

豚鼠内耳解剖检验 技术手册

丁大连 姜泗长

学林出版社

前 言

对于耳部疾病的发生发展机制的理论研究，常常藉助于动物实验制出各种模型，从形态上观察其变化规律，认清疾病的本质，以对内耳疾病的预防和治疗提供有价值的实验依据，为近几十年来耳科工作者采用的有效研究手段。随着现代医学和科学技术的发展，内耳剖验不但与病理学的关系极为密切，且与生物物理学、组织胚胎学、生物化学、细胞遗传学、药理学等学科有广泛的联系，逐渐发展成为耳科学中必不可少的一门边缘学科。目前广泛采用豚鼠进行动物实验，是因豚鼠内耳结构近似人耳，且耳蜗突入中耳腔内，易于取出完整的材料，进行内耳病理剖验工作。本册著者积累了20年的各种技术的经验，总结成手册，内容有豚鼠生物特性、饲养、繁殖及选择等，并进行了详细介绍。对实验室的布局提出个人安排的建议。其中大量资料为内耳标本固定技术、铺片技术、切片技术、电镜制备技术及内耳标本染色技术。鉴于目前国内各大医院对各种类型的耳聋问题的研究，多数借助于豚鼠的动物实验，但有关这类的文献甚少的现状，本手册内容很丰富，为很有实用价值的参考资料，兹特为介绍。

姜泗长

目 录

第一章 内耳病理剖验的意义.....	(1)
第二章 受试豚鼠.....	(3)
第一节 豚鼠的生物学特性.....	(3)
一、豚鼠的种类.....	(3)
二、豚鼠一般生理状况.....	(4)
三、豚鼠年龄与体重的估计.....	(4)
第二节 豚鼠的饲养与繁殖.....	(5)
一、豚鼠的饮食习性.....	(5)
二、饲养方法.....	(5)
三、繁殖管理.....	(6)
第三节 受试豚鼠的选择.....	(7)
一、一般检查.....	(7)
二、耳科特殊检查.....	(7)
三、筛选受试豚鼠的注意事项.....	(8)
第四节 豚鼠实验的一般技术规程.....	(9)
第三章 内耳病理实验室.....	(13)
第一节 实验室布局.....	(13)
一、实验室的布置.....	(13)
二、实验室各间的使用与安排.....	(14)
第二节 实验室设备.....	(19)
一、仪器与设备.....	(19)
二、器械.....	(21)
三、玻璃器皿.....	(21)

四、一般物品.....	(22)
第三节 实验室药品.....	(22)
第四章 内耳的组织与解剖.....	(24)
第一节 骨迷路.....	(24)
第二节 膜迷路.....	(26)
第三节 内耳血管与神经.....	(33)
第五章 内耳标本的固定技术.....	(36)
第一节 采用合适的处死动物的方法.....	(36)
第二节 选择合适的化学固定剂.....	(38)
第三节 掌握合适的固定条件.....	(43)
第四节 内耳标本的固定方法.....	(44)
一、内耳局部活体灌流固定.....	(44)
二、心脏灌流固定.....	(46)
三、离体颞骨灌流固定.....	(47)
四、离体颞骨抽气固定.....	(48)
第六章 内耳铺片技术.....	(49)
第一节 全耳蜗基底膜分离铺片术.....	(49)
一、戴树宏氏耳蜗基底膜软铺片术.....	(49)
二、改良全耳蜗基底膜硬铺片术.....	(50)
第二节 全耳蜗螺旋韧带分离铺片术.....	(52)
第三节 球囊斑和椭圆囊斑分离铺片术.....	(54)
一、球囊斑分离铺片术.....	(54)
二、椭圆囊斑分离铺片术.....	(55)
第四节 壶腹嵴分离铺片术.....	(56)
第五节 全内耳膜迷路分离铺片术.....	(58)
第七章 内耳切片技术.....	(61)
第一节 颞骨火棉胶切片术.....	(61)

