

• 继续教育园地 •

## 动物听觉诱发反应特点及测试技术(1)

鲁海涛<sup>1</sup> 李兴启<sup>2</sup>

DOI:10.3969/j.issn.1006-7299.2010.05.039

【中图分类号】 R764.04 【文献标识码】 A 【文章编号】 1006-7299(2010)05-0518-03

随着耳科基础研究尤其是分子生物学的不断深入和发展,当人类基因组计划完成后,功能基因的研究已提到议事日程,因而哺乳类动物的听功能检测技术迫切需要完善和充实,以满足科研工作需求。听觉诱发反应包括听觉诱发电位和耳声发射。在此着重叙述听性脑干反应(ABR),包括短声诱发 ABR(c-ABR)和电诱发的电位(E-ABR, E-PR, E-SVR)和耳蜗电图(ECochG)、耳声发射(OAE)的特点及检测技术。

### 1 豚鼠听性脑干反应

#### 1.1 动物准备

**1.1.1 品种选择** 因豚鼠的听力学特征与人类较接近,所以既往人们在做听觉生理实验时,多选用豚鼠。目前常用的豚鼠品种是英国种,又称荷兰猪,为1919年从日本引入中国东北,早期在民间饲养。目前国内大多数实验动物繁育单位饲养的豚鼠多为此品种,其特点是被毛短而光华,毛色有白、黑、棕、灰、淡黄、巧克力等单色,也有白与黑、白与棕、以及白、棕、黑三色花毛。应选择皮毛有光泽、活泼的豚鼠,因为体质较好的健康豚鼠才能耐受较长时间的实验观察和反复的实验。正常豚鼠肛温38.6℃,心率230~350次/分,呼吸次数100~150次/分。

**1.1.2 动物听力筛查** 耳廓反射测试:一手持动物,另一手将对侧耳廓盖住对其耳道,距测试耳10cm,用力吸唇,发出高频短声,声强相对较弱时,观察动物测试耳耳廓有无抖动。如有耳廓抖动,提示耳廓反射灵敏,可选做实验对象。体重选择:根据不同实验要求而异,通常在300~400g较好,体重过轻,耐受能力差,体重过重,生长时间长,可能听力差。

**1.1.3 麻醉药品** 常用麻醉药品有速眠新(0.3~0.8ml/kg)、10%水合氯醛(4~5ml/kg)等。豚鼠对麻醉药品的耐受个体差异较大,尤其是不同批次的动物,饲养的环境不同对其亦有影响。

#### 1.2 电极制作及放置位置

**1.2.1 针形电极** 常以三号绣花针做为记录电极,通过带鳄鱼夹的记录导线与放大器相连。将绣花针在两耳廓前缘连线的中点钉入颅骨(注意不要进入颅内),以手指轻轻碰触针鼻处,动物头与针一起运动,即证明电极深度到位。然后将鳄鱼夹夹在绣花针中部。

**1.2.2 针灸用针头** 15cm的针灸用长针头可用作地板和参考电极,地板常插入鼻尖,参考电极插入同侧或对侧耳垂,

视实验要求而定。

#### 1.3 刺激声选择(根据实验要求)

**1.3.1 短声(click)** 是时程为90~100μs的矩形或正弦直流电脉冲冲击耳机或扬声器发出的短声。短声的时间可短至数毫秒以内,其频谱范围很宽,能量主要集中在3~4kHz。短声的时间特性主要取决于耳机的瞬态响应特性,而不取决于脉冲的宽窄。

**1.3.2 短音(tone pip)** 为周期数固定、外包络呈菱形的一段准正弦波。短音具有上升/下降时间,但没有平台期或平台期很短(小于1个周期)。短音具有频率特异性,其频率特异性的好坏取决于其时程,时程长,频率特异性好,但瞬态性变差;时程短,频率特异性差,瞬态特性好。

**1.3.3 短纯音(tone burst)** 时程为数十至上百毫秒的纯音段。但临床常将时程超过200ms的短纯音定义为纯音。短纯音具有一定的上升/下降时间和平台期,上升/下降时间和平台期越长,短纯音频率特异性越好。

#### 1.4 给声方式

**1.4.1 扬声器或耳罩式耳机** 是将电能转换为声能并在空气中辐射到远处的电声换能器。不同的扬声器其频响特性不同,有的主要包括中、高频成分,用其测试低频音时就会影响测试结果的准确性。通常扬声器与实验动物耳之间有一定的距离,其发出的声音是在开放声场中传播,因此,其与测试耳的距离亦会影响测试结果,因此,在测试时要固定好扬声器离动物外耳道的距离。

