d,内耳神经元及其中枢端神经纤维才表现出明显的继发性破坏。**结论** 在毛细胞缺失后,内耳神经元外周端神经纤维发生的退化早于内耳神经元细胞体及其中枢端神经纤维的延迟性破坏。外周端神经纤维的早期退化说明内耳神经元与内耳感觉上皮之间的神经联系已经完全丧失,中枢端神经纤维的继发性破坏证明内耳与中枢之间的神经联系彻底中断。

**关键词:** 内耳; 毛细胞; 神经系统; 庆大霉素; 延迟性神经元死亡

**中图分类号:** R764.4

## Secondary neural damage in the inner ear induced by intratympanic gentamicin injection

DING Dalian<sup>1,2,3,4</sup>, SHI Lin<sup>5</sup>, XING Yazhi<sup>1</sup>, LI Peng<sup>3</sup>, QI Weidong<sup>6</sup>, ZHANG Jianhui<sup>4</sup>, JIANG Haiyan<sup>1</sup>, SHI Haibo<sup>1</sup>  
(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China; 2. State University of New York at Buffalo, NY 14214, USA; 3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 4. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610014, China; 5. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, China; 6. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

**Abstract:** **Objective** To conduct a comprehensive quantitative evaluation of the primary lesions and secondary damages of the inner ear in the rat model of intratympanic gentamicin injection. **Methods** Sixteen adult rats were randomly divided into four groups, with 4 rats in each group: a normal control group (8 ears), a group 7 days after single intratympanic injection of gentamicin (40 mg/mL) (8 ears), a group 30 days after single injection of gentamicin (8 ears), and a group 60 days after single injection of gentamicin (8 ears). One ear from each rat was made into flat

基金项目:国家自然科学基金项目(82171147,82071050,81973913);科技部国家重点研发计划(2023YFC2410205);四川省自然科学基金(2023NSFC0621)。

第一作者简介:丁大连,男,博士,教授。

通信作者:邢雅智,Email:yazhi\_0807@hotmail.com;李鹏,Email:lp76@163.net

surface preparation of whole membranous labyrinth to quantitatively evaluate the hair cell density in each sensory epithelial region, while the other ear was sectioned along the sagittal plane of the temporal bone for quantitative evaluation of the density of cochlear and vestibular neurons and the density of their peripheral and central nerve fibers. **Results** Quantitative analysis of hair cells in the surface preparations of whole membranous labyrinth showed that the extent and severity of hair cell damage were consistent across different observation time points following intratympanic gentamicin injection. This indicated that gentamicin-induced initial destruction of hair cells did not cause significant secondary degeneration of the surviving hair cells. Quantitative analysis of the inner ear nervous system in sagittal temporal bone sections revealed that the peripheral nerve fibers of cochlear and vestibular neurons were almost completely absent 30 days after hair cells death. However, the soma of the inner ear neurons and their central nerve fibers remained unaffected at 30 days after hair cell missing. Significant secondary degeneration of the inner ear neurons and their central nerve fibers did not occur until 60 days after the hair cell loss. **Conclusion** The degeneration of peripheral nerve fibers of inner ear neurons occurs earlier than the delayed degeneration of neuronal cell bodies and their central nerve fibers after hair cell loss. The early degeneration of peripheral nerve fibers indicates the complete loss of peripheral neural connection due to hair cell loss, while the secondary damage of central nerve fibers provides evidence of the disruption of neural connections between the inner ear and the central nervous system.

**Keywords:** Inner ear; Hair cells; Nervous system; Gentamicin; Delayed neuronal death

庆大霉素和卡那霉素的耳毒性机制被认为与药物在内耳淋巴液和毛细胞内的积累以及靶向性结合并抑制线粒体 70S 核糖体蛋白质合成具有密切的关系<sup>[1-4]</sup>。庆大霉素的耳毒性作用是在内耳淋巴液中高浓度积聚的条件下特异性损害耳蜗和前庭的感觉毛细胞,但并不直接破坏内耳的神经元。然而,任何原因造成的毛细胞缺失却都可以引起内耳输入刺激信号的减少和神经营养因子的缺乏,进而导致继发性延迟性神经元死亡<sup>[1,5-11]</sup>。以往对耳蜗神经系统的组织病理学检查主要是观察评估耳蜗毛细胞、毛细胞底部神经突触、穿越疆孔的外周端听神经纤维和位于蜗轴螺旋管内的螺旋神经节数量<sup>[6,9,12-17]</sup>,对前庭神经系统的组织病理学检查则聚焦于前庭各感觉上皮区毛细胞及其底部的外周端神经突触以及位于前庭上神经管和前庭下神经管内的前庭神经节<sup>[18-20]</sup>。然而,很少有报道关注从耳蜗螺旋神经节通向耳蜗核的中枢端听神经纤维束<sup>[21-23]</sup>,以及从前庭神经元通向前庭核的中枢端前庭神经束<sup>[24]</sup>。尽管耳蜗螺旋神经节发出的外周端神经纤维和中枢端神经纤维都是螺旋神经节细胞体的一部分,但是螺旋神经节外周端的神经纤维在耳蜗毛细胞被破坏之后往往迅速退化,而螺旋神经节中枢端的神经纤维数量在螺旋神经节细胞存活的情况下却并不发生明显改变。因此在耳蜗听神经发生继发性损害的实验模型,尤其是人工耳蜗植入相关的实验研究中<sup>[25]</sup>,听神经中枢端神经纤维的定量观察将有助于判断从人工耳蜗植入电极发出的电刺激信号能否通过存活螺旋神经节传送到耳蜗核。同样,前庭神经元的