第二节 颞骨石蜡切片术.....	(62)
第三节 颞骨冰冻切片术.....	(64)
第四节 分离膜迷路冰冻切片术.....	(65)
一、用明胶包埋膜迷路的冰冻切片方法.....	(65)
二、用肝脏包埋螺旋韧带的冰冻切片方法.....	(65)
第八章 内耳标本电镜制备技术.....	(67)
第一节 透射电镜样品制备技术.....	(67)
第二节 扫描电镜样品制备技术.....	(71)
第九章 内耳标本染色技术.....	(75)
第一节 内耳标本普通染色法.....	(75)
第二节 内耳标本特殊染色法.....	(77)
第三节 内耳标本组织化学染色法.....	(84)
第十章 内耳毛细细胞的电镜细胞化学技术.....	(100)
主要参考文献.....	(106)

第一章 内耳病理剖验的意义

内耳病理剖验是通过内耳解剖、内耳组织切片和内耳膜迷路铺片等检查，对内耳疾病的发生和发展进行研究，探索发病的机制，并对内耳疾病的预防和治疗提供有价值的实验依据。随着现代医学和科学技术的发展，内耳剖验不但与病理学的关系极为密切，还与生物物理学、组织胚胎学、生物化学、细胞遗传学、药理学等学科发生广泛的联系，逐渐发展成为耳科学中必不可少的一门边缘学科。目前，内耳病理剖验的工作已在许多医疗和科研部门展开，但是，有关内耳病理剖验技术的书籍出版甚少，我们将从事内耳病理工作20余年来所采用和建立的各种剖验技术及有关内耳病理实验的内容整理成书，期望有助于内耳病理研究事业的发展。本书详述了内耳病理各种剖验技术，具有如下意义：

1、内耳剖验技术是了解内耳结构的最有效手段。内耳由于其盘旋弯曲复杂的组织结构，而有“迷路”之称。通过内耳剖验，有助于理解内耳各终器的空间排布和立体的结构，并能由此理解内耳结构与功能之间的内在联系。

2、内耳剖验技术与普通染色方法相结合，可以从形态学的改变观察内耳各种病变的病程及发展规律，证明内耳的形态改变是内耳功能变化的基础。

3、内耳剖验技术与特殊染色，组织化学和电镜技术相结合，可以从内耳组织的退变，组化成分的改变和超微结构的变化，探讨各种内耳病变的病理机制，为针对不同的内耳

病理机制而采取有效的预防和治疗措施,提供可靠的实验根据。

4、动物内耳剖验技术,是筛选预防及治疗内耳疾病药物的有效方法,有一定的临床参考价值。目前,内耳剖验技术已逐步成为认识内耳疾病,提高治疗技术和医疗质量,改进治疗措施的重要检测手段。

5、内耳剖验技术是制作解剖学、组织学、胚胎学、耳科学教学资料的重要方法,可以为医学生提供内耳各种教学模型,有助于学生加深对内耳三维结构的理解,是搞好耳科教学必不可少的手段。

6、内耳剖验技术可以发现各种内耳畸形或后天发育中所发生的不正常情况,以及老年性内耳功能退变的病理情况,为胚胎发育和老年医学中有关内耳状况的了解提供必要的实验依据。

7、内耳剖验技术为医学科学试验提供重要的科研资料,是积累科研资料的重要途径之一。

8、内耳剖验技术在检测新药是否具有耳毒作用的实验中起着鉴定的重要作用。

内耳剖验技术牵涉到较多的学科,我们在进行内耳病理研究工作中,不但要有较好的耳科学和病理学基础,还要广泛学习医学、药学、生物学等各门学科的相关知识,以适应这门边缘学科的发展需要。

第二章 受试豚鼠

动物实验对医学科学研究具有重要意义，是临床医学研究工作过渡到人体试用所不可缺少的。豚鼠由于其内耳具有与人类相近似的解剖生理学特点，且突出于中耳腔内，容易完整取材，而被广泛用于各种内耳损害的实验。本章为实验人员了解内耳损害的主要受试对象——豚鼠，介绍一些有关的基本常识。

第一节 豚鼠的生物学特性

一、豚鼠的种类

豚鼠属脊索动物门、脊椎动物亚门、哺乳纲、啮齿目。豚鼠原产于欧洲中部，又名天竺鼠，因其外形似猪，故又名荷兰猪、海猪。

豚鼠一般分为三种：

(一)短毛种：短毛种豚鼠由于地区差别和被毛颜色差别又分为荷兰变种、南美变种、喜马拉雅变种、龟甲变种及斑点变种。短毛种豚鼠被复的毛较短而且柔软，毛多为白色、黄色和黑色所组成，故又可分为白色、黄色或黑色的单色豚鼠、两色豚鼠和三色豚鼠。其中两色和三色豚鼠是杂种，体质较健壮，单色豚鼠是纯种，其中白色豚鼠的体质较其他颜色豚鼠的体质为弱。