**1.4.2 耳塞式耳机** 目前使用最多的耳塞式耳机有两种,美国Etymotic Research公司生产的ER-3A和美国Aearo公司生产的EARtone-3A。通常由四部分组成:肩挂式换能器、声管、乳头状转接头和一次性海绵耳塞插头,其优点是可降低环境噪声对测听结果的影响,双耳的耳间衰减可扩展到70~80dB,可减少测听过程中的掩蔽环节。

**1.4.2 刺激声校准** 声级计是声学测量的基本装置。目前较为通用的声级计有丹麦B&K公司生产的脉冲精密声级计,用于开放声场的校准,可以直接读出声压级(SPL)。将声级计的传感器头放置在耳机的正前方,二者之间的距离必须与测听时耳机和动物外耳道口距离相同。而对于插入式耳机,常用声学耦合器和仿真耳检测。

#### 1.5 ABR采集及记录方法

**1.5.1 仪器选择** 常用听力测试仪包括临床用电反应测听仪和实验室用TDT系统。①临床用电反应测听仪:因临床对人测试时高频常到8kHz截止,因此,其耳机的高频响应差。在测试8kHz以上频率时,测试结果失真。②TDT系

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院耳鼻喉科(武汉430022); 2 解放军总医院耳鼻喉研究所

统(Ⅲ):是 IHS 公司开发的专门用于实验室的多功能平台。其耳机响范围可到 1~50 kHz。

1.5.2 放大器增益选择 放大器增益范围在 30~100 k。

1.5.3 电信号采集带滤波范围 测试豚鼠 ABR 时带滤波范围是高通为 100 Hz,低通为 3 000 Hz。高通的截止频率太低,低频成分增多会使诱发的反应变的平坦,波峰不清晰,波形界限不清楚,肌电和自发脑电也可混在诱发反应中,使波 V 难以辨认,甚至使反应波的潜伏期延长。而当增加了低频滤波截止范围时,又会导致更多的反应高频的“锯齿”状波混杂在一起,波峰识别变得困难,波潜伏期减小。

1.5.4 声刺激间隔 比较高的刺激重复率(即刺激间隔较短)在一定的周期内得到大量反应的总和,但对改善波形的清晰度不利,将引起早期波形的消失,特别容易使波 V 的确切界限受到影响,因此,一般情况定为 10~20 次/秒。增加刺激重复率还会使潜伏期延长,如果做椎基底动脉供血不足实验,可增加到 30~50 次/秒。

1.5.5 平均叠加次数 采用平均叠加技术可以增加诱发放电信号振幅,降低自发反应的自发放电和来自机内外的噪声所引起的干扰信号,增加信噪比(SNR)。SNR 与叠加次数的数学关系为  $\sqrt{N} \times A/B$  (A 为信号, B 为噪声, N 为叠加次数),因而过分增加叠加次数会延长测试时间,但信噪比并不成倍提高。测试豚鼠常用的叠加次数是 1 024 次。

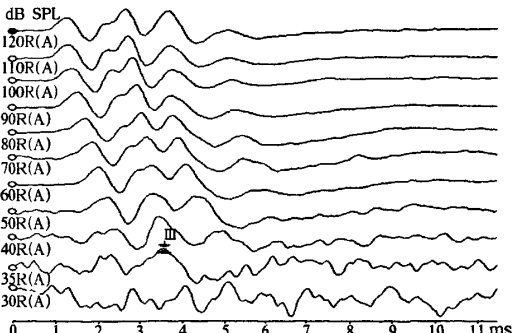


图 1 正常豚鼠各强度短声诱导 ABR 波形

1.6 豚鼠正常 ABR 波形及识别

1.6.1 豚鼠典型的 ABR 波形图形 常包括 5 个波形(图 1)。依次用罗马数字 I、II、III、IV、V 表示,IV、V 波往往融合。波 III 振幅较高,可达 6~7 μV。但随着刺激声强的降低,波 IV、V 消失,波 III 后出现一个较大的切迹,波 II 有时出现在波 III 的上升段,或引不出。

1.6.2 ABR 各波的出现率 在听力正常豚鼠,90 dB SPL 短声刺激时,ABR 波 I、III、IV 出现率为 100%,波 II 为 70%,但在低声强时,波 III 出现率最高(图 1)。

1.6.3 以 ABR 波 III 出现为判断 ABR 反应阈的标准 豚鼠的 ABR 波 III 出现最为稳定,振幅相对较高,因此常常以波 III 作为判断阈值的标准。阈值附近衰减档要求为 5 dB,且在记录时必须做出一条较阈值强度低 5 dB 的无电反应的曲线。

1.6.4 峰潜伏期测量 潜伏期的量取一般是从电脉冲冲击电声换能器时算起,至电位的起始点为真正的潜伏期;作为研究性的工作,则从声音到达鼓膜的时间算起。但电位的起始点很难确定,所以通常以各波的峰尖为电位的“起始”点,以此方法来量取的潜伏期为峰潜伏期。如果波峰不能重复时,则取两个峰的均值,如果波峰是宽的或平滑的,则用延长线的方法,取其波两侧斜线的交点。

