

对氨基苯肿酸损伤小鼠前庭的实验模型

栗志远¹, 王新红¹, 黄 矛² (1. 中国人民解放军第 22 医院, 青海 格尔木 816000; 2. 第二军医大学新药评价中心, 上海 200433)

摘要 目的:建立一种操作简单、切实可行的前庭损伤小鼠模型。**方法:**动物全麻后中耳注射 100 mg/mL 对氨基苯肿酸溶液 0.05 mL。3 d 后以空中翻正反射成功率、接触翻正反射恢复时间以及头偏和游泳行为学评分对小鼠前庭功能作评估。**结果:**内耳注射对氨基苯肿酸溶液后, 小鼠空中翻正反射成功率明显降低、接触翻正反射恢复时间明显延长, 头偏明显且游泳能力显著降低, 提示对氨基苯肿酸溶液损伤了前庭器官。**结论:**该模型是一种操作简单、切实可行的前庭损伤小鼠模型。

关键词 化学迷路切除; 对氨基苯肿酸; 小鼠; 模型; 前庭功能

中图分类号: R965.1; R852.33 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)06-0427-03

An animal model of experimental vestibular dysfunction by intratympanically injecting arsanilic acid in mice

LI Zhi-yuan¹, WANG Xin-hong¹, HUANG Mao² (1. The 22nd Hospital of PLA, Gemu 816000, China; 2. Center for New Drug Evaluation, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To establish a convenient and feasible animal model of vestibular dysfunction for pharmacodynamic study in mice. **Methods:** Both inner ears of the animals were intratympanically injected with 100 mg/mL solution of arsanilic acid for 0.05 mL. 3 days later, vestibular function was assessed by air righting reflex and contact righting reflex, as well as the head tilt and swimming behavior. **Results:** Correct landings rates of air righting reflex were decreased; time of contact righting reflex was prolonged; scores of head tilt and swimming behavior were higher than control. **Conclusion:** It is a convenient and feasible model of experimental vestibular dysfunction with injections of arsanilic acid in the inner ears of mice for research on pharmacodynamics of prophylactic drug for motion sickness and vertigo.

KEY WORDS Chemical labyrinthectomy; arsanilic acid; mice; model; vestibular function

前庭神经系统是人空间定向和保持平衡的重要系统, 其功能异常和病理改变是晕动病或眩晕的重要原因。晕动病是因机体暴露于运动环境中, 受不适宜的运动环境的刺激而引起 的神经系统功能失调; 眩晕是一种自身或外界物体的运动性幻觉, 是自我平衡感觉障碍或空间位置感觉的自我体会错误。二者都由前庭刺激诱发并且都伴有头晕、上腹部不适、恶心、呕吐、出冷汗、面色苍白等前庭和自主神经反应为主的症候群。可见, 晕动病和眩晕与前庭器官关系密不可分^[1,2]。

在实验型晕动病动物模型的研究中, 常需破坏动物的前庭器官, 观察前庭毁坏前后动物晕动病指标的变化, 以证实前庭器对诱发晕动病的必需性^[3]。因此, 前庭功能损伤的模型在前庭生理、病理及药理研究, 尤其是眩晕和晕动病等的研究中也愈显重要。

作者简介: 栗志远 (1976-), 男, 博士, 主管药师。E-mail: zhiyuani88@yahoo.com.cn.

松鼠猴、豚鼠和大鼠等动物内耳听泡较大而易实施外科手术, 常用于研究迷路切除前后动物前庭平衡功能、晕动病症状及其二者之间的关系^[3-6]。而小鼠由于内耳小而脆, 外科手术难度大, 在晕动病和前庭功能整体动物的研究中极少采用。Nakagawa 等^[7]虽然通过外科手术于外半规管和后半规管注射新霉素, 建立了感觉毛细胞损伤的小鼠模型, 但具体操作复杂, 手术过程本身亦损伤毛细胞。