外周端神经纤维的损失程度在单纯前庭感觉毛细胞破坏的情况下也可能与其中枢端神经纤维的损失程度并不一致。因此在人工前庭植入相关的实验动物研究中<sup>[26]</sup>,观察前庭神经元中枢端神经纤维同样有助于评估从人工前庭装置发放的电刺激信号能否通过存活的前庭神经元传送到前庭核。

本文通过应用全内耳膜迷路铺片技术和颞骨矢状面切片技术以及小视野范围内的组织细胞密度测定技术,对鼓室注射庆大霉素大鼠模型的内耳感觉毛细胞的原发病变以及内耳神经系统的继发损害进行全方位的定量评估。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试动物

16 只雌雄不限、出生后 4 个月、体重 250 ~ 400 g 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠被平均分为 4 组,每组 4 只。这 4 组大鼠分别为正常对照组、鼓室注射庆大霉素(40 mg/mL)后 7 d 组、鼓室注射庆大霉素后 30 d 组、鼓室注射庆大霉素后 60 d 组。上述用药剂量和实验时间与我们先前发表的豚鼠实验条件相同<sup>[27]</sup>。为了获得受试动物的内耳膜迷路铺片和耳蜗及前庭毛细胞的定位定量观察结果,同时也为了避免单侧前庭终器破坏造成的严重平衡障碍,我们对鼓室注射庆大霉素的受试大鼠施行了双侧鼓室注射,受试大鼠的一侧颞骨被用于全内耳膜迷路铺片的毛细胞定量观察<sup>[7,19,27]</sup>,另一侧颞骨被用于颞骨矢状面连续切片的定量观察。本实验项目中所有程

序均得到上海市第六人民医院动物伦理委员会审查批准。

## 1.2 鼓室注射庆大霉素

用于庆大霉素鼓室注射实验的受试SD大鼠在腹腔内注射氯胺酮(50 mg/kg)和赛拉嗪(6 mg/kg)的麻醉状态下侧卧在带有直肠探针的温控加热垫上监控和维持受试大鼠的体温在39℃。清除外耳道内的盯聆后,将70%乙醇溶液灌入外耳道浸泡5 min进行外耳道消毒,然后用无菌棉签吸干外耳道内残留的乙醇溶液。用1 mL注射器抽取浓度为40 mg/mL的硫酸庆大霉素生理盐水溶液,在手术显微镜下,将注射针尖刺破一侧耳的鼓膜插入到鼓室,然后将庆大霉素生理盐水溶液缓慢注入到该耳的中耳腔直至溶液充满中耳腔并保持动物侧卧体位30 min<sup>[27]</sup>;再对另一侧耳实施同样的鼓室注射。

## 1.3 内耳感觉上皮铺片的样品制备

按照设计好的实验终止时间,取出受试大鼠的颞骨浸入10%福尔马林溶液浸泡固定数小时。在解剖显微镜下打开鼓室外侧壁暴露耳蜗蜗轴和前庭各个感觉上皮区,用分离针沿着蜗轴骨性螺旋板分离取下整个耳蜗基底膜,再用分离针紧贴前庭感觉上皮背侧的骨壁分离取出各个前庭终器。取下的耳蜗基底膜和各个前庭终器经苏木素染色后铺放在载玻片上的甘油滴中,盖上盖玻片<sup>[19,28]</sup>。

## 1.4 内耳感觉毛细胞的定量观察

在放大400倍的显微镜下,摄影取景框的长度经测量为0.2 mm,宽度为0.15 mm,面积为0.03 mm<sup>2</sup>;在放大1000倍的显微镜下,摄影取景框的长度经测量为0.12 mm,宽度为0.09 mm,面积为0.0108 mm<sup>2</sup>。本实验对大鼠耳蜗毛细胞的计数方法是在放大400倍的光学显微镜下,从耳蜗回开始对大鼠全耳蜗基底膜上的内外毛细胞逐个视野进行计数直至耳蜗底回的钩端。将受试大鼠内外毛细胞的计数结果依次输入到耳蜗图软件的表格并与正常大鼠耳蜗毛细胞正常参考数值在每一个位点上进行比较,最后生成各组实验动物的全耳蜗毛细胞损失平均图<sup>[29]</sup>。本实验对大鼠前庭终器铺片的毛细胞计数方法是在放大1000倍图像的取景框面积(0.0108 mm<sup>2</sup>)内检测该取景框视野范围内的毛细胞数量,从而根据视野面积换算出毛细胞的密度。每个前庭感觉上皮区的毛细胞密度来自该前庭终器4个不同区域毛细胞计数的平均值<sup>[7]</sup>。

## 1.5 颞骨矢状面切片的样品制备

在解剖显微镜下,用尖针在耳蜗尖、圆窗和卵圆

窗处开孔,注入2.5%戊二醛固定液并固定6 h,用0.1 M磷酸盐缓冲液漂洗颞骨后再浸入2%四氧化锇溶液2 h。将颞骨浸入10%乙二胺四乙酸-钠盐(EDTA)溶液脱钙5 d后,依次浸入70%、80%、90%和100%乙醇溶液分别脱水10 min,再浸入乙醇和丙酮混合溶液浸泡10 min,然后浸入100%丙酮溶液浸泡10 min,最后将颞骨浸入丙酮和Epon-812混合溶液中浸泡渗透过夜。第2天将充分渗透的颞骨样品植入到Epon-812包埋槽中调整颞骨的包埋位置,使面向后颅窝的颞骨内侧表面位于样品包埋槽的一端,以确保随后实施的连续切片都处于颞骨的矢状面切片角度。将盛放浸入Epon-812的颞骨包埋槽移放到60℃的恒温箱内48 h,使环氧树脂聚合变硬。在超薄切片机上用玻璃刀沿着颞骨内侧面的平面切取厚度为2 μm的半薄切片,将半薄切片置放在载玻片上的蒸馏水中,加温使漂浮在蒸馏水表面的半薄切片平整展开,直至半薄切片随着水分的烘干粘贴在载玻片上。向半薄切片上滴加0.5%甲苯胺蓝染色液,加温染色5 min,然后冲洗并烘干,最后滴上中性树胶并盖上盖玻片<sup>[6-7]</sup>。

