

周凌,宣伟军,丁大连. CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞随着年龄增长不同损害模式的比较[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 790-798.

Zhou L, Xuan WJ, Ding DL. Comparison of different damage patterns of cochlear hair cells between CBA/CaJ and C57BL/6J mice with aging [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 790-798.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.016

CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞 随着年龄增长不同损害模式的比较

周凌¹, 宣伟军^{2,3,*}, 丁大连⁴

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院耳鼻喉科, 哈尔滨 150040; 2. 广西中医药大学第一临床医学院
耳鼻喉科, 南宁 530023; 3. 马萨诸塞州总医院, 哈佛大学医学院, 波士顿 MA 02114, 美国;
4. 听力与耳聋中心, 纽约州立布法罗大学, 布法罗 NY 14214, 美国)

【摘要】 目的 探讨和比较 CBA/CaJ 与 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞随着年龄增长不同损害模式与规律。
方法 选择年龄在 6 个月、12 个月、18 个月和 24 个月的 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠各 32 只, 其中每个年龄各 8 只, 全身麻醉下取耳蜗, 进行全耳蜗基底膜铺片, 将全耳蜗内、外毛细胞计数结果输入计算机并应用耳蜗图软件, 按照对应的不同年龄进行两个鼠种耳蜗毛细胞密度对比和统计学分析。**结果** CBA/CaJ 小鼠于 12 月龄耳蜗顶部外毛细胞开始出现轻度损失, 伴随着年龄增加, 外毛细胞损失继续扩大, 以顶部向中部发展为主, 后期内毛细胞也出现损失。从 18 月龄开始, 耳蜗外毛细胞损失与上个年龄组比较均增加显著 ($P<0.05$)。而 C57BL/6J 小鼠于 6 月龄耳蜗底部均已出现外、内毛细胞损失, 而且以外毛细胞损失为主, 此后伴随着年龄增加, 毛细胞损失不断扩大, 于 6 月龄开始, 耳蜗外、内毛细胞损失与同龄 CBA/CaJ 小鼠比较均明显增加 ($P<0.05$), 12 月龄开始与同鼠种上个年龄组比较均明显增加 ($P<0.05$)。**结论** CBA/CaJ 小鼠耳蜗毛细胞损害遵循着从顶部和底部两端开始, 向中部延伸, 但顶部毛细胞损害比底部严重的病变规律。C57BL/6J 小鼠耳蜗毛细胞损害遵循着主要从耳蜗底部开始, 逐渐向中部和顶部扩展的病变规律。外毛细胞损害比内毛细胞早。C57BL/6J 小鼠毛细胞损害比 CBA/CaJ 小鼠早。提示两个鼠种均可作为老年性毛细胞凋亡研究动物模型, 但以 C57BL/6J 小鼠模型更适合短期观察研究, 两者间所出现的毛细胞变化差别可能与 Cdh23 基因是否变异和缺失有关。

【关键词】 小鼠; 耳蜗毛细胞; 耳蜗图

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0790-09

Comparison of different damage patterns of cochlear hair cells between CBA/CaJ and C57BL/6J mice with aging

ZHOU Ling¹, XUAN Weijun^{2,3,*}, DING Dalian⁴

(1. Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China. 2. Department of Otorhinolaryngology, the First Clinical Medical College of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China. 3. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA 02114, USA. 4. Center for Hearing and Deafness, the State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY 14214, USA)

Corresponding author: XUAN Weijun. E-mail: xuan5352100@sina.com

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (81973913, 81774374, 81373700, 81260552)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81973913, 81774374, 81373700, 81260552)。

【作者简介】 周凌 (1957—), 女, 教授, 研究方向: 耳聋, 鼻窦炎。Email: zhouling8913@163.com

【通信作者】 宣伟军 (1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 耳聋及其他耳鼻咽喉科疾病; 光动力学。Email: xuan5352100@sina.com

[Abstract] Objective To investigate the different patterns of cochlear hair cell loss in CBA/CaJ and C57BL/6J mice with aging. **Methods** Thirty-two CBA/CaJ or C57BL/6J mice at 6, 12, 18, and 24 months of age were selected, with 8 mice in each age group. The cochleae were removed under general anesthesia, and then the intact basement membrane was taken out from the cochlea and used for making glass slides of whole cochlear basement membrane. The numbers of cochlear inner and outer hair cells were counted, and input into the computer using cochleogram software. The density of cochlear hair cells in the two mouse strains were compared at corresponding ages, and statistically analyzed. **Results** The outer hair cells from cochlear apex in the CBA/CaJ mice at 12 months of age began to loss slightly. With the increase of age, the losses of outer hair cells were continuously expanded, and their developments were mainly from the top to the middle part. The losses of inner hair cells also occurred in the later period. From 18 months of age on, the losses of the cochlear outer hair cells were increased significantly by comparison with that of the last age ($P < 0.05$). However, the losses of the outer and inner hair cells at the cochlear bottom appeared in C57BL/6J mice at the 6 months of age, and the losses were mainly of the outer hair cells. From then on, the losses of outer hair cells were continuously expanded with the increase of age. From 6 months of age on, the losses of the cochlear outer and inner hair cells were increased significantly compared with that of the CBA/CaJ mice at the same age ($P < 0.05$). From 12 months of age on, the losses of the cochlear outer and inner hair cells were increased significantly compared with that of the same strain ($P < 0.05$). **Conclusions** The damages of cochlear hair cells in the CBA/CaJ mice obey the rule of pathological changes that began at both ends of the cochlear top and bottom, and extended to the middle part, but the damages of hair cells at cochlear top were more serious than that at the cochlear bottom. The damages of cochlear hair cells in the C57BL/6J mice obey the rule of pathological changes that began mainly at the cochlear bottom and gradually extended to the middle and top. The damages of outer hair cells are earlier than that of inner hair cells. The damages of hair cells in C57BL/6J mice are earlier than that in CBA/CaJ mice. These result suggest that both species of mice can be used as animal models for the research of age-related hair cell apoptosis, but the model of C57BL/6J mouse is more suitable for the research of short-term observation. The differences of hair cell changes between the CBA/CaJ and the C57BL/6J mice may be related to the mutation and deletion of Cdh23 gene.

