

doi: 10.3969/j.issn.1672-4933.2024.04.024

圆窗膜挑开前后豚鼠听功能变化研究

Effect of Opening Round Window Membrane on Auditory Function of Healthy Guinea Pigs

张斯 王林娥 刘攀 郑文蕊 朱楨 段蓓蕾

ZHANG Si, WANG Lin-e, LIU Pan, ZHENG Wen-rui, ZHU Zhen, DUAN Bei-lei

【摘要】目的 探讨圆窗膜挑开后健康豚鼠听功能的变化。**方法** 选取健康豚鼠30只(60耳),吸入异氟烷麻醉后打开听泡挑开圆窗膜挑开前后分别行听性脑干反应(ABR)、耳蜗电图(electrocochleogram, ECochG)、电诱发复合动作电位(electrically evoked compound action potentials, ECAP)及电诱发听性脑干反应(electrically evoked auditory brainstem responses, EABR)检测,进行统计学分析。**结果** 豚鼠54耳记录到分化良好且稳定的以III波为主的ABR、ECochG、ECAP及EABR波形。圆窗膜挑开前后ABR阈值分别为 36.67 ± 7.76 dB SPL、 98.81 ± 10.74 dB SPL,二者之间有显著差异($P < 0.05$);ECochG中CAP阈值分别为 28.73 ± 9.72 dB SPL、 68.48 ± 11.21 dB SPL,二者之间有显著差异($P < 0.05$);ECAP阈值分别为 0.35 ± 0.11 mA、 0.46 ± 0.13 mA,二者之间有显著差异($P < 0.05$);EABR阈值分别为 0.21 ± 0.05 mA、 0.30 ± 0.07 mA,二者之间有显著差异($P < 0.05$)。**结论** 圆窗膜挑开前后健康豚鼠的听功能出现明显变化,表现为听力下降。

【关键词】 健康豚鼠;圆窗膜挑开;听性脑干反应;耳蜗电图;电诱发复合动作电位;电诱发听性脑干反应

【中图分类号】 R764.05

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-4933(2024)04-0433-05

【Abstract】Objective To investigate the effect of opening round window membrane on auditory function in healthy guinea pigs. **Method** Thirty healthy guinea pigs (60 ears) were anesthetized by inhalation of isoflurane. Otocyst was opened and round window film was opened. Auditory brainstem response (ABR), electrocochleogram (ECochG), electrically evoked auditory brainstem responses (EABR) and electroevoked compound action potentials (ECAP) was recorded before and after the round window membrane was opened. And statistical analysis was performed. **Results** In 54 ears of guinea pigs, well-differentiated and stable waveforms of ABR, ECochG, EABR and ECAP were recorded. The ABR thresholds before and after opening round window membrane were 36.67 ± 7.76 dB SPL and 98.81 ± 10.74 dB SPL, the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$). The ECochG thresholds before and after opening round window membrane were 28.73 ± 9.72 dB SPL and 68.48 ± 11.21 dB SPL, the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$); The EABR thresholds before and after opening round window membrane were 0.21 ± 0.05 mA and 0.30 ± 0.07 mA, and the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$); The ECAP thresholds before and after opening round window membrane were 0.35 ± 0.11 mA and 0.46 ± 0.13 mA, and the difference between them was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Before and after open round window membrane, the auditory function of healthy guinea pigs showed obvious changes, which showed hearing loss.

【Key words】 Opening round window membrane; Healthy guinea pigs; ABR; ECochG; EABR; ECAP

在我国听力残疾占五大残疾之首,成为严重危害人口健康及生活质量的疾病。人工耳蜗植入(CI)在全球范围广泛开展,是治疗重度或极重度感音神经性聋患者有效的生物医学工程装置。人工耳蜗植入术需要挑开圆窗膜后植入电极,圆窗膜挑开前后患者的听力是否有变化?利用健康豚鼠进行相关手术步骤及电生理测试会回答以上问题。本研究采用听性脑干反应(ABR)、耳蜗电图(electrocochleogram, ECochG)、电诱发复合动作电位(electrically evoked compound action potentials, ECAP)及电诱发听性脑干反应(electrically evoked auditory brainstem responses, EABR)检测健康豚鼠圆窗膜挑开前