(二)硬毛种：又叫蔷薇花种或阿比西尼亚种。其被毛呈蔷薇花状且又短又硬。硬毛种豚鼠体质弱，易感染各种疾病。

(三)长毛种：又叫秘鲁种。其遍体长毛遮盖着头和脚。长毛豚鼠较难饲养，并且易患各种疾病。

二、豚鼠一般生理状况

寿命	6~8年
体温	37.8~39.5℃
呼吸	100~150次/分
心跳	230~390次/分
血压	75/12mmHg
总血量	占体重6.4%
成熟体重	250~900克
性成熟(第一次交配)	6个月
性周期	14~17天
交配期	4~5天
雄性生产期限	2.5~3年
雌性生产期限	3~4年
每次产仔数	1~6只
孕期	60~68天
一年内产仔次数	3~5次
哺乳期	21~30天
断乳期	3~5周

三、豚鼠年龄与体重的估计

初生	55~80克
一周	100~120克
一月	150~200克
二月	200~280克
三月	300~350克
四月	350~400克

六月
一年

450~500克
700克

第二节 豚鼠的饲养与繁殖

一、豚鼠的饮食习性

豚鼠喜群居，食量大，不择食，无顿餐习惯，自由吃食随时排泄。豚鼠夜间不爱活动也不爱摄食。豚鼠体内不能自己合成维生素C，只能从饮食中摄取维生素C以维持生命代谢需要。

二、饲养方法

(一)饲养池用木屑锯末铺垫厚约5厘米，饲养期间要保持锯末松软和干燥，一般每隔三天清扫饲养池，并更换锯末。饲养豚鼠最好不用铁笼，因为铁笼不但较难清扫，而且不利于豚鼠的温暖和舒适，还易被青饲料堵塞笼孔，豚鼠在潮湿和食物变质环境易患各种疾病。

(二)幼年豚鼠(200克体重以下)在池内的饲养密度为20只/平方米。成年豚鼠饲养密度为10只/平方米。

(三)饲料的选择要从精饲料和青饲料两方面给予充分的供应。

1、精饲料可用含麸子20%、燕麦30%、鲜豆皮10%，豆饼10%、黑豆20%、玉米粉10%、鱼粉3%、食盐1%的配方配制。或用兔食混和饲料。

大麦食用前要经过水洗和浸泡，一般第一天下午浸泡，第二天上午便可食用，不要一次浸泡过多，以免大麦水泡后未及时食用而萌发，发芽大麦不宜再给豚鼠食用。食水泡大麦的豚鼠不用另外供应凉开水。

用大米或小米饲养豚鼠，同时要用饲水瓶供应凉开水。

2、含维生素C丰富的青饲料，是维持豚鼠生命健康日常不可缺少的重要辅食。一般常用小白菜、菠菜、包心菜、茼菜、青草等。青饲料投饲前要洗净其上附着的污泥、肥料和农药。青饲料一旦缺少，豚鼠会由于缺少维生素C而患坏血病，出现牙齿松动、关节肿胀、食欲不振、全身软弱等症状，甚至因此而死亡。

(四)日间要保持饲养池内有充足的清洁饲料，夜间应将饲料取出，以免饲料被豚鼠粪溺污染变质，再予饲用可致食物中毒。

(五)冬季可将稻草扎成束置于饲料池中，稻草束既有利于保持饲养池干燥和温暖，又可供豚鼠食用。

(六)豚鼠易因潮湿而患肺炎，易因饲料不清洁而腹泻，易因环境潮湿阴暗而生跳蚤。饲养过程中，一旦发现豚鼠有咳嗽、脓肿、流口涎、拉稀、精神萎顿、被毛蓬松等情况，应立即将病鼠隔离或淘汰，并清扫饲养池。