1.7 短纯音或短音诱发 ABR 的特点

1.7.1 各频率(0.5、1、2、4、8、16、32 kHz)ABR 的波形特点(图 2) 因为 ABR 是给声反应,依赖于神经发放的同步化程度,所以上升时间短的刺激是理想的声刺激信号。用短声或用高频的短音都可以引出清晰的可识别的 ABR 波形,而且随着短音频率的增高波形的清晰度逐渐增加。但当用短音作为刺激时 ABR 的波 III 潜伏期与刺激音的频率呈反比,即频率高波 III 潜伏期短,而频率低时波 III 潜伏期较长。低频(0.5、1 kHz)的短音对 ABR 的形态和振幅影响较大,且这种信号引起的 ABR 振幅远远小于短声诱导的反应,反应各波波界分化不清,这与神经元群的同步程度有关。但在 4 kHz 短音刺激诱导时,ABR 波形分化清晰,容易判断反应阈值。

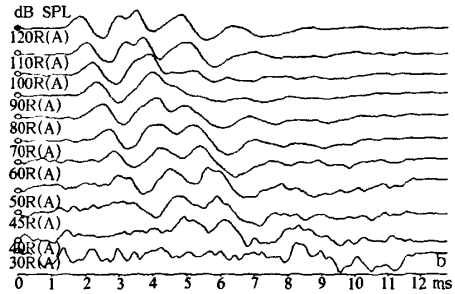
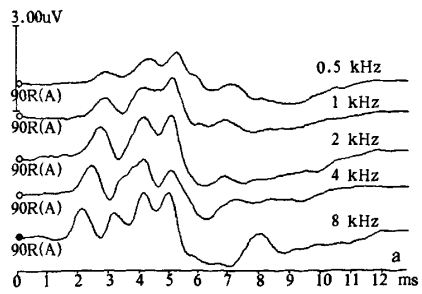


图 2 a 显示 90 dB SPL、时程为 3 ms 的 Blackman 包络各频率短音刺激时 ABR 波形图;b 显示 4 kHz、时程为 3 ms 的 Blackman 包络短音不同刺激强度时 ABR 波形

1.7.2 ABR 随频率变化的听反应曲线特点:在采用短音或短纯音刺激声时,ABR 阈值在低频时阈值较高,随频率的增加阈值逐渐降低,但 8 kHz 和 16 kHz 时阈值又升高(图 3)。

2 大鼠听性脑干反应

2.1 动物准备 大鼠性情温顺,行动迟缓,但抓取方法粗暴

时也很凶残,常咬人。嗅觉发达,味觉很差,食性较杂。喜居安静环境,夜间活跃。对外界刺激反映敏感。适应力较强,容易饲养。对维生素、氨基酸缺乏敏感。大鼠对空气的湿度耐受力较差。大鼠常由于其品系纯,遗传谱清晰,易于饲养而被选作实验对象。

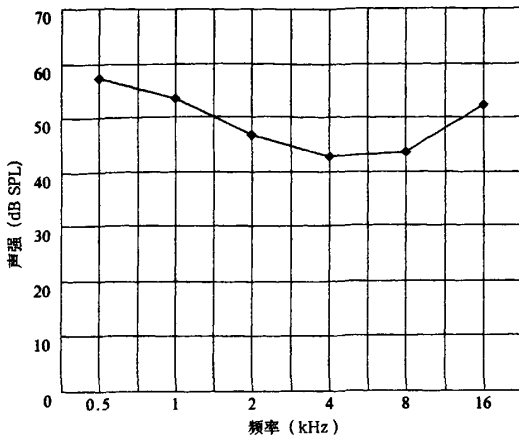


图3 豚鼠各频率 ABR 反应阈曲线

2.1.1 常用实验品种 大鼠品系封闭群 Wistar, Sprague-Dewley (SD)、Long Evans 常用近交系大鼠 ACI, F344, LEW, SHR, LOU/c 等。

2.1.2 常用生理值 正常大鼠肛温 39℃, 200~360 次/分, 呼吸次数 100~150 次/分。选作实验的大鼠体重通常为 180~250 g。

2.1.3 麻醉 速眠新(846)注射液 0.3~0.8 ml/kg, 10% 水合氯醛(3~5 ml/kg)等。大鼠对麻醉耐受较好, 麻醉药的安全界限相对较宽。

