

## 膜迷路积水动物模型造模方法的研究进展\*

陈茜茜, 蒋丽元, 陈华德<sup>△</sup>

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

**摘要:** 膜迷路积水是梅尼埃病的基本病理改变, 本文就目前存在的建立膜迷路积水动物模型的方法及特点等作一综述, 为进一步研究和探讨梅尼埃病的机制、诊断及治疗提供更好的依据。

**关键词:** 梅尼埃病; 膜迷路积水; 动物; 模型

**中图分类号:** R322.9      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1000-2723(2015)01-0088-04

梅尼埃病(Meniere's disease, MD)是以反复发作性、自发性、阵发性眩晕, 听力损失, 耳闷、耳鸣等为主要临床表现的特发性膜迷路积水综合征。1861年法国医生首次报道了梅尼埃病, Hallpike 等<sup>[1]</sup>最先提出了梅尼埃病病人的病理改变为膜迷路积水。后来人们逐渐认识到, 膜迷路积水是许多内耳疾病相同的病理改变, 而 MD 仅为其中的一种。鉴于人耳的特殊性, 很多实验只能靠建立动物模型来进行, 因此, 动物模型的制作在梅尼埃病的研究中占据了很重要的地位。本文将目前膜迷路积水动物模型的造模方法及特点等综述如下。

### 1 手术法

Kimura 等<sup>[2]</sup>通过手术来阻塞豚鼠内淋巴管和破坏内淋巴囊, 首次成功在豚鼠体内复制出了膜迷路积水的动物模型。Konishi<sup>[3]</sup>在此基础上, 创立了后颅窝硬膜外进路法, 此法只破坏了部分骨内淋巴囊和淋巴导管, 对枕骨破坏小, 也减少了对硬脑膜和乙状窦的刺激, 存活率也较之前高。Dunnebie<sup>[4]</sup>探索出了一种不破坏前庭导水管的新方法。具体方法为: 模型分为 2 组, 第 1 组分离乙状窦和远端淋巴囊, 其间填充明胶海绵; 第 2 组用硝酸银烧灼附于乙状窦骨外的淋巴囊, 不填充任何物质。手术 23d 后取材, 观察到第 1 组大部分豚鼠中度到重度积水, 部分轻度积水, 最严重的部位在顶转, 其次

是底转; 第 2 组部分轻度积水。Dunnebie 认为, 内淋巴囊对于淋巴液的吸收是双向的。所以使淋巴囊和乙状窦完全分离是制作 MD 模型更好的手术方法, 能使我们更好地观察 MD 的病理生理学, 从而也证明了骨内的淋巴囊在调理膜迷路积水中起着重要的作用。

手术方法制作 MD 模型成功率高, 但是难度大, 操作技术要求严格, 动物易感染致死。

### 2 内分泌调节法

有研究发现 MD 患者血清中抗利尿激素(ADH)水平在病情发作时明显高于正常人<sup>[5]</sup>, 说明 ADH 在 MD 的致病机理中起着一定的作用。Kumagami 等<sup>[6]</sup>认为, 血管加压素(AVP)对膜迷路积水的影响是通过内淋巴囊对内淋巴液的重吸收实现的。其实验方法如下: 通过对豚鼠腹腔注射血管加压素, 0.5 单位/g·d<sup>-1</sup>, 连续注射 60d, 制作出了慢性膜迷路积水模型, 成功率为 70%, 其中 30% 中轻度积水, 40% 重度积水, 并指出: 内淋巴囊可能是 AVP 依赖调节的靶器官, 在内淋巴囊中可能存在 AVP-V2R-cAMP-AQP2 通道, AVP 在内耳通过作用于淋巴囊上皮细胞, 减少内淋巴囊对淋巴液重吸收而引起膜迷路积水。

醋酸去氨加压素是 ADH 的类似物, 邢巍巍等<sup>[7]</sup>通过腹腔注射醋酸去氨加压素的方法制备豚鼠膜

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81373757)

