

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )12-1097-03

## 豚鼠耳蜗血管交感神经支配的逆行追踪与免疫组化相结合的双标

申宇鹏, 邱建华, 乔莉, 刘顺利 (第四军医大学西京医院全军耳鼻咽喉专科中心, 陕西 西安 710033)

**Sympathetic nerve-innervated cochlear blood vessels in guinea pig: Retrograde tracing combined with immunohistochemical double-labeled technique**

SHEN Yu-Peng, QIU Jian-Hua, QIAO Li, LIU Shun-Li

Center of Otorhinolaryngology of Chinese PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the detailed innervation patterns of the sympathetic nerve to the cochlear blood vessels and related neurotransmitters in the guinea pig. **METHODS:** The spiral modiolar artery (SMA) in guinea pig cochlea was exposed by microsurgery, then the fluorogold (FG) or horseradish peroxidase (HRP) was given around the SMA for retrograde tracing. The bilateral superior cervical ganglia (SCG) and stellate ganglia (STG) were observed to find retrogradely labeled neurons. The neurotransmitters of these sympathetic fibers around SMA were ascertained by using retrograde tracing combined with immunohistochemical double-labeled technique. **RESULTS:** Retrogradely labeled neurons with FG or HRP were found in the rostral half of the ipsilateral SCG. No labeled neurons were observed in the contralateral SCG and the bilateral STG. Most of HRP-labeled neurons in SCG were TH-IR positive and NPY-IR positive, while none of them were CGRP- or SP-positive. **CONCLUSION:** The TH-IR positive and NPY-IR positive neurons in SCG send projections to the ipsilateral cochlear blood vessels. The norepinephrine and NPY may be used by sympathetic nerve to regulate cochlear blood flow.

**【Keywords】** spiral modiolar artery; sympathetic nerve; tyrosine 3-monoxygenase; immunohistochemistry; guinea pigs

**【摘要】**目的: 研究豚鼠耳蜗螺旋蜗轴动脉接受交感神经支配的具体来源情况及与该交感神经纤维调节功能相关的神经递质。方法: 在正常豚鼠单侧耳蜗螺旋蜗轴动脉局部滴加逆行追踪剂辣根过氧化物酶(HRP)或荧光金(FG), 观察双侧交感颈上神经节、星状神经节内 HRP 或 FG 逆标神经元的分

布, 采用逆标与免疫组化相结合的双重标记方法观察追踪阳性神经元是否表达酪氨酸羟化酶(TH)、神经肽 Y(NPY)、钙基因相关肽(CGRP)或 P 物质(SP)。结果: 同侧颈上神经节内可见逆行追踪阳性神经元胞体, 对侧颈上及双侧星状神经节内却未见阳性细胞, 阳性神经元多同时呈 TH、NPY 阳性, 但未见 CGRP 或 SP 双标的阳性神经元。结论: 豚鼠颈上神经节内存在 TH 及 NPY 阳性神经元支配同侧耳蜗血管, 去甲肾上腺素和神经肽 Y 可能是交感神经节后纤维调节耳蜗血流的递质或调质。

**【关键词】** 螺旋蜗轴动脉; 交感神经; 酪氨酸单氧化酶; 免疫组织化学; 豚鼠

**【中图分类号】** R339.16 **【文献标识码】** A

## 0 引言

耳蜗正常的血液供应对维持其生理功能及内环境稳定具有重要意义, 已证实耳蜗微血管存在复杂的调节机制, 交感神经系统、体循环血压、局部代谢产物、药物及血管活性肽等都会影响耳蜗血流。现有研究观察到哺乳动物耳蜗接受丰富的交感神经支配<sup>[1]</sup>, 且这些交感神经纤维大多是去甲肾上腺素能的。Wangemann 等<sup>[2]</sup>在体外实验观察到耳蜗的主要供血动脉如: 基底动脉、小脑前下动脉及螺旋蜗轴动脉的收缩都受到交感神经的调节。邱建华等<sup>[3]</sup>观察到豚鼠螺旋蜗轴动脉及其放射状动脉周围均有不同程度的酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)免疫反应阳性神经纤维的分布。本研究旨在明确豚鼠耳蜗螺旋蜗轴动脉接受交感神经节后纤维支配的具体来源情况以及与该交感神经纤维调节功能相关的神经递质, 为进一步研究交感神经对耳蜗血流的调节作用奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选用健康、耳廓反射灵敏的白色豚鼠 12 只, 由第四军医大学实验动物中心提供, 体质量(280 ± 50)g, 雌雄不拘, 自由摄取食水。将豚鼠随机分为 3 组: 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)追踪组, 荧光金(fluorogold, FG)追踪组和对照组。追踪用 HRP 及显色剂四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)购自德国 Roche 公司, 免疫组织化学 ABC 试剂盒、兔抗神经肽 Y(NPY)及 P 物质(SP)抗体