2.1.3 大鼠听力筛查 大鼠不存在耳廓反射, 不能把惊跳反射误认为耳廓反射。通常筛选动物时, 可检查外耳道是否有耵聍栓塞。

## 2.2 电极制作及放置位置

2.2.1 针形电极 常以三号绣花针做为记录电极。通过带鳄鱼夹持的记录导线与放大器相连。将绣花针在两耳廓前缘连线的中点打入颅骨(注意不要进入颅内), 以手指轻轻碰触针鼻处, 动物头与针一起运动, 即证明电极深度到位。然后将鳄鱼夹夹在绣花针中部。

2.2.2 针灸用针头 15 cm 长针灸用针头可用作地极和参考电极。地极常插入鼻尖。参考电极插入同侧或对侧耳垂, 视实验要求而定。

## 2.3 刺激声选择(根据实验要求)

2.3.1 短声(Click) 是时程为 90~100 μs 的矩形或正弦直流电脉冲冲击耳机或扬声器发出的短声。短声的时间可短至数毫秒以内, 其频谱范围很宽, 能量主要集中在 3~4 kHz。短声的时间特性主要取决于耳机的瞬态响应特性, 而不取决于脉冲的宽窄。

2.3.2 短音(tone pip) 为周期数固定, 外包络呈菱形的一段正弦波。短音具有上升/下降时间, 但没有平台期或平台期很短(小于 1 个周期)。短音具有频率特异性, 其频率特异性的好坏取决于其时程。时程长, 频率特异性好, 但瞬态性变差; 时程短, 频率特异性差, 瞬态特性好。

2.3.3 短纯音(tone burst) 时程为数十至上百毫秒的纯音段。但临床常将时程超过 200 ms 的定义为纯音。短纯音

具有一定的上升/下降时间和平台期。上升/下降时间和平台期越长, 短纯音频率特异性越好。

## 2.4 给声方式

2.4.1 扬声器或耳罩式耳机 是将电能转换为声能并在空气中辐射到远处的电声换能器。不同的扬声器其频响特性不同。有的主要包括中、高频成分, 用其测试低频音时就会影响测试结果的准确性。通常扬声器与实验动物耳之间有一定的距离, 其发出的声是在开放声场中传播, 因此, 其与测试耳的距离亦会影响测试结果。在测试时要固定好扬声器离动物外耳道距离。

2.4.2 耳塞式耳机 目前使用最多的有两种: 美国 Ety-motic Research 公司生产的 ER-3A 和美国 Aearo 公司生产的 EARTone-3A。通常由四部分组成: 肩挂式换能器、声管、乳头状转接头和一次性海绵耳塞插头。其优点是可降低环境噪声对测听结果的影响, 双耳的耳间衰减可扩展到 70~80 dB, 可减少测听过程中的掩蔽环节。

2.4.3 刺激声校准: 声级计是声学测量的基本装置。目前较为通用的声级计有丹麦 B&K 公司生产的脉冲精密声级计, 用于开放声场的校准, 可以直接读出声压级(SPL)。将声级计的传感器头放置在耳机的正前方, 二者之间的距离必须与测听时耳机和动物外耳道口距离相同。而对于插入式耳机, 常用声学耦合器和仿真耳检测。

## 2.5 ABR 采集及记录方法

2.5.1 仪器选择 常用听力测试仪包括临床用电反应测听仪和实验室用 TDT 系统。①临床用电反应测听仪: 因临床对人测试时高频常到 8kHz 截止。因此, 其耳机的高频响应差。在测试 8kHz 以上频率时, 测试结果失真。②TDT 系统(Ⅲ): 是 IHS 公司开发的专门用于实验室的多功能平台。其耳机频响范围可到 1~50 kHz。

2.5.2 放大器增益选择 放大器增益范围在 30~100 k。

2.5.3 电信号采集带通滤波范围 测试大鼠 ABR 时带通滤波范围在 100~3 000 Hz, 进行较高频带的滤波, 低频成分增多会使诱发的反应变的平坦, 波峰不清晰, 波形界限不清楚, 甚至使反应波的潜伏期延长。而当增加了低频滤波截止范围时, 又会导致更多的诱发反应成分混杂在一起, 波峰识别变的困难, 波潜伏期减小。当截止频率低于 100 Hz 时, 肌电和自发脑电也可混在诱发反应中; 超过 100 Hz 时, 又会使记录的反应中慢的成分失真。特别使波 V 的负波失真, 使波 V 难以辨认。

2.5.4 声刺激间隔 比较高的刺激重复率(即刺激间隔较短)在一定的周期内得到大量反应的总和, 但对改善波形的清晰度不利, 重复率越高, 将引起早期波形的消失, 特别容易使波 V 的确切界限受到影响, 一般情况 10~20 次/秒。增加刺激重复率还会使潜伏期延长。如果做椎基底动脉供血不足实验, 可增加到 30~50 次/秒。

(待续)

(2009-11-11 收稿)

(本文编辑 李翠娥)