收稿日期: 2014-11-10

作者简介: 陈茜茜(1989-), 女, 浙江台州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 针灸治疗脑功能障碍性疾病的基础与临床。

<sup>△</sup>通信作者: 陈华德, E-mail: docchd@sina.com

迷路积水模型,  $4\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$ , 连续注射 1 周。1 周后观察到部分豚鼠有水平性眼震, 但时间无特异性, 第 3 周部分豚鼠出现走路蹒跚, ABR 阈值较对照组升高。耳蜗组织切片观察到了 40% 中度积水, 60% 重度积水, 积水程度从顶转到底转逐步加重, 部分前庭膜有破裂, AQP-2 在蜗管外侧壁、螺旋神经节及 Corti 氏器等处表达增加。该方法操作简单, 模型成功率较腹腔注射血管加压素高, 但是在模拟 MD 的临床表现方面仍较差。

蒋子栋等<sup>[8]</sup>在 Dunnebier<sup>[9]</sup>两期法的启发下, 发现单纯腹腔注射醛固酮也可以制做出膜迷路积水的模型。具体方法如下: 豚鼠腹腔注射醛固酮,  $0.1\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$ , 连续注射 5d。观察到 1 个月后开始出现轻度积水, 并随时间变长而加重, 从底转开始, 2 个月之内发展成了中度和重度, ABR 阈值较实验前明显提高。

### 3 透明质酸凝胶蜗顶注射法

Salt 等<sup>[10]</sup>通过豚鼠耳蜗顶转注射透明质酸凝胶的方法来诱导膜迷路积水模型, 观察到传感位点的持续性变化, Corti's 器向鼓阶移动, 而耳蜗内电位和复合动作电位的变化与 Corti's 器的移位相一致。并推测可能的原因为: 在注射过程中, 鼓阶底转产生的压力使前庭阶和外淋巴液之间产生了微小的压力差而使凝胶从鼓阶渗透到耳蜗导水管, 引起 Corti's 器向鼓阶的移动。该方法诱导的膜迷路积水可以模拟出 Corti's 器持续性向鼓阶凸出的病理改变, 耳蜗内部的电位变化也有助于解释 MD 患者对外界低频压力改变的敏感性。

### 4 人工淋巴液注射法

通过向鼓膜直接注射人工淋巴液是诱导膜迷路积水最直接最快速的方法。Kakigi 等<sup>[11]</sup>观察到, 往豚鼠鼓膜内连续注入淋巴液大于  $3\mu\text{L}$  时, 外淋巴液中钾离子的浓度明显升高, 并认为这是 MD 病患者前庭功能障碍的原因之一。Brown 等<sup>[12]</sup>通过微管在豚鼠内耳蜗中阶缓慢注入人工淋巴液, 观察到复合动作电位的阈值升高, 基底膜向鼓阶移动; 通过向椭圆囊注入人工淋巴液, 观察到前庭诱发动作电位的降低, 瞬时敏感性增加。而耳蜗内电位变化随着注射速度的快慢具有明显的波动性。这有助于解释 MD 患者波动性的病情变化。

### 5 噪声暴露法

Salt<sup>[13]</sup>将豚鼠置于 200Hz 的低频噪声环境中, 给声强度为 115dB SPL, 3min 后观察到, 膜迷路积水约增加 30%, 并在暴露结束后数分钟恢复, 造成了快速的暂时性的听力损伤和膜迷路积水。屈立新等<sup>[14]</sup>将豚鼠置于 4kHz 的窄带噪声环境中, 给声强度为 120dB SPL, 刺激时间为 4h, 观察到 ABR 阈值明显升高后, Caspase-12 蛋白含量在噪声刺激后迅速增高, 耳蜗螺旋神经元细胞(SGC)不同程度地凋亡, 并指出 Caspase-12 活化介导内质网应激参与噪声引起耳蜗 SGC 凋亡的过程, 能造成模型永久性的听力损失。噪声暴露法能快速建立有效的膜迷路积水动物模型, 但该方法诱导产生的积水并不稳定。