有研究曾经建立了庆大霉素损伤小鼠前庭的实验模型, 为前庭生理、眩晕、晕动病和药理学等的研究提供简便实验模型^[8]。但是, 庆大霉素具有明显的肾毒性, 对前庭功能的影响程度尚未清楚。

小鼠具有生殖力强、低成本、生理学和遗传学特征与人相似等优势, 在疾病和功能紊乱尤其是晕动病和前庭功能等方面研究的价值日显重要^[9]。本实验以小鼠为研究对象, 观察了内耳注射氨基苯肿酸钠溶液对前庭器官的损伤, 为前庭生理、眩晕、晕

动病和药理学等的研究提供简便实验模型。

1 材料和方法

1.1 动物 健康昆明种小鼠 20 只,雌雄各半,体重 18~22 g。由上海复旦大学医学院实验动物部提供(清洁级),实验动物质量合格证号:SCXK(沪)2002~0002。实验前在恒温室(20±2)℃饲养适应一周。

1.2 药物 对氨基苯胂酸(arsanilic acid, AA),购自 Sigma 公司。临用时 100 mg/mL 的 AA 溶液溶于 0.3 M NaHCO₃ 溶液即可。

1.3 游泳装置 用 DK 型电热恒温水浴器(上海精宏实验设备有限公司生产)代替。盛水的不锈钢内胆 30 cm×36 cm,水深 12 cm,水浴恒温控制在 37℃。

1.4 方法

1.4.1 给药方案 小鼠 20 只,随机分为 2 组,即对氨基苯胂酸(AA)组和空白对照(生理盐水)组,每组 10 只。动物经戊巴比妥钠麻醉后,穿过鼓膜向双侧内耳内注射药物。AA 组和空白对照组分别注射对氨基苯胂酸溶液和生理盐水 0.05 mL,注射后保持耳向上体位 5 min,然后用火棉胶塞紧以防外漏^[10,11]。监测动物,待动物清醒后归笼恢复 3 d。

1.4.2 前庭功能的评价^[12,13] 内耳注射药物 3 d 后分别用以下方法对小鼠前庭功能进行评估。

1.4.2.1 空中翻正反射(Air righting reflex) 于一平面铺上海绵,距离海绵 50 cm 处,将动物从空中仰卧位水平落下,观察动物着地的体位,以四足平稳落地为阳性。正常动物能够四足平稳落地,前庭功能异常者身体或其它部位首先着地,观察 5 次试验中每只动物准确着地的阳性率来评价动物前庭功能。

1.4.2.2 接触翻正反射(Contact righting reflex) 将小鼠置于去芯 50 mL 注射器外管中,使其呈仰卧位。正常小鼠能辨认颠倒位而在注射器外管中数秒钟内翻正体位;前庭损伤小鼠则难以辨认颠倒位而不能翻转或体位翻正时间延长。实验中观察并记录小鼠翻正反射恢复时间。

1.4.2.3 头偏和游泳行为评分法(Head tilt and swimming behavior rating) 将小鼠置于盛水容器中央,观察小鼠在 2 min 内的游泳行为,以小鼠头偏和游泳行为来评分。评分标准^[8]如下,0 分:无明显损伤(无头偏,直线游到容器的一侧,爬壁);1 分:轻微损伤(无明显头偏,轻微环形游动,试图爬壁);2 分:中度损伤(轻微头偏,频繁环形游动,不能一贯达壁);3 分:严重损伤(明显头偏,环形游动,无法达壁)。

1.4.2.4 其它方法 正常小鼠水平旋转后倾倒现象明显,前庭损伤小鼠水平旋转后无明显倾倒现象。

1.5 统计方法 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表

示,采用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 χ^2 分析。

2 结果

给药后 d4, AA 组大鼠一般体征表现为:头偏、躯干卷曲、肢体外展、强迫环形运动和头震(和称眼震样头震)等;且旋转后无明显倾倒现象。空白对照组小鼠行为正常,倾倒现象明显。小鼠空中翻正反射准确率、接触翻正反射时间及头偏和游泳行为评分分别见图 1、图 2 和图 3。