后听功能的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康豚鼠30只,雌雄不限,体重400~500 g,耳廓反射灵敏,无强噪声暴露及耳毒性药物使用史,电耳镜检查鼓膜正常。

1.2 实验环境及设备

电生理测试均在电磁屏蔽室进行,屏蔽室墙壁铜网接地,操作者禁止携带电子设备,如手机等。实验设备采用Neuro-Audio听觉诱发电位仪(Neurosoft Ltd., Ivanov,

基金项目:北京市科学技术委员会“应用技术研究与开发项目”(Z191100007619043)

作者单位:首都医科大学附属北京友谊医院耳鼻咽喉头颈外科 北京 100050

作者简介:张斯 硕士 医师;研究方向:听觉电生理及听力学

通讯作者:王林娥, E-mail: wlebjyy@126.com

俄罗斯),刺激设备选择该公司外置电刺激器。实验软件使用 Neuro-Audio1.0.103.2 版本。诱发电位仪及电刺激器之间使用USB线缆连接于同一笔记本电脑。

1.3 实验方法

1.3.1 麻醉与手术 健康豚鼠称重后放入便携式多功能麻醉剂诱导箱中,用异氟烷(吸入体积分数为3%~5%的异氟烷和96.5%~97%的氧气)诱导吸入麻醉后,取出并继续用异氟烷吸入维持麻醉。麻醉过程中注意环境及操作台温度,予豚鼠保暖。待麻醉稳定后进行ABR及ECochG测试。

测试完成后,豚鼠测试耳朝上,耳后剃毛并碘伏消毒,于耳廓后方切开皮肤皮下,逐层钝性分离肌肉至骨面,避免损伤其中穿过的神经及血管,豚鼠听泡位置约在耳后乳突区0.2~0.5 cm处,1 mL注射器针头穿刺挑开听泡骨质,显微镜下暴露圆窗,如图1a、b。

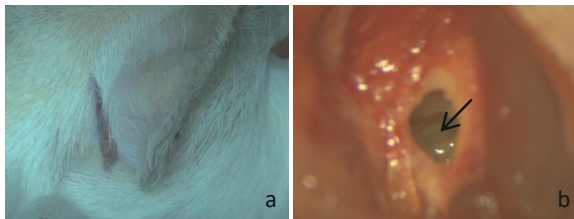


图1 a豚鼠手术耳后切口位置;b充分暴露圆窗,箭头所指为圆窗膜

1.3.2 声诱发电位测试 ①ABR测试:记录电极、参考电极、接地电极均使用针状电极。记录电极置于两外耳道口连线与颅顶正中交叉处皮下,参考电极置于测试耳后乳突区皮下,接地电极置于对侧耳后乳突区皮下。参数设置:在Neuro-Audio1.0.103.2中选择听性脑干反应模式,刺激频率21 Hz,分析时限15 ms,叠加1024次,拒绝水平 $\pm 40 \mu\text{V}$,信号输入范围500 μV ,低频100 Hz,高频2000 Hz,采样率40000 Hz,选取短声(click)为刺激声,极性为疏/密波,波宽100 μs 。阈值判定:刺激声强度从100 dB SPL开始,以步长10 dB SPL逐渐递减,以反复出现2次以上III波的最低刺激强度定义为ABR阈值。②ECochG测试:记录电极使用银球电极,参考电极、接地电极使用针状电极。记录电极银球放置于测试耳鼓膜表面前下或后下处,参考电极置于测试耳后乳突区皮下,接地电极置于两外耳道口连线与颅顶正中交叉处皮下。参数设置:在Neuro-Audio1.0.103.2中选择耳蜗电图模式,刺激频率7 Hz,分析时限7 ms,叠加300次,拒绝水平 $\pm 50 \mu\text{V}$,信号输入范围500 μV ,低频5 Hz,高频2000 Hz,采样率80000 Hz,选取短声(Click)为刺激声,极性为疏/密波,波宽100 μs 。阈值判定:刺激声强度从90 dB SPL

