刘泽萱,王鑫乐,郑曲,等. 听力损失的动物模型研究现状及展望[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1463-1471.
LIU Z X, WANG X L, ZHENG Q, et al. Research status and future prospects of animal models of hearing loss [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1463-1471.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.011

听力损失的动物模型研究现状及展望

刘泽萱[1],王鑫乐[1],郑曲[1,2*],戴俭宇[1,2*]

(1. 辽宁中医药大学,沈阳 110847;2. 辽宁省教育厅针灸生物学重点实验室,沈阳 110847)

【摘要】 听力损失(hearing loss,HL)作为致病因素复杂、发病机制尚不明确的疾病,可以导致患者听力低下,严重影响患者的健康和生存质量。为了更好地探索听力损失发病机制,并为其治疗研究提供依据,建立出能够模拟人类听觉障碍的动物模型具有重要价值。现有经典的造模方法为药物注射,包含腹腔注射顺铂、庆大霉素、线粒体毒素、D-半乳糖、呋塞米和卡那霉素、新霉素以及先天性巨细胞病毒等;物理方式造模包含噪音、颈椎注射硬化剂、缺血再灌注、注射血管加压素等,此外还有基因改造技术等其他新颖造模方式。本文从上述听力损失造模方法优缺点的角度进行综述,希望能够为更加深入研究听力损失造模方式提供基础和依据。

【关键词】 听力损失;动物模型;造模方式
【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847(2024)11-1463-09

Research status and future prospects of animal models of hearing loss

LIU Zexuan[1], WANG Xinle[1], ZHENG Qu[1,2*], DAI Jianyu[1,2*]

(1. Liaoning University of Traditonal Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. Key Laboratory of Acupuncture and Moxibustion Biology in Liaoning Provincial Department of Education, Shenyang 110847, China)
Corresponding author: DAI Jianyu. E-mail: daijy2009boshi@163.com; ZHENG Qu. E-mail: zxyjh-zhengq@lnutcm.edu.cn

【Abstract】 Hearing loss is a disease with complex pathogenic factors and unclear pathogenesis, which can seriously affect patient health and quality of life. There is thus a need for an animal model that can simulate human hearing loss, to allow research into the pathogenesis of hearing loss and provide a basis for its treatment. Existing classical modeling method involve drug injection, including intraperitoneal injection of cisplatin, gentamicin, mitochondrial toxin, D-galactose, furosemide and kanamycin, and neomycin, and congenital cytomegalovirus infection. Physical modeling method include noise, cervical spinal injection of sclerosing agent, ischemia reperfusion, and vasopressin injection. Other novel modeling method also exist, such as genetic modification. In this article, we review the advantages and disadvantages of the above modeling method, with the aim of providing a basis for further research on the modeling method of hearing loss.

【Keywords】 hearing loss; animal model; modeling method
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

听力损失(hearing loss,HL)是临床常见的产生不同程度听力减退的听功能障碍性疾病。世界卫生组织(World Health Organization,WHO)的调查数据显示:预计到 2050 年致残性听力损失将超过 9 亿,而且 65 岁以上有三分之一的人受到听力损失的影响[1]。梅尼埃病、糖尿病、肢端肥大症以及精神

[基金项目]辽宁省自然科学基金面上项目(2024-MS-120)。
Funded by Liaoning Province Natural Science Foundation Surface Project (2024-MS-120).
[作者简介]刘泽萱,女,在读硕士研究生,研究方向:耳科疾病的中医临床与基础。Email: 1443084703@qq.com
[通信作者]戴俭宇,男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:耳科疾病的中医临床与基础。Email: daijy2009boshi@163.com;
郑曲,男,博士,讲师,研究方向:耳科疾病的中医临床与基础。Email: zxyjh-zhengq@lnutcm.edu.cn。
*共同通信作者

疾病均可产生不同程度的听力损失,听力损失不仅影响患者的沟通能力,还会影响患者的情绪[2-4]。听力依赖于耳蜗内基底膜部位被称为毛细胞的特殊细胞,细胞名字来源于它们表面发现的毛发状纤维束,当声波进入耳朵时,这些纤维会产生移动,这种运动激活了毛细胞,毛细胞再通过突触的接触点向附近的神经元发送信号。毛细胞必须快速、连续地传输信息,才能让人类识别复杂的声音流并听懂语言[5]。人类听力损失的常见原因主要包括:暴露于噪音或耳毒性药物、先天遗传因素、衰老以及外伤等,其病因较为复杂,且尚不明确,治愈难度高,相关听力损失的机制研究有限,模拟听力损失模型的制作难度较高,不能完全准确地模拟临床患者的症状和发病进程,因此听力损失动物模型的建立对探究听力损失的发病机制和防治方法具有重要意义。目前常见的听力损失造模方式主要有 4 大类:(1)以庆大霉素(gentamicin,GM),顺铂(cisplatin,CDDP)等耳毒性药物为代表的药物性听力损失;(2)噪声,缺血再灌注等物理因素导致的听力损失;(3)基因改造技术模拟先天性听力损失;(4)毛细胞缺失等其他特殊方式导致的听力损失。本文对以上听力损失动物模型进行综述,为建立合理的听力损失动物模型提供参考。

1　药物性听力损失模型

引起听力损失或耳蜗损伤的耳毒性临床常用药物如氨基糖苷类抗生素、水杨酸盐、利尿剂、抗肿瘤药物等均可能导致药物性听力损失[6]。这类药物均有可能造成内耳微循环障碍、内耳毛细胞变性坏死并最终导致高频听力渐向低频扩展的听力损失。药物可经各种途径进入内耳并在其中长时间停留,从而损伤具有听觉感受器功能的耳蜗毛细胞,造成患者双侧或单侧进行性的不可逆听力损失[7]。