[Keywords] mice; cochlear hair cells; cochleograms

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

老年性聋又称年龄相关性聋 (age-related hearing loss, AHL), 随着世界人口的老年化, AHL 的发病率也逐年递增^[1]。AHL 因其病因病机复杂和防治困难, AHL 成为当前耳科学研究的重要热门课题之一^[2-4]。由于在 AHL 的临床研究中较难开展组织细胞水平或蛋白水平或基因水平等分子层面的实验研究, 因此目前对 AHL 的组织细胞学及更微细结构的研究大多还是借助动物实验模型。在诸多哺乳类实验动物模型中, 由于小鼠的生命周期相对较短而且目前已成功建立起多种 AHL 相关基因缺陷的小鼠实验模型, 因此 AHL 小鼠模型中的 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠得到更多的应用。CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠最早是由美国 Jackson Laboratory 于上世纪四十年代引入通过近交培育出的、具有遗传基因纯合、个体差异小、对试验反应均一、试验结果更准确和更可靠等特点的两个鼠种, 并维持应用至今。然而, 这两种较常用小鼠模型的耳蜗毛细胞损害规律及发展模式却并不相同^[5-6]。本文应用全耳蜗基底膜铺片技术和耳蜗图制备技

术, 对出生后不同年龄的 CBA/CaJ 小鼠和 C57BL/6J 小鼠的全耳蜗毛细胞进行了精确的定位定量观察, 并将两种不同小鼠的耳蜗毛细胞病理学改变进行了对比分析及讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验动物为清洁级 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 成年小鼠各 32 只, 雌雄各半, 年龄分别在 6 个月、12 个月、18 个月和 24 个月, 每个年龄组各 8 只, 由美国国家核准认定的标准实验动物源提供机构、国际标准 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠培育基地 Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain>) 提供, 其 mouse strain datasheet-stock No. 分别是 000654、000664, 均饲养于获得美国官方严格认证的美国纽约州立布法罗大学 (State University of New York at Buffalo) 实验动物中心。研究项目获得美国相关部门严格审查和批准开展。

1.1.2 试剂及仪器

主要实验试剂 Hematoxylin Solution, Harris Modified (Sigma-Aldrich, 产品号 HHS16), Potassium dihydrogen phosphate (Sigma-Aldrich, 产品号 NIST200B), Disodium hydrogen phosphate (Sigma-Aldrich, 产品号 NIST218611), Sodium succinate dibasic hexahydrate (Sigma-Aldrich, 产品号 S2378), Tetranitroblue tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich, 产品号 T4000), Xylenes (Sigma-Aldrich, 产品号是 XX0060)。

1.2 方法

1.2.1 耳蜗标本制备与铺片

在麻醉状态下,牵引小鼠颈部造成颈椎脱位,然后开颅取出小鼠颞骨。在解剖显微镜下,在蜗尖钻孔并摘除镫骨同时打开园窗,向耳蜗内灌入 4% 甲醛固定液并固定 24 h 以上,再经 5% 盐酸溶液脱钙 48 h 后,分离取出全耳蜗基底膜,逐级递减梯度乙醇水化,苏木素染液常规对基底膜染色,自来水冲洗返蓝,逐级递增梯度乙醇脱水,二甲苯透明,最后将全耳蜗基底膜移入载玻片上的甘油滴中,盖上盖玻片,中性树胶封固。或向耳蜗内灌入琥珀酸脱氢酶孵育液,即琥珀酸脱氢酶孵育液由一份 0.2 mol/L 琥珀酸钠和一份 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液及两份 0.1% 氯化硝基四氮唑蓝混合配制而成。将含有琥珀酸脱氢酶孵育液的耳蜗置于 37℃ 恒温箱内孵育 40~60 min,然后将耳蜗浸入 10% 中性福尔马林固定液固定 24 h 以上,前法脱钙后,分离取出全耳蜗基底膜移入载玻片上的甘油滴中,盖上盖玻片,中性树胶封固^[7-9],显微镜下观察。

1.2.2 耳蜗图和毛细管的定位定量分析

在放大 400 倍的普通光学显微镜下,分别对 6 月龄组、12 月龄组、18 月龄组和 24 月龄组的 CBA/CaJ 小鼠和 C57BL/6J 小鼠的全耳蜗基底膜进行毛细胞缺损的定位定量观察。在置有标记单位长度为 0.24 mm 的显微测量尺目镜的光学显微镜下,从蜗尖向蜗底逐个视野依次进行内、外毛细胞计数,并将采集的数据输入到计算机中,分别与耳蜗图软件中预先设置的 CBA/CaJ 小鼠和 C57BL/6J 小鼠参考数据进行逐一比较,耳蜗基底膜的实际全长被转换为百分比长度单位,单位长度内的毛细胞实际数量被转换成毛细胞密度并按照百分比分布在耳蜗