开始,以步长5 dB SPL逐渐递减,以反复出现2次以上CAP波形的最低刺激强度定义为阈值。

1.3.3 电诱发电位测试 ①ECAP测试:刺激电极正极使用银球电极,刺激电极负极、记录电极、参考电极、接地电极使用针状电极。刺激电极正极银球置于测试耳蜗圆窗膜表面,刺激电极负极置于测试耳后乳突区皮下,记录电极置于两外耳道口连线与颅顶正中交叉处皮下,参考电极置于对侧乳突区皮下,接地电极置于鼻尖皮下。参数设置:在Neuro-Audio1.0.103.2中选择ECAP模式,刺激频率7 Hz,分析时限5 ms,叠加1500次,拒绝水平 $\pm 50 \mu\text{V}$,信号输入范围500 μV ,低频5 Hz,高频2000 Hz,采样率80000 Hz,交替极性单向脉冲电流,波宽100 μs ,采用同步触发模式记录结果。监测时程40 ms,监测灵敏度20 μV ,采集时程2 ms,采集灵敏度100 μV ,叠加时程1 ms,叠加灵敏度5 μV 。阈值判定:刺激强度从0.8 mA开始,以步长0.1 mA逐渐递减,以反复出现2次以上ECAP的最低刺激强度定义为阈值。实验同时观察豚鼠触须及面部肌肉抽动情况。②EABR测试:刺激电极正极使用银球电极,刺激电极负极、记录电极、参考电极、接地电极使用针状电极。刺激电极正极银球置于测试耳蜗圆窗膜表面,刺激电极负极置于测试耳后乳突区皮下,记录电极置于两外耳道口连线与颅顶正中交叉处皮下,参考电极置于对侧乳突区皮下,接地电极置于鼻尖皮下。参数设置:在Neuro-Audio1.0.103.2中选择EABR模式,刺激频率21 Hz,分析时限7 ms,叠加2000次,拒绝水平 $\pm 10 \mu\text{V}$,信号输入范围500 μV ,低频200 Hz,高频1000 Hz,采样率80000 Hz,交替极性单向脉冲电流,波宽100 μs ,采用同步触发模式记录结果。监测时程40 ms,监测灵敏度20 μV ,采集时程2 ms,采集灵敏度100 μV ,叠加时程1 ms,叠加灵敏度5 μV 。阈值判定:刺激强度从0.8 mA开始,以步长0.1 mA逐渐递减,以反复出现2次以上III波的最低刺激强度定义为阈值。实验同时观察豚鼠触须及面部肌肉抽动情况。

1.3.4 显微镜下钩针挑开圆窗膜,按照上述方法进行挑开圆窗膜后ABR、ECochG、ECAP、EABR测试。ECAP、EABR刺激电极置于圆窗3点位置,余电极位置同挑开圆窗膜前。

1.4 统计分析

采用spss 22.0统计软件对资料进行统计分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 及中位数(Md)(最小值,最大值)表示,差异显著性水平 $P<0.05$ 。应用Wilcoxon符号秩检验进行统计学分析。

2 结果

豚鼠54耳记录到分化良好且稳定的以III波为主的

ABR、ECochG、ECAP及EABR波形。

2.1 声诱发电位测试

2.1.1 ABR测试 圆窗膜挑开前后ABR波形如图2所示。阈值分别为36.67±7.76 dB SPL、98.81±10.74 dB SPL,中位数分别40(30,50) dB SPL、100(80,110) dB SPL, Wilcoxon符号秩检验显示,Z=-6.437,二者之间有显著差异(P<0.05)。

表1 圆窗膜挑开前后ABR阈值变化

ABR	阈值(dB SPL)	III波幅值(mA)	Z	P
圆窗膜挑开前	36.67±7.76	2.18±0.96	-6.437	0.000*
圆窗膜挑开后	98.81±10.74	0.63±0.18		

*P>0.05,下同

2.1.2 ECochG测试 圆窗膜挑开前后ECochG波形如图3所示。CAP阈值分别为28.73±9.72 dB SPL、68.47±11.21 dB SPL,中位数分别25(15,50) dB SPL、70(45,85) dB SPL, Wilcoxon符号秩检验显示,Z=-6.408,二者之间有显著差异(P<0.05)。