## 1.6 内耳神经元密度及其周边端和中枢端神经纤维密度的测量

在光学显微镜下,观察耳蜗底回蜗轴螺旋管的横断面切片并对单张切片中的螺旋神经节细胞进行计数<sup>[6,13,22]</sup>。观察耳蜗骨性螺旋板的横断面切片并对单个疆孔内的神经纤维进行计数<sup>[13,17,22]</sup>。观察耳蜗神经孔的横断面切片并对通向耳蜗核的听神经束的中枢端神经纤维在放大400倍显微镜下的摄影取景框范围内进行计数,然后计算出螺旋神经节中枢端神经纤维的密度。观察前庭上神经元和前庭下神经元及其周边端及中枢端神经纤维的横断面切片,同样是在放大400倍显微镜下的摄影取景框范围内进行神经元和神经纤维的密度测量。

## 1.7 统计学方法

应用单因素方差分析评估细胞和神经纤维的计数结果,应用GraphPad Prism(ver.5)软件中的one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc comparison进行数据差异的统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 鼓室注射庆大霉素造成的耳蜗毛细胞破坏

鼓室内注入的含有庆大霉素溶液淹没圆窗龛和椭圆窗之后,庆大霉素可经圆窗膜渗透进入到耳蜗

鼓阶的外淋巴液,也可以渗透穿越镫骨底板周围的环韧带进入到前庭池的外淋巴液,从而使庆大霉素避开血-迷路屏障的阻碍进入内耳并迅速达到足以损害耳蜗毛细胞的浓度(图1)。全耳蜗基底膜铺片显示鼓室注射庆大霉素后7、30 d及注射后60 d的毛细胞损害范围和程度非常相似;与正常对照大鼠的耳蜗基底膜铺片相比,注射庆大霉素后30 d组及60 d组的耳蜗基底膜铺片显示耳蜗底回的内外毛细胞和绝大部分支持细胞全部缺失,注射庆大霉素后7 d组的平均耳蜗图结果显示,除了耳蜗顶回尚有少部分存活的内外毛细胞之外,整个耳蜗底回的内外毛细胞破坏程度达到100%。值得注意的是,注射庆大霉素后30 d组和注射庆大霉素后60 d组的耳蜗毛细胞缺失程度基本和用药后7 d一致,并没有随着用药后时间的推移而加重,说明经圆窗膜和镫骨底板周围环韧带渗透进入内耳的庆大霉素的一次性攻击足以在短时间内造成整个耳蜗底回的内外毛细胞永久性破坏,但未被庆大霉素一次性攻击破坏的耳蜗顶回毛细胞却继续存活。耳蜗螺旋器的横断面切片显示,耳蜗内外毛细胞死亡后,随着实验动物生存时间的延长,内外毛细胞全部缺失区域的所有支持细胞也相继发生继发性破坏,最终在基底膜上仅存一层扁平的上皮细胞。见图1。

## 2.2 鼓室注射庆大霉素造成的前庭毛细胞破坏

经圆窗膜和镫骨底板周围环韧带渗透进入内耳淋巴液的庆大霉素对每个前庭感觉上皮区的毛细胞都造成了相当严重的破坏。我们在前庭终器铺片的实验观察中发现,鼓室注射庆大霉素造成的3个壶腹嵴上毛细胞的破坏程度基本相似,但是鼓室注射庆大霉素造成的球囊斑微纹区和椭圆囊斑微纹区的毛细胞破坏程度却比周边区的毛细胞破坏更为严重。因此,我们分别测量了3个壶腹嵴上的毛细胞密度和2个囊斑的微纹区及周边区的毛细胞密度。与正常对照大鼠的前庭终器铺片和前庭终器横断面切片相比,鼓室注射庆大霉素后7 d组、30 d组及60 d组各个前庭感觉上皮区的毛细胞缺失程度基本一致(图2)。这个现象提示,渗透进入内耳的庆大霉素造成了前庭各个终器一部分毛细胞的致命性破坏,但未被庆大霉素第一轮攻击杀死的残存毛细胞却并没有随着时间的推移发生延迟性破坏,这或许意味着经渗透进入内耳的庆大霉素只是对毛细胞进行了一次短暂攻击。与正常对照大鼠前庭终器切片的毛细胞密度值相比,注射庆大霉素后7、30 d及60 d组的椭圆囊斑毛细胞密度平均减少将近60%,