1.1　注射 GM 建立听力损失模型

GM 是一种重要的氨基糖苷类抗生素,用于治疗革兰氏阴性细菌感染,是临床常用的药物之一,然而高剂量 GM 引起的耳毒性是一个严重的健康问题,内耳的损伤是不可逆转的,GM 的耳毒性主要来自于活性氧的生成,活性氧在内耳造成一系列反应,最终引起毛细胞的凋亡,对全世界数百万人造成严重影响[8],因此需要建立一个合理的耳毒性动物模型用于研究 GM 的耳毒性对人体的损伤。腹腔注射是 GM 造模最常见的方式。YU 等[9]将 8 只 3 月龄的 KM 小鼠每日行腹腔注射 GM 100 mg/kg,连续 10 d 后,造模完成,并通过听觉测试(auditory brainstem response,ABR)值从 60 dB 下降了 10 dB 和细胞染色评估 GM 诱导的听力损失对听觉耳蜗毛细胞数量的影响。腹腔注射 GM 造模方式相对成熟,安全性更高,因此应用较为广泛。BANAKIS HARTL 等[10]开发了一种龙猫单侧耳聋(single-sided deafness,SSD)动物模型,该物种在听力测量方面与人类相当,耳朵大,易于手术,且听觉早熟,能够使用耳间时间和水平差提示。听力损失模型通过对 6 只成年雌性龙猫进行全身麻醉后行肌内注射盐酸氯胺酮(ketaved),30 mg/kg 和盐酸甲苯噻嗪(tranquived),5 mg/kg,同时进行补充注射以维持足够的麻醉水平。其中 4 只接受单侧耳聋手术,用 1.0 mL GM(40 mg/mL)的中耳腔滴注注射一次,其余 2 只用于对照。在滴注 GM 后的 24 h 内同侧诱发 ABR 几乎完全丧失,对侧诱发阈值保持不变,并且毛细胞特异性标记物肌球蛋白 7A 的染色显示未经治疗的耳蜗毛细胞结构正常,化学性听力损失后听力阈值的变化在长达 5 d 的重复测试中依旧是稳定的,没有明显变化,提示造模成功。HARYUNA 等[11]研究姜黄素对耳毒性褐家鼠的耳蜗成纤维细胞的抗凋亡作用,选取雄性褐家鼠,体重 150 ~ 250 g,为 0.03 ~ 0.05 mL 每只,GM 浓度为 40 mg/mL,总用剂量为 0.1 mL,在显微镜的帮助下注射到大鼠的前上鼓膜中,并使用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 原位切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)测定法测量耳蜗侧壁成纤维细胞中的凋亡指数来判断造模是否成功,耳蜗侧壁成纤维细胞的凋亡指数平均值为 30 提示造模成功。此方法具有良好的成模效果,成模时间短,未出现大鼠死亡,但有感染风险。

1.2　注射 CDDP 诱导建立听力损失模型

CDDP 是一种广泛使用的抗肿瘤药物。耳毒性是 CDDP 的主要副作用。据了解,在接受 CDDP 治疗的患者中,高达 80% 的患者会出现听力损失。CDDP 在注射后积聚在内耳然后被内耳上皮细胞吸收,进而导致毛细胞的死亡。CDDP 引起的耳毒性会导致儿童和成人癌症幸存者不同程度的听力损失[12]。胡鹏刚等[13]用外耳道无异常 SD 大鼠,雌雄不限,分 3 组进行实验:CDDP 1 组从大鼠出生 14 d

开始连续 7 d 腹腔注射 CDDP(3 mg/kg),此阶段大鼠听力发育完全;对照组为连续 7 d 腹腔注射相应量的生理盐水(0.3 mL/100 g)。此外,设立 CDDP 2 组为性成熟大鼠,连续 7 d 腹腔注射 CDDP(3 mg/kg)。每组 3 只大鼠在测听后取耳蜗进行免疫荧光染色观察。通过 ABR 测试 CDDP 1 组为 60 ~ 80 dB,CDDP 2 组为 40 ~ 60 dB 与对照组 20 dB 的平均值有明显差异提示造模成功,并且免疫荧光染色观察到 CDDP 组耳蜗外毛细胞大量缺失。CDDP 诱导的耳聋模型稳定,造模时间短,此模型更好的诠释了不同周龄的大鼠耳毒性的敏感度不同,具有较高的临床研究价值,但临床 CDDP 的使用多为多剂量、多周期给药,动物模型不能完全反应临床 CDDP 给药方案,限制了对听力敏感性的长期变化和潜在保护性治疗效果的评估。FERNANDEZ 等[14]提出了一种优化 CDDP 耳毒性小鼠模型的详细方法,选用 35 只成年 CBA/CaJ 雌或雄性小鼠(17.9 ~ 31.3 g)进行两个独立的实验。小鼠被随机分为对照组和 CDDP 治疗组,每组保持性别平衡。在 35 只动物中,23 只用于试剂量的比较研究,在该研究中,使用平均体重为 24.8 ± 3.5 g(范围 17.9 ~ 31.3 g)的小鼠连续 3 个周期共 42 d 接受 2.5、3.0 和 3.5 mg/kg 的 CDDP(1 mg/mL)腹腔注射,注射持续 4 d,随后是 10 d 的恢复期,恢复期不做干预。所有 CDDP 治疗小鼠每天早上皮下注射 1 mL 0.9% NaCl,每天下午皮下注射 1 mL 生理盐水。CDDP 治疗组的高频区(> 32 kHZ)ABR 阈值显著升高且 CDDP 治疗的小鼠都显示出畸变产物耳声发射(distortion product otoacoustic emission,DPOAE)振幅显著降低或 DPOAE 缺失则提示造模成功。该方法利用多周期给药方案能更好地模拟临床观察到的听力损失类型和程度且死亡率极低。为临床研究 CDDP 引起的听力损失机制以及开发保护接受 CDDP 治疗的癌症患者听力提供新的造模方法。