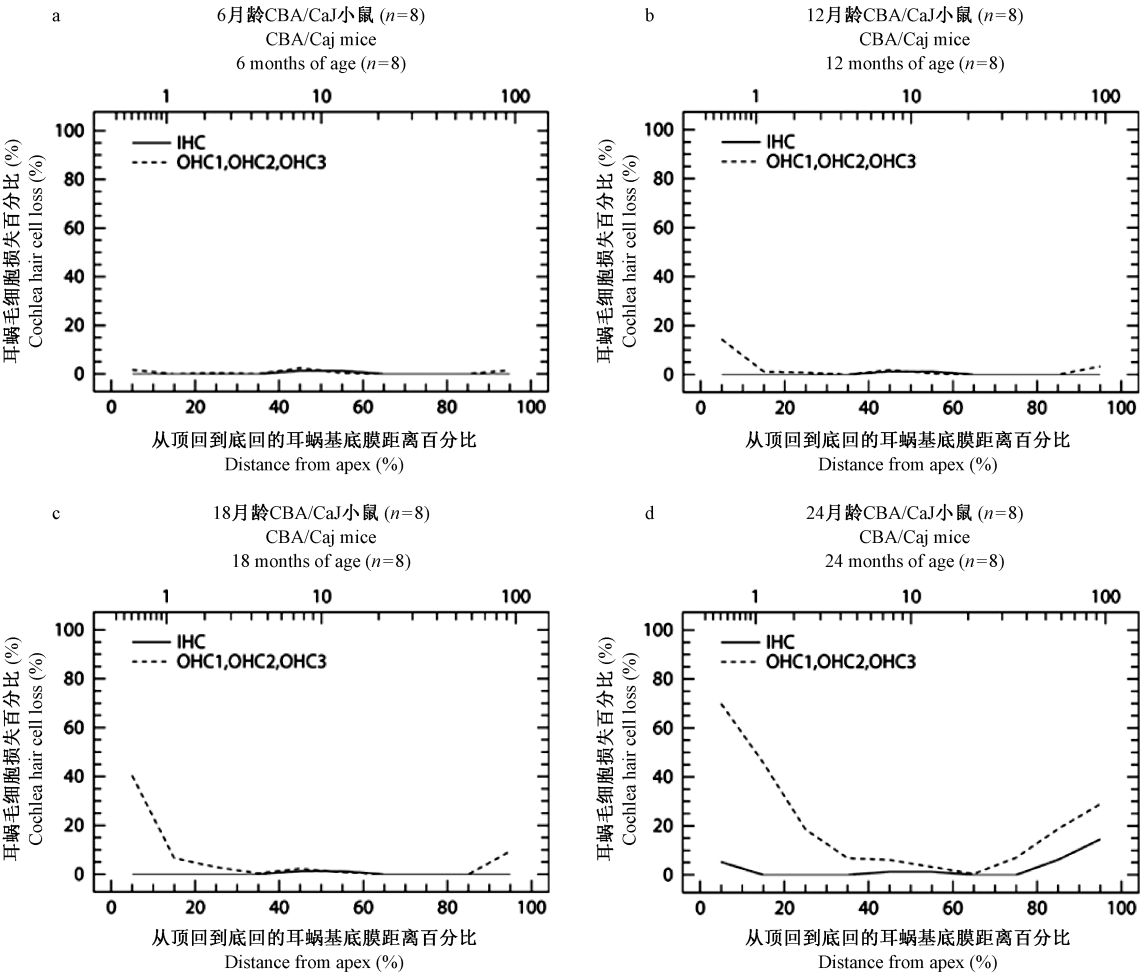
基底膜的各个部位,从而建立其该耳蜗的毛细胞缺损分析图。最后应用本耳蜗图软件程序,将每组 8 个耳蜗的毛细胞缺损分析图整合成该组动物的平均耳蜗图^[7-9]。另外,将不同区域的毛细胞密度值摘出,采集数据被输入到 GraphPad Prism 5 软件系统,最后进行统计分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。两个或多个构成比比较应用卡方 (χ^2) 检验法,以 $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

CBA/CaJ 小鼠耳蜗图结果显示,6 月龄全耳蜗内外毛细胞数量完整,未见缺损(图 1a)。12 月龄从蜗尖开始至距离蜗尖 15% 区域出现外毛细胞缺损,离蜗尖越近缺损越重,最高缺损达到 15%。耳蜗底回 Hook 区域,即距离蜗尖 85% 至沟端区域也有缺损,离底部越近缺损越多,但不如顶部明显,最高缺损占 5%(图 1b)。18 月龄耳蜗外毛细胞缺损扩大,从蜗尖开始至距离蜗尖 30% 区域均出现外毛细胞缺损,其中从蜗尖至距离蜗尖 15% 区域处呈陡降高峰,显示该区域缺损最重,最高缺损达到 40%,同时向底回方向逐渐减少。耳蜗底回距离蜗尖 85% 至沟端区域外毛细胞也有缺损,缺损继续扩大,最高达到 15%,与耳蜗顶回缺损相反,外毛细胞缺损向底回方向逐渐加重(图 1c)。24 月龄全耳蜗各回外毛细胞均有不同程度缺损,比 18 月龄明显扩大,其中从蜗尖至距离蜗尖 35% 区域处呈陡降高峰,显示该区域外毛细胞缺损最重,最高缺损达到 70%。距离蜗尖 65% 至沟端区域,外毛细胞缺损也对应扩大,最高缺损占 30%。耳蜗顶部和底部内毛细胞开始出现缺损,其中距离蜗尖 75% 至沟端区域缺损增加,最高可达 15%,而顶回有所缺损,最高占 5%,比底部轻(图 1d)。CBA/CaJ 小鼠不同龄全耳蜗铺片顶回、底回毛细胞比较镜下观察见图 2A1-D2。总之,CBA/CaJ 小鼠耳蜗毛细胞变化特点是,伴随着年龄增长,12 月龄开始出现耳蜗外毛细胞轻度缺损,遵循着从顶回和底回两端开始,向中回延伸,但顶回毛细胞损害比底回严重的病变规律。24 月龄内毛细胞在顶回和底回两端开始出现缺损,但损害程度较轻。