### 6 免疫法

Watanabe 等<sup>[15]</sup>用 KLH 诱导膜迷路积水动物模型, 先通过全身 KLH 致敏, 2 周后再次加强免疫, 之后将 KLH 注入内淋巴囊行局部免疫, 观察到 Reissner's 膜不同程度地凸向前庭阶, 检测到了从底转到顶转的一氧化氮合酶(iNOS)免疫反应, 并提出假设: iNOS 合酶在膜迷路积水中起着调节作用。通过免疫法诱导膜迷路积水发生率较高, 能模拟出 MD 的病理改变, 但造模后模型不稳定, 观察周期较长, 实验研究较少用。

### 7 综合法

Segenhout 等<sup>[16]</sup>利用两期法的原理, 先分离豚鼠左耳远端的淋巴囊, 之后腹腔注射注射醛固酮,  $100\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ , 连续注射 5d, 成功制备听力损伤的膜迷路积水动物模型。Dunnebier 和 Segenhout<sup>[17]</sup>再一次通过实验验证了此制作方法的优越性。该方法的优点在于, 很接近 MD 患者波动性的听力变化。手术诱导产生的膜迷路积水主要引起顶转低频听力的下降, 醛固酮主要引起底转高频听力的下降, 是较为理想的模型。

Kim 等<sup>[18]</sup>通过腹腔注射醛固酮联合鼓室注入脂多糖(LPS)的方法来诱导膜迷路积水的动物模型。其方法具体如下: 腹腔注射醛固酮  $100\mu\text{g}/100\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ , 与此同时, 通过左耳鼓膜将脂多糖注入到左鼓室,  $1\text{mg}/\text{d}$ , 连续注射 5d。耳蜗切片结果显示, 耳蜗轻度到中度的水肿, 在血管纹处压力渗透蛋白 94 (OSP94) 显著提高, 但是仍然没有模拟出前庭神经

功能紊乱的临床症状。

## 8 Phex 基因鼠模型

这种模型为 PhexHyp 和 PhexGy, 即位于 X 线染色体<sup>[19-20]</sup>上的具有造成同源性肽酶的磷酸调节功能丧失的基因模型。但是雄性 PhexGy 鼠不育, 从而失去了其作为研究工具的有用性。Lorenz 等<sup>[21]</sup>报道了一种新的动物模型, PhexHyp-Duk, 该种小鼠会表现出盘旋等前庭功能损害的征象, 包括前庭中阶的肿大和听力的损失, 并随年龄增长积水程度逐渐加重。Megerian 等<sup>[22]</sup>指出, 该种小鼠在出生后会自发性内耳功能损害, 包括盘旋, 头上下摇动, 步态不稳, 该表现在出生后 15d 即开始出现, 到 30d 的时表现已经非常明显。该模型可以作为一个较理想的模型来研究 MD, 因为它并不需要手术干预。

Ichikawa 等<sup>[23]</sup>发现, Phex 基因的突变量可能会对矿物离子的代谢产生影响。从而影响到细胞外磷酸盐浓度的设置点。Semaan 等<sup>[24]</sup>提出假说, PhexHyp-Duk 鼠产后膜迷路积水进行性恶化的机制可能与内耳螺旋神经元细胞凋亡有关。Wick 等<sup>[25]</sup>在总结该鼠模型时指出, Phex 基因鼠模型膜迷路积水的发展并不是完全由于基因的缺失, 而且该模型内耳螺旋神经元细胞的死亡先于内耳听细胞, 所以观察内耳螺旋神经元细胞的凋亡变性, 实时性的病理诊断, 以及未来神经元的保护治疗可能会成为以后研究 MD 的新着手点。