1.3　注射 D-半乳糖(D-galactose,D-gal)诱导建立听力损失模型

D-gal 是动物体内一种普通的代谢产物,D-gal 在体内可氧化产生大量自由基,使机体抗氧化酶活力下降,过氧化产物累积,还可以造成组织细胞内半乳糖醇堆积,影响正常渗透压,导致细胞肿胀、功能障碍,代谢紊乱。还有研究发现 D-gal 具有降低细胞增殖能力,加速细胞老化作用,最终加速机体衰老,并诱导体内多器官发生衰老性疾病[15-16]。帅常娟等[17]选取耳廓反射灵敏、无噪声暴露及耳毒性药物使用史 30 只 4 月龄豚鼠(体重 230 ~ 400 g),随机分为对照组、D-gal 模型组(简称模型组)、D-gal 模型 + 电针组(简称电针组),每组 10 只,18 月龄豚鼠 10 只(体重 500 ~ 700 g)作为老年组。模型组及电针组豚鼠行颈背部皮下注射 D-gal 300 mg/(kg·d),对照组予以注射等量生理盐水,每天 1 次,连续 6 周。老年组豚鼠常规饲养,不作任何处理。造模后检测豚鼠 ABR 阈值,模型组与老年组的 ABR 阈值显著升高为造模成功,其中模型组为(74.5 ± 5.59)dB,老年组为(76.5 ± 7.8)dB。D-gal 衰老模型是目前使用较为广泛的一种人工老化模型,具有衰老变化明显、模型稳定等优点,但相对其他造模方式而言,本造模方式时间周期相对较长,多为 6 周及以上,大多用于老年性耳聋模型的建立。小鼠寿命较短,在系统发育方面与人类有较大差距,用于模拟人类疾病时,与年龄相关的病理学与人类有差异性。

1.4　注射卡那霉素(kanamycin,Kana)联合呋塞米(furosemide,FSM)建立听力损失模型

Kana 是氨基糖苷类抗生素,可以引起小鼠耳蜗基底膜毛细胞损伤。FSM 是一种利尿剂,适量的使用可以治疗各种疾病导致的水肿症状,当使用大剂量的 FSM 同时配合快速静脉注射会引起短暂性的耳鸣或听力损失症状。有研究报道 Kana 联合 FSM 用药可导致耳毒性[18]。BAKO 等[19]将 65 只 BFA 浅色豚鼠(n = 40;BFA bunt;310 ~ 560 g)分为 3 个小组,其中 2 个实验组分别肌内注射枸橼酸芬太尼 0.025 mg/kg,咪达唑仑 0.2 mg/kg,和盐酸美托咪定 1 mg/kg,全麻后通过单侧耳后入路打开大疱,用一根绝缘金线的裸露尖端放置在圆窗壁龛中,在听力测试后用 Kana 联合 FSM 溶液(200 mg/mL 硫酸 Kana 和 50 mg/mL FSM 溶液)分别填充(160 ~ 220 μL)大疱 1 和 2 h,术后取出溶液,用林格溶液冲洗中耳,对照组未使用任何溶液,然后闭合大疱,并对耳后皮肤切口进行皮内闭合,对照组未做任何处理。在术后的 5、14 和 26 周的不同时间处死动物,1 周后进行组织学分析。通过测量听神经复合动作电位(compound action potentials,CAPs)反应发现所有频率的中度听力损失都可检测到为 31 ~ 79 dB,更高的频率下则有更严重的听力损伤趋势,暴露后可以立即看到阈值偏移和最大 CAPs 幅度的恶化,在以后的测量中没有 CAPs 响应提示造模成功。此

模型可以用于诱导毛细胞再生或向内耳递送神经营养因子等研究,并且是一种可复制、安全的听力损失动物模型。单独使用 Kana 需要重复给药才能实现永久性听力损失,与环路利尿药物联合给药可以增强其效果,且局部用药可以减轻耳毒性还能建立单侧听力损失模型。但是,氨基糖苷类抗生素的肾毒性等副作用也会随着动物和人类环路利尿剂的全身联合给药而增强。肾耳毒性相关研究可应用该类造模方法。

1.5　注射新霉素(neomycin,Neo)诱导建立听力损失模型

Neo 是氨基糖苷类抗生素,在我国广泛用于治疗较为严重的感染,约 5%的患者在使用此类抗生素时表现出严重的听力损失。特别是与其他氨基糖苷类抗生素相比,Neo 在全球范围内的听力损失发生率更高[20]。CUTRI 等[21]将 Neo 悬浮液(500 μL,50 和 100 mg/mL)单次左耳显微注射到野生型 CBA/CaJ 新生小鼠内淋巴中。通过耳廓正后方的耳后切口暴露出后半规管和耳蜗大泡,进行显微注射。用 Neo(10 ∶ 1 混合 2.5%快速绿色染料)的悬浮液加载到硼硅酸盐玻璃移液管(1.5 mm 外径(OD) × 0.86 mm 内径(ID))中),填充隔间,通过成功着色来确认注射成功。注射 4 周后进行 ABR 听力测试,声学信号以音调点的形式呈现,在频率 8、16、24 和 32 kHz 下,上升和下降时间为 0.5 ms,总持续时间为 5 ms,音调点低于阈值,然后以 5 ~ 10 dB 的增量增加,直到达到 100 dB 声压级(sound pressure level,SPL)的最大输出。Neo 组的 ABR 平均峰值阈值在注射后一个月的所有频率(8 ~ 32 kHz)都显著增加,均值在 80 ~ 100 dB,提示造模成功。与局部和全身氨基糖苷类注射相比,该方法通过在新生小鼠中单次输注 Neo 提供了可靠、稳健且快速的耳聋模型,减少因反复注射给药导致基底层出现可变的、有限的损伤,耐受性也更好,听力损失时间也更快速,且 Neo 的临床应用率较高,有较大研究价值。该模型还可以研究听觉成熟过程中内耳损伤的影响。

1.6　注射先天性巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)诱导建立听力损失模型

CMV 感染是新生儿听力损失的重要原因,其引起的感音神经性听力损失是进行性的,但在耳蜗水平上,听力损失背后的解剖病变和病理生理机制仍不清楚。感染 CMV 的新生儿患听力损失等感觉神经障碍的风险很高,需要广泛关注[22]。CARRARO 等[23]在出生后第 3 天的 BALB/c 小鼠的大脑皮层接种 mCMV,向右脑半球注射 2 μL mCMV,剂量 2000 pfu(斑块形成单位)。将小鼠进行麻醉,然后将 30 G 的注射针穿过颅骨插入中顶叶皮层,对照小鼠未接种 mCMV。在 6 周时使用 ABR 和 DPOAE 测量来监测耳蜗功能。在 8 周龄时使用部分腐蚀铸造技术对耳蜗血管系统进行组织学评估。CMV 感染后耳蜗功能障碍在 6 周大时出现明显的 ABR 阈值升高,平均值 60 ~ 80 dB,DPOAE 振幅降低,平均值 60 ~ 80 dB 提示造模成功。CMV 感染诱导小鼠耳聋模型用于模拟新生儿病毒感染后的进行性感音性听力损失技术较为成熟,可以用于神经感觉后遗症的愈后工具的研发,但据研究显示,CMV 感染具有明显的男性偏向性,且母体免疫力和胎龄不同也会导致不同程度的听力损伤。LAZARINI 等[24]研究 CMV 感染对听力的影响,通过对深度麻醉的妊娠小鼠(E13)进行小鼠 CMV 的子宫内胎盘接种,在妊娠期间, CMV 感染胎盘, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)在所有 W3 新生小鼠的唾液样本中评估 CMV 核酸的存在。由于雌性小鼠的样本量太小,无法达到统计分析所需的能力选择只研究雄性小鼠的听觉。在出生后 4 和 16 d 的 8 只 CMV 雄性小鼠和随机选择的 8 只 CTL 雄性小鼠中用 ABR 测试评估听力,在 4 d 时未见明显差异,16 d 时平均值显著升高达 80 dB,根据母体免疫力和胎龄的不同,其结果各不相同,可以用于母体感染 CMV 后对新生儿的发病研究,及神经感觉后遗症的愈后工具的开发。