2.2 电诱发电位测试

2.2.1 ECAP测试 圆窗膜挑开前后ECAP波形如图4

表2 圆窗膜挑开前后ECochG中CAP阈值变化

ECochG	阈值(dB SPL)	幅值(mA)	Z	P
圆窗膜挑开前	28.73±9.72	9.15±2.22	-6.408	0.000*
圆窗膜挑开后	68.47±11.21	2.25±1.19		

表3 圆窗膜挑开前后EABR阈值变化

EABR	阈值(mA)	Z	P
圆窗膜挑开前	0.21±0.05	-5.777	0.000*
圆窗膜挑开后	0.30±0.07		

所示。阈值分别为0.35±0.11 mA、0.46±0.13 mA,中位数分别0.3(0.2,0.6) mA、0.4(0.2,0.7) mA, Wilcoxon符号秩检验显示,Z=-5.661,二者之间有显著差异(P<0.05)。

表4 圆窗膜挑开前后ECAP阈值变化

ECAP	阈值(mA)	Z	P
圆窗膜挑开前	0.35±0.11	-5.661	0.000*
圆窗膜挑开后	0.46±0.13		

2.2.2 EABR测试 圆窗膜挑开前后EABR波形如图5所示。阈值分别为0.21±0.05 mA、0.30±0.07 mA,中位数分别0.2(0.1,0.3) mA、0.3(0.2,0.4) mA, Wilcoxon符号秩

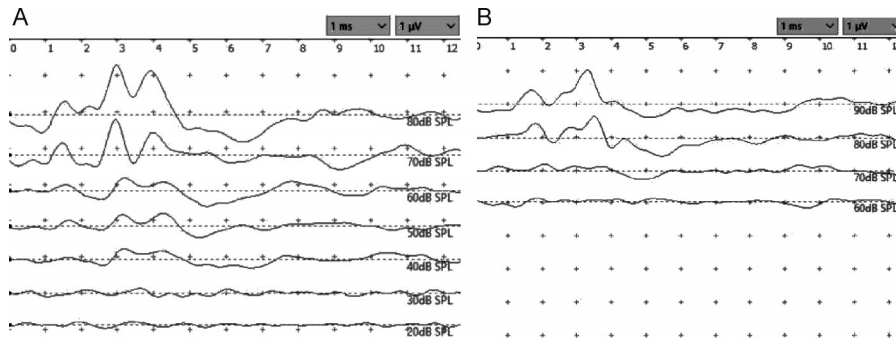


图2 A圆窗膜挑开前;B后ABR波形

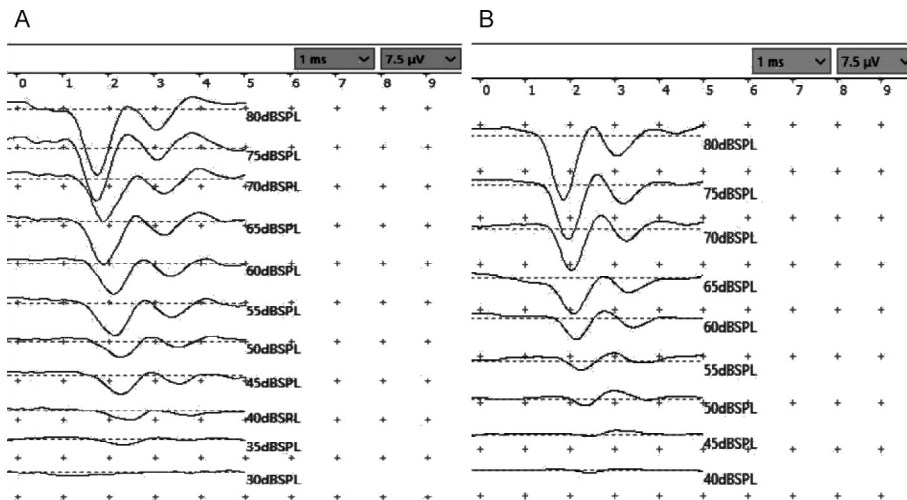