收稿日期 2006-02-21; 接受日期 2006-03-22

通讯作者: 邱建华. Tel: (029)84775381 Email: qiujh@fmmu.edu.cn

作者简介: 申宇鹏. 硕士生(导师邱建华), 医师. Tel: (029)82554079

Email: shenyp@fmmu.edu.cn

(1:100)购自武汉博士德生物制品有限公司,FG及兔抗TH、钙基因相关肽(CGRP)抗体(1:5000)均购于美国Sigma公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物模型制作** 采用20 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)肌肉注射麻醉,所有动物术前测试听觉脑干反应(auditory brainstem response, ABR)均为正常,均选择右耳手术。手术采取右颈侧进路,切断茎突及其附着肌腱后打开听泡,暴露耳蜗并拭去底转外侧壁表面黏膜,微型钻于耳蜗底转行骨壁开窗,直径约1.5 mm,吸除外淋巴液,高倍显微镜下去除部分基底膜及骨性螺旋板,仔细暴露螺旋蜗轴动脉(spiral modiolar artery, SMA),将浸有1  $\mu$ L追踪剂(300 g/L HRP或30 g/L FG溶于生理盐水)的明胶海绵微球置于SMA表面,术中避免追踪剂流入中耳腔,骨水泥封闭耳蜗骨窗及听泡开口,缝合关闭伤口,应用磺胺嘧啶钠预防感染。对照组使用生理盐水代替300 g/L HRP溶液。

**1.2.2 取材、切片** HRP追踪组豚鼠术后存活48 h,FG追踪组豚鼠术后存活7 d。采用20 g/L戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,开胸经心脏升主动脉插管灌注生理盐水200 mL冲出血液,继之用低温(4 $^{\circ}$ C)含40 g/L多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)600 mL缓慢灌注固定2 h。迅速分离暴露颈交感链,取下双侧颈上神经节及星状神经节,标本用新鲜40 g/L多聚甲醛缓冲液后固定6~8 h,经0.01 mol/L PBS漂洗后置入300 g/L蔗糖磷酸缓冲液(pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)至沉底。OCT胶包埋后用恒冷箱切片(CM1900, Leica, Heidelberg, Nussloch, Germany),片厚16  $\mu$ m。FG追踪组标本切片后即可在Olympus荧光显微镜下观察并照相,激发光波长为323 nm。

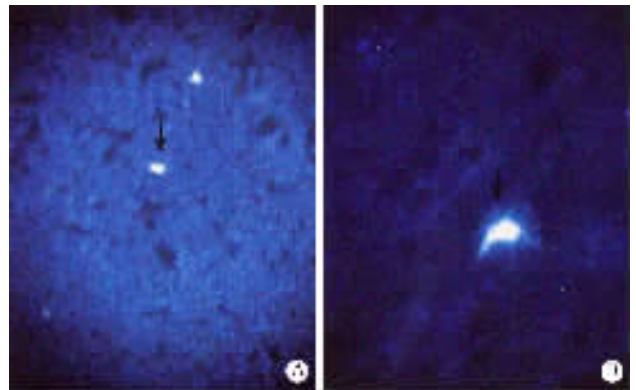
**1.2.3 免疫组化实验** HRP追踪的切片分为5组,采用钨酸钠加强的TMB法行HRP显色反应,观察显色结果并照相。其中4组切片继续行TH, NPY, CGRP或SP免疫组织化学染色。

切片经0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 5.4)漂洗10 min,用含50 mL/L牛血清白蛋白、50 mL/L正常羊血清和4 g/L TritonX-100的磷酸盐缓冲液封闭2 h,清洗后分别加入兔抗TH, CGRP(1:5000), NPY或SP(1:100)多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C孵育48 h,抗体稀释液用含10 mL/L牛血清白蛋白、10 mL/L正常羊血清和4 g/L Triton X-100的磷酸盐缓冲液配制。生物素标记的羊抗兔IgG室温孵育2 h,ABC复合液室温孵育