注：IHC：内毛细胞平均曲线。OHC1、OHC2、OHC3：第一、二、三排外毛细胞平均曲线。

图 1 CBA/CaJ 小鼠不同龄全耳蜗毛细胞计数耳蜗图

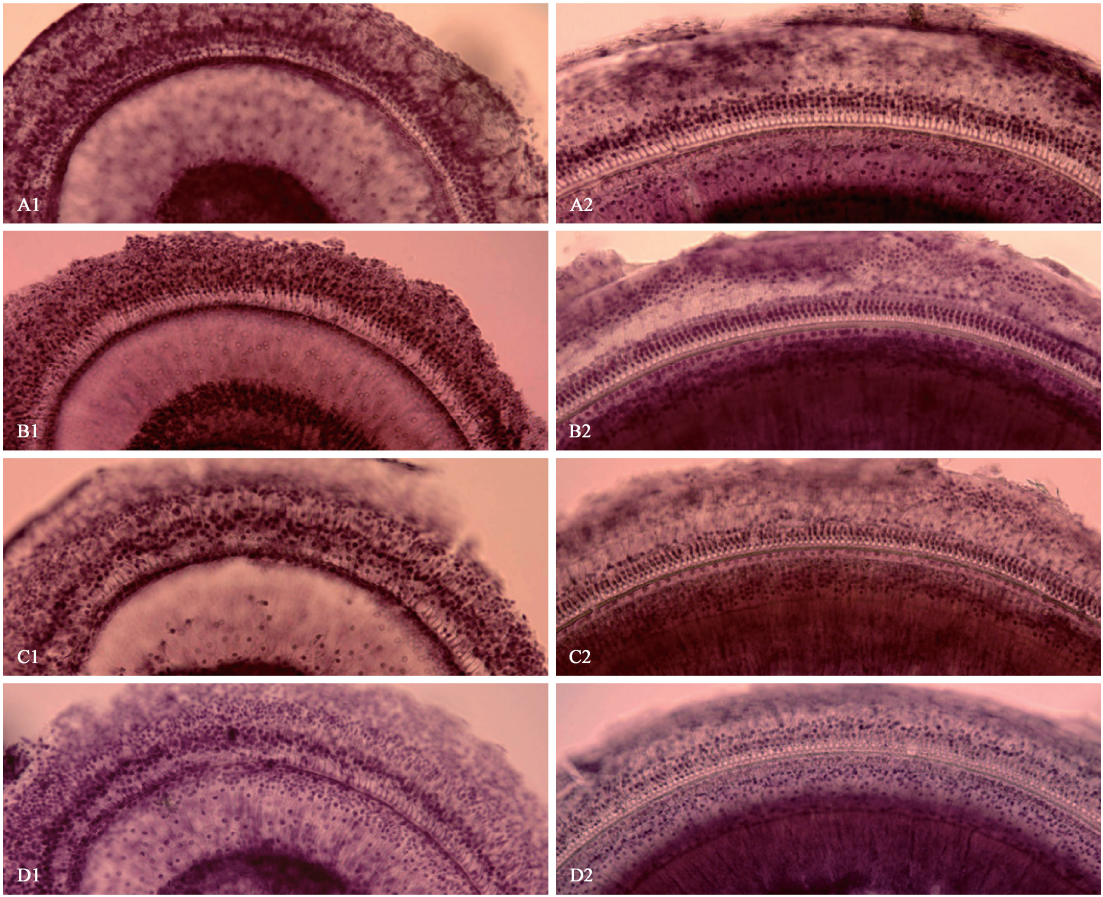
Note. IHC: average curve of inner hair cells. OHC1, OHC2, OHC3: average curve of the first, second and third row of outer hair cells.

Figure 1 Cochleograms of whole cochlea hair cells count in the CBA/CaJ mice at different ages

C57BL/6J 小鼠耳蜗图结果显示,6 月龄已经出现外毛细胞缺损,以耳蜗底部为主,即从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 75% 区域出现外毛细胞缺损,越往底部越重,最高缺损可达 65%,同时从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 85% 区域也出现了内毛细胞的缺损,最高缺损程度可达 25%。耳蜗顶部出现外毛细胞缺损较少,从蜗尖开始至距离蜗尖 15% 区域出现外毛细胞缺损,离蜗尖越近外毛细胞的缺损数量越多,最高缺损可达 20%,但内毛细胞基本完整(图 3a)。12 月龄耳蜗底部外、内毛细胞缺损明显加重,从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 50% 区域都出现了外毛细胞的缺损,最高缺损程度达到 100%,同时从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 70% 区域开始出现内毛细胞缺损,最高缺损程度达到 55%。与 6 月龄动物相比,耳蜗顶部外毛细胞缺损变化不大,内毛细胞仍然保持基本完整(图 3b)。18 月龄动物耳蜗底部外、内毛细胞缺损继续扩大,从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 45% 区域均出现外、内毛细胞缺损,外毛细胞缺损形成陡降高峰,其中从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 70% 区域,外毛细胞的缺损都达到 100%,该区域内毛细胞平均缺损达到 50%。耳蜗顶部距离蜗尖 30% 区域外毛细胞缺损最高可达 40%,但顶部内毛细胞基本完整(图 3c)。24 月龄耳蜗外毛细胞缺损基本覆盖了耳蜗基底膜全程,其中从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 40% 区域,相当耳蜗底回和中回外毛细胞缺损达到 100%,耳蜗顶部距离蜗尖 25% 以上区域外毛细胞缺损最高可达 80%,距离蜗尖 25% 至 35% 区域外毛细胞

胞缺损最轻,但也达到 25%。耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 45% 区域,出现内毛细胞大范围缺损,其中距离蜗尖 70% 以下区域的内毛细胞缺损程度平均达到 90%,但出现在顶回区域的内毛细胞缺损仅占 10%(图 3d)。C57BL/6J 小鼠不同龄全耳蜗铺片顶回、底回毛细胞比较镜下观察举例见图 4E1-H2。总之,C57BL/6J 小鼠耳蜗毛细胞变化特点是,伴随着年龄的增长,6 月龄已出现耳蜗外、内毛细胞缺损,并遵循着外毛细胞损害为主和从耳蜗底部开始,逐渐向中回和顶回扩展的病变规律。

两个不同鼠种不同龄耳蜗外、内毛细胞平均损失占比经 χ^2 检验结果表明(表 1),C57BL/6J 小鼠从 6 月龄开始至 24 月龄,与同龄 CBA/CaJ 小鼠比较,外、内毛细胞损失差异具有显著性意义($P<0.05$),与相同鼠种相邻观察年龄段比较,差异也具有显著性意义($P<0.05$)。CBA/CaJ 从 18 月龄至 24 月龄,与相同鼠种相邻观察年龄段外毛细胞缺损比较,差异具有显著性意义($P<0.05$),24 月龄内毛细胞与前个年龄段比较差异也具有显著性意义($P<0.05$)。