图3 圆窗膜挑开A前B后ECochG波形

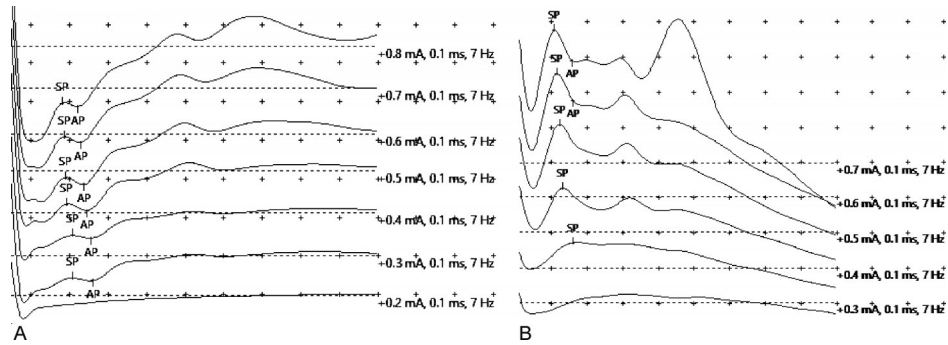


图4 A圆窗膜挑开前B后ECAP波形

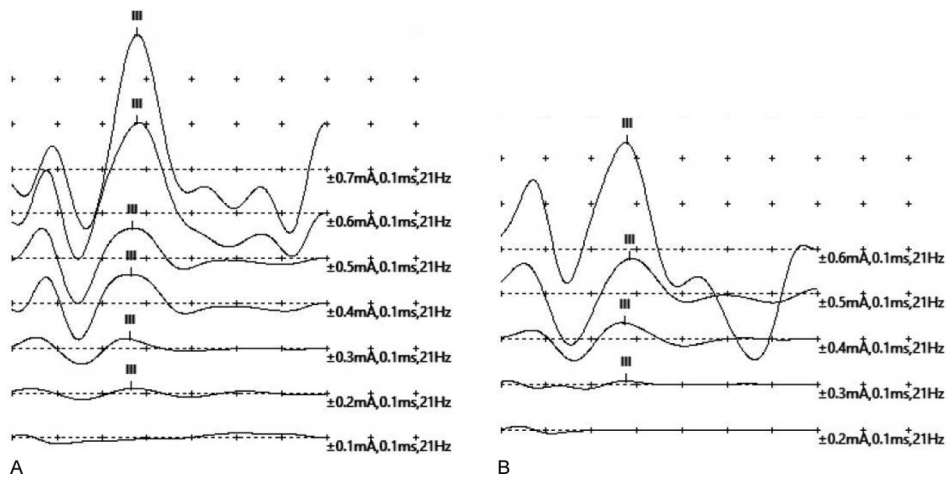


图5 A圆窗膜挑开前B后EABR波形

检验显示, $Z=-5.777$, 二者之间有显著差异 ($P<0.05$)。

3 讨论

目前,我国听力和言语残疾总数为2780万,占中国残疾人总数的34%,人工耳蜗植入(CI)是治疗重度极重度聋患者的有效方法,可恢复其听觉^[1]。1993年Lehnhardt提出“柔手术”概念^[2],即手术手法轻柔,减少对内耳的损伤,做到无创或微创,减少内耳暴露。此后越来越多的学者开展针对CI手术的研究^[3-5]。CI可能造成残余听力损失^[6],圆窗开窗大小会影响蜗内压力,从而影响植入效果^[7]。探讨人工耳蜗植入过程对患者听觉功能的影响,可以从手术动物模型着手。手术动物模型中豚鼠的耳蜗相比小鼠、大鼠更大,圈数更多,研究操作可以做到更精细,得出更好的结果^[8]。本研究即应用健康成年豚鼠作为实验动物,在圆窗膜挑开前后测试其听功能,进而探讨圆窗膜挑开前后豚鼠听功能的变化。

本研究选择ABR、ECochG、ECAP以及EABR作为豚鼠听功能的评价指标。ABR是临床常用的客观测听方法,可以与其他听力学检查相结合,用于鉴别听力损失的性质。ABR常用于检查有无蜗后病变。本研究发现挑开