30 min, DAB显色后,轻微脱水,透明,封片, Olympus光学显微镜观察并照相。双染色过程中注意漂洗液pH值以避免HRP标记产物洗脱。

## 2 结果

**2.1 FG逆行追踪** 豚鼠耳蜗螺旋蜗轴动脉局部滴加FG后7 d,同侧颈上神经节内可见FG标记神经元,在323 nm激发光下发出金黄色荧光。FG标记神经元数量约在5~16个,绝大部分位于颈上神经节头侧或中部,大小不等(图1)。部分FG标记神经元可见到明显的轴突及相对空白的核区。对侧颈上神经节及双侧星状神经节未见FG标记神经元。

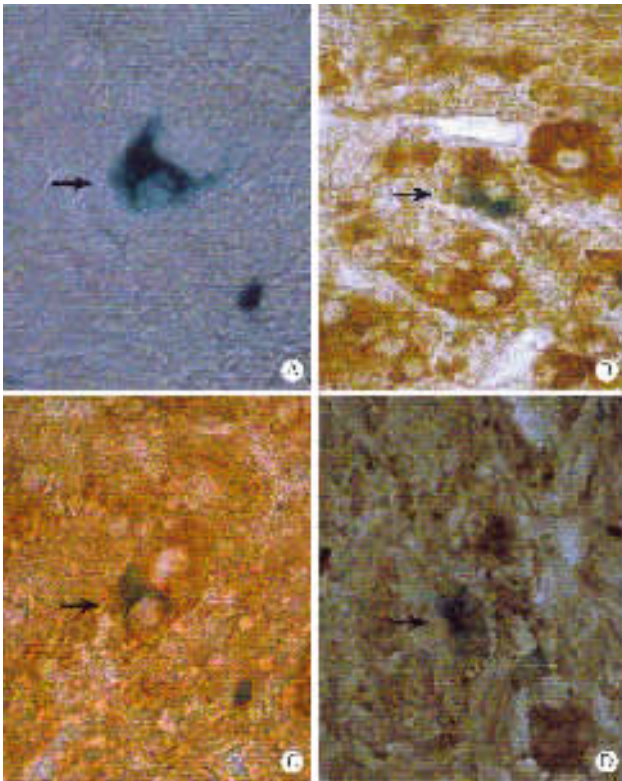


A:  $\times 200$ ; B:  $\times 400$ .

图1 颈上神经节内FG逆标神经元

**2.2 HRP逆行追踪** 耳蜗螺旋蜗轴动脉局部滴加HRP后48 h,经钨酸钠-TMB法呈色,同侧颈上神经节内可见HRP标记神经元。标记神经元呈深蓝绿色,核区明显淡染,少数神经元可见突起,高倍镜下可见胞浆内的蓝绿色颗粒(图2A)。手术同侧颈上神经节内HRP标记神经元的数量约为4~12个,大小不等,形态各异,其分布与FG追踪组相似,几乎全部位于颈上神经节头侧半,对侧颈上神经节及双侧星状神经节内未见HRP标记神经元。对照组双侧颈上神经节及星状神经节切片经TMB法染色,均未发现标记神经元。

**2.3 HRP逆标与TH, NPY免疫组化染色相结合的双重标记** 将部分HRP标记的切片继续行TH或NPY的免疫组化反应。颈上神经节内有大量的TH阳性神经元和NPY阳性神经元,多数HRP追踪阳性神经元同时呈TH阳性,HRP-TH双标神经元胞体内可同时见到深蓝绿色颗粒和棕黄染色颗粒(图2B, C)。多数HRP追踪阳性神经元也呈NPY阳性(图2D)。



A: 颈上神经节内 HRP 标记神经元; B: 颈上神经节内 HRP-TH 双标神经元; C: 显示图 A 内的 HRP 逆标神经元同时呈 TH 阳性; D: 颈上神经节内 HRP-NPY 双标神经元。

图 2 颈上神经节内 HRP 逆标神经元及结合 TH, NPY 免疫组化染色的双重标记  $\times 400$

**2.4 HRP 逆标与 SP, CGRP 免疫组化染色相结合的双重标记** 将部分 HRP 追踪的切片行 SP 及 CGRP 免疫组化反应。颈上神经节内可见 CGRP 阳性神经元, 数量明显少于 TH, NPY 阳性神经元, 颈上神经节内偶可见到 SP 阳性细胞, 但 SP 阳性终末比较密集, 未见 HRP-SP 或 HRP-CGRP 双标神经元。