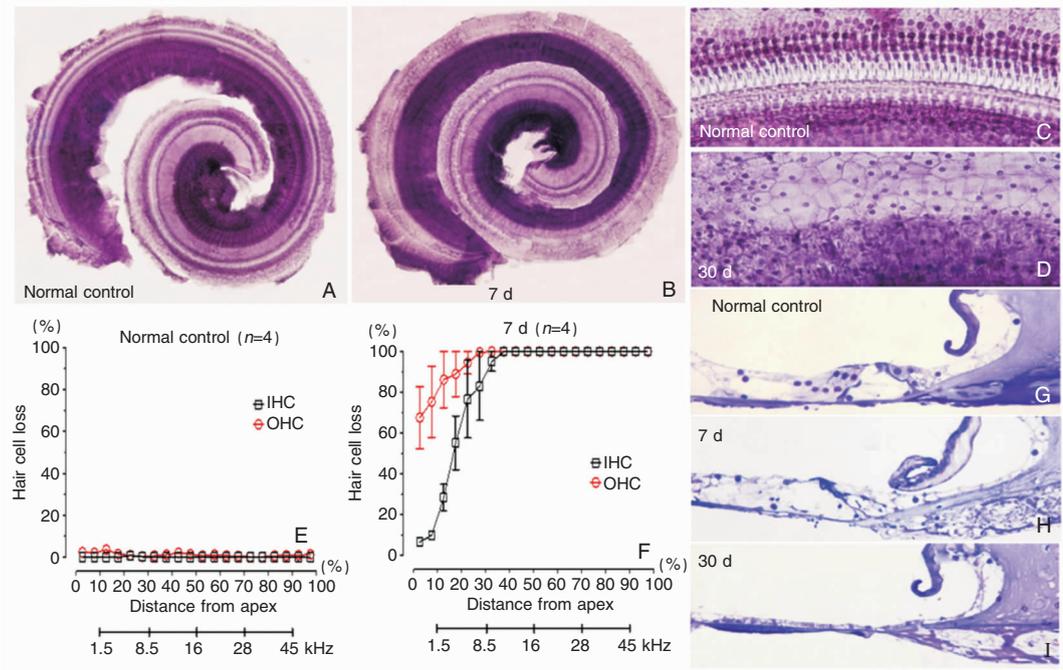
而壶腹嵴的毛细胞密度平均减少约75%,说明庆大霉素引起的壶腹嵴毛细胞缺失程度比囊斑毛细胞的缺失程度更为严重。见图2。

## 2.3 鼓室注射庆大霉素造成的耳蜗神经继发性破坏

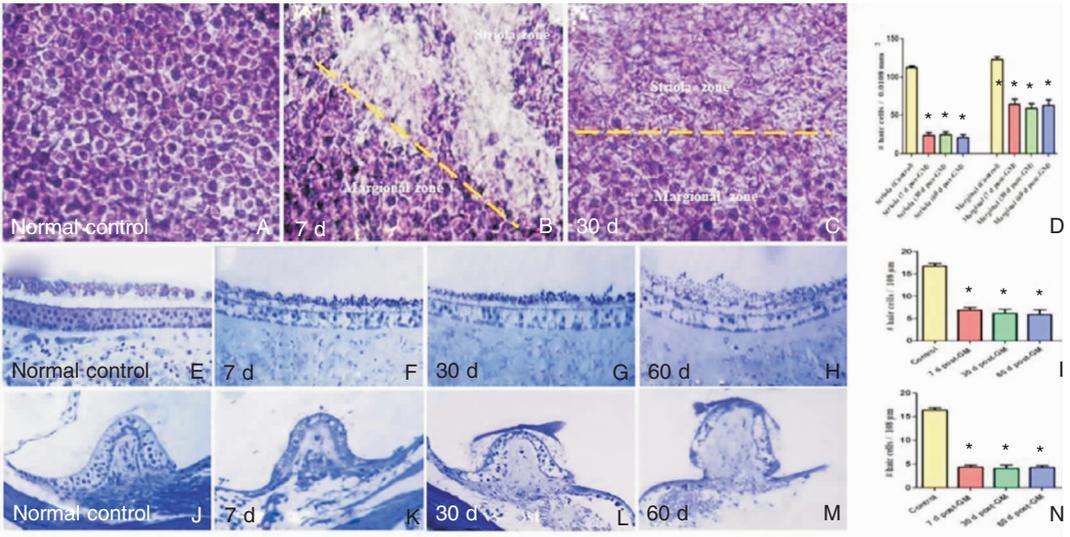
从颞骨矢状面切片的3个不同观察平面分别显示蜗轴螺旋管内的螺旋神经节细胞体和疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维及耳蜗神经管内的螺旋神经节中枢端神经纤维(图3)。单张耳蜗底回蜗轴螺旋管切片内的螺旋神经节数量在正常对照组和注射庆大霉素后7 d组、30 d组基本一致,说明庆大霉素一次性破坏耳蜗毛细胞之后,螺旋神经节数量在鼓室注射庆大霉素后30 d内尚未发生明显的减少。但是庆大霉素注射后60 d组的存活螺旋神经节数量却发生了显著减少,说明在耳蜗毛细胞被破坏后的30~60 d,耳蜗螺旋神经节才发生非常严重的延迟性神经元死亡。单个疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维在正常对照组和注射庆大霉素后7 d组未见病理学改变上的差别,说明庆大霉素早期作用仅仅破坏了耳蜗毛细胞,但并不破坏螺旋神经节外周端的神经纤维。但在注射庆大霉素后30 d,疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维显著减少。鉴于螺旋神经节细胞体在注射庆大霉素后30 d尚未发生病变,说明螺旋神经节外周端神经纤维的退行性改变比螺旋神经节细胞体的破坏发生得早。在注射庆大霉素后60 d,螺旋神经节外周端神经纤维几乎全部消失。耳蜗神经孔内的螺旋神经节中枢端神经纤维在正常对照组和注射庆大霉素后7 d组、30 d组均保持正常,但在注射庆大霉素后60 d组显著减少。提示螺旋神经节中枢端神经纤维的病变时间和程度与螺旋神经节细胞体的破坏时间和程度保持高度一致。见图3。