圆窗膜后豚鼠ABR阈值明显升高。圆窗膜是耳蜗与中耳之间的关键结构,将声波振动从鼓膜传递至耳蜗内淋巴液。圆窗膜的完整性对于维持耳蜗内液体压力的平衡至关重要,挑开圆窗膜会导致耳蜗内液体流动的异常,进而影响耳蜗毛细胞的正常功能。因此,圆窗膜的损伤会直接导致声音振动传递路径的中断或改变,使声音信号无法被有效转换和传递,从而引起听力下降。这种听力下降可能表现为对某些频率声音的敏感度降低,甚至在某些情况下,可能导致严重的听力损失。与本文相似,赵长青等^[9]研究表明,内耳手术后,豚鼠出现ABR阈值升高情况,与本研究不同的是仅4耳出现与ABR阈值明显升高超过20 dB,甚至45 dB。可能与其采取耳蜗底转开孔的手术方式,且向耳蜗内注射钥孔威血蓝素(keyholelimpethemocyanin, KLH)及氨甲喋呤(methotrexate, MTX)相关。虽然KLH可诱导豚鼠内耳炎症但在不同文献中表明,MTX可抑制小鼠抗KLH抗体产生^[10]。仅挑开圆窗膜前后豚鼠听力损失在5~20 dB(平均9.1 dB),在术后7天基本恢复术前听力水平^[11]。推测在豚鼠行内耳手术后外淋巴液渗出导致内淋巴腔压力增高,耳蜗内液体平衡改变导致阈值提高。圆窗膜破裂10耳中,3耳表现出不同

程度的耳蜗形态异常,主要为内淋巴水肿,可能为内耳血液循环紊乱导致内淋巴回流不畅^[12]。还可能与外淋巴液漏出导致中耳存在外淋巴液,从而引起传导性听力损失,或圆窗膜挑开形成膜迷路开放性损伤^[13]相关。

ECochG是一项可以记录声刺激后耳蜗及听神经的电生理反应检查^[14]。耳蜗电图通常包括耳蜗微音电位(CM)、总和电位(SP)、听神经复合动作电位(CAP或AP)^[15]3部分。CM主要反映外毛细胞功能,SP主要反映内毛细胞功能,CAP是多个听神经元放电的动作电位的总和。总体来说,ECochG反映耳蜗毛细胞及听神经末端神经动作电位。鲁海涛等^[16]用针刺破豚鼠圆窗膜后,进行ECochG长期观察发现,术后第一天反应阈平均增高12.5dB,此后逐渐恢复,术后14天基本恢复正常。本研究观察到CAP阈值显著上升的现象,这一结果可能与模拟人工耳蜗植入手术过程中对圆窗膜的彻底挑开有关。在手术过程中,采取更为激进的方法,彻底破坏了圆窗膜,这不仅导致了圆窗膜的结构完整性被破坏,而且对内耳的干扰和刺激也更为显著。这种损伤可能包括耳蜗毛细胞的损伤^[17]、神经纤维的损伤^[18]或耳蜗淋巴液的变化^[19],这些因素都可能导致CAP阈值升高。在圆窗膜破裂的病例中可以得到相似结论,CAP幅值很小,并且在与纯音阈值相当的声压级下迅速衰减。但在此研究中圆窗膜破裂修复4周后,轨迹没有变化^[20]。

ECAP主要测试听神经在耳蜗内的反应,即听神经动作电位。它与脑干诱发电位I波的发生源相同^[21]。EABR是一种电刺激听觉诱发电位,人工耳蜗植入患者,尤其是儿童患者的重要客观评估手段。其可以反应听觉神经传导通路的完整性及功能。优势在于可以不经受损的毛细胞而将刺激直接传导至螺旋神经节细胞,从而避免蜗性损害对测试结果的影响。目前对于豚鼠挑开圆窗膜前后ECAP的变化尚未有研究,而EABR的研究仅限于正常值及不同位置刺激电极EABR特点分析^[22,23]。本研究对全麻正常豚鼠进行圆窗ECAP、EABR测试,对比挑开圆窗膜前后豚鼠ECAP阈值,发现阈值存在显著差异。对比挑开圆窗膜前后豚鼠EABR阈值,发现存在显著差异。说明挑开圆窗膜手术操作会使豚鼠听功能受到影响,表现为听功能下降。与声刺激测试相比,挑开圆窗膜前后ECAP、EABR阈值变化并不明显,与电刺激不经过中耳传导直接将电极置于圆窗窝相关,且两种测试是绕过了易在手术中受损的毛细胞直接作用于末梢螺旋神经节细胞有关。