三、繁殖管理

(一)选种：

- 1.雄种体重在700克以上，雌种体重在600克以上。
- 2.体格发育良好，肌肉丰满，四肢有力，脊背平直。
- 3.雄种睾丸大小相等，雌种乳头凸起。
- 4.雄种生产年限三年，雌种生产年限四年。
- 5.雄种曾保持授胎率在70%以上，雌种曾保持受胎率，并一胎生三仔以上记录。

(二)交配：

- 1.交配池中每次用一只雄鼠与6—10只雌鼠交配。
- 2.交配同居期为三周。

3.同居期满后，雄鼠调出，休息两周后方能再行交配。

4.同居期满后，雌鼠留在池内等待妊娠检查与分娩。

(三)哺乳：1.哺乳期为3—5周。

2.若母鼠患病或死亡，仔鼠可由其他母鼠代乳。并且做标记，代乳仔鼠成年后不宜做为种鼠。

3.离乳母鼠至少休息一周，方能再行交配。

第三节 受试豚鼠的选择

一、一般检查

(一)健康豚鼠被毛致密柔软，有光泽，紧贴身体表面。年老或患病豚鼠被毛蓬松稀疏，无光泽并且易于脱落。

(二)健康豚鼠眼睛明亮，瞳孔清晰。年老或患病豚鼠眼睛朦胧混浊并有分泌物。

(三)健康豚鼠背部平直，臀部匀称，四肢骨骼发育良好，行动活泼。年老或患病豚鼠背部塌陷，身体软弱，行动迟缓。

(四)雄鼠可见生殖器圆孔中露出性器官的突起。雌鼠在生殖器孔露出三角形间隙，并有两个乳头分布在生殖器两侧的腹部。

二、耳科特殊检查

(一)在额镜反光或电耳镜下观察豚鼠外耳道及鼓膜。有盯聃堵塞者取出盯聃，患中耳炎者淘汰。

(二)用电测听仪以突然给声的方式，分别对豚鼠两耳进行耳廓反射的测定。声刺激频率采用2KHz和4KHz，声音强度用100dB。筛选出耳廓反射灵敏的豚鼠做为耳蜗功能和病理的受试对象。进而对豚鼠进行耳蜗电位和脑干听觉诱发电

位的测定。

(三)用 0℃ 的冰水 0.2 毫升对豚鼠每耳进行微量冰水诱发眼震的检测。筛选出肉眼观察诱发眼震的持续时间在 40—70 秒的豚鼠，做为内耳前庭功能和病理的受试对象。进而用眼球震颤描绘仪监测眼震。

三、筛选受试豚鼠的注意事项

(一)除进行胚胎发育，幼年生长和老年退变等特殊实验外，一般选用体重在 300—400 克的青年豚鼠作为受试对象。

(二)选择同一品种、同一年龄、同一体重的健康豚鼠受试。

(三)性别尽可能保持一致，并且最好选用雄鼠。若受试豚鼠中有雌雄两种，则应分池饲养。尽量避免豚鼠性周期，动物性交及受孕等因素干扰实验结果。

(四)硬毛种和长毛种豚鼠对寒冷和潮湿异常敏感，易感染各种疾病，一般不适用于作实验。

(五)短毛种中的非纯种杂色豚鼠动物，体质健壮，但在慢性实验中对损害因素的耐受性有差异，这种个体差异常常使实验结果分散，因此，杂种豚鼠不宜用作慢性实验。

(六)短毛种中的白色纯种豚鼠动物，体质较杂种为弱，但在慢性实验中个体差异较小。因此，用此种豚鼠进行内耳损害的慢性实验，可使实验结果相对较为集中。

(七)在诸多豚鼠种类中，除白色红目豚鼠外，所有黑目豚鼠的内耳血管纹和膜半规管上都有点状的黑色素，以及椭圆囊囊壁和三个壶腹嵴两侧半月面都有片状的黑色素。这种黑色素常常干扰染色结果，尤其对组织化学的呈色观察影响更甚。因此，在选用受试豚鼠时，应用白色红目豚鼠做为受试对象。