## 2.4 鼓室注射庆大霉素造成的前庭神经继发性破坏

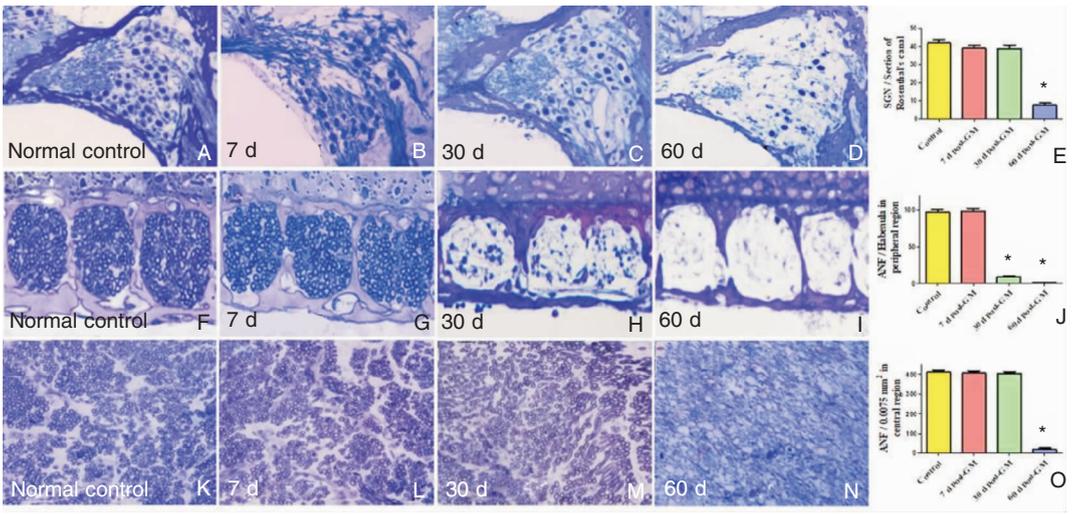
我们从颞骨矢状面切片的3个不同观察平面分别评估了前庭上神经元和前庭下神经元的细胞体及其外周端神经纤维和中枢端神经纤维的密度(图4)。我们发现前庭神经元在前庭毛细胞破坏之后的继发性损伤与耳蜗螺旋神经节的继发性损伤相似,同样表现为神经元外周端神经纤维的继发性损伤发生较早,而神经元细胞体及其中枢端神经纤维的继发性损伤略为迟后,而且前庭神经元中枢端神经纤维的病变时间和程度与前庭神经元细胞体的破坏时间和程度完全一致。见图4。



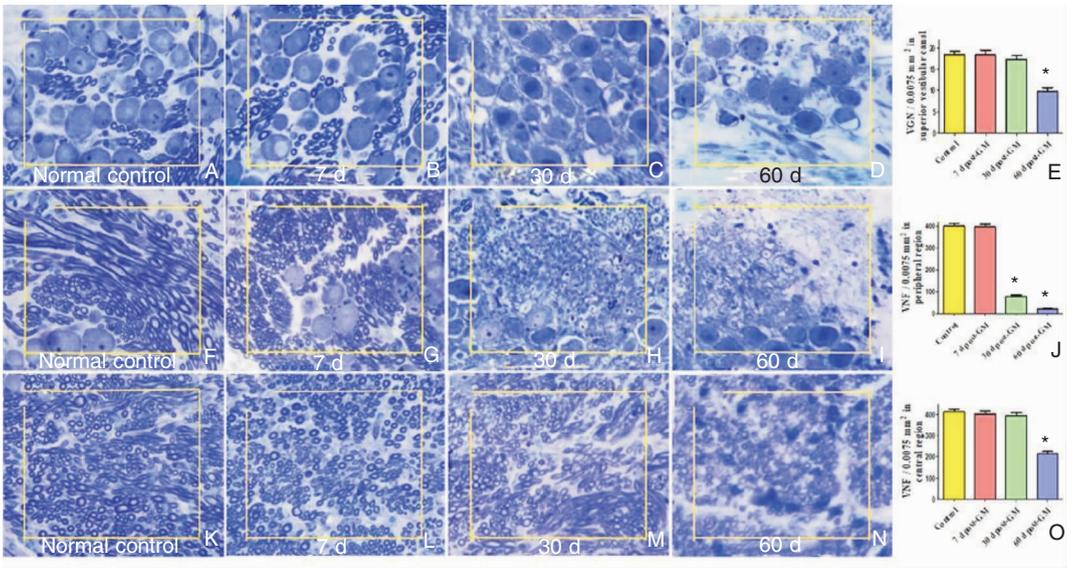
**图1** 鼓室注射庆大霉素造成的耳蜗毛细胞破坏 (苏木素 ×400) A:正常对照大鼠耳蜗内外毛细胞完整无缺;B:注射庆大霉素7 d后,底回内外毛细胞破坏殆尽,但顶回毛细胞仍有部分存活;C:对照耳蜗毛细胞排列整齐;D:注射庆大霉素30 d后,底回毛细胞和支持细胞均遭破坏,仅存一层扁平上皮;E:对照组毛细胞缺失率接近0%;F:注射庆大霉素7 d后,底回毛细胞缺失100%,顶回外毛细胞缺失约80%,内毛细胞缺失约44%;G:正常对照耳蜗切片显示完整无损的Corti器结构;H:注射庆大霉素7 d后,毛细胞已遭破坏,但支持细胞并未受损;I:注射庆大霉素30 d后,被破坏的毛细胞和支持细胞被单层扁平上皮取代