2　物理性耳聋模型

2.1　椎动脉型颈椎病(cervial spondylosis of vertebral artery type,CSA)致听力损失模型—兔模型

CSA 是由于颈椎退行性病变导致椎基底动脉供血不足的临床综合征。临床表现以颈性眩晕为主,可伴有头晕、头痛、失眠、耳鸣、视力模糊、恶心、呕吐、颈肩或枕颈疼痛,甚至猝倒等一系列症状[25]。其发病率随着年龄的增长而增加,中老年人是此疾病的高发群体。近年来,随着人们生活节奏的加快和伏案工作人员比例的提高,其发病率逐年上升,并趋于年轻化,约占颈椎病的 20%[26]。周翔等[27]采用注射硬化剂法形成 CSA 进而导致突发性听力

损失的动物模型。将消痔灵注射液 10 mL 注射于新西兰大耳朵兔(2.62 ± 0.30)kg 颈椎横突旁软组织,注射位置 2 ~ 6 颈椎横突,深度 1 ~ 1.5 cm,一周一次,连续 3 周。造模前及造模后进行经颅多谱勒(transcranial doppler,TCD)检测,然后随机选取大耳兔进行病理组织检测,如左右椎动脉及基底动脉血流平均速度(vmean,Vm)下降,椎动脉阻力指数(resistance index, RI)、血流灌注指数(perfusion index,PI)增加,注射区域颈部组织出现广泛瘢痕化及挛缩,则证明造模成功。注射硬化剂制作的动物模型符合慢性 CSA 临床发病机理,其方法简便、安全,具有很高的科研价值,但家兔与人类的颈椎有一定差异,例如颈椎大小,结构,硬度和易损程度等方面,不能完全模拟人 CSA 导致的听力损失表现,且本模型仅适用于 CSA 导致的听力损失。

2.2　噪音性诱导的听力损失模型

噪声被认为是感音神经性听力损失的主要原因。据报道,大约 16%的听力损失归因于持续暴露在大噪音中。长期暴露在超过 80 dB 的噪音水平下会增加听力损失的风险[28]。如果有足够的强度和持续时间的噪音,毛细胞可能会被严重破坏,但具体的强度和时间没有明确规范,因此建立一个合理的噪音性耳聋模型十分必要[29]。XU 等[30]将 C57BL/6 小鼠(8 ~ 12 周龄,22 ~ 30 g)放置在具有四个形状隔间的丝网暴露笼中,并且小鼠能够在隔间内移动。笼子被放置在由 Industrial Acoustics 公司设计的 MAC-1 隔音室中,隔音室内衬隔音泡沫,以最大限度地减少反射。小鼠暴露于中心频率(2 ~ 4 kHz)为 100 dB SPL(声压级)的白噪声中,噪声暴露持续 6 h/d,连续 3 d,然后测试 ABR 听力阈值,在不同的声音频率下 ABR 阈值正常的(10 ~ 50 dB SPL)噪声模型的小鼠表现出听力损失(70 ~ 90 dB SPL)为造模成功。此外,LIU 等[31]发现小鼠模型中,间隙连接蛋白 26(recombinant connexin 26, Cx26)异源缺失减少了耳蜗侧壁中耳蜗内电位的产生,并导致外毛细胞电动蛋白 prestin 补偿性上调,从而增加主动耳蜗放大和听力敏感性。主动耳蜗放大的增加也增加了对噪音的敏感度,暴露于日常噪音可能会导致 $Cx26^{+/-}$ 小鼠永久性听力阈值偏移,导致听力损失。此研究表明,Cx26 隐性杂合突变并不像之前认为的那样对听力没有损伤,反而还可能导致听力过度敏感。贾占伟等[32]将雄性 Wistar 大鼠放置于小笼内(30 cm × 30 cm × 100 cm),每笼 2 只,放入暴露舱(1.0 m × 0.5 m × 1.0 m),利用 81150A 脉冲函数任意噪声发生器发声,噪音频率 3 kHz,声强 116 dB 声压级,大鼠暴露范围内声扬不均匀度为 ± 2 dB,每天暴露 8 h,共暴露 7 d,造模前及造模结束后,检测各组大鼠 ABR 听力阈值。噪音引起的听力损失是日常生活中常见的病因,广泛存在于工业领域及其他长期受噪声干扰的工作环境,噪音导致的听力损失具有较大研究意义,但动物不能完全模拟人的社会化属性,暴露于相同条件的噪音中,不同人受到的损伤可能不同,这与个体差异或周边因素有关[33]。

2.3　缺血再灌注耳聋模型

胡莹[34]对健康的 SD 大鼠(300 ~ 350 g)进行麻醉处理。麻醉后在大鼠颈前正中切口,并分离各层组织,进而暴露锁骨下动脉及其分支椎动脉,并分离一侧颈总动脉,灼断双侧椎动脉,用微动脉夹夹闭颈总动脉 1 h,此为缺血时间,1 h 后松开动脉夹,在解剖显微镜下观察到颈总动脉血液复流搏动恢复后计时为再灌注时间,缝合切口。各组大鼠分别于手术造模后 24 h 且未给药前及造模 7 d 后分别依次测量 ABR 阈值,刺激的测试强度由 85 dB SPL 开始,按 5 dB SPL 逐档递减,听阈的判断以 ABR 的Ⅲ波首次消失为准,提示造模成功。内耳缺血再灌注损伤的细胞学和分子学机制已经大致清楚,具有机制明确的优点,用于研究内耳微循环障碍导致的听力损失,且可作为适用于外伤导致的突发性听力损失的研究模型,为临床治疗外伤导致的听力损失提供模型,但手术创伤大,操作复杂,死亡率较高,因此建立一个简单、成功率高的造模方法仍需进一步研究[35]。