综上所述,挑开圆窗膜手术操作会使豚鼠的ABR、ECochG中CAP、ECAP及EABR阈值出现变化,表现为阈

值升高。说明挑开圆窗膜会对豚鼠的听功能造成一定损伤。因此,在未来的研究中,应将这一因素纳入考量,以确保研究结果的准确性和可靠性。增加在手术后对豚鼠进行长期的跟踪研究,观察手术对豚鼠听力的长期影响,以及随时间的变化趋势。今后可进一步利用豚鼠模型探索使用特定药物或治疗方案减轻手术引起的听力损伤,例如使用抗氧化剂或神经营养因子保护耳蜗毛细胞。希望通过对豚鼠耳蜗手术模型的研究探索,不仅能够提高听力学研究的精确度,还能为临床听力保护和治疗提供更科学的依据。

参考文献

- [1] Ghiselli S, Nedic S, Montino S, et al. Cochlear implantation in post-lingually deafened adults and elderly patients: analysis of audiometric and speech perception outcomes during the first year of use[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2016,36(6):513-519.
- [2] Lehnardt E. Intracochlear placement of cochlear implant electrodes in soft surgery technique [J]. HNO, 1993,41(7):356-359.
- [3] 袁永一,戴朴.微创人工耳蜗植入手术策略[J].中华医学杂志, 2021, 101(02):87-91.
- [4] 赖若沙,伍伟景,李葭,等.内耳畸形人工耳蜗植入手术难点及其处理[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020,34(10):919-924.
- [5] Bruce B, Jane B, Benjamin W. Early Pediatric Implantation: Cochlear Implant Surgery at the Crossroads?[J]. J Int Adv Otol, 2019,1(2):01-10.
- [6] Stuermer KJ, Klünter HD, Lang-Roth R, et al. Preservation of Vestibular Function and Residual Hearing After Round Window Cochlear Implantation[J]. Otol Neurotol, 2019,40(7):878-882.
- [7] Todt I, Ernst A, Mittmann P. Effects of Round Window Opening Size and Moisturized Electrodes on Intracochlear Pressure Related to the Insertion of a Cochlear Implant Electrode[J]. Audiology and Neurotology Extra, 2016,6(1):01-08.
- [8] 刘爱国,王正敏,周梁.豚鼠颞骨显微解剖学研究[J].解剖科学进展, 2003,5(03):224-226.
- [9] 赵长青,赵海亮.豚鼠内耳手术对脑干诱发电位测定的影响[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2004,54(06):13-15.
- [10] Kato Y, Paterson A, Langone JJ. Monoclonal antibodies to the chemotherapeutic agent methotrexate: production, properties and comparison with polyclonal antibodies[J]. J Immunol Methods, 1984, 67(2):321-336.
- [11] Eshraghi A A, Polak M, He J, et al. Pattern of hearing loss in a rat model of cochlear implantation trauma[J]. Otol Neurotol, 2005,26(3): 442-447, 447.
- [12] 刘秀丽,别旭.豚鼠圆窗膜破裂引起耳蜗形态变化的探讨[J].听力学及言语疾病杂志, 2004,72(04):254-255.
- [13] Ikeda R, Nakaya K, Oshima T, et al. Calcium concentration in cochlear endolymph after vestibular labyrinth injury[J]. Neuroreport, 2010, 21 (9):651-655.
- [14] 冀飞,陈艾婷,邓新生,等.听力正常者交替短声诱发的耳蜗电图特征[J].听力学及言语疾病杂志, 2009,17(01):32-35.

(下转446页)