**图2** 鼓室注射庆大霉素对前庭毛细胞的破坏 (苏木素 ×400) A:正常对照大鼠球囊斑铺片显示毛细胞完整无缺;B:鼓室注射庆大霉素7 d后微纹区毛细胞遭到严重破坏,但周边区毛细胞很少受损;C:鼓室注射庆大霉素30 d后微纹区毛细胞的损害仍然比周边区严重;D:毛细胞计数结果显示微纹区毛细胞的密度降低约75%,周边区毛细胞的密度降低约50%;E:正常对照椭圆囊斑毛细胞完整无缺;F~H:显示鼓室注射庆大霉素后第7天、第30天、第60天的毛细胞缺失程度相似;I:鼓室注射庆大霉素后,毛细胞密度平均降低约60%,各组之间无显著差异;J:正常壶腹嵴毛细胞完整无缺;K~M:在鼓室注射庆大霉素后不同时间的毛细胞缺失程度相似;N:鼓室注射庆大霉素引起的壶腹嵴毛细胞密度降低约75%



**图3** 鼓室注射庆大霉素造成的耳蜗神经继发性破坏 (甲苯胺蓝 ×400) A~D:正常对照组、注射庆大霉素后7 d组、注射庆大霉素后30 d组及注射庆大霉素后60 d组蜗轴螺旋管内的螺旋神经节;E:可见鼓室注射庆大霉素后60 d,蜗轴螺旋管内的螺旋神经节数量明显减少;F~I:正常对照组、注射庆大霉素后7 d组、注射庆大霉素后30 d组及注射庆大霉素后60 d组蜗孔内的螺旋神经节外周端神经纤维;J:可见耳蜗毛细胞被破坏后30 d和60 d螺旋神经节外周端神经纤维损失殆尽;K~N:正常对照组、注射庆大霉素后7 d组、注射庆大霉素后30 d组及注射庆大霉素后60 d组螺旋神经节中枢端神经纤维;O:可见注射庆大霉素后60 d,螺旋神经节中枢端神经纤维发生严重破坏



**图4** 鼓室注射庆大霉素造成的前庭神经继发性破坏 (甲苯胺蓝 ×400) A~D:正常对照组、注射庆大霉素后7 d组、注射庆大霉素后30 d组及注射庆大霉素后60 d组前庭神经孔内的前庭神经元细胞体;E:可见鼓室注射庆大霉素后60 d发生了严重的延迟性神经元死亡;F~I:正常对照组、注射庆大霉素后7 d组、注射庆大霉素后30 d组及注射庆大霉素后60 d组前庭神经元外周端神经纤维;J:可见前庭毛细胞被破坏后30 d和60 d前庭神经元外周端神经纤维损失殆尽;K~N:正常对照组、注射庆大霉素后7 d组、注射庆大霉素后30 d组及注射庆大霉素后60 d组前庭神经元中枢端神经纤维,注射庆大霉素后60 d,前庭神经元中枢端神经纤维发生严重的脱髓鞘病变;O:可见注射庆大霉素后60 d,前庭神经节中枢端神经纤维密度显著降低

### 3 讨论

#### 3.1 庆大霉素对内耳毛细胞的选择性破坏作用

目前已经明确庆大霉素和卡那霉素等几种氨基糖苷类抗生素对内耳毛细胞的破坏作用与药物在内耳淋巴液中的蓄积和排泄延缓有密切关系。当进入的药物浓度超过一定限度就会造成毛细胞的破坏,由于细菌核糖体和线粒体核糖体都具有被氨基糖苷类抗生素特异性结合的靶位,从而使浸浴在内耳淋巴液中富含线粒体的毛细胞像细菌一样首当其冲成为庆大霉素攻击的靶细胞<sup>[14,29-35]</sup>。毛细胞周围支持细胞的线粒体含量很少,因此支持细胞并不是氨基糖苷类抗生素攻击的首要靶细胞。尽管内耳膜迷路的支持细胞不会被庆大霉素直接破坏,但是仍然难免在毛细胞死亡之后的一段时间内发生继发性病变<sup>[1,5,8]</sup>。

#### 3.2 继发于内耳毛细胞死亡的延迟性神经元死亡

神经刺激信号和神经营养因子是维持螺旋神经节的功能和存活的必备条件,而耳蜗毛细胞正是向螺旋神经节发放听神经刺激信号并提供神经营养因子的重要来源<sup>[11,36-39]</sup>。尽管大量动物实验证实庆大霉素造成的耳蜗原发病变仅仅是破坏感觉毛细胞,并不直接破坏螺旋神经节,但是一旦丧失了耳蜗毛细胞,螺旋神经节终将会因为丧失神经刺激信号和缺乏神经营养因子而发生延迟的继发性螺旋神经节死亡<sup>[1,5-8,10-11,13]</sup>。如果在耳蜗毛细胞丧失之后补充神经营养因子或对内耳施加电刺激,均可以有效减少延迟性螺旋神经节死亡的发生<sup>[11,39-40]</sup>。由于人工耳蜗植入需要有足够数量并具有功能的螺旋神经节才能发挥作用,人们正在日益加强对失聪动物模型应用渗透泵输送神经营养因子或神经营养因子基因转染等疗法的研究,目前在改善螺旋神经节存活率的临床前研究中已经获得很有希望的研究成果<sup>[11]</sup>。此外,NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)炎性小体介导的神经炎性反应以及巨噬细胞在螺旋神经节区域的持续激活也是造成螺旋神经节继发性损害的重要原因<sup>[41]</sup>。在中枢神经系统,抑制吞噬细胞的活动也被证明可以有效抑制脑缺血后造成的延迟性神经元死亡,例如抑制吞噬蛋白Mer受体酪氨酸激酶和乳脂球表皮生长因子8的活动或者抑制p53凋亡通路都可以有效减少延迟性脑神经元死亡的发生<sup>[42-43]</sup>。至于抑制特定的吞噬途