2.4　膜迷路积水导致听力损失—豚鼠模型

膜迷路积水是梅尼埃病(meniere disease,MD)的典型特征,MD 主要表现为耳鸣,眩晕,进而形成听力损失,严重影响到患者的社会生活[36]。WANG 等[37]选取 18 只健康的红眼豚鼠(36 耳),体重 200 ~ 350 g,随机分为 3 组,采用注射醋酸去氨加压素(desmopressin acetate,DDAVP)进行造模:对照组,连续 7 d 腹腔注射无菌生理盐水(与其他两组的体积相同);DDAVP-7 d 组,连续 7 d 腹腔注射 10 mg/(mL·kg)醋酸去氨加压素;DDAVP-14d 组腹腔注射 10 mg/(mL·kg) DDAVP 连续 14 d。成功造模后,处死所有动物,收集耳蜗组织,分别通过逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase

chain reaction,RT-PCR)和蛋白质印迹检测(Western Blot)环磷酸腺苷 1(cyclic adenosine monophosphate,cAMP-1)和 2 直接激活的交换蛋白(epac1,epac2)和阻遏物激活蛋白-1(repressor activator protein-1,rap1)的 mRNA 和蛋白质表达,其中 DDAVP-7 d 组耳蜗组织中 epac1、epac2、rap1A 和 rap1B 的相对 mRNA 表达显著高于对照组,而 Rap1 GTP 酶激活蛋白(RAP1 GTPase activating protein, rap1gap) mRNA 表达在两组之间无显著性差异,提示造模成功。腹腔注射 DDAVP 是现如今常见的快速形成内淋巴积水进而导致听力损伤的模型,其实验方法简单、破坏性小、造模周期短、技术成熟,造模成功率高,但豚鼠价格昂贵,对于气候适应性差,不方便操作,病死率高。因此王娜等[38]改用 3 ~ 6 月龄健康 SD 大鼠,体重 160 ~ 210 g,行腹腔注射,大鼠的使用剂量为 4 μg/(kg·d)(DDAVP)连续注射 7 d 后,增大剂量至 6 μg/(kg·d),继续连续注射 3 d,停止用药 7 d 后分别对实验组,对照组(注射与实验组等量生理盐水)及未作任何处理的正常组行 ABR 检测。大鼠出现明显行为学改变,行动迟缓,出现明显听力下降,耳蜗切片采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining,HE)染色前庭膜变形,耳蜗中阶(cochlea media,SM)与耳蜗中阶加前庭阶(scala vestibuli,SV)SM + SV 横截面积比值基本等于 1/3,建立模型率达 90%,符合建模成功标准。大鼠的环境适应性较强、价格低廉、成模率更高,但相较于豚鼠,耳蜗较小,后期实验动物的取材难度较大。

3　基因敲除技术模型

遗传导致的听力损失是临床上常见的先天性听力损失原因。迄今为止,已检测出近百种与听力损失相关的基因,由于基因导致听力损失研究尚且不足,因此建立与人类近似的动物模型进行模拟研究[39]。曾华沙[40]通过体细胞核移植获取母猪卵巢,采集卵母细胞,在体外培养至减数第二次分裂中期,将减数第二次分裂中期的细胞去除细胞核和第二极体,复苏基因敲除的细胞系,将不同敲除基因型的细胞混合,用物理或化学的方法将(如电脉冲、钙离子载体、乙醇、蛋白酶合成抑制剂等)激活受体细胞,使其完成细胞分裂和发育过程。通过电刺激使两种细胞融合,供体核进入受体卵母细胞,完成胚胎重组,体外培养 48 h,将胚胎移入受体(代孕)母猪体内,超声波监测代孕母猪怀孕情况。宰杀胚胎移植 37 d 的代孕母猪,从子宫取出 14 只正常胎猪(另有 1 只溶血,3 只吸收,3 只死胎),用于制备氧固醇结合蛋白样 2(oxysterol binding protein-like 2,OSBPL2)敲除预制前体纤维(pre-formed fibrils,PFFs)。制备细胞时,每头胎猪留取部分组织,提取基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA)进行基因型的鉴定。目前基因敲除技术在小鼠模型中已经取得不少的进展,但由于小鼠模型不能较好的再现人类听力缺陷的病理表型与发病规律,凭借小型猪模型与人在听觉器官的形态和结构方面具有极高的相似性,以小型猪为动物模型,努力寻找到一种手术路径,既能将耳聋基因高效的转导入靶细胞,又能导致最小的听力损失[41]。

4　其他造模方式导致听力损失模型

4.1　一种单纯毛细胞缺失性听力损失模型

单纯毛细胞缺失是指利用耳蜗侧壁打孔经中阶进行内淋巴灌注注射用水或腺病毒液来造成正常豚鼠耳蜗毛细胞损害,引起听力损失。庄文杰等[42]使用麻醉后的健康花豚鼠(250 ~ 350 g)自左侧下颌下缘中点剪开毛皮长约 1.5 cm,皮下稍加分离后置入撑开器,提起颈阔肌扩大切口,沿着咬肌内侧表面向深处分离,将腺体牵向中线(灰白色泡膜状),下颌下腺及颈外静脉在下方也牵向中线,下方可以看到茎突及前方走向的二腹肌后腹及腱膜,在咬肌内侧二腹肌深处可以探到一个骨性平面就是骨性听泡,将肌肉和迷走神经牵向中线就可以看到骨面,分离骨膜上撑开器,用血管钳在骨面最突起的后内方夹开少许骨质,去除后,撕掉内面的骨膜进入听泡,可以看到内侧的耳蜗和外侧的鼓膜,在倒数第二圈(基本上覆盖 40% ~ 70%的区域频率在 1000 ~ 8000 Hz 之间的基底膜区)的中部色素带偏下打孔(使用自制尖端 0.2 mm 的三棱针)。导入聚亚酰胺微管,深度在 0.1 ~ 0.2 mm,另一端连接微量注射泵(速率为 0.5 μL/min),药物的容量为 5 μL(含 1 μL 0.25%快绿生物染料),使用快绿生物染料作为指示剂,确定是否位于中介内,病毒组使用携带增强绿色荧光蛋白基因(enhanced green fluorescent protein,EGFP)的腺病毒和快绿生物染料混合液,注射用水组使用商品化的注射用水和快绿生物色素混合液。注射完毕,用小块颈阔肌封闭骨孔,用牙科磷酸锌水门汀封闭听泡骨性开口。分层