## 9 总结与展望

综上所述, 诱导膜迷路积水的动物模型方法各异, 原理也各不相同, 但都存在自己的局限性, 而且造模后对模型的临床表现的观察时间都偏短, 虽几经改进, 但 MD 的临床症状模拟仍未到达很理想的状态。尽管如此, 这些造模方法还是对 MD 的病因病理以及发病机制的研究带来了很大的促进作用。近几年发展起来的 Phex 鼠膜迷路积水动物模型作为 MD 的研究虽较为理想, 但是因为基因缺失而带来的对于模型本身其它方面影响仍需要做进一步的研究。

## 参考文献:

[1] Hallpike CS, Cairns H. Observations on the pathology of Meniere's syndrome[J]. Laryngol Otol, 1938, 31(11): 1317-1336.

[2] Kimura RS, Schuknecht HF. Membranous hydrops in the inner ear of the guinea pig after obliteration of the endolymphatic sac[J]. ORL, 1965, 27(6): 343-354.

[3] Konishi S, Shea J. Experimental endolymphatic hydrops and its relief by interrupting the lateral semicircular duct in guinea pigs[J]. Laryngol Otol, 1975, 89(6): 577-592.

[4] Dunnebier EA, Segenhout JM, Wit HP, et al. Endolymphatic hydrops after total dissection or cauterization of the distal portion of the endolymphatic sac [J]. ORL, 1996, 58(5): 271-276.

[5] Takda T, Taguchi D. Aquaporins as potential drug targets for Meniere's disease and its related diseases [J]. Handb Exp Pharmacol, 2009, 190: 171-184.

[6] Kumagami H, Loewenheim H, et al. The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear[J]. Pflug Arch, 1998, 43(6): 970-975.

[7] 邢巍巍, 王占伟, 刘永新, 等. 中耳加压治疗膜迷路积水及其机制的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(33): 17-22.

[8] 蒋子栋, 张连山. 醛固酮诱发豚鼠双耳膜迷路积水[J]. 中国医学科学院学报, 2002, 24(5): 501-504.

[9] Dunnebier EA, Segenhout JM, Wit HP. Two-phase endolymphatic hydrops: a new dynamic guinea pig model[J]. Acta Oto-Laryngologica, 1997, 117(1): 13-19.

[10] Salt AN, Brown DJ, Hartsock JJ, et al. Displacements of the organ of Corti by gel injections into the cochlear apex [J]. Hear Res, 2009, 250(1-2): 63-75.

[11] Kakigi A, Salt AN, Takeda T. Effect of artificial endolymph injection into the cochlear duct on perilymph potassium[J]. ORL Otorhinolaryngol Relat Spec, 2010, 71(1): 16-18.

[12] Brown DJ, Chihara Y, Wang Y. Changes in utricular function during artificial endolymph injections in guinea pigs [J]. Research paper, 2013, 304: 70-76.

[13] Salt AN. Acute endolymphatic hydrops generated by exposure of the ear to nontraumatic low-frequency tones [J]. Assoc Res Otolaryngol, 2004, 5(2): 203-214.

[14] 屈立新, 薛英, 薛秋红. Caspase-12 在强噪声暴露后豚鼠耳蜗螺旋神经节细胞凋亡中的动态观察[J]. 医学新知杂志, 2014, 24(1): 39-41.

[15] Watanabe K, Tomiyama S. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Cochlea following Immune Response in the Endolymphatic Sac of Guinea Pigs[J]. ORL, 2001, 63(3): 155-159.