径或p53凋亡通路是否同样可以减少延迟性内耳神经元死亡的发生,还有待进一步研究。本文展示的内耳神经元及其中枢端和外周端神经纤维的定量研究方法,可望为失聪动物模型人工耳蜗植入的研究提供重要的内耳病理学观察指标。

#### 3.3 内耳神经元外周端和中枢端神经纤维继发病变的差别

耳蜗螺旋神经节和前庭神经元都是双极神经元,从神经元细胞体的一端发出通向内耳感觉毛细胞的外周端神经纤维,从神经元细胞体的另一端发出通向中枢神经系统的中枢端神经纤维。本实验首次证实内耳神经元两端神经纤维的继发性病变并不同步,其外周端神经纤维的退化只能说明内耳神经元与内耳感觉上皮的神经联系丧失,但并不意味着内耳神经元与中枢神经系统也切断了联系。耳蜗毛细胞的缺失除了造成其感受器电位丧失并导致投射到传入神经末梢和螺旋神经节的刺激信号丧失之外,还使原本由毛细胞分泌的神经营养因子丧失,从而引发了延迟性螺旋神经节死亡。我们曾经在联合应用利尿酸钠和庆大霉素一次性摧毁全耳蜗毛细胞的实验模型中发现,当耳蜗毛细胞死亡之后,原先与毛细胞建立突触联系的神经纤维由于失去靶细胞而迅速从Corti器撤离。在毛细胞死亡后1周,70%的耳蜗传出神经已经从耳蜗底回的Corti器撤离;在毛细胞死亡后2周,疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维几乎全部消失,但是螺旋神经节细胞体的数量在毛细胞死亡后2周仅减少约1/3<sup>[1,5]</sup>。本实验证实,鼓室注射庆大霉素摧毁了耳蜗底回所有的毛细胞之后,疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维在毛细胞死亡后30d已经消失殆尽,但是蜗轴螺旋管内的螺旋神经节细胞体数量在毛细胞死亡后30d未见明显减少(图3)。显然,本实验的大鼠耳蜗底回毛细胞死亡模型与我们先前发现的南美栗鼠全耳蜗毛细胞死亡模型的延迟性螺旋神经节继发性破坏结果有所不同,这或许是因为本实验保留下来的顶回毛细胞可继续向耳蜗底回的螺旋神经节提供一定的神经营养因子,从而延缓了底回螺旋神经节延迟性死亡的发生(图3)。本实验还发现前庭神经外周端神经纤维的破坏也比前庭神经元细胞体的破坏发生得早(图4)。本实验观察结果首次证实内耳神经元两端神经纤维的继发性病变并不同步,其外周端神经纤维的退化只是说明内耳神经元与内耳感觉上皮的神经联系丧失,但并不意味着内耳神经元与中枢神经系统也同时切断了联系。外周端神经纤维退化

与延迟性神经元死亡不同步的现象提示,内耳神经元外周端神经纤维的退化或许可以作为一项预示继发性神经元死亡即将发生的评判指标。值得注意的是,无论是耳蜗螺旋神经节还是前庭神经元,其中枢端神经纤维的延迟性病变始终与神经元细胞体的破坏程度保持同步(图4),说明从颞骨矢状面切片角度获取的内耳神经元中枢端神经纤维密度可以作为评判内耳神经系统与中枢神经系统之间联系状态的重要评判指标,而内耳神经元外周端的神经纤维密度并不能反映内耳外周神经元与中枢神经系统之间的联系状态。