缝合切口。通过断续骚扰测试(CLICK)的豚鼠听阈阈值提高(92.5 ± 8.22)dB SPL,鬼笔环肽染色(phalloidin)显示清晰,在灌注的方向上外毛细胞受损严重,提示造模成功。这种耳聋模型的方法造成了单纯的毛细胞特别是外毛细胞损害,有利于药物的同期灌注,并且较以往的耳聋模型对耳蜗的损害轻,但是造成毛细胞损害的机理尚不明确,可能和膜迷路的压力增加有关。通过耳蜗侧壁打孔经中阶入路灌注注射用水或病毒液可以引起以外毛细胞为主的损失,同时这种损害的程度与灌注液体的成分似乎没有直接的影响,从而获得了一个较为单纯的以外毛细胞损伤为主的耳聋模型。这个模型不仅具有仅造成基底膜单一细胞损害的优点外,还为中阶内淋巴药物灌注建立了临时通路[43]。

4.2　2 型糖尿病导致听力损失模型

有研究表明糖尿病(diabetes, DM)与听力损失存在相关性,当人体血糖浓度较高时,缝隙连接系统会受到破坏,连接蛋白减少,进而导致听力损失。DM 患者的听力下降率是非 DM 患者的两倍,而前DM 患者的听力下降率则高出 30%。听力下降是否与 DM 的血糖控制仍有待确定[44]。栾峰等[45]选用60 只 ABR 测试正常的雄性 Wistra 大鼠,体重 160 ~ 200 g,其中 40 只实验组通过喂食高脂高糖饲料两个月,对照组 20 只喂食普通饲料。两月后全部禁食不禁水 12 h,对照组按 30 mg/kg 腹腔注射枸橼酸缓冲液;实验组按 30 mg/kg 腹腔注射 10 mg/L 小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)溶液。于第 9 周末取全部大鼠尾静脉全血,测空腹血糖 > 7.8 mmol/L 为 2 型 DM 模型成功。检测模型成功后第 1、2、3、4、5 月的空腹血糖以及 ABR 测试,刺激声为 CLINK 短声,刺激频率每秒 21.1 次,带通滤宽为 100 ~ 3000 Hz,最大声刺激强度为 60 dB,以能分辨出 ABR 的Ⅱ波波形的最低刺激强度作为 ABR 的反应阈值来提示造模成功。此造模方式对研究以 DM 为基础导致的听力损失的作用机制具有重要意义,并且具有造模方式成熟稳定,操作简单等优点,但是相对而言,DM 患者地血糖变化往往具有进行性,本造模方法不能完整的模拟患者血糖逐渐升高导致的进行性听力损伤,且造模时间较长[46]。

5　结语

以上对听力损失造模的实验性研究证实了听力损失的致病原因复杂,因此造模方式多样,优缺点各异。药物性听力损失大多采用腹腔注射,肌内注射以及中耳滴注等操作,简便易懂,创伤小,感染风险低,技术成熟,对各种药物毒性具有参考价值,但很难完全模拟耳毒性药物的进行性损害[47]。物理性听力损失造模方法为模拟外伤、外界刺激等外源性听力损失提供了良好的方法,可用于单纯性听力损失的研究,并且对继发于其他外源性疾病导致的听力损失也具有借鉴意义,但操作难度相对较大,感染、死亡风险高,且具有不确定的社会属性等相关干扰因素[48-49]。基因敲除及其他基因改造技术的造模成功率高,对听力损失彻底,但机制研究尚且较为表浅,听力损失大多不可逆,成模及治疗难度高,有待深入挖掘与研究[50]。此外,还有一些新颖的造模方式为听力损失的模型建立提供新的思路,其成功率及应用价值仍有待考究,需要通过反复实验,确定最佳造模条件,时间等重要因素,因此在未来,需要研究人员进一步重视能够模拟听力损失的发病机制及过程,协同基因,药物,环境等因素的模型,为更好的研究和防治听力损失提供基础。

参　考　文　献(References)

[1] 王敬鑫, 艾丽梅, 李晓玥, 等. 中国普通人群听力损失定义及流行特征 [J]. 中国预防医学杂志, 2023, 24(6): 594-601.
WANG J X, AI L M, LI X Y, et al. A systematic review of the definition and epidemiological characteristics of hearing loss in Chinese general population [J]. Chin Prev Med, 2023, 24(6): 594-601.

[2] GACEK R R. On the nature of hearing loss in méniere's disease [J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2021, 83(3): 144-150.

[3] BLAZER D G, TUCCI D L. Hearing loss and psychiatric disorders: a review [J]. Psychol Med, 2019, 49(6): 891-897.

[4] TEIXEIRA L S, SILVA I B O, SAMPAIO A L L, et al. Hearing loss in acromegaly: A review [J]. Int Arch Otorhinolaryngol, 2018, 22(3): 313-316.

[5] WONG H C, ZHANG Q, BEIRL A J, et al. Synaptic mitochondria regulate hair-cell synapse size and function [J]. eLife, 2019, 14(8): e48914.

[6] 陈阳. 氨基糖甙类抗生素治疗耳毒性研究 [J]. 中国实用医药, 2019, 14(15): 192-193.
CHEN Y. Study on aminoglycoside antibiotics for ototoxicity [J]. China Pract Med, 2019, 14(15): 192-193.

[7] 孙丽芳. 靶向外毛细胞 Prestin 的 PLGA 纳米粒拮抗急性听力损失的作用研究 [D]. 广州: 广东药科大学; 2021.
SUN L F. Protective effect of PLGA nanoparticles targeting prestin of outer hair cells against acute hearing loss [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University; 2021.