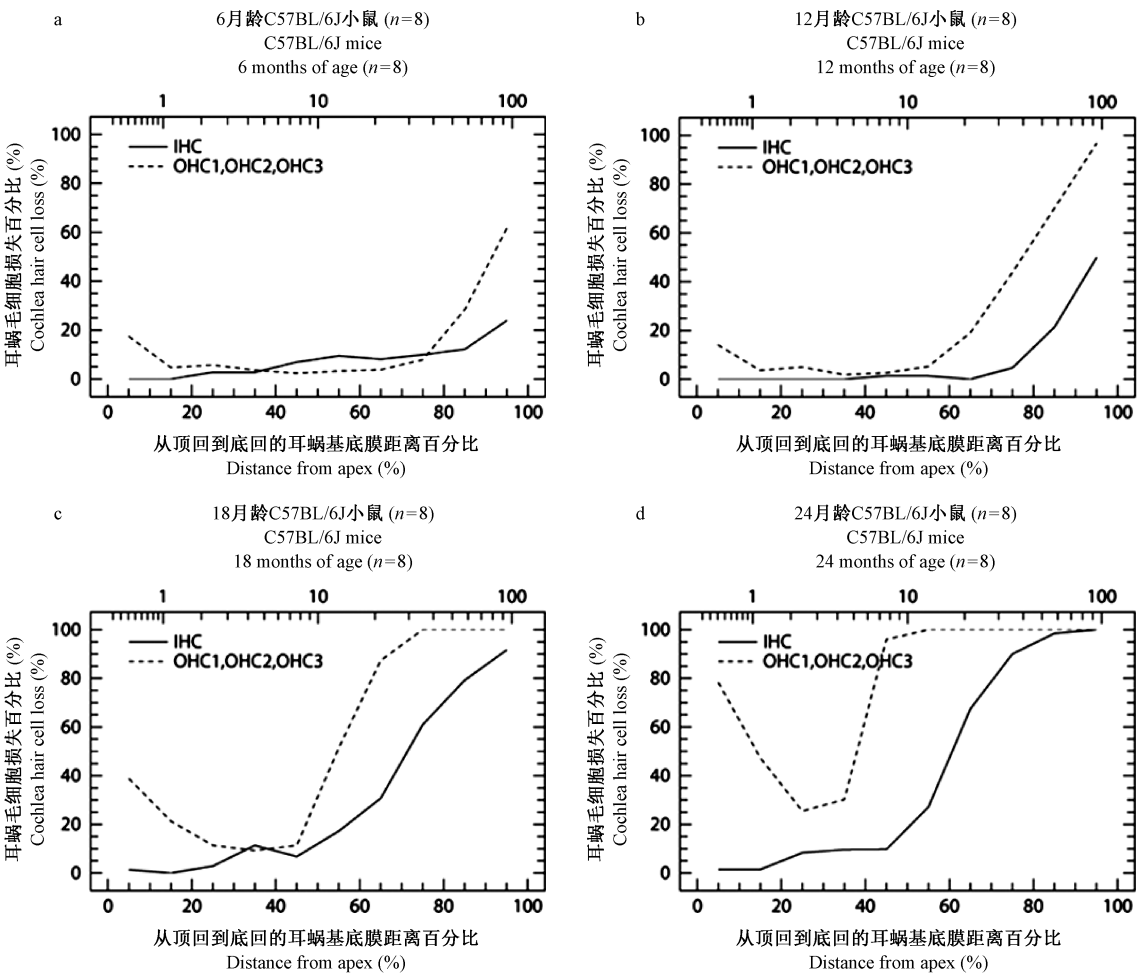


注:A1:6 月龄耳蜗基底膜顶回。A2:6 月龄耳蜗基底膜底回。B1:12 月龄耳蜗基底膜顶回。B2:12 月龄耳蜗基底膜底回。C1:18 月龄耳蜗基底膜顶回。C2:18 月龄耳蜗基底膜底回。D1:24 月龄耳蜗基底膜顶回。D2:24 月龄耳蜗基底膜底回。(苏木素染色,×100)

图 2 CBA/CaJ 小鼠不同龄耳蜗顶回、底回毛细胞比较镜下观察

Note. A1, Apical turn of the cochlear basement membrane at 6 months of age. A2, Basal turn of cochlear basement membrane at 6 months of age. B1, Apical turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. B2, Basal turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. C1, Apical turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. C2, Basal turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. D1, Apical turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. D2, Basal turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. (Hematoxylin staining, ×100)

Figure 2 Microscopic comparison of the hair cells in cochlear apical turn and basal turn of CBA/CaJ mice at different ages



注：IHC:内毛细胞平均曲线。OHC1,OHC2,OHC3:第一、二、三排外毛细胞平均曲线。

图 3 C57BL/6J 小鼠不同龄全耳蜗毛细胞计数耳蜗图

Note. IHC: average curve of inner hair cells. OHC1, OHC2, OHC3:average curve of the first, second and third row of outer hair cells.