2.1 空中翻正反射 距离海绵 50 cm 处,将动物从空中仰卧位水平落下时,空白对照组小鼠能够四肢正常落地,成功率达 87%。相反,AA 组小鼠很难完成翻正反射,身体在空中多次翻滚,落地时常头部或背部着地,成功率约 25%,显著低于空白对照组($P < 0.01$)。

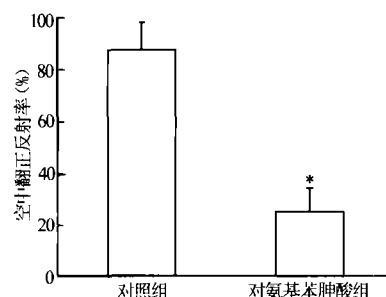


图 1 小鼠空中翻正反射准确率($n=8$)
* $P < 0.01$,与对照组比较

2.2 接触翻正反射 置于 50 mL 注射器呈仰卧位的空白对照组小鼠能够在 5 s 内翻正体位,而 AA 组小鼠约 40 s 内恢复正常体位而翻正。二者接触翻正反射时间具有统计学意义($P < 0.01$)。

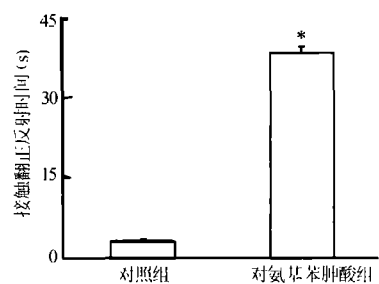


图 2 小鼠接触翻正反射时间($n=8$)
* $P < 0.01$,与对照组比较

2.3 头偏和游泳评分 与空白对照组比较,AA 组小鼠游泳行为学评分显著升高($P < 0.01$)。空白对照组小鼠游泳行为正常,头伸出水面直线游动,试图爬出容器;AA 组小鼠不能保持身体的平衡和控制前进方向,头几乎不能伸出水面,表现为身体下沉或翻滚。

以上结果显示,AA 组小鼠给药后与对照组比较,空中翻正准确率、接触翻正反射时间及头偏和游

泳评分均具有统计学意义($P < 0.01$),提示AA组小鼠前庭功能已经破坏。

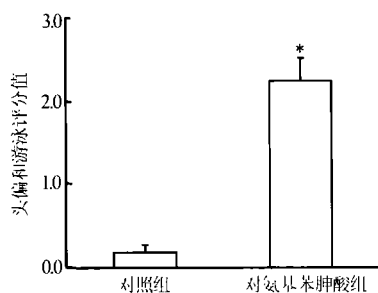


图3 小鼠头偏和游泳行为评分分值($n=8$)

* $P < 0.01$,与对照组比较

3 讨论

砷衍生物对鸽子,小鼠,猪、犬和人具有明显的耳毒性,尤其是对氨基苯酸钠,能有效毁坏大鼠、豚鼠和草地鼠迷路系统^[11]。内耳注射对氨基苯酸钠可致脑干前庭神经变性,并伴有迷路翻正反射丧失和头偏等失衡等症状。该化合物也可破坏壶腹嵴和囊斑的分泌细胞,最终破坏毛细胞和迷路系统渗透性。因此,本实验采用对氨基苯酸钠的碳酸氢钠溶液作为破坏小鼠迷路的工具药,观察了内耳注射该物后对小鼠前庭功能的影响。实验结果显示,内耳注射对氨基苯酸钠溶液后小鼠出现了倾倒反射现象消失、空中翻正反射和接触翻正反射能力下降、以及游泳行为障碍等症状,提示对氨基苯酸钠破坏了小鼠前庭器官。

空间的定向需要前庭、视觉和本体感受器的正常传入。视觉和本体感受器在水中的作用相对减弱,所以小鼠头偏和游泳行为是反映前庭系统功能变化的敏感指标。游泳时,前庭破坏后的小鼠不能保持身体的平衡和控制前进方向,表现为身体下沉或翻滚。头偏行为和游泳定向能力障碍反映了对氨基苯酸钠对大鼠前庭系统机能的影响。头偏和游泳行为评估的是半规管和耳石器功能,耳石器位于椭圆囊、球囊中,故头偏和游泳行为能够全面评价前庭功能。