[8] 崔静文, 胡慧. 艾灸对庆大霉素致听力损伤豚鼠模型的干预效应及其作用机制 [J]. 环球中医药, 2022, 15(11): 2038-2045.
CUI J W, HU H. Effect and mechanism of moxibustion on gentamicin-induced hearing loss in guinea pig model [J]. Glob Tradit Chin Med, 2022, 15(11): 2038-2045.

[9] YU Y, CAO L, GUAN N, et al. Acupuncture attenuates ototoxicity induced by gentamicin in mice [J]. Altern Ther Health Med, 2022, 28(2): 78-83.

[10] BANAKIS HARTL R M, GREENE N T, BENICHOUX V, et al. Establishing an animal model of single-sided deafness in Chinchilla lanigera [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2019, 161(6): 1004-1011.

[11] HARYUNA T S, PURBA A H, FARHAT F, et al. The antiapoptotic effect of curcumin in the fibroblast of the cochlea in an ototoxic rat model[J]. Iran J Otorhinolaryngol, 2018, 30(100): 247-253.

[12] ZHANG X, TRENDOWSKI M R, WILKINSON E, et al. Pharmacogenomics of cisplatin-induced neurotoxicities: Hearing loss, tinnitus, and peripheral sensory neuropathy [J]. Cancer Med, 2022, 11(14): 2801-2816.

[13] 胡鹏刚, 田克勇, 毛小波, 等. 顺铂耳毒性大鼠耳聋模型的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(23): 4412-4416.
HU P G, TIAN K Y, MAO X B, et al. A study on cisplatin-induced hearing loss in a rat model [J]. Prog Mod Biomed, 2021, 21(23): 4412-4416.

[14] FERNANDEZ K, WAFA T, FITZGERALD T S, et al. An optimized, clinically relevant mouse model of cisplatin-induced ototoxicity [J]. Hear Res, 2019, 375: 66-74.

[15] LI C, SHI S. Neuroprotective effect of huperzine A on d-galactose-induced hearing dysfunction [J]. Ear Nose Throat J, 2021, 100(3): 269S-276S.

[16] PENG Z, ZHAO C, YANG Z, et al. D-galactose-induced mitochondrial oxidative damage and apoptosis in the cochlear stria vascularis of mice [J]. BMC Mol Cell Biol, 2023, 24(1): 27.

[17] 帅常娟, 刘淑云, 姚宇, 等. 电针耳穴通过 SIRT1/PGC-1α 途径延缓 D-半乳糖致衰老豚鼠听皮层老化 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2018, 26(2): 167-171.
SHUAI C J, LIU S Y, YAO Y, et al. Effect of electroacupuncture at Tinggong and Yifeng on D-galactose-induced aging of auditory cortex through SIRT1/PGC-1α pathway in guinea pigs [J]. J Audiol Speech Pathol, 2018, 26(2): 167-171.

[18] 董玉梅, 洪玉, 汪朦, 等. 快速建立 CBA 小鼠急性耳毒性模型的研究 [J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2018, 36(2): 234-237.
DONG Y M, HONG Y, WANG M, et al. Rapid establishment of acute ototoxicity model in CBA mice [J]. J Shihezi Univ (Nat Sci), 2018, 36(2): 234-237.

[19] BAKO P, GERLINGER I, WOLPERT S, et al. The ototoxic effect of locally applied kanamycin and furosemide in guinea pigs [J]. J Neurosci Methods, 2022, 372: 109527.

[20] LI W, ZHANG Y, XU J, et al. Fasudil prevents neomycin-induced hair cell damage by inhibiting autophagy through the miR-489/NDP52 signaling pathway in HEI-OC1 cells [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(1): 43.

[21] CUTRI R M, LIN J, NGUYEN N V, et al. Neomycin-induced deafness in neonatal mice [J]. J Neurosci Methods, 2023, 391: 109852.

[22] ALDÈ M, BINDA S, PRIMACHE V, et al. Congenital cytomegalovirus and hearing loss: the state of the art [J]. J Clin Med, 2023, 12(13): 4465.

[23] CARRARO M, ALMISHAAL A, HILLAS E, et al. Cytomegalovirus (CMV) infection causes degeneration of cochlear vasculature and hearing loss in a mouse model [J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2017, 18(2): 263-273.

[24] LAZARINI F, KATSIMPARDI L, LEVIVIEN S, et al. Congenital cytomegalovirus infection alters olfaction before hearing deterioration in mice [J]. J Neurosci, 2018, 38(49): 10424-10437.

[25] LU J, SONG Q, ZHU Y, et al. The effect of acupuncture used for cervical spondylosis of vertebral artery type: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. Medicine, 2022, 101(8): e28956.

[26] 王鑫, 李艾琳, 闫绍妹, 等. 平衡针刀联合温针灸治疗椎动脉型颈椎病的疗效观察 [J]. 针刺研究, 2022, 47(7): 625-629.
WANG X, LI A L, YAN S M, et al. Effect of balance acupotomy combined with warm needling in treatment of cervical spondylosis of vertebral artery type [J]. Acupunct Res, 2022, 47(7): 625-629.

[27] 周翔, 何嘉莹, 高婷, 等. "平衡复位正骨推拿法" 对兔颈源性突发性耳聋模型血流速度及听性脑干反应的影响 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(3): 412-414, 463.
ZHOU X, HE J Y, GAO T, et al. Effect of bone-setting manipulation on blood flow velocity and auditory brainstem responses of cervicogenic sudden hearing loss model rabbits [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2017, 26(3): 412-414, 463.

[28] 王华, 刘超, 苏钰, 等. DPOAE 在噪声性听力损失诊断评估中的应用研究进展 [J]. 中华耳科学杂志, 2023, 21(1): 110-114.
WANG H, LIU C, SU Y, et al. Research progress on application of DPOAEs in the diagnosis and evaluation of noise-induced hearing loss [J]. Chin J Otol, 2023, 21(1): 110-114.

[29] 崔钟丹, 吴菁, 唐佳, 等. 噪声所致听力损失现象的物种差异及可能生理机制研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(4): 407-422.
CUI Z D, WU J, TANG J, et al. Research progress in species differences and underlying physiological mechanism of noise-induced hearing loss [J]. Prog Biochem Biophys, 2021, 48(4): 407-422.