Figure 3 Chochleograms of whole cochlea hair cells count in the C57BL/6J mice at different ages

表 1 不同龄 CBA/CaJ、C57BL/6J 小鼠耳蜗外、内毛细胞平均损失百分比 X² 检验结果(百分比:%)

Table 1 The results of chi-square test for percentage of average loss of outer and inner hair cells in the cochleae of CBA/CaJ and C57BL/6J mice at different ages(Percentage:%)

种类 Mice	n	6 月龄 6 months		12 月龄 12 months		18 月龄 18 months		24 月龄 24 months	
		外 Outer	内 Inner	外 Outer	内 Inner	外 Outer	内 Inner	外 Outer	内 Inner
		1	0	2	0	10 [△]	0	30 [△]	5 [△]
C57BL/6J	8	18 [*]	5 [*]	35 [*] △	10 [*] △	60 [*] △	30 [*] △	80 [*] △	50 [*] △

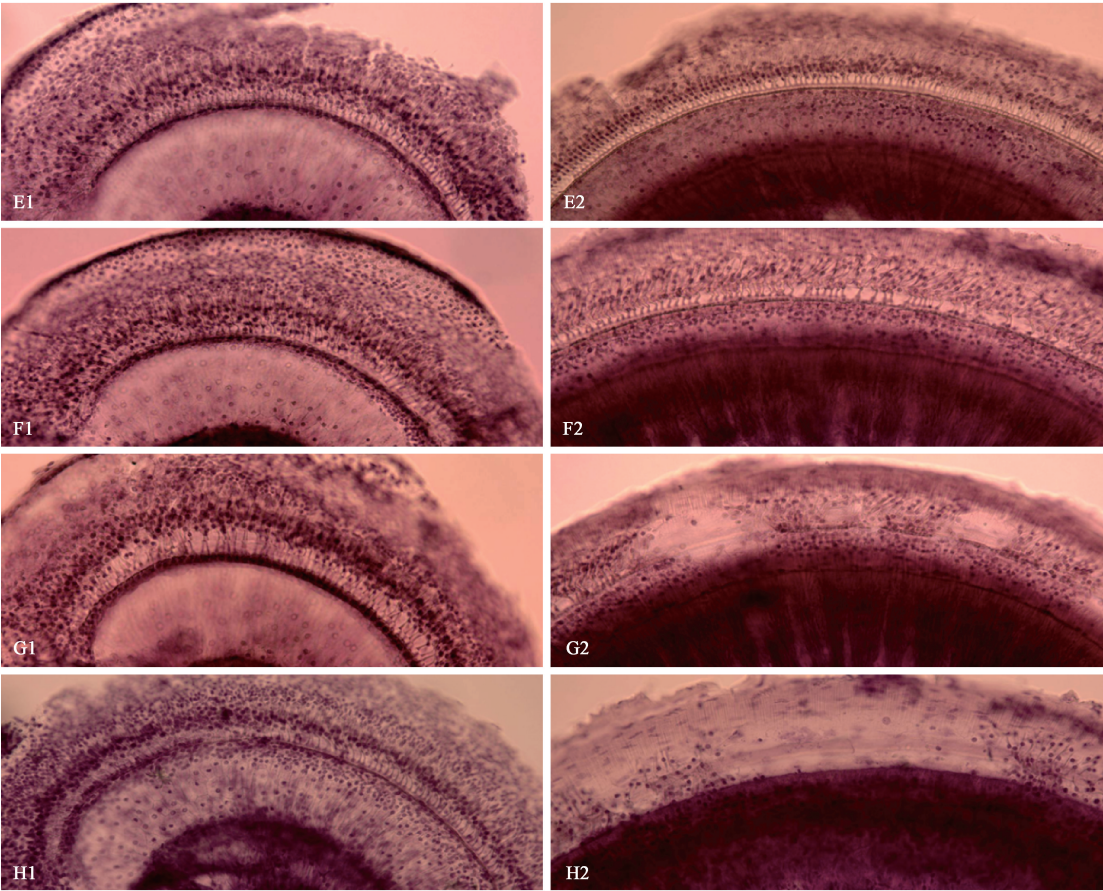
注：两个不同鼠种同龄同属细胞比较，**P*<0.05。相同鼠种该年龄与上年龄同属细胞比较，[△]*P*<0.05。

Note. Comparisons in the same genus cells of two different species at the same age, **P* < 0.05. Comparisons between the age and last age in the same genus cells of the same species, [△]*P*<0.05.

3 讨论

人类 AHL 因发病隐匿并呈渐进性发展,病程长,不易观察,一直是临床研究难题,其中如何进行耳蜗细胞形态学临床研究更是研究的瓶颈,因此,如何选择合适的动物模型研究和认识 AHL 细胞形

态学及其发展变化规律,并由此为基础研究分子通路机制、药物干预作用,一直以来成为耳科界探索热点,而观察、研究和比较耳蜗基底膜全程的毛细胞密度则是揭示研究 AHL 细胞形态学及其发展变化规律的关键,并为寻找合适的实验动物模型提供可参考实验依据。耳蜗图软件可以对全耳蜗毛细



注: E1: 6 月龄耳蜗基底膜顶回。E2: 6 月龄耳蜗基底膜底回。F1: 12 月龄耳蜗基底膜顶回。F2: 12 月龄耳蜗基底膜底回。G1: 18 月龄耳蜗基底膜顶回。G2: 18 月龄耳蜗基底膜底回。H1: 24 月龄耳蜗基底膜顶回。H2: 24 月龄耳蜗基底膜底回。(苏木素染色, $\times 100$)

图 4 C57BL/6J 小鼠不同龄耳顶回、底回毛细胞比较镜下观察举例

Note. E1, Apical turn of cochlear basement membrane at 6 months of age. E2, Basal turn of cochlear basement membrane at 6 months of age. F1, Apical turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. F2, Basal turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. G1, Apical turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. G2, Basal turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. H1, Apical turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. H2, Basal turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. (Hematoxylin stain, $\times 100$)

Figure 4 Microscopic comparison of hair cells in cochlear apical turn and basal turn of the C57BL/6J mice at different ages

胞密度、毛细胞丢失、耳蜗长度进行精准定位定量分析,为全面、完整、正确评估耳聋研究提供了一个重要的研究方法和手段,目前应用耳蜗图对全耳蜗毛细胞定位定量的评估方法已成为国际各权威耳科研究机构普遍采用的常规标准^[7-9]。哺乳类动物耳蜗听觉反应的特点是不同频率声波信号在基底膜上不同部位形成最大的振动幅度,从而可以选择性刺激该频率共振特定部位的毛细胞。一般来说,耳蜗底回的毛细胞感应高频声音刺激信号,而耳蜗顶回毛细胞则只对低频声音刺激起反应,由于耳蜗基底膜上不同部位的毛细胞只对特定频率的声音刺激起最大反应,因此沿着耳蜗基底膜的全长便形成了一个重要的耳蜗频率位置对应关系。不同物