空中翻正反射实验中,啮齿类动物对视觉信息的依赖较少,由于接近失重和四肢缺乏接触物,本体信息实际上是缺乏的,故小鼠前庭信息的传入为主;接触翻正反射实验中,动物实际上接收了关于翻正位置的错误本体信息,视觉信息和本体信息一样都微乎其微。空中和接触翻正反射中是前庭信息决定动物翻正^[12]。因此,翻正反射实验能有效评价前庭功能。

有研究表明对氨基苯酸钠能引起前庭器官的病理学改变^[10];而且,在庆大霉素损伤小鼠前庭模型的研究中,翻正反射、游泳等行为学明显障碍的小

鼠,其前庭器官的病理组织也出现明显异常,如囊斑或壶腹嵴纤毛减少或弯曲等^[8]。因此,本实验没有进行小鼠前庭器官或前庭神经损伤程度的病理检查。本实验中,给予AA的小鼠也出现类似于庆大霉素损伤的前庭行为学变化,提示该评价前庭行为的方法可靠,可以作为评估迷路成功切除的标准。

因此,空中翻正反射、接触翻正反射以及头偏和游泳行为可直接评价小鼠前庭功能,内耳注射对氨基苯酸钠溶液可以建立一种适合前庭生理、眩晕和晕动病研究的前庭损伤小鼠模型。

参考文献:

- [1] Takeda N, Morita M, Horii A, et al. Neural mechanisms of motion sickness[J]. J Med Invest, 2001, 48(1-2):44.
- [2] Zajonc TP, Roland PS. Vertigo and motion sickness. Part I: vestibular anatomy and physiology[J]. Ear Nose Throat J, 2005, 84(9):581.
- [3] Gilchrist DP, Cartwright AD, Burgess AM, et al. Behavioural characteristics of the quick phase of vestibular nystagmus before and after unilateral labyrinthectomy in guinea pig[J]. Exp Brain Res, 2003, 149(3):289.
- [4] Morita M, Takeda N, Kubo T, et al. Pica as an index of motion sickness in rats[J]. ORL, 1988, 50(3):188.
- [5] Ossenkopp KP, Parker LA, Limebeer CL, et al. Vestibular lesions selectively abolish body rotation-induced, but not lithium-induced, conditioned taste aversions (oral rejection responses) in rats[J]. Behav Neurosci, 2003, 117(1):105.
- [6] Matsunami K. Squirrel monkeys and space motion sickness[J]. Jpn J Physiol, 2002, 52(1):1.
- [7] Nakagawa T, Kim TS, Murai N, et al. A novel technique for inducing local inner ear damage[J]. Hear Res, 2003, 176(1-2):122.
- [8] 栗志远,黄矛,张晓冬,等.庆大霉素损伤小鼠前庭的实验模型[J].癌变·畸变·突变,2006,18(1):1.
- [9] Malakoff D. The rise of the mouse, biomedicine's model mammal[J]. Science, 2000, 288(5464):248.
- [10] Kim MS, Kim JH, Jin YZ, et al. Temporal changes of cFos-like protein expression in medial vestibular nuclei following arsanilate-induced unilateral labyrinthectomy in rats[J]. Neurosci Lett, 2002, 319(1):9.
- [11] Ossenkopp KP, Eckel LA, Hargreaves EL, et al. Sodium arsanilate-induced vestibular dysfunction in meadow voles (Microtus pennsylvanicus): effects on posture, spontaneous locomotor activity and swimming behavior[J]. Behav Brain Res, 1992, 47(1):13.
- [12] Khan Z, Carey J, Park HJ, et al. Abnormal motor behavior and vestibular dysfunction in the stargazer mouse mutant[J]. Neuroscience, 2004, 127(3):785.
- [13] Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, et al. Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat[J]. Hear Res, 2001, 158(1-2):165.

收稿日期:2008-05-26