[30] XU F L, CHENG Y, YAN W. Up-regulation of autophagy and apoptosis of cochlear hair cells in mouse models for deafness [J].

Arch Med Sci, 2018, 17(2): 535-541.

[31] LIU L M, LIANG C, CHEN J, et al. Cx26 heterozygous mutations cause hyperacusis-like hearing oversensitivity and increase susceptibility to noise [J]. Sci Adv, 2023, 9(6): eadf4144.

[32] 贾占伟, 何强, 张玉波, 等. 前列地尔联合针刺对噪音性耳聋大鼠耳蜗毛细胞血管内皮生长因子、Bcl-2 及 Bax 表达的影响 [J]. 川北医学院学报, 2018, 33(3): 388-391.

JIA Z W, HE Q, ZHANG Y B, et al. Effect of acupuncture combined with Alprostadil injection on the expression of VEGF, Bcl-2 and Bax in the cochlear hair cells of rats with noise induced deafness [J]. J N Sichuan Med Coll, 2018, 33(3): 388-391.

[33] LE PRELL C G, HAMMILL T L, MURPHY W J. Noise-induced hearing loss: Translating risk from animal models to real-world environments [J]. J Acoust Soc Am, 2019, 146(5): 3646.

[34] 胡莹. 泻火化瘀通窍法对耳蜗 IRI 模型大鼠 Caspase-9/6 及 Bax/Bcl-2 影响的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2016.

HU Y. An experimental study on the effect of fire clearing and stasis clearing on cochlear IRI model rats Caspase-9/6 and Bax/Bcl-2 [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2016.

[35] 吴琳, 吴芳, 刘娅楠, 等. 大鼠脑缺血再灌注模型制作流程详述及经验总结 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(3): 62-65.

WU L, WU F, LIU Y N, et al. Detailed process and experiences of cerebral ischemia-reperfusion model in rats [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(3): 62-65.

[36] VAN ESCH B, VAN DER ZAAG-LOONEN H, BRUINTJES T, et al. Betahistine in ménière's disease or syndrome: a systematic review [J]. Audiol Neurootol, 2022, 27(1): 1-33.

[37] WANG C, LI Y, JIANG W, et al. cAMP-Epac1 signaling is activated in DDAVP-induced endolymphatic Hydrops of guinea pigs [J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2023, 89(3): 469-476.

[38] 王娜, 李旻, 王静, 等. 大鼠膜迷路积水模型的建立及评定 [J]. 中华耳科学杂志, 2021, 19(1): 97-100.

WANG N, LI M, WANG J, et al. Establishment and evaluation of A rat model of membranous labyrinthine hydrops [J]. Chin J Otol, 2021, 19(1): 97-100.

[39] 李霄飞. Spag6 基因敲除对小鼠内耳和中耳的影响及相关机制研究 [D]. 济南: 山东大学; 2015.

LI X F. The effects of deletion of Spag6 gene on the inner and middle ear of mouse and the possible mechanisms underlying such actions [D]. Jinan: Shandong University; 2015.

[40] 曾华沙. 利用 CRISPR/Cas9 技术建立 OSBPL2 基因敲除耳聋巴马小型猪模型 [D]. 南京: 南京医科大学; 2018.

ZENG H S. Establishment of OSBPL2-knockout bama miniature pig phenotyping with hearing loss via CRISPR/Cas9 method [D]. Nanjing: Nanjing Medical University; 2018.

[41] 曾华沙, 姚俊, 王红顺, 等. 人/猪 OSBPL2 同源性比较及猪 PFFs 靶基因敲除细胞系的建立 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(2): 149-154.

ZENG H S, YAO J, WANG H S, et al. Homology comparison between human and pig OSBPL2 and establishment of pig PFFs with target gene knockout [J]. Acta Univ Med Nanjing (Nat Sci), 2018, 38(2): 149-154.

[42] 庄文杰, 丛宁, 韩朝. 一种单纯毛细胞缺失豚鼠耳聋模型的建立 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2021, 29(2): 81-84, 95.

ZHUANG W J, CONG N, HAN Z. A new deafness model with only hair cells loss in guinea pigs [J]. Chin J Otorhinolaryngol Integr Med, 2021, 29(2): 81-84, 95.

[43] 王凯, 罗琳, 何志洲. 听神经病的分子机制 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 54(2): 149-156.

WANG K, LUO L, HE Z Z. The molecular mechanisms underpinning auditory neuropathy [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2019, 54(2): 149-156.

[44] SAMOCHA-BONET D, WU B, RYUGO D K. Diabetes mellitus and hearing loss: a review [J]. Ageing Res Rev, 2021, 71: 101423.

[45] 栾峰, 张燕, 陈旭真, 等. 缝隙连接蛋白 26 和 30 在大鼠 2 型糖尿病性耳聋模型中的表达 [J]. 解剖学报, 2022, 53(1): 108-113.

LUAN F, ZHANG Y, CHEN X Z, et al. Expression of connexin 26 and 30 in cochlea in a rat model of type 2 diabetes [J]. Acta Anat Sin, 2022, 53(1): 108-113.

[46] ELANGOVAN S, SPANKOVICH C. Diabetes and auditory-vestibular pathology [J]. Semin Hear, 2019, 40(4): 292-299.

[47] HORVATH L, BÄCHINGER D, HONEGGER T, et al. Functional and morphological analysis of different aminoglycoside treatment regimens inducing hearing loss in mice [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(2): 1123-1130.

[48] 赵超越, 杨金源, 王伟倩, 等. 隐性听力损失小鼠模型的噪声性聋易感性研究 [J]. 中华耳科学杂志, 2023, 21(3): 367-371.

ZHAO C Y, YANG J Y, WANG W Q, et al. Susceptibility to noise-induced hearing loss in a mouse model of hidden hearing loss [J]. Chin J Otol, 2023, 21(3): 367-371.

[49] VALENZUELA C V, LEE C, BUCHMAN C A, et al. A revised surgical approach to induce endolymphatic *Hydrops* in the guinea pig [J]. J Vis Exp, 2020, 160: 10379-10397.

[50] OMICHI R, SHIBATA S B, MORTON C C, et al. Gene therapy for hearing loss [J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(1): R65-R79.

[收稿日期] 2024-04-17