种动物的耳蜗基底膜长度和听觉频率范围并不相同,例如人类的耳蜗基底膜长度大约在 35 mm 左右,其可听频率范围一般被认为是从 20 ~ 20 000 Hz;大鼠的耳蜗基底膜长度大约在 9 mm 左右,其可听频率范围是从 1000 ~ 90 000 Hz;小鼠的耳蜗基底膜长度大约在 6 mm 左右,其可听频率范围是从 1000 ~ 100 000 Hz。因此,耳蜗基底膜对应不同频率感应区的位置在不同种类的实验动物也不相同。由于实验动物的耳蜗图制备包含着该种类动物的耳蜗基底膜总长度和基底膜上每个不同位点的不同毛细胞密度及其对应的音频反应位置等重要信息,因此耳蜗图成为精准评估各种实验动物全耳蜗毛细胞病理学改变并对应其听觉功能障碍的最可

靠研究方法之一^[7]。

由于豚鼠寿命长,平均约在 5 年左右,以豚鼠作为研究老年性内耳损害模型,需要等待若干年直到动物进入老年,因此不易观察和研究。而小鼠生命周期短,尤其是有的特殊基因缺陷型小鼠能够提早发生 AHL,因此国际针对 AHL 研究,更多倾向于采用小鼠 AHL 模型。研究发现,不同种株近交系小鼠耳蜗毛细胞的退变随着年龄的增长存在着截然不同的病变发生时间和病理学改变进程^[7,10]。用于研究 AHL 动物模型较多的是 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠。然而,通过听力学研究表明,在成年早期,CBA/CaJ 并没有表现 AHL,而 C57BL/6J 小鼠出现 AHL 较早,但在后期 CBA/CaJ 同样也出现 AHL^[11]。本次通过耳蜗图毛细胞密度、定位定量分析也证实,6 月龄 C57BL/6J 小鼠耳蜗基底部毛细胞已出现损失,但同龄 CBA/CaJ 小鼠几乎未见变化,至 18 月龄仅外毛细胞才出现具有统计学意义的时间可比性损失变化,但相较 C57BL/6J 小鼠,损失不多,而同龄 C57BL/6J 小鼠耳蜗外毛细胞损失过半,内毛细胞也损失几乎 1/3,之后随着年龄老化,CBA/CaJ 小鼠耳蜗毛细胞损失迅速增加。这些毛细胞退变和损失变化与前述文献报道的两种小鼠听力学改变一致。两种不同属性小鼠不同时间出现 AHL,与它们的基因遗传学密切相关,C57BL/6J 小鼠存在隐性等位基因改变,CBA/CaJ 小鼠则没有^[10]。为了探明 C57BL/6J 小鼠存在的隐性等位基因改变,通过对 C57BL/6J 小鼠 $Sod1^{+/+} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 、 $Sod1^{+/+} Cdh23^{+/+}$ 、 $Sod1^{-/-} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 、 $Sod1^{-/-} Cdh23^{+/+}$ 四种基因型 ABR (auditory brainstem-evoked response) 听力检测研究发现, $Sod1^{+/+} Cdh23^{+/+}$ 小鼠在 15 个月龄前仍保持正常听力,其中 $Sod1^{-/-} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 小鼠表现出听力损失最早而且发病最严重,其次是 $Sod1^{+/+} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 、 $Sod1^{-/-} Cdh23^{+/+}$,由此认为, $Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 基因缺陷型是导致 C57BL/6J 小鼠早期即出现 AHL 病变的主要原因^[12-13]。进一步研究显示,C57BL/6J 小鼠与 CBA/CaJ 小鼠不同,在于 C57BL/6J 隐性 $Cdh23$ 等位基因(ahl)在纯合子时对 AHL 的易感性增加,而 CBA/CaJ 是显性等位基因(Ahl+)则具有对 AHL 不易感性,通过对 3 个月、6 个月、9 个月、12 个月、15 个月和 18 个月龄时测量 8 kHz、16 kHz 和 32 kHz 纯音刺激的 ABR 阈值比较,C57BL/6J 小鼠 32 kHz ABR 阈值在 6 月龄时明显高于 CBA/CaJ 小鼠,其

16 kHz 阈值在 12 个月龄时显著高于 CBA/CaJ 小鼠。这些结果表明,CBA/CaJ 衍生的 $Cdh23^{(ahl+)}$ 等位基因在其他 C57BL/6J 遗传背景下可显著减少听力损失和毛细胞死亡,但 C57BL/6J 小鼠衍生的 $cdh23^{(ahl)}$ 等位基因对其他 CBA/CaJ 背景下的听力损失影响不大^[14]。最新针对 $cdh23$ 基因,利用 C57BL/6 NJ 和 129S1/SvImJ 胚胎干细胞并使用互联单碱基对替换(B6- $Cdh23C.753A>G$ 和 129S1- $Cdh23C.753G>A$),进行同源重组设计小鼠种株,对与许多近交系鼠共同的钙粘蛋白 23 基因($Cdh23C.753A$)的单核苷酸变体(SNV)进行研究,通过检测 ABR 阈值和耳蜗病理学观察,对这些 SNV 小鼠同源 B6.129S1- $Cdh23Ahl+$ 与 129S1.B6- $Cdh23ahl$ 和亲源(B6N 和 129S1)进行了比较,结果证实, $Cdh23C.753G$ 等位基因对 C57BL/6J 小鼠至少 18 个月龄的高频听力损失具有保护作用,而 $Cdh23C.753A$ 等位基因的 AHL 诱导作用加重了 129S1 小鼠的听力损失。两个同源小鼠的 ABR 阈值不同和互联回交导致差异原因是定位于 Chr 10 QTL。这些结果说明了种株背景和同源区相关听力损失影响与 $Cdh23C.753$ 等位基因变异有关,即 $Cdh23C.753A$ 的 SNV,可加速 AHL,并可恶化其他突变的听觉表型^[15]。