#### 参考文献:

- [1] Ding D, Salvi R. Review of cellular changes in the cochlea due to aminoglycoside antibiotics[J]. *Volta Rev*, 2005, 105(3):407-438.
- [2] Ding D, Jiang H, Salvi R. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following co-administration of gentamicin and ethacrynic acid[J]. *Hear Res*, 2010, 259(1-2):16-23.
- [3] 丁大连, 金晓杰, 赵纪余. 卡那霉素在耳蜗基底膜细胞中的积聚部位[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1995, 30(6):323-325.
- [4] 丁大连, 金晓杰, 赵纪余. 卡那霉素在耳蜗毛细胞中的积聚部位[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1997, 32(6):323-325.
- [5] McFadden SL, Ding D, Jiang H, et al. Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla[J]. *Brain Res*, 2004, 997(1):40-51.
- [6] Ding D, Jiang H, Salvi R. Cochlear spiral ganglion neuron degeneration following cyclodextrin-induced hearing loss[J]. *Hear Res*, 2021, 400:108125.
- [7] Ding D, Manohar S, Kador PF, et al. Multifunctional redox modulator prevents blast-induced loss of cochlear and vestibular hair cells and auditory spiral ganglion neurons[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):15296.
- [8] 丁大连, 李鹏, 亓卫东, 等. 耳蜗毛细胞死亡引发耳蜗内延迟性继发病变的研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2022, 28(6):1-10.
- [9] Aedo C, Aguilar E. Cochlear synaptopathy: new findings in animal and human research[J]. *Rev Neurosci*, 2020, 31(6):605-615.
- [10] 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.
- [11] Leake PA, Akil O, Lang H. Neurotrophin gene therapy to promote survival of spiral ganglion neurons after deafness[J]. *Hear Res*, 2020, 394:107955.
- [12] Ding D, Jiang H, Chen G, et al. N-acetyl-cysteine prevents age-related hearing loss and the progressive loss of inner hair cells in gamma-glutamyl transferase 1 deficient mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4):730-750.
- [13] Ding D, Jiang H, Manohar S, et al. Spatiotemporal developmental upregulation of prestin correlates with the severity and location of cyclodextrin-induced outer hair cell loss and hearing loss[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:643709.
- [14] Ding D, Qi W, Jiang H, et al. Excitotoxic damage to auditory nerve afferents and spiral ganglion neurons is correlated with developmental upregulation of AMPA and KA receptors[J]. *Hear Res*, 2021, 411:108358.
- [15] Fu Y, Ding D, Jiang H, et al. Ouabain-induced cochlear degeneration in rat[J]. *Neurotox Res*, 2012, 22(2):158-169.
- [16] 丁大连, 于进涛, 李鹏, 等. 实验动物标准颞骨切片规范[J]. *中华耳科学杂志*, 2015, 13(1):1-6.
- [17] 丁大连, 王坚, 郑向阳, 等. 耳蜗毛细胞和螺旋神经节及其神经纤维的联合定量观察[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 1998, 4(4):200-204.
- [18] Ding D, Wang J, Salvi R. Early damage in the chinchilla vestibular sensory epithelium from carboplatin[J]. *Audiol Neurootol*, 1997, 2(3):155-167.
- [19] 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.
- [20] 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(1):170-173.
- [21] El-Badry MM, Ding D, McFadden SL, et al. Physiological effects of auditory nerve myelinopathy in chinchillas[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25(5):1437-1446.
- [22] 丁大连, 李鹏, 亓卫东, 等. 耳蜗听神经纤维和耳蜗螺旋神经节的定量观察[A]//内耳组织病理学图谱[M]. 北京:中国出版集团有限公司, 世界图书出版公司, 2024:173-181.
- [23] Wang J, Ding D, Salvi R. Carboplatin-induced early cochlear lesion in chinchillas[J]. *Hear Res*, 2003, 181(1-2):65-72.
- [24] 丁大连, 李鹏, 亓卫东, 等. 前庭切片[A]//内耳组织病理学图谱[M]. 北京:中国出版集团有限公司, 世界图书出版公司, 2024:27-43.
- [25] Shearer AE, Hansen MR. Auditory synaptopathy, auditory neuropathy, and cochlear implantation[J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2019, 4(4):429-440.
- [26] 韩鹏, 赵欢娣, 张令, 等. 人工前庭植入及相关进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2023, 37(17):848-852.
- [27] 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.
- [28] Ding D, McFadden SL, Salvi R. Cochlear hair cell densities and inner-ear staining techniques. In: Willott, JF, (Ed.), *Handbook of Mouse Auditory Research from Behavior to Molecular Biology*. CRC Press, Boca Raton, 2001:189-204.
- [29] 丁大连, 李鹏, 亓卫东, 等. 不同种属实验动物耳蜗毛细胞年龄相关性缺失的不同模式[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2023, 29(4):7-13.
- [30] Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection[J]. *Int J Otolaryngol*, 2011, 2011:937861.

- [31] Ding D, McFadden SL, Browne RW, et al. Late dosing with ethacrynic acid can reduce gentamicin concentration in perilymph and protect cochlear hair cells[J]. *Hear Res*,2003,185(1-2):90-96.
- [32] Hu DN, Qui WQ, Wu BT, et al. Genetic aspects of antibiotic induced deafness; mitochondrial inheritance [J]. *J Med Genet*, 1991,28(2):79-83.
- [33] Hutchin T, Haworth I, Higashi K, et al. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics [J]. *Nucleic Acids Res*,1993,21(18):4174-4179.
- [34] Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA[J]. *Hum Mutat*,2006,27(11):1072-1081.
- [35] Cox EC, White JR, Flaks JG. Streptomycin Action and the Ribosome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1964,51(4):703-709.
- [36] Fritsch B, Pirvola U, Ylikoski J. Making and breaking the innervation of the ear; neurotrophic support during ear development and its clinical implications[J]. *Cell Tissue Res*,1999,295(3):369-382.
- [37] Stankovic K, Rio C, Xia A, et al. Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear[J]. *J Neurosci*,2004,24(40):8651-8661.
- [38] Fariñas I, Jones KR, Tessarollo L, et al. Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression [J]. *J Neurosci*,2001,21(16):6170-6180.
- [39] Leake PA, Stakhovskaya O, Hetherington A, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and electrical stimulation on survival and function of cochlear spiral ganglion neurons in deafened, developing cats[J]. *J Assoc Res Otolaryngol*,2013,14(2):187-211.
- [40] Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, et al. Temporary Neurotrophin Treatment Prevents Deafness-Induced Auditory Nerve Degeneration and Preserves Function [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(36):12331-12345.
- [41] Fang J, Li Z, Wang P, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome attenuates spiral ganglion neuron degeneration in aminoglycoside-induced hearing loss[J]. *Neural Regen Res*, June 03, 2024. DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-23-01879.
- [42] Neher JJ, Emmrich JV, Fricker M, et al. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2013,110(43):E4098-E4107.
- [43] Plesnila N, von Baumgarten L, Retiounskaia M, et al. Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity[J]. *Cell Death Differ*, 2007,14(8):1529-1541.

(收稿日期:2024-09-13)

**本文引用格式:**丁大连,石林,邢雅智,等. 鼓室注射庆大霉素引起的内耳神经系统继发病变[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2024,30(6):11-19. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202424356

**Cite this article as:**DING Dalian, SHI Lin, XING Yazhi, et al. Secondary neural damage in the inner ear induced by intratympanic gentamicin injection[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2024,30(6):11-19. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202424356