### 3 讨论

耳蜗的供血主要来自椎-基底动脉系统的小脑前下动脉分出的迷路动脉、耳蜗总动脉、耳蜗主动脉及前庭耳蜗动脉<sup>[4]</sup>。耳蜗主动脉沿蜗底向蜗顶呈螺旋样走行, 形成螺旋蜗轴动脉, 其在不同位置发出的各级动脉和放射状动脉提供了包括蜗轴在内 3/4 的耳蜗血流。已有研究证实, 耳蜗螺旋蜗轴动脉和骨螺旋板周围存在酪氨酸羟化酶及多巴胺  $\beta$  羟化酶阳性纤维分布, 分布于血管周围的去甲肾上腺素能纤维可能参与耳蜗微循环的调节。

本研究观察到豚鼠耳蜗螺旋蜗轴动脉周围给予神经逆行追踪剂后, 同侧颈上神经节内可见逆行标记神经元, 而对侧颈上神经节及双侧星状神经节未见逆

行标记神经元。可见分布于耳蜗血管周围的交感神经节后纤维主要来源于同侧颈上神经节, 这与 Gil-Loyzaga 等<sup>[5]</sup>报导的切除大鼠颈上神经节后同侧耳蜗内去甲肾上腺素浓度下降 82% 相符合。也有研究报道星状神经节对耳蜗血流的调节起主要作用, 但本研究未能在双侧星状神经节内观察到逆标神经元, 这种现象可能与追踪剂敏感性和动物存活时间有关, 也可能因为星状神经节发出的节后纤维主要分布于椎-基底动脉系统的较大分支来行使其调节功能, 而位于蜗轴内的交感神经纤维则主要来源于同侧颈上神经节。

同时我们还通过对逆标神经元行 TH, NPY, CGRP 及 SP 的免疫组化染色观察到, 这些分布于螺旋蜗轴动脉周围的交感神经节后纤维来源于同侧颈上神经节内的 TH 阳性神经元, 并且大多同时呈 NPY 阳性。这也提示了交感神经节后纤维及其相关递质对耳蜗微循环起重要的调节作用, 这种调节作用可能是通过去甲肾上腺素、多巴胺及神经肽类等多种神经递质协同完成, 也可能受到 SP, CGRP 阳性的交感神经节前纤维的上位调控。目前认为耳蜗微血管系统对机体灌注压的改变存在显著的自身调节反应, 以保持耳蜗微循环的相对稳定。Watanabe 等<sup>[6]</sup>观察到猫单侧颈上神经节切除后同侧耳蜗侧壁血管纹处微血管明显扩张, 结合我们的研究结果可以推测交感颈上神经节对耳蜗微血管的神经支配参与了维持内耳微循环稳定的复杂的调控网络, 其具体调节机制以及失交感神经支配后耳蜗听觉生理和血流的变化情况有待深入研究。

### 【参考文献】

- [1] Lyon MJ, Payman RN. Comparison of the vascular innervation of the rat cochlea and vestibular system [J]. *Hear Res*, 2000, 141(1-2): 189-198.
- [2] Wangemann P, Wonneberger K. Neurogenic regulation of cochlear blood flow occurs along the basilar artery, the anterior inferior cerebellar artery and at branch points of the spiral modiolar artery [J]. *Hear Res*, 2005, 209(1-2): 91-96.
- [3] 邱建华, 乔莉, 刘顺利. 耳蜗血管交感及感觉神经双重调节的形态学证据 [J]. *听力学及言语疾病杂志* 2004, 12(2): 96-97.
- [4] Nakashima T, Naganawa S, Sone M, et al. Disorders of cochlear blood flow [Review] [J]. *Brain Res*, 2003, 43(1): 17-28.
- [5] Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres MA, Arce A, et al. Effect of superior cervical ganglionectomy on catecholamine concentration in rat cochlea [J]. *Brain Res*, 1998, 779(1-2): 53-57.
- [6] Watanabe K, Sugimoto T, Tsunoda A. Effect of sympathectomy on capillaries of the cochlear lateral wall [J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 1990, 52(4): 205-210.