综上所述,C57BL/6J 小鼠青年时期即可出现与年龄相关的毛细胞损失并由此导致 AHL 的主要原因是 $Cdh23$ 基因的缺失,而 CBA/CaJ 小鼠青年时期尚未出现毛细胞损失并由此导致 AHL 的主要原因正是因为其具有显性 $Cdh23$ 基因。因此,CBA/CaJ 小鼠所表现出的发生较晚的年龄相关听觉障碍似乎可以被认为是一种天然发生的 AHL 动物模型。于此不同的是,C57BL/6J 小鼠存在着 $Cdh23^{ahl}$ AHL 等位基因片段的缺失,在这种小鼠身上发生的较早听觉衰退被多数人赞同的看法似乎更像是与遗传基因缺陷有关。以往我们的研究,主要以 C57BL/6J 小鼠作为 AHL 动物模型,是利用其早期即出现 AHL,便于短期观察的特点^[6,16-17]。但 C57BL/6J 小鼠毕竟属于基因变异种株,相比之下,CBA/CaJ 小鼠更接近自然形成的 AHL,其导致 AHL 病理机制与 C57BL/6J 异同点,有待进一步探讨和揭示。

参 考 文 献(References)

- [1] Sprinzl GM, Riechelmann H. Current trends in treating hearing loss in elderly people: a review of the technology and treatment options—a mini-review [J]. Gerontology, 2010, 56(3): 351–358.
- [2] Vaisbuch Y, Santa Maria PL. Age-related hearing loss:

- innovations in hearing augmentation [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2018, 51(4): 705–723.
- [3] Humes LE. The World Health Organization's hearing-impairment grading system; an evaluation for unaided communication in age-related hearing loss [J]. *Int J Audiol*, 2019, 58(1): 12–20.
- [4] Han C, Ding D, Lopez MC, et al. Effects of long-term exercise on age-related hearing loss in mice [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(44): 11308–11319.
- [5] Ding D, McFadden SL, Wang J, et al. Age- and strain-related differences in dehydrogenase activity and glycogen levels in CBA and C57 mouse cochleas [J]. *Audiol Neurotol*, 1999, 4(2): 55–63.
- [6] 宣伟军, 丁大连, 蒋海燕, 等. 复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠 AHL 毛细胞的保护作用 [J]. *中华耳科学杂志*, 2016, 14(2): 272–277.
- Xuan WJ, Ding DL, Jiang HY, et al. Protective effects of the compound healthy ear agent against presbycusis in C57BL/6J mice [J]. *Chin J Otol*, 2016, 14(2): 272–277.
- [7] Ding D, McFadden S, Salvi RJ. Cochlear hair cell densities and inner-ear staining techniques. In: *Handbook of Mouse Auditory Research* [M]. Florida: CRS Press, 2001.
- [8] 亓卫东, 丁大连, 蒋海燕, 等. 全耳蜗毛细胞定量分析系统 [J]. *听力学与言语疾病杂志*, 2007, 15(2): 158–160.
- Qi WD, Ding DL, Jiang HY, et al. Quantified analytic system for cochlear hair cells [J]. *J Audiol Speech Pathol*, 2007, 15(2): 158–160.
- [9] 丁大连, 亓卫东, 曲雁, 等. 内耳形态学研究方法. *内耳科学* [M]. 北京: 科学技术出版社, 2010.
- Ding DL, Qi WD, Qu Y, et al. *Research Method on Inner Ear Morphology*. Inner Ear Science [M]. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 2010.
- [10] Willott JF, Erway LC, Archer JR, et al. Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds [J]. *Hear Res*, 1995, 8(1–2): 143–155.
- [11] Erway LC, Shiao YW, Davis RR, et al. Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss [J]. *Hear Res*, 1996, 3(1–2): 181–187.
- [12] Zheng QY, Ding D, Yu H, et al. A locus on distal chromosome 10 (ahl4) affecting age-related hearing loss in A/J mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(10): 1693–1705.
- [13] Johnson KR, Yu H, Ding D, et al. Separate and combined effects of Sod1 and Cdh23 mutations on age-related hearing loss and cochlear pathology in C57BL/6J mice [J]. *Hear Res*, 2010, 268(1–2): 85–92.
- [14] Kane KL, Longo-Guess CM, Gagnon LH, et al. Genetic background effects on age-related hearing loss associated with Cdh23 variants in mice [J]. *Hear Res*, 2012, 283(1–2): 80–88.
- [15] Johnson KR, Tian C, Gagnon LH, et al. Effects of Cdh23 single nucleotide substitutions on age-related hearing loss in C57BL/6 and 129S1/Sv mice and comparisons with congenic strains [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(3): 44450.
- [16] 宣伟军, 丁大连, 宣毅, 等. 复方健耳剂对抗小鼠老年性耳蜗螺旋神经节神经元凋亡效应及机制研究 [J]. *中华老年医学杂志*, 2016, 35(12): 1329–1333.
- Xuan WJ, Ding DL, Xuan Y, et al. Effects of healthy ear compound of traditional Chinese medicine against age-induced apoptosis on cochlear spiral ganglion neurons in C57BL/6J mice and research on mechanisms by regulating caspase-3 [J]. *Chin J Geriatr*, 2016, 35(12): 1329–1333.
- [17] 宣伟军, 唐俊波, 陈壮, 等. 中药复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠 AHL 的防护效应 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(10): 1247–1251.
- Xuan WJ, Tang JB, Chen Z, et al. Protecting effects of Jian'erji on age-related hearing loss of C57BL/6J mice [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2016, 36(10): 1247–1251.

[收稿日期] 2019-04-14