第四节 豚鼠实验的一般技术规程

一、麻醉

(一)10%水合氯醛：按每公斤体重150mg的剂量腹腔注射，10分钟后进入全麻。

(二)1%戊巴比妥钠：按每公斤体重44mg的剂量腹腔注射，8分钟后进入全麻。

(三)10%氨基甲酸乙酯：按每公斤体重1.6g的剂量腹腔注射，5分钟后进入全麻。

(四)2%硫苯妥钠：按每公斤体重40mg的剂量腹腔注射，10分钟后进入全麻。

二、保温措施

动物在麻醉期体温易下降，因此实验最好在动物实验恒温箱内进行。或在实验台下铺放软垫和热水袋，同时用肛表监测体温变化。

三、人与豚鼠的用药换算比例

人与豚鼠用药量均按单位体重给药剂量进行换算。一般情况下，人用药量与豚鼠用药量的比例是1:15或1:20，即豚鼠每公斤体重用药量是人每公斤体重用药量的15~20倍。当给药途径不同时，剂量要相应有所增减。例如：当以口服量为100时，灌肠量为100—200，皮下注射量应为30—50，肌肉注射量为25—30，静脉注射量为25。

四、给药量的确定

在进行药物最小量、最大量、中毒量和致死量的动物实

验中，要先以少量豚鼠进行预试。化学药品可参考化学结构相似的已知药物的剂量，植物粗制剂可按生药剂量折算。实验用逐渐加大剂量的方法进行，在比较几个剂量的实验结果后，再确定给药剂量，然后用于正式实验。

五、呼吸的观察

(一)肉眼观察豚鼠胸廓起伏运动，计每分钟呼吸次数。

(二)肺流速仪描记。

六、心跳的观察

(一)食指按压在豚鼠左侧前肢腋窝，测定心脏搏动。

(二)心电图描记。

七、体温的测量

体温计测量端涂少许凡士林，插入豚鼠肛门 3.5 厘米，测量体温。

八、血压的测量

全麻下手术暴露豚鼠颈动脉，将灌有抗凝剂的塑料插管从剪开的颈动脉小口插入，塑料管另一端接压力换能器，测量并记录豚鼠血压。

九、皮下注射

将豚鼠腹部剪去一小片被毛，用碘酒和酒精消毒皮肤，用手提起皮肤把针尖刺入皮下，注入药物。

十、肌肉注射

消毒豚鼠后腿膝关节内侧的皮肤，将针刺入皮下并穿入臀部肌肉，抽吸无回血方可注入药物。抽出针后用手指在针孔上部加压一分钟，以防药水从皮肤针孔流出。

十一、静脉注射

消毒颈部皮肤后，切开并分离暴露颈内静脉，将针刺入颈内静脉注入药物。用血管钳夹住静脉止血后再缝合创口。

十二、腹腔注射

将豚鼠左侧腹部下三分之一处皮区进行脱毛和消毒，把豚鼠取头低臀高体位，针直刺入腹腔，回抽无回血及其他液体方可注入药物。

十三、口服药物

液体药物可直接滴入豚鼠口中。片剂药物可捣碎后塞入豚鼠口中，再滴入凉开水服下。

十四、采血

(一)耳缘静脉取血：剪开耳廓，挤出血滴，用吸管吸取血液。

(二)眼底静脉窦抽血：用5号细针沿内眦紧贴眶内骨壁刺入眼底，抽取血液。豚鼠经多次眼底抽血后可致失明。

(三)趾端采血：消毒脚趾皮肤后剪下一节脚趾，用毛细玻璃管在伤口处吸取血液后，压迫止血。

(四)心脏穿刺抽血：针直刺心脏抽取血液，但易造成动物死亡。

十五、抽取内耳外淋巴液

将豚鼠听泡取下，暴露鼓室内壁，用消毒尖针刺破蜗窗膜，再用磨钝针尖的微量注射器将镫骨轻轻推入前庭池，抽取外淋巴液，一般每耳可抽取10~15微升外淋巴液。若蜗尖孔不通畅，可将蜗尖钻孔后，分别从前庭窗和蜗窗抽取外淋巴液。

十六、豚鼠实验编号

(一)白色豚鼠编号：个位数用3%苦味酸在豚鼠左侧、背部和右侧身体依次前、中、后进行标记编号。十位数用0.5%中性红在豚鼠身体上从左到右，从前到后依次标记编号。

(二)花色豚鼠用铝制编号脚圈或金属颈圈编号。