[16] Dunnebier EA, Segenhout JM. Sensory Cell Damage in

- Two-phase Endolymphatic Hydrops: A Morphologic Evaluation of a New Experimental Model by Low-voltage Scanning Techniques [J]. *Otology & Neurology*, 2001, 22(5): 655-661.
- [17] Dunnebia EA, Segenhout JM. Cochlear ultrastructure in two-phase endolymphatic hydrops in the guinea-pig[J]. *Eur Arch Otorhino laryngol*, 2002, 259(1): 17-23.
- [18] Kim CH, Kim YC. Expression of osmotic stress protein 94 in murine endolymphatic hydrops model [J]. *Acta Oto-Laryngological*, 2012, 123(10): 118-123.
- [19] Francis F. A gene(PEX)with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets[J]. *Nat Genet*, 1995, 11(2): 130-136.
- [20] Strom TM. Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide models for X-linked hypophosphatemia [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(2): 165-171.
- [21] Lorenz DB, Guido VE. New intragenic deletions in the Pex gene clarify X-linked hypophosphatemia-related abnormalities in mice[J]. *Mamm Genome*, 2004, 15(3): 151-161.
- [22] Megerian CA, Semaan MT. A mouse model with postnatal endolymphatic hydrops and hearing loss [J]. *HearRes*, 2008, 237(1-2): 90-105.
- [23] Ichikawa S, Gray AK. Dosage effect of a Pex mutation in a murine model of X-linked Hypophosphatemia [J]. *Calcif Tissue In*, 2013, 93(2): 155-162.
- [24] Semaan MT, Zheng QY. Characterization of Neuronal Cell Death in the Spiral Ganglia of a Mouse Model of Endolymphatic Hydrops[J]. *Otol Neurotol*, 2013, 34(3): 559-569.
- [25] Wick CC, Semaan MT. A Genetic Murine Model of Endolymphatic Hydrops: The Pex Mouse[J]. *Curr Otorhino-laryngol Report*, 2014, 2(3): 144-151.
- (编辑:徐建平)

### Advances in Establishment of Endolymphatic Hydrops Animal Models

CHEN Xi-xi, JIANG Li-yuan, CHEN Hua-de

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT:** It is generally accepted that endolymphatic hydrops is the main histopathologic change of Meniere's disease. The purpose of this paper is to summarize the relevant publications on the development of experimentally induced endolymphatic hydrops in the animal model over recent years, and to provide a better basis for the further study of the mechanism, diagnosis and intervention of Meniere's disease.

**KEY WORDS:** Meniere's disease; endolymphatic hydrops; animal; model

(上接第 87 页)

- [3] 刘建鹏, 范红旗, 刘海金, 等. 肱骨干并发肱骨髁上髁间粉碎骨折 12 例治疗体会 [J]. *河北医科大学学报*, 2014(8): 937-939.
- [4] 杨阳, 李玛琳. 促骨修复的重组生长因子的研究开发进展 [J]. *云南中医学院学报*, 2013, 36(4): 96-100.
- [5] 郭英, 李雷, 常敏, 等. “原始创腔”理论在儿童肱骨髁上伸直型骨折治疗中的体会 [J]. *云南中医学院学报*, 2004, 27(4): 39-40.
- [6] 庄志强, 林乔龄, 洪嘉志, 等. 基于 Baumann 角测定在预测儿童肱骨髁上骨折并发肘内翻的发生率的临床意义 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2012, 32(2): 27-28.
- [7] 谭晓奋, 陈学忠, 鲁海江, 等. 经皮穿针治疗小儿肱骨髁上骨折疗效观察 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2013, 33(4): 44-45.
- [8] 江惠照. 儿童移位性伸直型肱骨髁上骨折 137 例临床观察 [J]. *新中医*, 2004, 36(3): 31-32.
- [9] 张世虎. 肱骨髁间骨折 38 例治疗的临床体会 [J]. *河南中医*, 2014, 34(B06): 229-229.
- [10] 吴丽娟. 小儿肱骨髁上骨折术后功能恢复的影响因素调查 [J]. *内蒙古中医药*, 2014, 33(7): 17-18.
- [11] 刘虹, 张黎, 石安华, 等. 云南省中医类别全科医师转岗理论培训的实践与思考 [J]. *云南中医学院学报*, 2014, 37(4): 84-86.
- [12] 董玮, 高启龙, 常敏, 等. 跟骨三柱分型法在临床教学中的应用探讨 [J]. *云南中医学院学报*, 2013, 36(1): 86-87.
- (编辑:徐建平)